# Die Funktion des Insulinrezeptorsubstratproteins von 53 kDa für Dendriten und Synapsen in der Maus (*Mus musculus*, Linné 1758)

## Dissertation

## zur Erlangung des Doktorgrades im Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg



vorgelegt von

Kerstin Berhörster

Hamburg 2006

Genehmigt vom Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. H.-J. KREIENKAMP Weiterer Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. K. WIESE Tag der Disputation: 13. Oktober 2006

Hamburg, den 31. September 2006



Professor Dr. Reinhard Lieberei Leiter des Departments Biologie

INHALTSVERZEICHNIS	Ι
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Bakterienstämme und Zelllinien	16
2.1.3. Ausgangsvektoren	16
2.1.4 Oligonukleotide	16
2.1.5. Antikörper	17
2.2 Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	19
2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	20
2.2.4 Restriktionsverdau von DNA	20
2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten	20
2.2.6 Herstellung kompetenter Bakterien	21
2.2.7 Transformation kompetenter Bakterien	21
2.2.8 Minipräparation von Plasmid-DNA (TELT-Lyse)	22
2.2.9 Midipräparation von Plasmid-DNA	22
2.2.10 DNA-Sequenzierung	23
2.2.11 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien (SB)	23
2.3 Biochemische Methoden	24
2.3.1 Proteinbestimmung	24
2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.3.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	25
2.3.4 Western-Blot Analysen	25
2.3.5 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen	26
2.3.6 Kopplung von Proteinen und Peptiden an NHS-Sepharose	27
2.3.7 Aufreinigung polyklonaler Antikörper-Seren	27

2.3.8 Immunpräzipitation aus transfizierten HEK293-Zellen	28
2.3.9 Affinitätspräzipitation mit Peptiden	28
2.3.10 Herstellung eines Proteinlysats aus dem Gehirn der Maus	29
2.3.11 Präparation der postsynaptischen Dichte aus dem Gehirn der Maus	29
2.4 Zellbiologische Methoden	30
2.4.1 Kultivierung von HEK293-Zellen	30
2.4.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	31
2.4.3 Kultivierung primärer Hippokampusneurone	31
2.4.4 Transfektion primärer Hippokampusneurone	33
2.4.5 Immuncytochemie primärer Hippokampusneurone	33
2.4.6 Herstellung einer homozygoten IRSp53 knock out-Maus durch die	
Gene-Trap Mutagenese	34
2.4.7 Perfusion von Mäusen	34
2.4.8 Kryokonservierung perfundierter Mausgewebe	35
2.4.9 β-Galaktosidase-Färbung von Gewebeschnitten	35
2.4.10 Immunhistochemie	36
2.4.11 Hematoxylin-Färbung von Gewebeschnitten	36
2.4.12 Mikroskopische Arbeitstechniken	37
2.4.13 Elektronenmikroskopie	37
Ergebnisse	38
3.1 Analyse der Funktion von IRSp53.1 in primären, kultivierten	
Hippokampusneuronen der Ratte	38
3.1.1. Effekte der Überexpression verschiedener IRSp53-Expressionskonstrukte	>
auf die Morphologie von Hippokampusneuronen	38
3.1.2. Effekte der Überexpression verschiedener IRSp53-Expressionskonstrukte	>
auf die Morphologie der dendritischen Dornen von	
Hippokampusneuronen	41
3.1.3. Effekt der Überexpression von IRSp53.1 auf die Bildung von PSD-95-	
Clustern	43
3.2 Untersuchungen zur Regulation der Shank/IRSp53-Interaktion	46
3.2.1. Einfluss der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren PIX, Kalirin-7 und	
Intersectin auf die Interaktion von IRSp53 und Shank in HEK293-Zellen	46
3.3 Herstellung einer IRSp53 knock out-Maus	48

3.

3.3.1 Die Gene-Trap Mutagenese als Methode der Wahl zur Erzeugung einer	
IRSp53-defizienten Maus	48
3.3.2 Genotypisierung der Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäuse	51
3.3.3 Nachweis der IRSp53-Defizienz homozygoter Mäuse auf Proteinebene	52
3.3.4 Nachweis der Expression des Gene-Trap Fusionsproteins in	
verschiedenen Geweben homozygoter IRSp53 knock out-Mäuse	53
3.3.5 Biochemischer Nachweis der Expression von IRSp53 in verschiedenen	
Geweben der Wildtyp-Maus	56
3.4. Anatomische Untersuchungen der IRSp53-defizienten Gehirne	57
3.5 Untersuchungen zur Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte im	
Gehirn von Wildtyp- und homozygoten IRSp53 knock out-Mäusen	58
3.5.1 Vergleich der Proteinzusammensetzung der PSD von Wildtyp- und	
IRSp53 knock out-Gehirnen mit Hilfe des Coomassie-gefärbten Gels	58
3.5.2 Vergleich des Proteingehalts bestimmter postsynaptischer Proteine in der	
PSD der Wildtyp- und der homozygoten IRSp53 knock out-Gehirne mit	
Hilfe des Western-Blots	60
3.6 Untersuchung der Funktion von IRSp53 mittels primärer, kultivierter	
Hippokampusneurone der IRSp53 knock out-Mäuse	67
3.6.1 Effekte der IRSp53-Defizienz auf die Morphologie primärer, kultivierter	
Hippokampusneurone der Maus	67
3.6.2 Effekte der Überexpression von IRSp53 auf die Morphologie	
homozygoter IRSp53 knock out-Neurone	69
3.6.3. Vergleich der Bildung von PSD-95-Clustern in homozygoten IRSp53	
knock out- und Wildtyp-Neuronen	73
4. Diskussion	76
5. Zusammenfassung	90
6. Literaturverzeichnis	91
7. Anhang	102
Publikationen	

Danksagung

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abi-1	Abl Interactor 1
Abp1	actin binding protein
AG	Arbeitsgruppe
AP-2	Adaptorprotein 2
Ara-C	Cytosine $\beta$ -D-arabino-Furanoside Hydrochoride
AMPA	amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
AS	Aminosäuren
ATCC	American Type Culture Collection
BAIAP2	brainspecific angiogenesis inhibitor associated protein 2
Bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
CaMKII	Calcium/Calmodulin dependent protein kinase II
°C	Grad Celsius
C-	Carboxy-
ca.	circa
Cdc42	cell division cycle 42
CH	calponin homology domain
Cluster	engl. Aggregation, Zusammenballung
	Cortactin-binaing protein
	Cac42/Rac1 interacting binaing
DNA	aesoxyribo-nucieic acia Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRPLA	Dentatorubrale-Pallidolysiane Atrophie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK1/2	extracellular regulated kinase1/2
F-Aktin	filamentöses Aktin
GAP	GTPase activating factor
GEF	guanine-nucleotide exchange factor
gER	glattes endoplasmatisches Retikulum
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
GK	guanvlate kinase
GKAP	guanylate-kinase associated protein
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guaninnukleotid-Triphosphat
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEK	human embryonic kidney
HIP55	hematopoietic progenitor kinase 1(HPK1)-interacting protein of 55 kDa
HRP	horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IMD	IRS/MIM homology domain
IP <sub>2</sub> R	Inositol-1 4 5 Trisphosphat-Rezentor
IPTG	Isopropylindolyl-thiogalactosid

IRS-1	insulin receptor substrate-1
IRSp53	insulin receptor substrate of 53 kDa
kB	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
ko	knock out
LIM-K	Lin-11, Isl-1, and Mec-3 kinase
MAGUK	membrane associated guanylate kinase
MALS	mammalian Lin-7 homologue
MAP2	microtubule associated protein
MEM	Minimum Essential Medium
Mena	mammalian enabled
mGlu-R	metabotroper Glutamat-Rezeptor
NHS	N-Hydroxy-Succinimidyl
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPF	nucleation promoting factor
NR1	NMDA-Rezeptor-Untereinheit 1
NR2A	NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2A
NR2B	NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2B
N-WASP	neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
P1	postnataler Tag 1
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
РАК	p21-activated kinase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDZ	PDS-95/Dlg/ZO-1
pН	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Protonen-Konzentration
РКС	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	postsynaptische Dichte
PSD-95	PSD protein of 95 kDa
Rac1	Ras-related C3 botuminum toxin substrate 1
Rap1	ras related protein 1
RhoA	Ras homologous member A
RNA	ribo nucleic acid
RT	Raumtemperatur
SAM	sterile alpha motif
SAPAP	synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH3	Src homology 3
Shank	SH3 domain and ankyrin repeat containing protein
SSTRIP	Somatostatin-receptor-interacting protein
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N'N,N'-Tetramethylethylendiamin

Tiv	Tage in vitro
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat
U	Einheit für enzymatische Aktivität
UV	Ultraviolett
Upm	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumen pro Volumen
WAVE2	Wiskott-Aldrich syndrome protein family Verprolin-homologous protein
(w/v)	Gewicht pro Volumen
XGal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
ZMNH	Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg

## 1. Einleitung

Das Gehirn stellt das zentrale Organ aller Wirbeltiere dar und steuert sämtliche Körperfunktionen. Es kontrolliert die Koordinierung des Bewegungsapparates und ermöglicht Sinneswahrnehmungen sowie Vorgänge des Erinnerns und Lernens. Anatomisch wird das Gehirn in drei Hauptstrukturen unterteilt, das Großhirn, das Kleinhirn (Cerebellum) und den Hirnstamm.

Die äußere Schicht des Großhirns wird als Cortex cerebri bezeichnet. Sie besteht aus einer 2-5 mm dicken, dicht gepackten Schicht von Neuronen und unterstützenden Gliazellen. Der Cortex cerebri bedeckt die tiefer in der Großhirnhemisphäre liegende weiße Substanz, die hauptsächlich aus langen, von Myelin umgebenen Axonen besteht. Die Aufgabe des Cortex cerebri liegt in der Koordination von Informationen aus vielen Quellen, um die kognitiven Funktionen, also alle Aspekte des Empfindens, des Denkens und Erinnerns aufrechtzuerhalten. Der Hippokampus gehört zum limbischen System und ist für die Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis wichtig. Menschen, bei denen der Hippokampus zerstört ist, können keine neuen Erinnerungen formen, alte Erinnerungen bleiben aber meist erhalten. Der Hippokampus generiert demnach die Erinnerung, während die Gedächtnisinhalte in verschiedenen anderen Stellen des Cortex cerebri gespeichert werden. Caudate und Putamen bilden zwei der drei Basalganglien, knotenförmige Gebilde, in denen die Zellkörper von Neuronen angehäuft sind. Aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit werden diese Neuronen-Cluster oft als Corpus striatum zusammengefasst. Sie sind an der Steuerung der Bewegungsabläufe sowie der sensomotorischen Integration beteiligt und befinden sich tief in der weißen Substanz unterhalb des Cortex cerebri.

Das Cerebellum ist verantwortlich für die motorische Koordination, Körperhaltung und das Gleichgewicht. Beim Menschen umfasst es eine walnussgroße Struktur an der Schädelbasis. Der Hirnstamm lokalisiert ebenfalls an der Schädelbasis und sorgt für die Steuerung von Atmung, Schlaf und Kreislauf (http://de.brainexplorer.org).

Die häufigsten im Gehirn vorkommenden Zelltypen sind Neurone und Gliazellen, wobei die Anzahl der Gliazellen die der Neurone um das 10-50-fache übersteigt. Gliazellen dienen zum einem als Stützgerüst der Neurone sowie als Leitstrukturen in der frühen Hirnentwicklung der Vertebraten, zum anderen üben sie viele nicht strukturelle Funktionen aus. Die Astroglia machen den mehrheitlichen Zelltyp der Gliazellen im zentralen Nervensystem des Säugerhirns aus. Durch die Aufnahme von Kalium-Ionen und Neurotransmittern regulieren sie die externe chemische Umgebung der Neurone. Die Oligodendrozyten, ein weiterer Gliazelltyp gewährleisten die elektrische Isolation der Neurone untereinander, indem sie diese mit Myelin ummanteln.

Die Neurone besitzen die Fähigkeit elektrische Signale zu erzeugen, weiterzuleiten und als neuronale Information zu speichern, was sie zu einem der wichtigsten Bestandteile des Nervensystems macht. Ihre Morphologie ist auf die Reizleitung spezialisiert und wird aus dem Zellkörper, den Dendriten und einem Axon mit den terminalen Axonendigungen gebildet. Das Dendritennetzwerk ist hauptsächlich für die Verarbeitung der ankommenden elektrischen Impulse zuständig, während das Axon die elektrische Information in Form eines Aktionspotentials an andere Zellen weiterleitet. Beim Menschen kann es dabei eine Länge von bis zu einem Meter erreichen. Die Ausbildung der polarisierten Morphologie von Dendritennetzwerk und Axon ist ein essentieller Schritt bei der Differenzierung der Neurone und resultiert aus Veränderungen des F-Aktin-Cytoskeletts. So konnten Bradke et al. (1999) zeigen, dass die Destabilisierung der Aktinfilamente ausreicht um die Bildung von Axonen zu induzieren. Die neuronale Polarität wird durch intrazelluläre Signalmoleküle wie z. B. den kleinen GTPasen der Rho-Familie beeinflusst. Die Überexpression der Rho-GTPase Cdc42 (cell division cycle 42) führt zu einem Auswachsen von Neuriten und zu Veränderungen der Aktin-Lokalisation in den Wachstumskegeln der Neurone (Brown et al. 2000). Erste Hinweise, welches der auswachsenden Neuriten dazu bestimmt ist zu einem Axon zu differenzieren gab die kleine GTPase Rap1B (RAS related protein 1B). Seine Konzentration in der Spitze eines Neuriten bestimmt die Entwicklung dieses Neuriten zu einem Axon. Dabei agiert Rap1B upstream von Cdc42 und des Par-Proteinkomplexes (Par3, Par6, aPKC), der in verschiedenen Zelltypen die Ausbildung der neuronalen Zellpolarität determiniert (Schwamborn et al. 2004). Die Morphologie der Dendriten wird ebenfalls durch die kleinen Rho-GTPasen RhoA (Ras homologous member A), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) und Cdc42 reguliert. Die Überexpression von aktiviertem RhoA führt zu einem verminderten Wachstum des dendritischen Astes und die Überexpression von dominantnegativen Cdc42 sowie Rac1 resultiert in einer Reduktion der dendritischen Verzweigungen des Neurons. RhoA hemmt somit die Dendritenbildung während Cdc42 und Rac1 stimulierend auf diese wirken (Ahnert-Hilger et al. 2004, Hayashi et al. 2002). Eine normale Morphologie der Dendriten ist von großer Bedeutung, da einige mentale Krankheiten, wie z. B. das Down-Syndrom mit verkürzten und weniger stark verzweigten Dendriten in Verbindung gebracht werden (Takashima et al. 1981, Becker et al. 1986).

Die Kontaktaufnahme der terminalen Endigungen eines neuronalen Axons mit den Dendriten oder dem Zellkörper anderer Neurone erfolgt durch die Ausbildung von Synapsen. 90 % der exzitatorischen Synapsen im adulten Säugerhirn befinden sich auf morphologisch spezialisierten Ausstülpungen des Dendriten, den sogenannten dendritischen Dornen oder *spines*. Dendritische Dornen haben ein Volumen von ungefähr 0,01 bis 0,8 µm<sup>3</sup> und sind in ihrer Morphologie sehr variabel (Harris und Kater 1994, Harris et al. 1999). Aus diesem Grund werden sie in fünf verschiedene Formen eingeteilt: filopodienförmig, kurz-stummelförmig, kurz und dünn, pilzförmig sowie kelchförmig (Abb. 1.1).



Abb.1.1: Die Morphologie der dendritischen Dornen. A: Ein primäres hippokampales Neuron der Ratte wurde mit einem monoklonalen MAP2-Antikörper zur Darstellung der Dendriten angefärbt. B: Dendritenabschnitt eines mit GFP-transfizierten Neurons; man erkennt die darauf befindlichen dendritischen Dornen. C: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Morphologien der dendritischen Dornen (Lipman et al. 2004).

Die Morphologie der *spines* ist allerdings keinesfalls statisch sondern hochdynamisch, was durch mikroskopische *time-lapse*-Studien an lebenden Neuronenkulturen belegt wurde (Bonhoeffer und Yuste 2002). In sich entwickelnden jungen Neuronen ändert sich die Länge der filopodienförmigen *spines* in einem Zeitraum von Minuten, während die reiferen pilzförmigen *spines* eine geringere Motilität aufweisen (Dailey und Smith 1996, Ziv und Smith 1996, Fischer et al. 1998, Parnass et al. 2000). Die morphologischen Veränderungen der *spines* sind in der Polymerisation sowie Depolymerisation von Aktinfilamenten begründet und können entwicklungsspezifisch reguliert werden (Dunaevsky et al. 2003, 2001, Deng und Dunaevsky 2005). Tetanische Stimuli, die eine Langzeitpotenzierung (LTP) an den Synapsen induzieren, resultieren in einer Zunahme von filamentösem Aktin und in einer Vergrößerung sowie Neubildung der dendritischen *spines* (Maletic-Savatic et al. 1999, Engert und Bonhoeffer 1999 Okamoto et al. 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass die Langzeitpotenzierung hauptsächlich über dünne, bewegliche *spines* vermittelt wird. Die

stabileren, pilzförmigen *spines* zeigen dagegen eine erhöhte Menge an AMPA-Rezeptoren und bestärken dadurch die Aufrechterhaltung des synaptischen Kontakts. Die dünnen dendritischen Dornen können demnach die synaptische Plastizität ausführen, während die pilzförmigen *spines* für die Speicherung von Erinnerungen und Erlerntem verantwortlich sind (Matsuzaki et al. 2004, Kasai et al. 2003).

1

Voraussetzung für die synaptische Plastizität als auch die Speicherung von Erlerntem ist die Weiterleitung eines elektrischen Impulses über die Synapsen an andere Neurone. Der elektrische Impuls kann in Form eines Aktionspotentials über elektrische oder chemische Synapsen an die Dendriten des benachbarten Neurons weitergegeben werden. Die Übertragung des Aktionspotentials an elektrischen Synapsen erfolgt direkt, ohne zeitliche Verzögerung über Membranverbindungen, sogenannten gap junctions, die zwei benachbarte Zellmembranen miteinander verknüpfen. Bei der chemischen Synapse kommt es im Vergleich zu den gap junctions zu einer minimalen zeitlichen Verzögerung der Reizleitung, da hier der elektrische Impuls erst in einen chemischen umgewandelt wird (Nicholls et al. 2002). Die wesentlich häufiger vorkommende chemische Synapse besteht aus der axonalen Präsynapse mit den Neurotransmitter enthaltenden synaptischen Vesikeln, dem synaptischen Spalt von 20-30 nm Breite und der dendritischen Postsynapse. Wenn ein Aktionspotential die Präsynapse erreicht, führt dies zur exocytotischen Verschmelzung der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Zellmembran und damit zur Freisetzung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt. Die Neurotransmitter gelangen durch Diffusion zur postsynaptischen Membran und binden dort an spezifische Membranrezeptoren. Die Rezeptoren können als Ionenkanäle fungieren und die Interaktion mit den Neurotransmittern kann zur Öffnung des Kanals führen. Der dadurch veranlasste Ionenstrom verändert das Membranpotential der Postsynapse und überträgt den elektrischen Impuls des präsynaptischen Aktionspotentials (Alberts et al. 1997).

Bei den chemischen Synapsen im Nervensystem differenziert man zwischen inhibitorischen (hemmenden) und exzitatorischen (erregenden) Synapsen. Für die inhibitorischen Synapsen sind die Neurotransmitter Glycin und GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) charakteristisch. Sie binden an entsprechende Rezeptoren in der postsynaptischen Membran, was zu einem Chlorid-Einstrom und damit zur Hyperpolarisation der Postsynapse führen kann (Nicholls et al. 2002). Das periphere Membranprotein Gephyrin stellt dabei die Kernkomponente an der cytoplasmatischen Seite der inhibitorischen postsynaptischen Membran dar. Es bildet durch Selbstaggregation ein zweidimensionales, hexagonales Netzwerk aus und besitzt die Eigenschaft sowohl mit Komponenten des Cytoskeletts als auch mit den Glycin-Rezeptoren

zu interagieren. Aufgrund dieser Wechselwirkungen fungiert Gephyrin in der inhibitorischen Synapse als Brückenprotein und verankert die Membranrezeptoren mit dem Cytoskelett (Kneussel und Betz 2000, Fischer et al. 2000, Sola et al. 2004, Giesemann et al. 2003, Kirsch et al. 1991). Die meisten exzitatorischen Synapsen des Säugerhirns nutzen die Aminosäure Glutamat als Neurotransmitter. Durch die Bindung des Glutamats an die ionotropen NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)und AMPA  $(\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isooxalol-Propionsäure)-Rezeptoren kommt es zu einem Calcium- bzw. Natrium-Ionen-Einstrom, so dass die exzitatorische, postsynaptische Membran, im Gegensatz zur inhibitorischen, depolarisiert wird. Inhibitorische und exzitatorische Synapsen kontrollieren somit in antagonistischer Weise das Membranpotential. Die ionotropen AMPA- und NMDA-Rezeptoren sorgen durch die Öffnung von Kationenkanälen für eine schnelle Reizleitung, während die metabotropen Glutamatrezeptoren die neuronale Erregbarkeit in den exzitatorischen Synapsen indirekt beeinflussen. Sie aktivieren heterotrimere G-Proteine und nehmen Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration sogenannter second messenger (Nakanishi und Masu, 1994).

Bei exzitatorischen Synapsen, die auf dendritischen Dornen lokalisiert sind, befindet sich direkt unterhalb der glutamatergen Rezeptoren eine charakteristische elektronendichte Struktur von 20-40 nm Dicke, die sogenannte postsynaptische Dichte (PSD). Sie umfasst die bereits besprochenen Glutamatrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle, Gerüstproteine und Enzyme, die an Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind (Abb. 1.2, Sheng und Kim 2002, Kim und Sheng 2004, Kennedy et al. 2005). Fast alle Proteine der PSD werden bei der synaptischen Aktivität dynamisch beeinflusst. Dies geschieht über Protein-Modifikationen wie Phosphorylierung und Ubiquitinylierung, Degradation und lokaler Translation bestimmter Proteine sowie der Protein-Translokation in die Synapse hinein oder heraus (Steward et al. 2003, Ehlers et al. 2003, Inoue et al. 2003).

Eine wichtige Funktion bei der Vernetzung der einzelnen Komponenten der postsynaptischen Dichte kommt dem über 200 kDa großen Protein Shank zu. Die Shank-Proteinfamilie umfasst die drei untereinander hochkonservierten Mitglieder Shank1, 2 und 3\*.

Shank1 wird gehirnspezifisch exprimiert. Shank2 ist neben Neuronen und Gliazellen auch in der Leber, den Nieren und in endokrinen Zellen vertreten während Shank3 im Gehirn sowie einer Vielzahl verschiedener Gewebe nachgewiesen wurde. Alle Shank-Proteine besitzen

<sup>\*</sup>weitere in der Literatur benutzte Synonyme für Shank1-3:

SSTRIP (Somatostatin-receptor-interacting protein) (Zitzer et al. 1999), ProSAP1/2 (Proline-rich synapseassociated protein) (Boeckers et al. 1999), CortBP1 (Cortactin-binding protein 1) (Du et al. 1998), Synamon (Yao et al. 1999), Spank1-3 (Tobaben et al. 2000)

N-terminal eine Ankyrin-Domäne, anschließend eine SH3 (*src homology*)-Domäne, eine PDZ (PSD-95/*Discs large*/ZO-1)-Domäne, eine prolinreiche Region sowie eine C-terminale SAM (*sterile alpha motif*)-Domäne (Lim et al. 1999, Zitzer et al. 1999, Redecker et al. 2001).

Im Gehirn existiert Shank2 als Spleißvariante, die im Gegensatz zu Shank1 und Shank3 keine Ankyrin-Domäne beinhaltet (McWilliams et al. 2004). Die Diversität der Shank-Proteine wird zusätzlich durch die Expression verschiedener Spleißvarianten erhöht (Boeckers et al. 1999, Lim et al. 1999). Die erst kürzlich erfolgte Identifizierung einer synaptischen Zielsequenz am C-Terminus von Shank2/3 und im Gegensatz dazu am N-Terminus von Shank1 gibt erste Hinweise auf eine unterschiedliche Funktion der einzelnen Shank-Proteine innerhalb der Postsynapse (Sala et al. 2001, Böckers et al. 2005). Die SAM-Domäne am C-Terminus ermöglicht den Shank-Proteinen Homodimere zu bilden. Strukturanalysen zeigten, dass mehrere SAM-Domänen in der Form eines helikalen Strangs vorliegen. In Anwesenheit von Zink-Ionen lagern sich die einzelnen Stränge in paralleler sowie antiparalleler Orientierung Seite an Seite aneinander. Nach dem von Baron et al. (2006) vorgestellten Modell könnten diese Aggregate eine Plattform erzeugen, die eine ideale Ausgangsposition für die Konstruktion des PSD-Komplexes darstellt (Abb. 1.2). Zink-Ionen werden nach einem elektrischen Stimulus Calcium-abhängig aus den präsynaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt entlassen und können die Funktion postsynaptischer Rezeptoren modulieren oder in die Postsynapse eindringen (Fisher et al. 1998, Sensi et al. 1999, Lu et al. 2000, Vogt et al. 2000). Das Zink-Ion ist an den intra- und interpolymeren Berührungsflächen der helikalen Stränge der SAM-Domänen lokalisiert und stabilisiert damit die ionische Bindung zwischen den antiparallelen Strängen. Aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität zu Shank3 besteht die Möglichkeit, dass die Assemblierung der Shank-SAM-Domänen durch die Zink-Ionen reguliert wird (Baron et al. 2006). Die Shank-PDZ-Domäne kann direkt mit den C-Termini der Proteine der GKAP (Guanylate kinase-associated proteins)-Familie interagieren, die wiederum PSD-95 bindet (Naisbitt et al 1999, Tu et al. 1999, Kim et al. 1997).

PSD-95 ist ein Mitglied der MAGUK (*membrane associated guanylate kinase*)-Proteinfamilie, die durch drei PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne sowie eine GK (*guanylate kinase*)-Domäne gekennzeichnet ist (Cho et al. 1992). Es ist das mit Abstand am stärksten exprimierte Protein der postsynaptischen Dichte des Vorderhirns der Ratte und interagiert über seine PDZ-Domäne mit den NMDA-Rezeptor-Untereinheiten NR2A und NR2B (Kornau et al. 1995, Niethammer et al. 1996, Cheng et al. 2006). Diese Interaktionen gewährleisten



eine stabile Verankerung der Rezeptoren innerhalb der postsynaptischen Membran und eine indirekte Verbindung zu Shank (Abb. 1.2).

Abb. 1.2: Schematische Darstellung einiger Komponenten des Proteinkomplexes der postsynaptischen Dichte (PSD). In Anwesenheit von Zink-Ionen ( $Zn^{2+}$ ) bilden die Shank-Moleküle eine Plattform aus, die ionotrope (NMDA-R) sowie metabotrope Rezeptoren (mGluR) durch die Hilfe von Gerüstproteinen (Homer1b, Densin-180, PSD-95, GKAP, CaMKII, IRSp53) und Aktin-assoziierten Proteinen ( $\alpha$ -Fodrin, Spectrin, Abp1, Cortactin, IRSp53, Mena) mit dem Aktin-Cytoskelett verankert. Die Translokation von IRSp53 in die PSD ist durch die Phosphorylierung der Proteinkinase C (PKC) regulierbar. Die Zelladhäsionsmoleküle Cadherin, Neuroligin sowie  $\beta$ -Neurexin tragen zur Ausbildung des synaptischen Spalts bei. Die GEFs  $\beta$ -PIX und Kalirin-7 aktivieren die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1, indem sie GDP gegen GTP austauschen. Der Inositoltriphosphat-Rezeptor (IP<sub>3</sub>R) ist ein Kanal des glatten endoplasmatischen Retikulums (gER), eines intrazellulären Calcium-Ionen (Ca<sup>2+</sup>)- Speichers.

PSD-95 ist auch in der Lage Zelladhäsionsmoleküle wie z. B. Neuroligin zu binden. Neuroligin ist ein Transmembranprotein, das durch seine Interaktion mit dem präsynaptischen Membranprotein  $\beta$ -Neurexin die Ausbildung des synaptischen Spalts beeinflusst. Die Blockierung dieser Interaktion führt in Neuronen zu einer verminderten Anzahl von Synapsen, während die Überexpression von Neuroligin die Synapsenanzahl erhöht. Die teilweise Erhöhung der EPSC (*excitatory postsynaptic current*)-Amplitude in den Neuroligin exprimierenden Neuronen zeigte eine vermehrte Anzahl postsynaptischer Rezeptoren und eine Vergrößerung der Synapse an. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass Neurexin und Neuroligin für die Ausbildung von Synapsen notwendig sind und dass Neuroligin möglicherweise an der Reifung der Synapsen beteiligt ist (Chih et al. 2005, Levinson et al. 2005, Dean et al. 2006). Eine weitere Funktion des Neuroligins wird bei der Entstehung von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen vermutet. Die Überexpression von PSD-95 führt zu einer Anreicherung des Neuroligin2, einer Neuroligin-Isoform inhibitorischer Synapsen, in der exzitatorischen postsynaptischen Membran. Dadurch wird das quantitative Verhältnis der inhibitorischen zu exzitatorischen Synapsen im Neuron verändert (Levinson et al. 2005). Dieses veränderte Verhältnis wird als Grund für viele neurologische Krankheiten wie z. B. Autismus vermutet (Rubenstein et al. 2003). An Autismus erkrankte Patienten haben oft Mutationen in den Genen der Neuroligin-Isoformen 3 sowie 4 (Philibert et al. 2000). Sie zeigen außerdem eine reduzierte Anzahl dendritischer Verzweigungen und eine veränderte Morphologie der dendritischen Dornen (Kemper et al. 1998, Zoghbi et al. 2003). Dieser Effekt wurde auch durch den *knock down* der Neuroligin Expression in kultivierten Neuronen beobachtet (Chih et al. 2005).

Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran werden nicht mit Hilfe der Gerüstproteine GKAP und PSD-95 sondern durch die Interaktion mit dem Homer1b-Dimer und der prolinreichen Region von Shank1b stabilisiert (Tu et al. 1999). Durch eine weitere Interaktion von Homer1b mit dem Inositoltriphosphatrezeptor (IP<sub>3</sub>R), einem intrazellulären Calciumkanal, hat Shank indirekten Einfluss auf die zellulären Calciumabhängigen Signalprozesse und die Aktivität der metabotropen Glutamat-Rezeptoren. Dies äußert sich bei Überexpression von Shank1b und Homer1b in kultivierten Neuronen durch eine Calcium-abhängige Erhöhung der Kalium-Kanal-Ströme, durch Rekrutierung der Calcium-Ionen speichernden ER (endoplasmatisches Retikulum)-Zisternen in die dendritischen Dornen sowie durch eine verstärkte Glutamat-Rezeptor-vermittelte Phosphorylierung der extracellular regulated kinase1/2 (ERK1/2) (Sala et al. 2005). Die Überexpression der beiden Proteine wirkt sich auch auf die Morphologie der spines aus. Sie werden bei Überexpression von Shank in Abhängigkeit von Homer1b insgesamt größer, was auf eine Funktion von Shank bei der spine-Reifung schließen lässt (Sala et al. 2001).

Die Interaktion von Shank mit anderen Proteinen lässt sich meistens auf eine einzelne Domäne eingrenzen. Manchmal sind die Domänen allerdings in Kombination notwendig, um eine Protein-Protein-Interaktion zu gewährleisten. Der C-terminale Bereich des PSD-Proteins Densin-180 bindet über eine solche Zwei-Punkt-Interaktion sowohl an die SH3-Domäne als auch an die prolinreiche Region von Shank. Ein weiterer Interaktionspartner für die C-

1

terminale Region von Densin-180 ist δ-Catenin, ein Protein, das unter anderem an den intrazellulären Bereich des Zelladhäsionsmoleküls Cadherin in der postsynaptischen Membran bindet. Erste Hinweise auf die physiologische Funktion des Densin-180 in der postsynaptischen Dichte gaben Quitsch et al. (2005). Die Überexpression von Densin-180 in Hippokampusneuronen induzierte das vermehrte Auswachen von Neuriten und eine starke Zunahme der dendritischen Verzweigungen. Durch die Koexpression von Shank in den Neuronen konnte das Auswachsen der dendritischen Verzweigungen verhindert werden und Koimmunpräzipitationsstudien zeigten, dass Shank die Interaktion von δ-Catenin mit Densin-180 blockiert. Da überexprimiertes δ-Catenin ebenfalls dendritische Verzweigungen in Neuronen induziert, besteht die Möglichkeit, dass Shank die Aktivierung eines Densin-180abhängigen δ-Catenin-Signalweges blockiert (Quitsch et al. 2005).

Shank kann über seine Ankyrin-Domäne mit den F-Aktin-assoziierten Proteinen α-Fodrin und Spectrin interagieren und ist damit indirekt mit dem Aktin-Cytoskelett der Synapse verknüpft (Boeckers et al. 2001). Des weiteren bindet die prolinreiche Region von Shank das Protein Cortactin sowie die SH3-Domänen von Abp1 (actin binding protein 1) und IRSp53 (insulin receptor substrate of 53/58 kDa) (Naisbitt et al. 1999, Bockmann et al. 2002, Soltau et al. 2002, Qualmann et al. 2004). Die identifizierten Interaktionen von Shank mit diesen Aktinassoziierten Proteinen gaben der Shank-Familie die Funktion eines wichtigen Gerüstproteins, welches die glutamatergen Rezeptoren mit dem Cytoskelett vernetzt. Das Cytoskelett ist ein dynamisches Netzwerk, das durch die Polymerisation sowie Depolymerisation von Aktinfilamenten modifizierbar ist. Diese Umstrukturierungen innerhalb der Synapse können in einer veränderten Morphologie der dendritischen spines resultieren und haben damit direkten Einfluss auf die Effizienz der synaptischen Transmission. Potentielle Regulatoren dieser Cytoskelett-abhängigen morphologischen Veränderungen in der Synapse sind die schon anfangs kurz erwähnten kleinen GTPasen. Sie kommen in einem GTP-gebundenen, aktiven sowie GDP-gebunden inaktiven Zustand vor und können zwischen diesen Zuständen hin- und herwechseln. Nur im aktiven Zustand ist es ihnen möglich bestimmte Effektorproteine zu binden und dadurch Einfluss auf zelluläre Eigenschaften wie Aktin-Reorganisation, Zelladhäsion oder Genexpression zu nehmen (Hall 1994; Takai et al. 2001; Van Aelst und D'Souza-Schorey 1997). Die Aktivierung der GTPasen erfolgt durch sogenannte GEFs (guanine exchange factors), die den Austausch von GDP durch GTP katalysieren. Die Inaktivierung resultiert aus der Hydrolyse des GTP und wird durch GAPs (GTPase activating factors) gefördert. Die kleinen GTPasen sind damit schnell und lokal

begrenzt einsetzbare Werkzeuge, die von vielen verschiedenen GEFs und GAPs individuell reguliert werden können. (Hall 1994; Takai et al. 2001). In bezug auf die synaptische Reorganisation des Aktin-Cytoskletts wurden bisher die Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 am besten charakterisiert. Aktives RhoA führt bei Überexpression in Neuronen zu einer Reduktion der spine-Dichte. Dieser Effekt kann durch den Einsatz eines spezifischen Rho-Kinase Inhibitors aufgehoben werden, so dass RhoA vermutlich über die Rho-Kinase auf die Organisation des Cytoskeletts wirkt (Nakayama et al. 2000). β-PIX ist ein GEF für Rac1 und Cdc42, der mit der PDZ-Domäne von Shank interagiert. β-PIX konnte im Komplex mit Shank und PAK (p21-activated kinase) aus dem Gehirn der Ratte isoliert werden (Park et al. 2003). PAK wird durch Rac1 sowie Cdc42 aktiviert und kann durch Aktivierung der LIM (Lin-11, Isl-1, and Mec-3)-Kinase hemmend auf Cofilin wirken. Cofilin fungiert als Aktinfilament depolymerisierendes Protein, so dass seine Inhibierung in einer Stabilisierung der Aktinfilamente resultiert (Abb. 1.3). Die F-Aktin stabilisierende Wirkung dieses Komplexes wird durch die Beobachtung gestützt, das Rac1 eine Erhöhung der spine-Dichte bewirkt (Nakayama et al. 2000, Tashiro et al. 2000). Außerdem zeigen Patienten mit Mutationen im Gen ARHGEF6, welches für α-PIX kodiert, X-chromosomal vererbte mentale Retardationen. a-PIX ist ein homologes Protein zu β-PIX und unterscheidet sich lediglich durch eine zusätzliche CH (calponin homology)-Domäne (Kutsche et al. 2000). Kalirin-7 hat die Funktion eines Rac-spezifischen GEFs und ist durch die Interaktion mit PSD-95 ebenfalls in der postsynaptischen Dichte lokalisiert. Aktiviertes Rac1 wirkt über die Interaktion mit NPFs (nucleation promoting factors, z. B. Cortactin) indirekt auf den Arp2/3-Komplex. Der aktivierte Arp2/3-Komplex stimuliert die F-Aktin-Polymerisation, indem er die Aktin-Nukleation initiiert (Abb. 1.3). Experimentell lässt sich dieser Effekt durch die Überexpression von Kalirin-7 in Neuronen bestätigen. Kalirin-7 induzierte eine Vergrößerung und Erhöhung der Anzahl dendritischer Dornen. Die Expression einer Kalirin-7-Mutante, bei der die GEF-Domäne inaktiviert wurde resultiert dagegen in einer stark verminderten Anzahl der spines (Penzes et al. 2001). Intersectin-1 ist ein GEF, der durch die Aktivierung von Cdc42 und mit Hilfe des NPF N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) sowie des Arp2/3-Komplexes das Aktin-Cytoskelett beeinflusst (Abb. 1.3). Dominant-negatives Intersectin-1 und Cdc42 führen zu einer Abnahme reifer pilzförmiger spines und Zunahme filopodienartiger Ausläufer (Irie und Yamaguchi 2002). Cdc42 kann die Morphologie der spines außerdem durch die Interaktion mit dem F-Aktin-assoziierten Protein IRSp53 beeinflussen. Die Überexpression von IRSp53 resultiert in einer Verlängerung dendritischer



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung einiger Signalwege, die durch die GEFs β-PIX, Kalirin-7 und Intersectin aktiviert werden und auf die Organisation des F-Aktin Cytoskeletts wirken. β-PIX und Kalirin-7 interagieren mit den postsynaptischen Proteinen Shank bzw. PSD-95 und aktivieren ebenso wie Intersectin die kleinen GTPasen Cdc42 oder Rac1, indem sie den Austausch von GDP zu GTP katalysieren. Durch die weitere Aktivierung von Effektorproteinen wird F-Aktin entweder stabilisiert oder seine Polymerisation stimuliert.

*spines*, was durch die Koexpression von Cdc42 gesteigert werden kann. Vermutlich hat die Bindung von Cdc42 an IRSp53 eine Konformationsänderung zur Folge, welche die Interaktion der SH3-Domäne mit dem Ena/VASP-Protein Mena ermöglicht. Mena interagiert mit Profilin, das eine hohe Bindungsaffinität zu G-Aktin aufweist. Dies führt zur Rekrutierung von G-Aktin und stimuliert die F-Aktin-Polymerisation (Soltau, Dissertation 2003, Soltau et al. 2002, Krugmann et al. 2001, Miki et al. 2000). IRSp53 kann über seine SH3-Domäne ebenfalls mit Shank interagieren und gleichzeitig über den C-Terminus die zweite PDZ-Domäne von PSD-95 binden. Durch die Ausbildung dieses ternären Komplexes stellt IRSp53 ein weiteres Brückenprotein bei der Verankerung der NMDA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran mit dem weiter im Inneren der Zelle lokalisiertem Shank dar. Dieser Proteinkomplex ist vermutlich auch für die starke Konzentration des Proteins in der PSD verantwortlich (Bockmann et al. 2002, Soltau et al. 2002, Soltau et al. 2004). Die indirekte Regulation durch den NMDA-Rezeptor deutete auf eine mögliche Funktion von IRSp53 in der synaptischen Plastizität hin und konnte von Hori et al. erstmals 2005 gezeigt werden. Nach der Stimulation primärer Hippokampusneurone mit Glutamat kam es zu einer Aktinfilament-abhängigen Translokation von diffus im Dendriten verteilten IRSp53 an die postsynaptische Membran. Der Einsatz spezifischer Proteinkinasehemmer zeigte, dass die Translokation des IRSp53 von der Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) abhängt und in einem Anstieg der EPSC-Amplitude resultiert. IRSp53 ist damit direkt an der durch den NMDA-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion innerhalb der Synapse beteiligt und durch den PKC-Signalweg regulierbar (Hori et al. 2005).

Bereits seit 1999 ist bekannt, dass IRSp53 durch den Insulinrezeptor, eine Tyrosin-Kinase, die auch in der postsynaptischen Membran enthalten ist, phosphoryliert wird. Die funktionelle Bedeutung ist bis heute nicht bekannt, führte aber zu der Namensgebung *insulin receptor substrate of 53/58 kDa* (Yeh et al. 1996, Abbott et al. 1999). In der Literatur ist IRSp53 ebenfalls unter dem Synonym BAIAP2 *(brainspecific angiogenesis inhibitor associated protein 2)* zu finden, da es mit dem Transmembranprotein *brainspecific angiogenesis inhibitor* (BAI) interagiert. Dieser Interaktion konnte bisher ebenfalls keine spezifische Funktion in Neuronen zu geordnet werden. (Oda et al. 1999).

Die ersten Untersuchungen zur Charakterisierung von IRSp53 von Yeh et al. (1996) zeigten die starke Expression des Proteins im Gehirn und die Existenz von mindestens zwei Formen mit den Molekulargewichten von 53 kDa und von 58 kDa. Die Isolierung der mRNAs und der Vergleich mit der Struktur des IRSp53-Gens bewiesen die Existenz von vier Spleißvarianten. Die IRS-S, -L und -T-Isoformen haben alle ein apparentes Molekulargewicht von ca. 53 kDa während die vierte Isoform 58 kDa umfasst. Die N-terminalen 511 Aminosäuren sind bei allen vier Isoformen identisch und enthalten mehrere Protein-Protein-Interaktionsdomänen (Abb. 1.4). Die Spezifität der vier Isoformen zeigt sich anhand der C-terminalen 9-41 Aminosäuren, welche aufgrund von alternativem Spleißen unterschiedlich sind. Sie sind in verschiedenen Geweben exprimiert und unterscheiden sich auch bezüglich ihrer Tyrosin-Phosphorylierung (Okumara-Oho et al. 2001, Miyahara et al. 2003). Abbildung 1.4 zeigt die schematische Darstellung der Proteininteraktionsdomänen, die in allen vier Isoformen von IRSp53 konserviert sind.



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von IRSp53.** Alle vier Isoformen von IRSp53 enthalten eine N-terminale *IRS/MIM homology* (IM)-Domäne, eine benachbarte *cdc42/rac interacting binding motif* (CRIB)- und eine anschließende *src homology* (SH3)-Domäne. C-terminal befindet sich die Tryptophan/Trytophan (WW)-Bindedomäne.

Die IRSp53-S-Isoform, auch IRSp53.1 genannt, ist vorwiegend im Gehirn exprimiert und besitzt als einzige der vier Isoformen eine PDZ-Bindedomäne am C-Terminus. Den vier Isoformen konnten bisher noch keine spezifischen Funktionen zugeordnet werden.

Kristallstrukturanalysen zeigten, das die C-terminale IRS/MIM homology (IM)-Domäne eine coiled-coiled Strukur annimmt und sich zu einem Dimer zusammenlagert, welches dann der Form eines Zeppelins ähnelt (Millard et al. 2005). Die IM-Domäne besitzt die Eigenschaft filamentöses Aktin zu bündeln, während das benachbarte cdc42/rac interacting binding motif (CRIB) nach seiner Fähigkeit die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac zu binden benannt wurde. Mit der PDZ-Bindedomäne des C-Terminus der IRSp53-S-Isoform (= IRSp53.1) interagiert sowohl das neuronale Protein PSD-95 als auch das Protein MALS (mammalian Lin-7 homologue), was in Zell/Zellkontakten exprimiert wird (Soltau et al. 2004, Hori et al. 2003). Für die Tryptophan/Trytophan-Bindedomäne sind noch keine Interaktionpartner bekannt während für die SH3-Domäne bisher die größte Gruppe interagierender Proteine identifiziert wurde. Sie umfasst Aktin-Cytoskelett-assoziierte und neuronale Proteine (Mena, Eps8, Tiam1, Shank, BAI) aber auch Proteine, die mit neurodegenerativen Krankheiten im Zusammenhang stehen. So konnte eine Interaktion von IRSp53 mit Atrophin-1 nachgewiesen werden. Bei einer mutierten Form des Atrophin-1 kommt es durch eine unverhältnismäßig häufige Wiederholung eines CAG-Nukleotidtripletts im Genom zu einem Polyglutamin-Abschnitt im Protein. Daraus resultiert die Dentatorubrale-Pallidolysiane Atrophie (DRPLA). Sie wird autosomal-dominant vererbt und führt zu einem Absterben von Neuronen in bestimmten Regionen des Gehirns. Bei den betroffenen Patienten äußert sich dieser Zustand durch Bewegungsstörungen, myoklonische Epilepsie und Demenz (Okamumoho et al. 1999). Des weiteren konnte die Interaktion von IRSp53 mit dem Protein 14-3-3 gezeigt werden, welches ebenfalls mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und scrapie in Verbindung gebracht wird (Mackie et al. 2005). Die physiologische Funktion von IRSp53 in diesen neuodegenerativen Krankheiten ist allerdings noch völlig ungeklärt.

Innerhalb des Gehirns erstreckt sich die Expression von IRSp53 über die Areale des Cerebellums, des Cortex cerebri, des Hippokampus, und Caudate Putamen (Bockmann et al. 2002). Es ist aber auch in vielen nicht-neuronalen Geweben nachweisbar. Die Expression des Proteins zeigte sich durch den Nachweis seiner mRNA sehr deutlich in Herz, Lunge, Leber, Niere, Dickdarm, Prostata und Hoden. Eine etwas schwächere Detektion der IRSp53-mRNA war in den Geweben des Pankreas, der Milz, des Thymus, der Eierstöcke, des Skelettmuskels

und in den Leukozyten möglich (Yeh et al. 1996, Okamura-Oho et al. 1999, Bockmann et al. 2002).

Die Identifizierung dieser Vielzahl verschiedener Gewebe führte zu einer umfangreichen Charakterisierung der nicht-neuronalen Funktion von IRSp53. Zum Teil können daraus Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion des Proteins im neuronalen Gewebe gezogen werden.

So konnte von Miki et al. (2001) gezeigt werden, dass IRSp53 in Fibroblasten einen ternären Komplex mit der kleinen GTPase Rac und WAVE2 (*Wiskott-Aldrich syndrome protein verprolin homologous*) bildet. Rac bindet dabei an die CRIB-Domäne, während WAVE2 mit der SH3-Domäne von IRSp53 interagiert. Der Rac/IRSp53/WAVE2-Komplex stimuliert mit Hilfe des Arp2/3-Komplexes die Aktin-Polymerisation. Überexpressionsstudien bewirkten die Ausbildung von Lamellipodien in den Fibroblasten und gaben damit einen Hinweis auf die physiologische Relevanz des ternären Komplexes (Miki et al. 2000, Takenawa et al. 2001).

Die Identifizierung der Interaktion von IRSp53 und Tiam1, einem GEF, der spezifisch die kleine GTPase Rac aktiviert sowie weitere *in vivo*-Studien führten zu der Hypothese, dass Tiam1 möglicherweise die durch Rac induzierte Ausbildung von Lamellipodien stimuliert. Im Gegensatz zu der Induktion von Lamellipodien durch den Rac/IRSp53/WAVE2-Komplex resultiert die Interaktion von IRSp53 mit der kleinen GTPase Cdc42 und dem cytoskeletalen Protein Mena in der Ausbildung von kurzen, dünnen Filopodien (*microspikes*) an der Zellperipherie der Fibroblasten. Tiam1 könnte damit als Regulator der cytoskeletalen Umstrukturierung von *microspikes* zu Lamellipoden fungieren, was bei der Zellmigration von großer Bedeutung ist (Krugmann et al. 2001, Connolly et al. 2005).

Eps8, ein weiterer Rac spezifischer GEF wurde als Hauptinteraktionspartner von IRSp53 in Krebszellen identifiziert. Eps8 und IRSp53 sind am Leitsaum migrierender Fibrosarkomazellen lokalisiert. Die Inhibierung der Eps8/IRSp53-Komplexbildung führt zu einer Arretierung der Zellbewegung, so dass IRSp53 auch für die Metastasierung maligner Tumorzellen von Bedeutung ist (Funato et al. 2004).

IRSp53 kann vermutlich viele, verschiedene Funktionen in der Zelle ausüben. Einerseits interagiert es mit postsynaptischen Proteinen wie der Shank-Familie, andererseits mit Proteinen, die zur Bildung von Filopodien (Mena) oder Lamellipodien (WAVE2) beitragen. Weiterhin bindet es an Proteine unbekannter zellulärer Funktion (z. B. Atrophin-1). Um die neuronale Funktion von IRSp53 genauer zu definieren wurde im Rahmen dieser Arbeit eine

IRSp53 *knock out*-Maus hergestellt und diese besonders in bezug auf neuronale Veränderungen analysiert.

#### 1.1 Zielsetzung

IRSp53 kann Umstrukturierungen des Aktin-Cytoskeletts beeinflussen und ist damit in die morphologischen Veränderungen von Zellen involviert. In Fibroblasten resultiert die Überexpression des IRSp53-Konstruktes in einem Auswachsen von Filopodien und der Lokalisation des Proteins in diesen Strukturen (Govind et al. 2001, Krugmann et al. 2001). Da IRSp53 sehr stark im Gehirn exprimiert ist und über seine Aufgabe in bezug auf die neuronale Morphologie nur sehr wenig bekannt war, bestand ein Ziel der vorliegenden Arbeit aus der Charakterisierung der Funktion sowie Regulation von IRSp53 im neuronalen Zellsystem.

Um die Funktion des IRSp53 im lebenden Organismus studieren zu können, war die Herstellung und Analyse einer IRSp53 *knock out*-Maus ein weiteres Ziel der Arbeit. Ein besonderes Interesse sollte hierbei möglichen Veränderungen in der Organisation der postsynaptischen Dichte und Veränderungen in bezug auf die Ausbildung der Synapsen gelten. Die Analyse der Auswirkungen des vollständigen Funktionsverlusts von IRSp53 auf die Morphologie der Neurone stellte einen weiteren Interessenschwerpunkt dieser Arbeit dar.

## 2. Material und Methoden

## 2.1 Material

## 2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck, Roth oder Sigma in p. A. Qualität bezogen.

## 2.1.2 Bakterienstämme und Zelllinien

#### Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

	Bezeichnung	Hersteller
Bakterienstämme	<i>E.coli</i> -Top10F	Invitrogen
Zelllinien	HEK293	ATCC

### 2.1.3. Ausgangsvektoren

Tab.	2.2:	Übersicht	über	die	verwendeten	Vektoren
I ab.		C Del Siene	ubei	uit	ver wenacten	v entor en

Vektor	Hersteller
pCR®II-TOPO®	Invitrogen
pcDNA3T7	Roth et al. (1997)
pcDNA3.1A/Myc-His	Invitrogen
pcDNA6A/Myc-His	Invitrogen
pEGFP.C1	Clontech
pCMV-26-3xFlag/Myc	Sigma-Aldrich

Die hier aufgelisteten Vektoren dienten als Ausgangsmaterial für alle im Rahmen dieser Arbeit klonierten Konstrukte. Eine Übersicht über die verwendeten Konstrukte befindet sich im Anhang.

## 2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden im Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) mit Hilfe eines *DNA/RNA Synthesizers* (Applied Biosystems) synthetisiert. Vor ihrer Verwendung wurden die Oligonukleotide nach Herstellerangaben über *MicroSpin G-25 Columns* (Amersham Biosciences) aufgereinigt und mit H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 10 pmol/µl eingestellt. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

## 2.1.5. Antikörper

**Tab. 2.3: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.** m = mouse (Maus), rb = rabbit (Kaninchen), gt = goat (Ziege)

		Eingesetzte Konzentration		
Primärantikörper	Hersteller	Western- Blot	Immun- cytochemie	
m-Anti-Aktin	Upstate	1:1000	-	
m-Anti-Abi-1	MBL International Corporation	1:1000	-	
m-Anti-Arc	BD Biosciences	1:1000	-	
m-Anti-CaMKII	Chemicon	1:10000	-	
rb-Anti-CaMKII(Thr286)	Cell Signaling Technologies	1:5000	-	
m-Anti-δ-Catenin	BD Biosciences	1:250	-	
m-Anti-Cdc42	BD Biosciences	1:1000	_	
m-Anti-Cortactin	Upstate	1:1000	-	
rb-Anti-Densin-180	BioGenes	1:2000	-	
m-Anti-EGFP	Covance	1:1000	1:100	
rb-Anti-EGFP	Abcam	1:1000	1:100	
m-Anti-Eps8	BD Biosciences	1:1000	-	
m-Anti-Flag	Sigma	1:1000	1:100	
rb-Anti-B-Galaktosidase	Abcam	1.8000	_	
rb-Anti-Glutamat-R1	Chemicon	1:500	_	
rb-Anti-Glutamat-R5	C. Sala, University of Milan, Mailand, Italien	1:5000	-	
gt-Anti-HIP55	Abcam	1:500	-	
rb-Anti-Homer	C. Sala, University of Milan, Mailand, Italien	1:5000	-	
rb-Anti-IRS-1	Upstate	1:1000	-	
rb-Anti-IRSp53	BioGenes	1:1000	1:100	
m-Anti-MAP2	Sigma	-	1:2000	
rb-Anti-MAP2	C. Garner, Stanford University, USA	-	1:2000	
m-Anti-Mena	BD Biosciences	1:2000	-	
m-Anti-Myc	Sigma	1:1000	-	
rb-Anti-Neomycin-Phospho- transferase II	Upstate	1:1000	-	
m-Anti-NMDA-R1	Chemicon	1:10000	-	
rb-Anti-NMDA-R2A/B	Chemicon	1:500	-	
rb-Anti-NMDA-R2A	Chemicon	1:1000	-	
rb-Anti-NMDA-R2B	Chemicon	1:1000	-	
rb-Anti-NMDA-R2B	Affinity BioReagents	1:1000	-	
rb-Anti-α-Pak	Santa Cruz	1:600	-	
rb-Anti-β-PIX	Chemicon	1:2000	-	
m-Anti-PSD-95	Upstate	1:1000	1:100	
m-Anti-Rac	Upstate	1:1000	-	
m-Anti-Rap1	BD Biosciences	1:1000	-	
m-Anti-Ras	BD Biosciences	1:1000	-	
m-Anti-Rho	Santa Cruz	1:600	-	
rb-Anti-SAPAP1/GKAP	AG Kindler, UKE, Hamburg	1:100	-	

rb-Anti-Shank <sub>PDZ</sub>	Pineda	1:1000	-
rb-Anti-Sharpin	E. Kim, Korea Advanced	1:2000	-
	Institute of Science and		
	Technology, Daejeon		
m-Anti-Sos-1	BD Biosciences	1:500	-
gt-Anti-Spectrin	A. Dityatev, ZMNH,	1:1000	-
	Hamburg		
m-Anti-T7-tag	Novagen	1:1000	-
m-Anti-α-Tubulin	Abcam	1:20000	-
rb-Anti-Tubulin	Abcam	1:500	-
rb-Anti-WAVE2	Upstate	1:500	-
m-Anti-Megalin	T. Willnow, MDC, Berlin	-	1:400

#### Tab. 2.4: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Eingesetzte Konzentration	
		Western-Blot	Immuncytochemie
Cy <sup>™</sup> 3-Anti-Maus IgG	Dianova	-	1:250
Cy <sup>™</sup> 3-Anti-Kaninchen IgG	Dianova	-	1:250
Alexa-Fluor488-Anti-	Molecular Probes	-	1:250
Kaninchen IgG			
Alexa-Fluor488-Anti-Maus	Molecular Probes	-	1:250
IgG			
HRP-Anti-Kaninchen IgG	Amersham	1:2500	-
HRP-Anti-Maus IgG	Amersham	1:2500	-
HRP-Anti-Meerschwein IgG	Dianova	1:2500	-
HRP-Anti-Ziege IgG	Santa Cruz	1:2000	-

### **Spezifische Agentien**

Phalloidin-TRITC (MobiTec) wurde zur Darstellung filamentösen Aktins in der Verdünnung 1:40 eingesetzt.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung von Vektor-Konstrukten diente die Polymerase-Kettenreaktion. Einem Reaktionsansatz von 50µl wurden 5-100 ng Template-DNA und Primer in einer Endkonzentration von 10 bis 100 nM zugefügt. Zusätzlich enthielt ein Ansatz 500 µM Desoxyribonukleotide, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub> und 1-3 U Polymerase. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde *AmpliTaq* DNA-Polymerase (PerkinElmer) oder *Turbo Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene) eingesetzt. Die Durchführung der Reaktion erfolgte im GeneAmp PCR System 2400 (PerkinElmer) oder im Biometra T Gradient Thermocycler 96 (Whatman). Nach der Denaturierung der DNA bei 94°C für 5 Minuten folgten 30 Zyklen mit folgenden Schritten:

Denaturierung: 94°C 30 Sek.

Primer-Anlagerung: 55-60°C 30 Sek.

Elongation: 72 °C 1 Minute pro Kilobase

Folgende Formel diente der Bestimmung der Anlagerungstemperatur:

 $T_m = 4 \ x \ N_{(G+C)} + 2 \ x \ N_{(A+T)}$ 

Nach Beendigung der PCR wurde eine Elongationsphase für 7 Min. bei 72°C angeschlossen. Bei Amplifikation mit *Turbo Pfu* Polymerase erfolgte nach Zugabe von 1 U *Taq* Polymerase ein weiterer Elongationsschritt für 10 Minuten bei 72°C, um das PCR-Produkt an beiden Enden mit einem A-Überhang zu versehen.

Im Anschluß wurden die PCR-Produkte im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.2), am UV-Tisch analysiert und, falls gewünscht, nach Aufreinigung (2.2.3) in pCR®II-TOPO-Vektoren subkloniert.

Die PCR zur Maus-Genotypisierung verlief wie oben beschrieben unter Verwendung der *AmpliTaq* DNA-Polymerase (Applied Biosystems), Zugabe von 5 µl 5M Betain und Einsatz von 0,5 µl genomischer *template*-DNA, die zuvor aus den Schwanzbiopsien aufgereinigt wurde (2.2.11)

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

1x TAE-Puffer:	100 mM Tris/Acetat
	5 mM EDTA pH 8
5x Probenpuffer:	30 % (v/v) Glycerin
-	40 mM Tris/HCl pH 8
	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	· · · · ·

Die Agarose (Invitrogen) wurde in einer Konzentration von 1% (w/v) in TAE-Puffer aufgekocht und mit 0,7  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach dem Aushärten des Gels in horizontalen Kammern mit TAE-Laufpuffer. Dazu wurden die DNA-Proben mit 1/5 Volumen des 5x Probenpuffers versetzt und bei 50-100 V entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Betrachtung des Gels auf einem UV-Tisch (UVT 2035, Herolab) ließen sich die DNA-Fragmente im Gel

2

sichtbar machen und dokumentieren. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente geschah mit Hilfe eines DNA-Molekulargewichtmarkers ( $\lambda$ DNA /EcoRI + HindIII), der parallel zu den DNA-Proben im Gel aufgetrennt worden war.

#### 2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte durch Verwendung des *QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit* (Qiagen). Dazu wurden die DNA-Fragmente auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und entsprechend der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

#### 2.2.4 Restriktionsverdau von DNA

(Sambrock et al. 1989)

Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurden nach Herstellerangaben mit den entsprechenden Enzymen und Puffern (Life Technologies, MBI Fermentas, New England Biolabs, Roche) verdaut. Die Spaltung der DNA wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung (2.2.2) überprüft und gewünschte DNA-Fragmente für anschließende Ligationen aus dem Gel isoliert (2.2.3).

#### 2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die linerisierte Vektor-DNA wurde mit einem dreifachen molaren Überschuss des entsprechend geschnittenen DNA-Fragments und dem passenden Reaktionspuffer (Roche) versetzt. Die Ligation des Vektors mit dem DNA-Fragment erfolgte durch Zugabe von 1U T4 DNA-Ligase für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 16°C.

#### 2.2.6 Herstellung kompetenter Bakterien

(Sambrock et al. 1989)

LB-Medium (LURIA-BERTANI-Medium)

10 g/l Bacto-Pepton 10 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt

TSB

10% Polyethylenglycol (PEG) 3350 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) 0,01 M MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 0,01 M MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine Einzelkolonie des Stamms TOP10F in 5 ml LB-Medium mit 15  $\mu$ g/ml Tetracyclin bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die Vorkultur wurde am nächsten Tag zu 500 ml LB-Medium ohne Antibiotikum gegeben und bis zu einer OD600 von 0,3-0,6 bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Kühlung der Kultur auf Eis folgte die Sedimentation der Bakterien durch Zentrifugation bei 1000g für 5 Minuten und 4°C. Das Pellet wurde in 50 ml eiskalten TSB resuspendiert, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und die Suspension anschließend aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Die Bestimmung der Kompetenz erfolgte durch Transformation von 100  $\mu$ l kompetenter Bakterien mit 0,1 ng Plasmid-DNA und anschließender Zählung der auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien. Die Kompetenz der Zellen sollte mindestens bei 10<sup>6</sup> Transformanden/µg Plasmid-DNA liegen.

#### 2.2.7 Transformation kompetenter Bakterien

5 x KCM:	0,5 M KCl
	0,15 M CaCl <sub>2</sub>
	0,25 M MgCl <sub>2</sub>

100 µl kompetenter Bakterien (TOP10F) wurden mit 70 µl H<sub>2</sub>O, 20µl 5x KCM sowie 10µl des Ligationsansatzes bzw. 10 bis 50 ng Vektor-DNA versetzt und für 20 Minuten auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock für 5 Minuten bei 37°C erfolgte die sofortige Zugabe von 800 µl vorgewärmten LB-Mediums (siehe 2.2.6) sowie die anschließende Inkubation der Bakterien für 20 – 40 Minuten bei 37°C im Thermoschüttler (Eppendorf). Danach wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten, die ein entsprechendes Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin oder 50µg/ml Kanamycin) enthielten, ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2

#### 2.2.8 Minipräparation von Plasmid-DNA (TELT-Lyse)

(Holmes und Quigley 1981)

TELT-Lysispuffer 50 mM Tris/HCl pH 7,5 62,5 mM EDTA 2,5 mM LiCl 0,4 % (v/v) Triton X-100

5 ml LB-Medium (siehe 2.2.6) wurden mit einer Bakterien-Kolonie der LB-Selektionsagarplatten beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach 12 bis 16 Stunden folgte die Zentrifugation von 1,5 ml dieser Kultur (1Min., 13000 Upm, RT) und die Resuspension des Pellets in 250 μl TELT-Lysispuffer. Anschließend wurden 25 μl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) zugegeben, 5 Minuten auf Eis, 5 Minuten bei 100°C und nochmals 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation des Bakterienlysats (10 Min., 13000 Upm, RT) konnte das Pellett aus Zelltrümmern, denaturierten Proteinen und genomischer DNA mit einem Zahnstocher aus dem Reaktionsgefäß entfernt werden. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 250 μl (0,75 Vol.) Isopropanol gefällt, durch Zentrifugation (20 Min., 13000 Upm, RT) sedimentiert und anschließend mit 75%igem Ethanol gewaschen (10 Min., 13000 Upm, 4°C). Nach der Trocknung der Plasmid-DNA wurde sie in 50 μl H2O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

#### 2.2.9 Midipräparation von Plasmid-DNA

Für die Transfektion von HEK293-Zellen oder Hippokampusneuronen wurden größere Mengen gereinigter Plasmid-DNA verwendet. Die Anzucht und Lyse der Bakterien sowie die Päparation der DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers ("Nucleobond®AX Kit", Macherey und Nagel).

Für die Transfektion von Hippokampusneuronen wurde Endotoxin-freie Plasmid-DNA mit Hilfe des EndoFree®Plasmid Maxi Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll der Hersteller. Die Konzentrationbestimmung der Plasmid-DNA geschah im Anschluß durch photometrische Messung bei 260 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers (Genequant, Amersham).

2

#### 2.2.10 DNA-Sequenzierung

Die Durchführung aller Sequenzierungen von Plasmid-DNA erfolgte im Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (Universitätkrankenhaus Hamburg-Eppendorf). Dazu wurden 0,5 bis 1 µg Plasmid-DNA zusammen mit 10 pmol des Sequenzierprimers aufgearbeitet und mit dem Sequenzierautomaten ABI Prism 377 (Perkin Elmer) ausgewertet.

#### 2.2.11 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien (SB)

SB-Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl pH8 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1% SDS

TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH8
	1mM EDTA pH8

Die Lyse eines ungefähr 0,5 cm langen Stück des Mäuseschwanzes erfolgte nach Zugabe von 500 µl Lysispuffer und 500 µg Proteinase K über Nacht bei 56°C im Thermoschüttler (Eppendorf). Nach Zentrifugation des Lysats für eine Minute bei 13000 Upm wurden 500 µl des Überstandes mit 500 µl Phenol<sup>®</sup>Roti (Roth) für eine Minute geschwenkt, anschließend bei 13000 Upm für 7 Minuten zentrifugiert und die obere, wässrige Phase abgenommen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und danach einmal zur Entfernung des Phenols mit reinem Chloroform (Merck) durchgeführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,75 Vol. Isopropanol und 10-minütigen Zentrifugieren bei 14000 Upm. Nach dem Waschen der gefällten DNA mit 70%igem Ethanol (Zentrifugation für 5 Minuten bei 14000 Upm) wurde das Pellet getrocknet und anschließend in 30 µl TE-Puffer resuspendiert.

#### 2.3 Biochemische Methoden

#### 2.3.1 Proteinbestimmung

(Bradford, 1976)

Für die Proteinbestimmung wurde eine Standardreihe von 0-20  $\mu$ g BSA (*bovine serum albumin*)/ml H<sub>2</sub>O angesetzt und die zu untersuchenden Proteinlösungen 1:10 sowie 1:20 verdünnt. Je 20  $\mu$ l der Proteinlösungen bzw. der Standards wurden mit 180  $\mu$ l Bradford-Reagenz (Sigma) vermischt und für 1-5 Minuten in einer 96-Loch-Platte inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte in einem *ELISA*-Reader über die Extinktionsmessung bei 620 nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories). Die Berechnung der Proteinkonzentration wurde anhand der Regressionsgleichung der BSA-Standardkurve in Excel vorgenommen.

#### 2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

5x Laemmli-Proben-Puffer:	50% (v/v) Glycerin	
	10% (v/v) ®-Mercaptoethanol	
	7,5% (w/v) SDS	
	300 mM Tris/HCl ph 6,8	
	0,25% (w/v) Coomassie G-250	
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl	
	192 mM Glycin	
	0,1% (w/v) SDS	

Mit Hilfe der SDS-PAGE werden Proteine in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die Herstellung der Gele mit einer Größe von 8 cm x 7,3 cm x 0,15 cm erfolgte mit Hilfe eines Mini-PROTEAN II Gießstandes (Biorad), wobei das Sammelgel etwa 1/5 der Größe des gesamten Gels ausmachte. Die Trenngele wurden mit einer Acrylamid-Konzentration von 8-12% gegossen. Vor dem Auftragen der Proteinproben auf die SDS-PAGE wurde den Proben 5x Laemmli-Probenpuffer zugegeben und diese für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120-180 V in einer Mini-PROTEAN II Elektrophoresekammer mit SDS-Laufpuffer. Als Größenstandard diente ein Protein-Molekulargewichtsmarker (Full-Range Rainbow<sup>TM</sup> Marker, Amersham Biosciences).

#### 2.3.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Coomassie-Lösung:	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Coomassie G-250
Entfärberlösung:	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure

Das Acrylamid-Proteingel wurde zunächst für 20 Minuten in Coomassie-Lösung geschwenkt und anschließend mit Entfärberlösung gewaschen.

#### 2.3.4 Western-Blot Analysen

Blotpuffer 20% (v/v) Methanol 192 mM Glycerin 25 mM Tris/HCl 0,02 % (w/v) Glycin

TBS-T : 150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 7,9 0,2 % (w/v) Tween-20

Der Western-Blot wird eingesetzt, um die auf einer Nitrozellulose-Membran fixierten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Vor dem Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte die elektrophoretische Auftrennung mittels SDS-PAGE (2.3.2). Das Trenngel wurde danach kurz in Blotpuffer equilibriert und nach den Angaben des Herstellers in die Blotapparatur eingesetzt (Mini-Trans-Blot Apparatur, BioRad). Der Transfer erfolgte bei 100 V für eine Stunde. Danach wurde die Membran kurz in TBS-T gespült und 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockierlösung (5% Milchpulver in TBS-T) geschwenkt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Erstantikörper, welcher in einer entsprechenden Verdünnung mit Blockierlösung (5% Milchpulver in TBS-T) für 1,5 Stunden auf die Membran gegeben wurde. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 15 Minuten mit TBS-T folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper in TBS-T, für 1 Stunde. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Immundetektion mit Hilfe des ECL-Reagenz (*Enhanced Chemilumiescence*, Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte durch die Belichtung eines Röntgenfilms (Cronex 5 Medical X-Ray Film, Agfa).

#### 2.3.5 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen

#### Expression von Fusionsproteinen

Im Rahmen der Arbeit wurden Proteine mit der Gluthation S-Transferase (GST) fusioniert. Der Expression des GST-Fusionsproteins war die Klonierung des entsprechenden Sequenzbereiches in den Vektor pGEX-4T2 (Amersham Biosciences) vorausgegangen. Nach der Transformation der Konstrukte in *E.coli* TOP10F (2.2.7) wurden 5 ml LB-Medium (+100  $\mu$ g/ml Ampicillin) mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die Zugabe der Vorkultur zu 200 ml LB/Amp-Medium und die Inkubation bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6. Es folgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid) und die anschließende Inkubation von 2-4 Stunden bei 37°C im Schüttler. Die Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation sedimentiert (5000 Upm, 4°C, Sorvall A6.14) und konnten bis zur Reinigung der Proteine bei -20°C aufbewahrt werden.

#### Reinigung von GST-Fusionsproteinen

STE Puffer:	50 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 8 1 mM EDTA	

Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8
	10 mM red. Glutathion

Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde das Bakterienpellet mit 10 ml STE-Puffer gewaschen und nach Zentrifugation für 15 Minuten, bei 5000 Upm, 4°C erneut in 10 ml STE-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 100 µl Lysozym (10 mg/ml) und Protease-Inhibitoren (10µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 100 µg/ml PMSF) wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert, bei -20°C über Nacht eingefroren und nach dem Auftauen 2 ml Triton X-100 (10 % in PBS) zugegeben. Es folgte die Inkubation des Lysats für 20 Minuten auf Eis und die Sedimentation der Zelltrümmer für 15 Minuten, bei 15 000 Upm und 4°C (Sorvall A8.24). Der Überstand wurde zu 1 ml der zuvor mit STE-Puffer gewaschenen Glutathion-Sepharose gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C im Rotator wurde die Sepharose 5x mit STE-Puffer gewaschen und das Protein danach mit 1 ml Elutionspuffer für 30 Minuten bei 4°C im Rotator eluiert. Die Bestimmung von Menge und Reinheit der Proteine erfolgte im Anschluß durch SDS-PAGE (2.3.2) und anschließende Coomassie-Färbung (2.3.3) des Gels.

#### 2.3.6 Kopplung von Proteinen und Peptiden an NHS-Sepharose

Kopplungspuffer pH 7,5:	100 mM NaHCO3 500 mM NaCl
Waschpuffer I pH 8,0:	100 mM Tris/HCl 500 mM NaCl
Waschpuffer II pH 4,0:	100 mM Na-Acetat 500 mM NaCl

Für die Aufreinigung von Antikörpern oder Affinitätspräzipitationen war es notwendig Proteine oder Peptide kovalent an *NHS-aktivierte Sepharose* (Amersham-Biosciences) zu binden. Dazu wurde die Sepharose mit 1 mM HCl zweimal gewaschen (Zentrifugation bei 1500g für 3 Minuten bei 4°C) und dann eine entsprechende Menge des zu koppelnden Proteins oder Peptids (im Kopplungspuffer gelöst) zugesetzt. Die Kopplung erfolgte durch Inkubation der Sepharose und des Peptids bzw. Proteins über Nacht bei 4°C im Rotator. Am nächsten Tag wurde die Sepharose je dreimal mit den beiden Waschpuffern im Wechsel gewaschen (Zentrifugation jeweils bei 1500g für 3 Minuten bei 4°C). Die Lagerung der gekoppelten Sepharose erfolgte in Kopplungspuffer mit 20% Isopropanol.

### 2.3.7 Aufreinigung polyklonaler Antiseren

PBS: 137 mM NaCl 8,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,7 mM KCl 0,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4

Die Herstellung affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper war für den spezifischen Nachweis des entsprechenden Proteins in Western-Blot Analysen und besonders in cytochemischen Untersuchungen unerlässlich.

Nach der kovalenten Kopplung von 2 mg des aufgereinigten Antigens an 1 ml aktivierte NHS-Sepharose (2.3.6) wurde die gekoppelte Sepharose mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Antiserum bei 4°C im Rotator über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Zentrifugation der Sepharose bei 1500g und 4°C für 3 Minuten. Das Antiserum im Überstand wurde abgenommen und die Sepharose viermal mit PBS gewaschen. Die Elution des gebundenen Antikörpers von der Antigen gekoppelten Sepharose erfolgte durch Inkubation mit 5 ml 100 mM Glycin pH 3 für 5 Minuten bei RT. Die anschließende Zentrifugation (2 Min., 1500g, 4°C) diente der Trennung der Sepharose vom Eluat, welches jetzt den aufgereinigten Antikörper enthielt. Der gereinigte Antikörper wurde durch sofortige Zugabe von 1 ml 1M Tris/HCl pH 8 neutralisiert, für die weitere Verwendung gegen PBS dialysiert und bei -20°C gelagert.

#### 2.3.8 Immunpräzipitation aus transfizierten HEK293-Zellen

RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 0,5% (w/v) Na-Deoxycholat 5 mM EDTA 0,1% (w/v) SDS

2

Zwei bis drei Tage nach der transienten Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte die Zelllyse. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend nach Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren (100  $\mu$ M PMSF, 1  $\mu$ g/ml Pepstatin A, 10  $\mu$ g/ml Leupeptin) für 15 Minuten auf Eis lysiert. Mit Hilfe eines Glasstabs und anschließender Zentrifugation (5 Min., 14000 Upm, 4°C) wurden die Zelltrümmer entfernt. Der Überstand wurde mit einer entsprechenden Menge (2-5  $\mu$ l) Antikörper versetzt und die Probe für 1 Stunde bei 4°C rotiert. Danach erfolgte die Zugabe von 30  $\mu$ l *Protein A/G Plus Agarose* (Santa Cruz) und die Rotation des Gemisches für 1 Stunde bei 4°C. Die Agarose wurde durch Zentrifugation pelletiert (1 Min., 1500 Upm, 4°C) und fünfmal mit RIPA-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 40  $\mu$ l 1x Laemmli-Probenpuffer wurde die Probe für 5 Minuten gekocht. Die Analyse des Experiments erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE (2.3.2) und anschließendem Western-Blot (2.3.4).

#### 2.3.9 Affinitätspräzipitation mit Peptiden

Für die Affinitätspräzpitation wurde das Peptid GKAP kovalent an *NHS-aktivierte Sepharose*(Amersham-Biosciences) gekoppelt (2.3.6) und 30  $\mu$ l der GKAP-Sepharose mit 6 ml Probe für eine Stunde bei 4°C im Rotator inkubiert. Des weiteren wurde wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben verfahren.
## 2.3.10 Herstellung eines Proteinlysats aus dem Gehirn der Maus

DOC-Puffer (Husi und Grant 2001): 50 mM Tris/HCl 1% (w/v) Na-deoxycholat 50 mM Na-Fluorid 20 µM ZnCl 1 mM Na-Orthovanadat

Für die Herstellung eines Proteinlysats wurden drei Gehirne von zwei Monate alten Mäusen (*Mus musculus*) präpariert und mit Hilfe eines Potters in je 10 ml DOC-Puffer mit Protease-Inhibitoren (100  $\mu$ g/ $\mu$ l PMSF, 1  $\mu$ g/ml Pepstatin A, 10  $\mu$ g/ml Leupeptin) homogenisiert. Zur Solubilisierung der Proteine folgte eine 1,5-stündige Rotation der Probe bei 4°C. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (40 Min., 15000 Upm, 4°C) und der Überstand in 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Nach dem Aufkochen der Probe erfolgte die weitere Analyse durch SDS-PAGE (2.3.2) und Western-Blot (2.3.4).

## 2.3.11 Präparation der postsynaptischen Dichte aus dem Gehirn der Maus

Lösung A:	4 mM HEPES pH 7,4 0,32 M Saccharose 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 mM CaCl <sub>2</sub> Protease-Inhibitoren (Pepstatin A, Leupeptin, PMSF)
Lösung B:	4 mM HEPES pH 7,4 0,32 M Saccharose Protease-Inhibitoren (Pepstatin A Leupentin PMSE)
TritonX-Lösung:	<ul> <li>12 mM Tris-HCl pH 8,1</li> <li>0,32 M Saccharose</li> <li>1% Triton X100</li> <li>Protease-Inhibitoren (Pepstatin A, Leupeptin, PMSF)</li> </ul>

Zur Isolierung der postsynaptischen Dichte wurden die Gehirne zwei Monate alter sowie zwei Wochen alter Mäuse nach Zugabe von 3 bzw. 1ml Lösung A pro Gehirn mit Hilfe eines Potters homogensiert. Es folgte eine 10 Minuten andauernde Zentrifugation bei 1400 g und 4°C. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml Lösung A resuspendiert, der Überstand sowie die Resuspension vereinigt und für 10 Minuten bei 710g zentrifugiert. Die Sedimentation der Synaptosomen und Mitochondrien erfolgte durch einen weiteren Zentrifugationsschritt des Überstandes bei 13800g, 4°C für 15 Minuten. Das entstandene Pellet wurde in Lösung B (3 ml bzw. 1ml der Lösung pro verwendetem Gehirn der zwei Monate bzw. zwei Wochen alten Mäuse) resuspendiert und auf einen Saccharose-Stufengradienten aufgetragen. Der Stufengradient bestand aus drei Saccharoseschichten der Molaritäten 1,2, 1,0 und 0,85. Nach der anschließenden Zentrifugation (zwei Stunden bei 82500g) wurde die Fraktion der Synaptosomen zwischen der 1,2 M und 1 M Saccharoseschicht des Stufengradienten aufgefangen. Zur Gewinnung der postsynaptischen Dichte wurde die Synaptosomenfraktion mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig aus dem Stufengradienten isoliert, auf 15 ml mit Lösung B aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen TritonX-Lösung rotierend für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Sedimentation der 92800g. Die sedimentierte PSD wurde in 300-500 µl Lösung B aufgenommen, in kleinen Aliquots mit Hilfe flüssigem Stickstoffs schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

## 2.4.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Versene-Puffer:	137 mM NaCl
	8,8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,7 mM KCl
	0,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 mM EDTA, pH 7,4

Die Kultivierung der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 (ATCC) erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FKS, Biother) bei 37°C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Zum Passagieren wurden semikonfluent bewachsene 10 cm-Zellkulturschalen (Nunc) einmal mit sterilem Versene-Puffer gewaschen und mit 1 ml 0,25 % Trypsin (Invitrogen) in Versene-Puffer inkubiert. Nach Inkubation der Zellen bis zur Ablösung von der Zellkulturschale folgte das Abstoppen der Trypsin-Wirkung durch Zugabe von 9 ml Medium. Die Zellsuspension wurde anschließend mit frischem DMEM 1:10 verdünnt und in neue Zellkulturschalen überführt. Das Passagieren der Zellen wurde alle 4 Tage wiederholt.

## 2.4.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

(Sambrock et al., 1989)

- 2x HEBS: 280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12 mM Dextrose 50 mM HEPES, pH 7,05
- PBS: 137 mM NaCl 8,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,7 mM KCl 0,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

Die transiente Transfektion ist eine Methode für den Transfer von Plasmid-DNA in Zellkultur-Zellen. Es findet keine Selektion der plasmidtragenden Zellen statt, so dass der Zeitraum, in dem die Plasmid-DNA in den Zellen verbleibt, begrenzt ist. Es kommt zu einem temporären Anstieg der Konzentration des Fremd-Proteins innerhalb der Zelle.

Zur Transfektion der HEK293-Zellen nach der 2x HEBS-Methode wurden die Zellen 24 Stunden vor der Transfektion in einer Dichte von 1 x  $10^6$  Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale ausgesät und über Nacht kultiviert. 10 µg Plasmid-DNA wurden anschließend mit 65 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> vermischt und auf 500 µl mit sterilen Wasser aufgefüllt. Nach Zugabe von 500 µl 2x HEBS folgte das Vermischen der Suspension mit Hilfe eines "Vortexers" für ca. 15 Sekunden.

Während einer 20-40-minütigen Inkubation bei RT bildeten sich DNA-Calciumphosphat-Präzipitate, die dann tröpfchenweise zu den ca. 50 % konfluent gewachsenen Zellen gegeben wurden. Nach spätestens 20 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Zellen zur Entfernung des überschüssigen Präzipitats drei- bis viermal mit PBS gewaschen wurden. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen für die Affinitätspräzipitationen (2.3.8) geerntet.

## 2.4.3 Kultivierung primärer Hippokampusneurone

(Brewer et al. 1993)

Plattiermedium:	MEM (Gibco) 0,6 % Glucose (w/v) 10 % Pferdeserum (v/v)
Boratpuffer:	0,05 M Borsäure 0,02 M Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>

## pH 8,5

Die Kultivierung primärer Hippokampusneurone erfolgte mit Hilfe von Neurobasal-Medium (Gibco). Für die Präparation wurden die Gehirne 18 Tage alter Rattenembryonen (Tag der Befruchtung: E0), Stamm Wistar, aus der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verwendet. Die Hippokampi wurden aus den kortikalen Hemisphären der Gehirne nach vorheriger Entfernung der Meningen isoliert und in 1x HBSS (*Hanks` balanced salt solution*, Gibco) gesammelt. Nach Zugabe von 0,25% (w/v) Trypsin folgte die Inkubation der Zellen für 20 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln im Wasserbad. Zur Sedimentation der Neurone wurden diese für 5 Minuten erschütterungsfrei stehengelassen, anschließend der Überstand abgenommen und mit 10 ml frischem 1x HBSS gewaschen. Nach dreimaliger Wiederholung des Waschschrittes folgte die Entfernung des Überstandes bis auf 2 ml und die Trituration der Zellen mit einer feuerpolierten Pasteurpipette zur mechanischen Vereinzelung. Die Wiederholung des Vorgangs mit einer zweiten Pasteurpipette, die eine verengte Öffnung aufwies, erhöhte die Effizienz der Zellvereinzelung. Danach wurde die Zellsuspension mit Plattiermedium auf 12 ml aufgefüllt und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Kultivierung der primären Neurone erfolgte auf Deckgläsern (Ø 18 mm, Marienfeld), die zuvor für 4 Stunden in 100% Ethanol gewaschen, danach zweimal mit destilliertem Wasser gespült und zur Sterilisation über Nacht bei 200°C gebacken wurden. Um ein optimales Anheften der Zellen zu erreichen wurden die Deckgläser für 2 Stunden mit 1 mg/ml Poly-L-Lysin in Boratpuffer pH 8,5 beschichtet.

Die Neurone wurden in einer Dichte von 1,4-2 x  $10^5$ Zellen/ml in einer 12-Lochplatte ausgesät und für 3 Stunden bei 37°C in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel zu Neurobasal-Medium mit 2% (v/v) B-27 Supplement (Gibco), 0,5 mM L-Glutamin und 25 µM Glutamat. Die Zugabe von Glutamat zum Medium fand nur am Tag der Präparation statt. Die Neurone konnten bis zu 3 Wochen in Kultur gehalten werden, wobei zweimal die Woche die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt wurde. Zwei bis drei Tage nach der Präparation wurden dem Medium 3 µM Ara-C zugesetzt um das Wachstum von nicht-neuronalen Zellen zu hemmen.

Die Präparation der Hippokampusneurone aus der Maus erfolgte am Postnataltag 1 und wurde analog zu dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt.

## 2.4.4 Transfektion primärer Hippokampusneurone

2x BBS Puffer:	50 mM BES
	80 mM NaCl
	1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO4
	рН 6,90-6,96

Die Transfektion der primären Neurone erfolgte entweder einen Tag oder 7 Tage nach der Präparation mittels der 2x BBS-Methode, die auf der Calciumphosphat-Präzipitation beruht. In einem Reaktionsgefäß wurden 2-10  $\mu$ g Endotoxin-freie Plasmid-DNA (siehe 2.2.9) und 10  $\mu$ l 2,5 M CaCl<sub>2</sub> mit sterilem Wasser auf 100  $\mu$ l Endvolumen aufgefüllt. Die tropfenweise Zugabe von 100 $\mu$ l 2x BBS-Puffer zu dem DNA/CaCl<sub>2</sub>-Gemisch erfolgte unter starkem Vortexen. Zur Ausbildung der DNA-Calciumphosphat-Präzipitate wurde der Ansatz für 20-40 Minuten bei RT stehengelassen und danach je 100  $\mu$ l des Ansatzes zu einem mit Neuronen bewachsenen Deckglas gegeben. Die Zellen wurden für 1-3 Stunden bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert, bevor zur Entfernung des Präzipitats viermal mit 1x HBSS gewaschen wurde. Nach Zugabe von 1 ml frischem Neurobasal-Medium pro Deckglas folgte die Kultivierung der Neurone für maximal 7 weitere Tage.

### 2.4.5 Immuncytochemie primärer Hippokampusneurone

Mowiol:	20 g Mowiol 4-88 (Hoechst)		
	80 ml PBS		
	über Nacht bei Raumtemperatur rühren lassen		
	40 ml Glycerin (reinst) zugeben und über Nacht rühren lassen, Zentrifugation		
	für 1h bei 31000 Upm bei Raumtemperatur; den Überstand abnehmen und im		
	Dunkeln bei 4° C lagern		
Dlaighachutz:	2.5 g.n. Dronylgallet		
Dielciischutz.	2,5 g n-riopyiganat		
	50 ml DDS		

50 ml PBS 50 ml Glycerin (reinst) über Nacht rühren lassen und bei 4° C im Dunkeln lagern Mowiol und Bleichschutz wurden vor Verwendung im Verhältnis 3:1 gemischt

Die Fixierung der primären Neurone erfolgte entweder für 7 Minuten mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS bei RT oder mit eiskaltem Methanol für 10 Minuten bei -20 °C. Bei der Fixierung mit Paraformaldehyd war es notwendig die Neurone für 2 Minuten mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS zu permeabilisieren. Nach dreimaligem Waschen der fixierten Neurone mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch 2% Pferdeserum (Gibco) in PBS für 1 Stunde blockiert. Die Inkubation der Zellen mit dem Erstantikörper erfolgte entsprechend verdünnt in ebenfalls 2% Pferdeserum/PBS für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Zweitantikörper verdünnt in 2% Pferdeserum/PBS zu den Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde im Dunkeln bei RT. Abschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen in Mowiol/Bleichschutz eingebettet.

## 2.4.6 Herstellung einer homozygoten IRSp53 knock out-Maus durch die Gene-Trap Mutagenese

Der embryonale Stammzellklon XG757 mit einer Insertion des Gene-Trap Vektors nach Exon3 des **IRSp53-Genoms** wurde vom "BayGenomics Consortium" (http://baygenomics.ucsf.edu) bezogen und von Irm Hermans-Borgmeyer (ZMNH) durch Mikroinjekton in murine Blastocysten transferiert. Die erfolgreich mikroinjizierten Blastocysten wurden anschließend in den Uterus scheinschwangerer Weibchen der Mauslinie C57BL eingepflanzt. Die chimären Nachkommen waren anhand des dominant vererbten agouti-Gens, welches bei den Mäusen eine grau-braune Fellfarbe hervorruft, identifizierbar. Zur Verifizierung der Keimzelltransmission des transgenen IRSp53-Gens folgte die Verpaarung der agouti-farbenen, männlichen Nachkommen mit schwarzen C57BL-Weibchen. Die heterozygoten, agouti-farbenen Nachkommen dieser Verpaarung wurden dann zur Gewinnung von homozygoten Mäusen miteinander verpaart. Die weitere Haltung und Zucht der Mäuse erfolgte in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

#### 2.4.7 Perfusion von Mäusen

Die Perfusion des gesamten Mausorganismus mit 4% (v/v) Paraformaldehyd in PBS diente der Fixierung sämtlicher Organe für die anschließenden (Immun)histologischen Untersuchungen.

Nach der Narkotisierung der Maus mit 12% Chloralhydrat (Sigma) in einer Konzentration von 10  $\mu$ l/g des Mausgewichtes wurde die Maus in Rückenlage fixiert und das Herz freigelegt. Die Entfernung des Bluts aus dem Gefäßsystem der Maus erfolgte durch die Einleitung von PBS mit einer Kanüle in die linke Herzkammer und durch das anschließende

Aufzupfen des rechten Vorhofs mit einer spitzen Pinzette. Zur Fixierung des Gewebes wurde nachfolgend mit 4 % (v/v) Paraformaldehyd/PBS für ca. 5 Minuten perfundiert. Es folgte die Entnahme der gewünschten Organe und die Inkubation der Organe in 4% (v/v) Paraformaladehyd/PBS zur Nachfixierung über Nacht.

## 2.4.8 Kryokonservierung perfundierter Mausgewebe

Zur Kryokonservierung der perfundierten Organe (siehe 2.4.7) wurden diese in 10% (w/v) Saccharose/PBS bis zum Absinken des Organs auf den Gefäßgrund inkubiert. Die Wiederholung dieser Inkubation erfolgte in 20 % (w/v) und anschließend in 30 % (w/v) Saccharose/PBS. Die Organe wurden danach in Tissue-Tek<sup>®</sup> (Sakura) eingebettet, auf Trockeneis durchgefroren und zur längerfristigen Lagerung bei -80 °C aufbewahrt.

## 2.4.9 β-Galaktosidase-Färbung von Gewebeschnitten

Lösung A:	$5 \text{mM K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$
	$5 \text{mM K}_4 \text{Fe}(\text{CN})_6$
	2mM MgCl <sub>2</sub>
	0,02 % NP40
	0,01 % Deoxycholat

40x X-Gal-Lösung: 0,4 g X-Gal 100 ml DMSO

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung erfolgte an Gewebeschnitten, die zuvor in einer Stärke von 12  $\mu$ m am Kryostaten (Microm HM 560) hergestellt, anschließend auf Objektträger (Marienfeld) transferiert und über Nacht getrocknet wurden.

Nach dem Spülen der Gewebeschnitte mit 1x PBS erfolgte die Zugabe des  $\beta$ -Galaktosidase-Subtrats X-Gal zu der vorgewärmten Lösung A in einfacher Konzentration. Die auf den Objektträgern fixierten Schnitte wurden nun mit 3 ml des LösungA/X-Gal-Gemisches versetzt und bei 37°C inkubiert, bis die Umsetzung des X-Gal-Substrats durch das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff sichtbar wurde (30 Minuten bis 24 Stunden). Das anschließende Spülen der auf den Objektträger fixierten Schnitte mit 1x PBS und das zweimalige Waschen mit deionisiertem Wasser für 2 Minuten diente dem Abstoppen der Enzymreaktion. Nach der Trocknung des Gewebeschnittes auf dem Objektträger folgte die Einbettung in 80 µl Permafluor (PerkinElmer) und das Eindeckeln der Schnitte mit 0,1 mm dicken, rechteckigen Deckgläsern (Marienfeld).

## 2.4.10 Immunhistochemie

```
Blockierlösung: 3% (v/v) Ziegenserum
0,3 %(v/v) TritonX-100
gelöst in 1x PBS
```

Für die immunologische Detektion bestimmter Proteine im Gewebe wurden 12  $\mu$ m dicke Gewebeschnitte am Kryostaten (Microm HM 560) hergestellt und über Nacht auf Objektträgern (Marienfeld) getrocknet, was eine bessere Haftung der Schnitte auf den Glasträgern gewährleisten sollte. Die Inkubation der Gewebeschnitte mit der Blockierlösung für 30 Minuten diente der Permeabilisierung des Gewebes sowie der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Nach Inkubation der Schnitte mit dem Erstantikörper, verdünnt in 3% Ziegenserum (v/v)/PBS, für 2 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C wurden diese dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Detektion des Erstantikörpers erfolgte durch die Zugabe eines Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpers, verdünnt in 3% Ziegenserum (v/v)/PBS für 1 Stunde bei RT im Dunkeln. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen der Gewebeschnitte mit 1x PBS für 5 Minuten entfernt und die Schnitte anschließend in Permafluor (PerkinElmer) eingebettet. Das Eindeckeln der Gewebeschnitte erfolgte mit rechteckigen, 0,1 mm dicken Deckgläsern (Marienfeld).

#### 2.4.11 Hematoxylin-Färbung von Gewebeschnitten

Die Färbung der Zellkerne innerhalb des Gewebes erfolgte mittels Mayer's Hematoxylin-Lösung im Anschluss an die  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung (siehe 2.4.9) nach dem Abstoppen der Enzymreaktion. Dazu wurden die 12  $\mu$ m dicken, auf einen Objektträger fixierten Gewebeschnitte für 30 Sekunden mit einem 1:1 Gemisch aus Mayer's Hematoxylin-Lösung und deionisiertem Wasser inkubiert. Das viermalige Waschen der Objektträger mit Wasser entfernte nicht gebundenen Farbstoff, so dass die Objektträger anschließend in Permafluor (PerkinElmer) eingebettet sowie mit entsprechenden Deckgläsern eingedeckelt werden konnten.

## 2.4.12 Mikroskopische Arbeitstechniken

Die Analyse der cytochemisch gefärbten Zellen bzw immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte erfolgte mit Hilfe eines Axiovert 135-Fluoreszenzmikroskops (Zeiss) und einer CCD C4742-95-12NRB Digital Kamera (Hamamatsu) unter Verwendung der Software Openlab 2.2.5 (Improvision). Es wurden ein N2.1-Filter (Anregung 515-560 nm, Emission 580 nm, Zeiss) sowie ein L5-Filter (Anregung 480 nm, Emission 505 nm, Zeiss) eingesetzt.

Alternativ wurde für die cytochemich gefärbten Zellen ein konfokales Laserscan Mikroskop (Leica DM IRBE) und die Software LSM 3.96 verwendet. Es kamen ein Helium-Neon-Laser (Anregung 543, Emission 570 nm) und ein Argon-Laser (Anregung 488 nm, Emission 510-525 nm) zum Einsatz.

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen der  $\beta$ -Gal-gefärbten Gewebeschnitte wurde das Leica WILD M3Z Mikroskop benutzt.

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit dem Programm AdobePhotoshop 6.0 (Adobe System Incorporated).

### 2.4.13 Elektronenmikroskopie

Karnowsky-Fixanz:	2% (w/v) Paraformaldehyd
	2,2% (v/v) Glutaraldehyd
	gelöst in 1x PBS

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Gehirnschnitte wurden die Mäuse mit Karnowsky-Fixanz perfundiert (2.4.7) und das entnommene Gehirn in 15 ml Karnowsky-Fixanz für 24 Stunden nachfixiert. Es folgte die Inkubation der Gehirne in 1x PBS/0,02 % Naazid für 48 Stunden. Dieser Vorgang wurde zweimal mit frischen 1x PBS/Na-azid wiederholt. Die Herstellung sowie Präparation der Gewebeschnitte und die Elektronenmikroskopie fanden in der AG Böckers am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Ulm statt.

## 3. Ergebnisse

## 3.1 Analyse der Funktion von IRSp53.1 in primären, kultivierten Hippokampusneuronen der Ratte

## 3.1.1. Effekte der Überexpression verschiedener IRSp53-Expressionskonstrukte auf die Morphologie von Hippokampusneuronen

IRSp53.1 wird durch die Interaktion mit PSD-95 und Shank1-3 in der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen verankert und könnte so eine wichtige Rolle in der neuronalen Plastizität spielen (Soltau et al. 2004, Bockmann et al. 2002). Bereits 2003 konnte ein Effekt von IRSp53.1 auf die Morphologie von Neuronen nachgewiesen werden. Die Überexpression des IRSp53.1-Gesamtkonstrukts (AS 1-521, Abb.3.1) in Hippokampusneuronen resultierte dabei in einem vermehrten Auswachsen von Neuriten und einer Verlängerung der dendritischen Dornen (Soltau, Dissertation 2003).

Zur weiterführenden Untersuchung der Funktion der einzelnen Domänen von IRSp53.1 für die Morphologie von Neuronen wurden vier verschiedene Expressionskonstrukte (Abb.3.1) hergestellt und in primären kultivierten Hippokampusneuronen der Ratte überexprimiert.



Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von IRSp53.1 und der verwendeten Deletionskonstrukte zur Untersuchung der Funktion der einzelnen Domänen für die neuronale Morphologie.

Das Konstrukt IRS-IMD kodiert für die Protein-Sequenz der N-terminalen IM-Domäne (IMD), welche direkt an filamentöses Aktin bindet und damit sowohl zur Bündelung von F-Aktin *in vitro* als auch zur Ausbildung von Filopodien *in vivo* beitragen kann (Yamagishi et al. 2004). Aufgrund der Interaktion der kleinen GTPase Cdc42 mit der CRIB-Domäne von IRSp53 vermuten Soltau et al. (2002), dass das kleine G-Protein möglicherweise regulierend auf die Konformation und die Interaktionsaktivität von IRSp53 wirkt. Diese Domäne wurde in dem IRSΔCRIB-Konstrukt deletiert. Bei dem IRSΔSH3-Konstrukt fehlt die SH3-Domäne,

die eine wichtige Verbindung zu verschiedenen Proteinen des Aktin-Cytoskeletts wie z. B. WAVE2 und Mena darstellt (Miki et al. 2000, Krugmann et al. 2001). Alle Konstrukte enthalten zur weiteren Detektion einen *Flag-tag*. Primäre Hippokampusneurone wurden sieben Tage nach der Präparation mit jeweils einem der Expressionskonstrukte von IRSp53 und EGFP zusammen oder mit EGFP allein transfiziert. Überexprimiertes EGFP verteilt sich gleichmäßig im Cytoplasma und macht dadurch sämtliche Konturen der Zelle sichtbar. Weitere sieben Tage nach der Transfektion (T*iv* 14) wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und die überexprimierten *Flag*-Fusionsproteine mit einem *Flag*-Antikörper detektiert. EGFP wurde anhand seiner Autofluoreszenz und zur Verstärkung des Signals mit Hilfe eines EGFP-Antikörpers nachgewiesen.

3

Das überexprimierte Gesamtkonstrukt IRSp53.1 verteilte sich wie EGFP diffus im Cytoplasma der Zelle. Im Vergleich zu den mit EGFP transfizierten Neuronen zeigten die IRSp53.1 überexprimierenden Zellen eine deutlich höhere Anzahl der Primärdendriten, die direkt aus dem Zellkörper der Neurone herauswachsen, und einen Anstieg der dendritischen Verzweigungen (Abb. 3.2A). Auch bei der Überexpression der N-terminalen IM-Domäne kam es zu einer Zunahme der Anzahl von Primärdendriten und dendritischen Verzweigungen im Vergleich zu den EGFP exprimierenden Kontrollneuronen. Die Neurone zeigten eine ähnliche Morphologie wie die IRSp53.1 exprimierenden Zellen (Abb. 3.2A). Im Gegensatz hierzu war die Anzahl der dendritischen Verzweigungen bei den IRSp53ΔSH3 exprimierenden Hippokampusneuronen stark reduziert. Verglichen mit den EGFP exprimierenden Neurone resultierte die Überexpression des IRSp53.1-Konstrukts mit deletierter CRIB-Domäne (IRSΔCRIB) in einer sehr deutlichen Zunahme der dendritischen Verzweigungen. Diese Neurone waren stärker verzweigt als die das Gesamtkonstrukt IRSp53.1 überexprimierenden Neurone (Abb. 3.2A).

Zur quantitativen Erfassung dieser morphologischen Veränderungen wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder der transfizierten Neurone erstellt und die Anzahl der Dendriten sowie die Anzahl der dendritischen Verzweigungen ausgezählt. Dabei wurde ein Bereich von 175 x 175 µm aufgenommen und der Zellkörper der Neuronen in der Bildmitte platziert. Um vergleichbare Datensätze zu erlangen erfolgte die Aufnahme der zu analysierenden Bilder ausschließlich im grünen (EGFP-) Kanal und die Bearbeitung der Bilder mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop 6.0.

39



Abb. 3.2.: Morphologische Effekte der Überexpression von IRSp53.1 und verschiedener IRSp53-Deletionskonstrukte in Hippokampusneuronen der Ratte. A: Die Neuronen wurden am Tiv 7 mit den verschiedenen IRSp53-Konstrukten im pCMV(*Flag*)-Vektor sowie einem pEGFP-Konstrukt kotransfiziert, am Tiv 14 fixiert und die *Flag*-Fusionsproteine mit einem monoklonalen *Flag*-Antikörper detektiert. In den Bildern hier ist das Fluoreszenzsignal des koexprimierten EGFP dargestellt, was durch einen polyklonalem EGFP-Antikörper verstärkt wurde (grün) (weißer Balken = 10µm). B: Zur Quantifizierung der Verzweigungspunkte pro Dendrit wurden n = 50 Neurone aus 3-4 verschiedenen Chargen ausgezählt. \* p< 0,00001: signifikanter Unterschied zum Wert der EGFP-transfizierten Kontrollneuronen.

Insgesamt wurden je Expressionskonstrukt 10 Neurone aus 3-4 verschiedenen Präparationschargen analysiert und die statistische Signifikanz durch den T-Test kontrolliert. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind durch ein Balkendiagramm in Abbildung 3.2B dargestellt. Die Kontrollneuronen, welche lediglich mit EGFP transfiziert wurden, hatten durchschnittlich 4 Verzweigungen pro Dendrit unter den hier analysierten Bedingungen. Es zeigte sich, dass die Überexpression des IRSp53.1-Gesamtkonstrukts zu einem 4-fachen Anstieg der Verzweigungen pro Dendrit im Vergleich zur Kontrollsituation der EGFP exprimierenden Neuronen führte. Die Expression der N-terminalen IM-Domäne resultierte in einem ähnlich starken Anstieg der Verzweigungen, er lag mit durchschnittlich 23 Verzweigungen/Dendrit beim 5-fachen des Kontrollwertes. Bei den IRS∆SH3 überexprimierenden Neuronen wurden ungefähr 1,5 Verzweigungen pro Dendrit gezählt. Dies entspricht einer Reduktion der dendritischen Verzweigungen von ca. 60% verglichen mit den EGFP exprimierenden Zellen. Die Analyse der IRSACRIB exprimierenden Neuronen ergab eine durchschnittliche Anzahl von 36 Verzweigungen pro Dendrit. Damit zeigte sich hier ein 9-facher Anstieg der Verzweigungen im Vergleich zu den Kontrollneuronen und außerdem ein Anstieg um das 2-fache im Vergleich zu den IRSp53.1 überexprimierenden Neuronen. Die Überexpression des IRSp53ACRIB-Konstruktes induzierte somit das Auswachsen dendritischer Verzweigungen von allen hier untersuchten Konstrukten am stärksten. Die Deletion der SH3-Domäne innerhalb des IRSp53-Konstruktes verhinderte dagegen bei Überexpression in den Neuronen die Ausbildung dendritischer Verzweigungen fast vollständig.

## 3.1.2. Effekte der Überexpression verschiedener IRSp53-Expressionskonstrukte auf die Morphologie der dendritischen Dornen von Hippokampusneuronen

Die Überexpression von IRSp53.1 wirkte sich nicht nur auf die Verzweigungen der Dendriten, sondern auch auf die Morphologie der kleinen Fortsätze auf den Dendriten, der dendritischen Dornen aus. In mehreren *in vitro* Studien an kultivierten Hippokampusneuronen konnten morphologische Veränderungen an den dendritischen Dornen im Laufe der Kultivierung beobachtet werden. Sie sind innerhalb der ersten 1-2 Wochen der Kultivierung vorwiegend filopodienförmig und werden im weiteren Verlauf der Entwicklung durch einen immer größeren Anteil an pilzförmigen Dornen ersetzt (Papa et al. 1995; Ziv und Smith 1996).

3

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen IRSp53-Expressionskonstrukte auch einen Effekt auf die Morphologie der dendritischen Dornen haben, wurden die Dornen der in Abschnitt 3.1.1. untersuchten Neurone analysiert. Es wurde ein konfokales Mikroskop verwendet, da die Auflösung eines normalen Fluoreszenzmikroskops zur Darstellung der dendritischen Dornen nicht ausreichte.

Wie in Abbildung 3.3 sichtbar und von Soltau (2003) bereits gezeigt resultierte die Überexpression des IRSp53.1-Gesamtkonstruktes im Vergleich zu den EGFP exprimierenden Kontrollneuronen in einer Verlängerung der dendritischen Dornen. Die Überexpression der N-terminalen IM-Domäne führte zu einer ähnlichen morphologischen Veränderung, auch hier bildeten sich verlängerte dendritische Fortsätze. Die IRSΔCRIB exprimierenden Neuronen zeigten noch längere dendritische Ausläufer als die Fortsätze der IRSp53.1 überexprimierenden Zellen und waren damit kaum von dendritischen Verzweigungen unterscheidbar. Im Gegensatz dazu waren bei den IRSΔSH3 exprimierenden Neuronen die dendritischen Dornen als sehr kurze, rudimentäre Fortsätze nachweisbar, die in einer sehr geringen Dichte auf dem Dendriten angeordnet waren (Abb. 3.3).

Um eine quantitative Aussage über die Dichte der dendritischen Dornen zu treffen, wurden die Dornen ausgezählt und die Anzahl der Dornen auf einem dendritischen Abschnitt von 10 µm bestimmt. Aus 3-4 verschiedenen Präparationen wurden je 10 Neurone pro Expressionskonstrukt ausgezählt. Die dendritischen Fortsätze der IRS-IMD und IRSACRIB exprimierenden Neuronen konnten in diese Analyse nicht miteinbezogen werden. Aufgrund ihrer Länge war es nicht mehr möglich die dendritischen Fortsätze von dendritischen Verzweigungen zu unterscheiden. Die Auszählung ergab für die EGFP exprimierenden Kontrollneuronen eine durchschnittliche Anzahl von 2,6 dendritischen Dornen pro 10 µm Dendritenlänge. Die Überexpression von IRSp53.1 führte im Vergleich zu der Kontrollsituation zu einem 1,5-fachen Anstieg der Dornendichte auf einen Wert von 3,8 pro 10 μm. Für die IRSΔSH3 exprimierenden Neuronen wurden durchschnittlich 0,6 dendritische Dornen auf einem Abschnitt von 10 µm bestimmt. Dies entspricht einer Reduzierung der Dornendichte auf das 0,2-fache bezüglich der EGFP exprimierenden Kontrollneuronen. Die Überexpression des Gesamtkonstruktes IRSp53.1 resultierte damit in der Ausbildung filopodienartiger Ausläufer und einer leichten Zunahme der Dichte dieser Ausläufer entlang des Dendriten. Die Deletion der SH3-Domäne innerhalb des IRSp53-Konstruktes führte dagegen bei Überexpression zu einer deutlich verminderten Anzahl rudimentärer, dendritischer Fortsätze.



Abb. 3.3: Effekte der Überexpression von IRSp53.1 und verschiedener IRSp53-Deletionskonstrukte auf die Morphologie der dendritischen Dornen. A: Die dendritischen Fortsätze der in Abb. 3.2 bereits beschriebenen Neurone wurden konfokal mikroskopisch analysiert (weißer Balken = 10  $\mu$ m). B: Zur Quantifizierung des Ergebnisses wurden jeweils n = 10 Neurone aus 3-4 verschiedenen Chargen ausgezählt. \* p < 0,001; \*\* p < 0,0001: signifikanter Unterschied zum Wert der EGFP-transfizierten Kontrollneurone.

#### 3.1.3. Effekt der Überexpression von IRSp53.1 auf die Bildung von PSD-95-Clustern

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob die bei Überexpression von IRSp53.1 induzierte Bildung dendritischer Verzweigungen und filopodienartiger Ausläufer zu einer Fehlbildung der Synapsen führt. Daher wurde der Einfluss von überexprimiertem IRSp53.1 auf die Ausbildung von endogenen PSD-95-*Clustern* untersucht. PSD-95 fungiert in der Postsynapse als Brückenprotein zwischen dem NMDA-Rezeptor und Shank1 und stellt damit ein Markerprotein der postsynaptischen Dichte (PSD) dar. Die korrekte Ausbildung der PSD gilt als Indiz für eine funktionsfähige Synapse. Es wurden primäre Hippokampusneurone nach sieben Tagen in Kultur mit IRSp53.1 im Vektor pcDNA6 transfiziert und nach weiteren sieben Tagen (T*iv* 14) fixiert. Die Detektion des endogenen PSD-95 erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen PSD-95-Antikörpers während das überexprimierte IRSp53.1 mit einem polyklonalen IRSp53-Antikörper nachgewiesen wurde. Die Dokumentation der gefärbten Neurone erfolgte mittels des konfokalen Mikroskops und anschließender Bearbeitung der Bilder mit dem Programm Adobe Photoshop 6.0.

In untransfizierten Hippokampusneuronen ist die Postsynapse nach etwa zwei Wochen ausgereift und PSD-95 ließ sich in Form vieler Aggregate entlang des Dendriten nachweisen. Endogenes IRSp53 kolokalisierte mit den PSD-95-*Clustern* (Abb. 3.4A). Nach der Überexpression von IRSp53.1 kam es zur Ausbildung zahlreicher filopodienartiger Ausläufer entlang der Dendriten und IRSp53 war im gesamten Cytoplasma gleichmäßig verteilt. Wie in Abbildung 3.4B erkennbar war die Anzahl der PSD-95-*Cluster* in den Neuronen, die IRSp53.1 überexprimieren, stark reduziert. Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurden Abschnitte der primären Dendriten von 25 µm am konfokalen Mikroskop aufgenommen und die Anzahl der PSD-95-*Cluster* gezählt. In die Untersuchung gingen 20 Abschnitte von 5 verschiedenen Neuronen je Gruppe ein. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests überprüft.

Untransfizierte Neurone besitzen durchschnittlich 16,3 PSD-95- *Cluster* auf einem Dendriten-Abschnitt von 25 µm, während bei den IRSp53.1 überexprimiernden Neuronen nur noch 4,15 *Cluster* vorhanden waren. Dies entspricht einer Abnahme um den Faktor 3,9 (Abb. 3.4C). Die Daten geben einen Hinweis darauf, dass bei der Überexpression von IRSp53.1 die Ausbildung der postsynaptischen Dichte stark beeinträchtigt wird.



Abb. 3.4: Effekt der Überexpression von IRSp53 auf die Bildung von PSD95-Clustern in primären Hippokampusneuronen. A: primäre Hippokampusneurone wurden am Tiv7 mit IRSp53.1 im Vektor pcDNA6 transfiziert und nach Tiv14 fixiert. Die Detektion von endogenem PSD-95 erfolgte mit monoklonalem PSD-95-Antikörper (rot) und der Nachweis von IRSp53.1 mit einem polyklonalem IRSp53-Antikörper (grün). B: Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen derselben Charge (weißer Balken = 5  $\mu$ m). C: Zur Quantifizierung des Ergebnisses wurden die PSD-95-Cluster auf n = 20 dendritischen Abschnitten von 25  $\mu$ m Länge aus 5 verschiedenen Neuronen gezählt. \* p < 0,0001: signifkanter Unterschied zum Wert der untransfizierten Kontrollneuronen.

## 3.2 Untersuchungen zur Regulation der Shank/IRSp53-Interaktion

## 3.2.1. Einfluss der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren PIX, Kalirin-7 und Intersectin auf die Interaktion von IRSp53 mit Shank in transient transfizierten HEK293-Zellen

IRSp53 wurde bereits 2002 als Interaktionspartner der Shank-Proteine in der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen identifiziert (Bockmann et al. 2002, Soltau et al. 2002). Die Regulation dieser Interaktion erfolgt durch die GTP-gebundene, aktivierte Form der kleinen GTPase Cdc42, welche im GTPase-Zyklus durch unterschiedliche Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) von der inaktiven, GDP-gebundenen in die aktive, GTP-gebundene Form überführt wird. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Funktion der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren PIX, Kalirin-7 und Intersectin bezüglich der IRSp53/Shank-Interaktion untersucht.

 $\alpha$ - und  $\beta$ -PIX kommen als potentielle Regulatoren der IRSp53/Shank-Interaktion in Frage, da sie im Gehirn von Säugern stark exprimiert sind und  $\beta$ -PIX mit Shank in der postsynaptischen Dichte interagiert (Park et al. 2003). Zur Analyse des Effekts von PIX auf die Shank/IRSp53-Interaktion wurden HEK293-Zellen transient mit den Konstrukten ShankpEGFP.C1, IRSp53pcDNA6/*Myc*-His.C und  $\alpha$ -PIXpCMV*Flag* bzw.  $\beta$ -PIXpcDNA3T7 transfiziert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit den Shank- sowie IRSp53-Konstrukten und den Leervektoren pCMV*Flag* bzw. pcDNA3T7 transfiziert.

Nach der Zelllyse wurden die Shank-Proteine mit Hilfe des C-terminalen Peptids des Proteins GKAP, das kovalent an NHS-Sepharose gekoppelt war, präzipitiert. Das Protein GKAP bindet mit seinem C-Terminus an die PDZ-Domäne der Shank-Proteine (Soltau et al. 2002). Der Nachweis der Proteine im Zelllysat und Präzipitat erfolgte nach SDS-PAGE im Western-Blot mit spezifischen monoklonalen *Myc*/T7/*Flag*- sowie polyklonalem Shank<sub>PDZ</sub>-Antikörpern (Abb. 3.5). Es ist zu erkennen, dass sich Shank mit der GKAP-Sepharose gut präzipitieren ließ und daran gebundenes IRSp53 kopräzipitierte.  $\beta$ -PIX war ebenfalls im Päzipaitat nachweisbar, da es mit der PDZ-Domäne von Shank interagieren kann. Trotz der Ausbildung eines tertiären Komplexes aus Shank, IRSp53 und  $\beta$ -PIX im HEK293-Zellsystem war zwischen den Zelllysaten, in denen die Leervektoren der PIX-Konstrukte koexprimiert waren und den PIX exprimierenden Zellen kein Unterschied in der Menge des kopräzipitierten IRSp53 nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion von Shank und IRSp53 in Anwesenheit von überexprimierendem PIX im Zellsystem nicht beeinflusst wird. Die Menge des kopräzipitierten IRSp53 blieb auch bei der Kotransfektion von Cdc42 in



pcDNA3T7 und bei vorheriger Inkubation der Zellen in serumfreien Medium unverändert (Daten nicht gezeigt).

Abb. 3.5: Effekt des Guaninnukleotid-Austauschfaktors PIX auf die Shank/IRSp53-Interaktion in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit den Konstrukten ShankpEGFP (S), IRSp53pcDNA6*Myc*-His.C (I) und  $\alpha$ -PIXpCMV*Flag* ( $\alpha$ ) bzw.  $\beta$ -PIXpcDNA3T7 ( $\beta$ ) kotransfiziert. Nach der Lyse der Zellen wurde Shank mit GKAP-Sepharose präzipitiert und das Zelllysat (In) sowie das Präzipitat (P) im Western-Blot analysiert. Als Negativkontrolle wurden statt der PIX-Konstrukte die entsprechenden Leervektoren (V) verwendet. Der Nachweis von Shank bzw. IRSp53 erfolgte im Western-Blot mit polyklonalem Shank<sub>PDZ</sub> - bzw. monoklonalem *Myc* -Antikörper, der Nachweis von  $\alpha$ -PIX bzw.  $\beta$ -PIX erfolgte mit monoklonalem *Flag*- bzw. T7-Antikörper.

Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor Kalirin-7 aktiviert spezifisch die kleinen GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac, Cdc42) und ist für die Erhaltung dendritischer Dornen in Neuronen notwendig (Penzes et al. 2001). Intersectin wirkt stimulierend auf Cdc42 und fördert somit die F-Aktin-Assemblierung (Hussain et al. 2001). Beide Proteine werden spezifisch im Gehirn exprimiert und können so möglicherweise regulatorisch auf die Shank/IRSp53-Interaktion wirken. Aus diesen Gründen wurde das oben beschriebene Experiment analog mit den Konstrukten pEAK10*Myc*Kalirin-7 und pRK5*Flag*Intersectin durchgeführt. Es war ebenfalls keine Veränderung in der Menge des kopräzipitierten IRSp53 zwischen den GEF exprimierenden Zellen und den Negativkontrollen detektierbar (Daten nicht gezeigt). Eine Regulation der Shank/IRSp53-Interaktion durch die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren PIX, Kalirin-7 oder Intersectin konnte anhand dieser Experimente nicht nachgewiesen werden.

## 3.3 Herstellung einer IRSp53 knock out-Maus

## 3.3.1 Die *Gene-Trap* Mutagenese als Methode der Wahl zur Erzeugung einer IRSp53defizienten Maus

Die Unterbrechung des Gens IRSp53 durch die Gene-Trap Mutagenese ermöglicht Funktionsanalysen, die die Auswirkungen der fehlenden IRSp53-Expression auf den gesamten Organismus der Maus untersuchen. Zur Herstellung dieser Maus wurde beim "BayGenomics Consortium" (http://baygenomics.ucsf.edu) der embryonale Stammzellklon XG757 bezogen, der eine Insertion des Gene-Trap Vektors pGT11xf im Gen von IRSp53 aufwies. Der Vektor pGTlxf besteht aus einer Spleißakzeptor-Sequenz, einer lacz-Genkassette, einer für die Neomycinphosphotransferase II kodierenden Gensequenz und einem Polyadenylierungssignal (Abb. 3.6). Der Transfer des Vektors in embryonale Stammzellen (ES) verläuft über Elektroporation und die Insertion des Vektors erfolgt zufällig irgendwo im Genom. Der Vektor untersteht dann den endogenen, regulatorischen Elementen des Gens, in dem die erfolgreiche Insertion stattgefunden hat. Falls der Spleißakzeptor des Gene-Trap Vektors im anschließenden Spleiß-Vorgang involviert ist und der Vektor sich außerdem im Leserahmen des Wirts-Gens befindet, bildet sich bei der Transkription die Gene-Trap mRNA. Diese mRNA wird aufgrund des Polyadenylierungssignals im Gene-Trap Vektor durch die Poly(A)Polymerase am 3'-Ende polyadenyliert, was der Stabilisierung und dem Schutz vor Exonukleasen dient. Die anschließende Translation der Gene-Trap mRNA terminiert aufgrund eines Stop-Codons am Ende der Neomycinphosphotransferasesequenz und führt so zur Bildung eines Fusionsproteins, dass nur noch einen geringen Teil des Proteins IRSp53, das Enzym β-Galaktosidase und die Neomycinphosphotransferase II enthält (Abb. 3.6). Die ES-Zellen, die das Gene-Trap Fusionsprotein exprimeren, werden aufgrund ihrer Neomycinresistenz selektiert, indem das Enzym Neomycinphosphotransferase II das Antibiotikum Neomycin inaktiviert. Die Identifizierung der Insertionsstelle des pGT11xf-Vektors geschieht auf mRNA-Ebene mittels 5'-RACE und wurde vom "Baygenomics Consortium" für IRSp53 zwischen Exon 3 und Exon 4 bestimmt.



Abb. 3.6: Schematische Darstellung der *Gene-Trap* Mutagenese in der genomischen Sequenz von IRSp53. Nach der Insertion des *Gene-Trap* Vektors in Inron 3 (I3) unterliegt der Vektor den endogenen, regulatorischen Elementen (R) des IRSp53 Gens, so dass ein Fusionsprotein aus einem Teil von IRSp53,  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) und dem Enzym Neomycinphosphotransferase II (Neo) gebildet wird. Voraussetzung hierfür ist, dass der Spleißakzeptor (SA) einen Spleiß akzeptiert hat und der Vektor im Leserahmen des IRSp53 Gens liegt. E1-4 = Exon 1-4, I1-3 = Intron 1-3, pA = Polyadenylierungsstelle.

Um den Genotyp der zu analysierenden Mäuse bestimmen zu können (siehe 3.3.2) musste die exakte Insertionsstelle des Gene-Trap Vektors in Intron 3 zwischen Exon 3 und 4 des IRSp53 Gens identifiziert werden. Dazu wurde mittels PCR fast das komplette Intron 3 und Exon 3 der genomischen DNA des ES-Zellklons XG757 analysiert. Die PCR-Ansätze enthielten immer den primer ßgalrev, welcher in der lacz-Sequenz des pGT11xf-Vektors bindet und jeweils unterschiedliche forward primer, die zu unterschiedlichen Stellen innerhalb des Introns 3 oder zu Stellen am Ende des Exons 3 komplementär waren (Abb. 3.7A). Da das Intron 3 des IRSp53 Gens eine Größe von ca. 20,48 kb aufweist, ergab sich eine Vielzahl von Möglichkeiten für die Insertion des Gene-Trap Vektors. Weiterhin wurde die Identifikation der Gene-Trap Insertionsstelle dadurch erschwert, dass die genomische Sequenz von IRSp53 für die Spezies Mus musculus aber nicht spezifisch für die Mauslinie C57Bl, aus der die ES-Zellen stammten, in der PubMed-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) vorhanden war. Daraus resultierte die Möglichkeit der Herstellung von primern anhand der Mus musculus Sequenzvorlage (accession number AB105196), die aufgrund von Sequenzunterschieden zwischen Mus musculus und der C57Bl-Linie keine Komplementarität zu den entsprechenden Sequenzen der Mauslinie C57Bl aufwiesen. Zusätzlich befinden sich in Intron 3 des IRSp53 Gens von Mus musculus zwei noch nicht sequenzierte Bereiche von unbestimmter Länge. Hätte die Insertion des Gene-Trap Vektors in einem dieser Bereiche stattgefunden, wäre die Insertionsstelle nicht zu identifizieren gewesen. Letztendlich wurden 12 primer-Kombinationen mittels PCR auf der genomischen DNA des ES-Zellklons XG757 getestet, aber nur für ein primer-Paar ein PCR-Produkt erhalten. Diese primer-Kombination bestand aus dem *reverse primer*  $\beta$ galrev und dem *forward primer XG6for*, welcher an Basenpaarposition 17124-17144 (*accession number* AB105196) im Exon 3 der genomischen DNA von IRSp53 bindet. Das PCR-Produkt wurde in den TOPO-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenz (Abb. 3.7B) zeigte, dass die Insertion des *Gene-Trap* Vektors nach den ersten 56 Nukleotiden des Introns 3 und somit an der Basenpaarposition 17200 der genomischen DNA von IRSp53 stattgefunden hat. Dies führt zur Bildung eines Fusionsproteins, welches aus den N-terminalen 93 Aminosäuren der IM-Domäne von IRSp53 (ca. 10 kDa), sowie  $\beta$ -Galaktosidase und Neomycinphosphotransferase II besteht (= *Gene-Trap Trap* Fusionsprotein).



Abb. 3.7: Identifizierung der Insertionsstelle des *Gene-Trap* Vektors pGT1lxf in Intron 3 der genomischen DNA von IRSp53. A: Die Identifizierung der Insertionsstelle des pGT1lxf-Vektors verlief mittels PCR unter Verwendung des *primers*  $\beta$ galrev, welcher in der *lacz*-Region des *Gene-Trap* Vektors bindet und jeweils unterschiedlichen *primern* (P1-P12), die im Intron 3 (I3) oder am Ende des Exon 3 (E3) assoziieren. Nur für die *primer*-Kombination  $\beta$ galrev und *XG6for* wurde ein PCR-Produkt synthetisiert, welches nach Klonierung in den TOPO-Vektor sequenziert wurde und zur Identifizierung der Insertionsstelle an Position 17200 im Intron 3 der genomischen DNA von IRSp53 führte (B).

Die N-terminalen 93 Aminosäuren der IM-Domäne von IRSp53 entsprechen lediglich 17 % des Gesamtproteins und 37,2 % der IM-Domäne. Die vollständige IM-Domäne umfasst 250 Aminosäuren (27,5 kDa) und kann erst nach korrekter Faltung ihre Funktion die F-Aktinbündelung ausführen. Die ersten 93 Aminosäuren dieser Domäne reichen vermutlich nicht aus, um korrekt gefaltet zu werden, so dass von einer funktionalen Inaktivität des IM-Domänenfragments des *Gene-Trap* Fusionsproteins ausgegangen werden kann.

Um chimäre Mäuse herzustellen, wurden die embryonalen Stammzellen des Klons XG757 in Blastocysten injiziert und diese in den Uterus scheinschwangerer Ammenmäuse der Linie C57BL transplantiert. Die Transplantation war bei einer von drei Ammenmäusen erfolgreich und führte zu 10 Nachkommen, 2 weiblichen und 8 männlichen Tieren. Die chimären Nachkommen sind aufgrund eines Farbfellmarkers, welcher durch das Gen *agouti* dominant autosomal vererbt wird, anhand ihres grau-braunen (*=agouti*) Fells identifizierbar. Alle 10 Nachkommen der Ammenmaus zeigten agoutifarbenes Fell. Die 8 männlichen, chimären Nachkommen wurden anschließend mit je 2 Wildtyp-Weibchen der Linie C57BL verpaart und die Nachkommen auf *agouti*-farbenes Fell hin untersucht, um die Keimzelltransmission des mutierten IRSp53 Gens sicherzustellen. Zur Gewinnung von homozygoten Mäusen wurden die hier entstandenen heterozygoten Tiere miteinander verpaart.

### 3.3.2 Genotypisierung der Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäuse

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels PCR anhand der genomischen DNA, welche aus den Schwanzbiopsien der zu untersuchenden Mäuse isoliert wurde. Zur Identifizierung des mutierten Allels von IRSp53 wurde das oben beschriebene *primer*-Paar *XG6for* und  $\beta$ galrev benutzt, so dass ein PCR-Produkt von 866 bp entstand. Die Identifizierung des Wildtyp-Allels erfolgte mit demselben *forward primer* und dem *reverse primer*, welcher im Intron 3 weiter 3' zur *Gene-Trap* Insertionsstelle bindet (Basenpaarposition 17601-17621, *accession number* AB105196) und damit ein PCR Produkt von 497 bp bildet. Bei Verwendung genomischer DNA heterozygoter Tiere zeigte sich mit beiden *primer*-Kombinationen ein PCR-Produkt, da hier sowohl das mutierte als auch das Wildtyp-Allel vorliegen (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Schematische Darstellung zur Identifizierung des Genotyps mittels PCR.** Das Wildtyp-Allel wurde mit dem *primer*-Paar *XG6for* und *XG6.2rev* und einem daraus resultierenden PCR-Produkt von 497 bp identifiziert. Das homozygote Allel war durch das *primer*-Paar *XG6for/βgalrev* und das PCR-Produkt von 866 bp nachweisbar. Die DNA heterozygoter Mäuse lieferte mit beiden *primer*-Kombinationen ein PCR-Produkt; die DNA homozygoter bzw. der Wildtyp-Mäuse dagegen nur mit jeweils einem entsprechenden *primer*-Paar.

Die homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp, sie waren lebensfähig und fertil. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit (08.05.2006) waren die ältesten homozygoten Männchen sowie Weibchen 17 Monate alt und noch immer lebensfähig. Die Verpaarungen der heterozygoten Mäuse resultierten in einer Nachkommenschaft, die nicht das nach den Mendelschen Regeln zu erwartende Verhältnis der Genotypen aufwies. 307 analysierte Mäuse lieferten ein Verhältnis von 0,2:1,8:1 anstatt 1:2:1 von homozygoten zu Wildtyp-Mäusen. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Nachkommen der Verpaarung zweier heterozygoter Tiere war dagegen normal ( $154 \ Q \ Q: 153 \ OC$ ).

#### 3.3.3 Nachweis der IRSp53-Defizienz homozygoter Mäuse auf Proteinebene

Die Unterbrechung des IRSp53 Gens durch die *Gene-Trap* Mutagenese wurde vom "BayGenomics Consortium" bereits auf mRNA-Ebene mittels 5`RACE nachgewiesen. Die Verifizierung der daraus resultierenden IRSp53-Defizienz auf Proteinebene erfolgte anhand von Hirnlysaten homozygoter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Das Hirngewebe wurde in DOC-Puffer homogenisiert und nach Denaturierung der Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt. IRSp53 wurde anschließend im Western-Blot durch den polyklonalen IRSp53<sub>SH3</sub>-Antikörper nachgewiesen, welcher die SH3-Domäne von IRSp53 als Epitop erkennt. Die SH3-Dömäne wird nach erfolgreicher Unterbrechung des IRSp53 Gens durch die *Gene-Trap* Mutagenese nicht mehr exprimiert. Die Proteine Shank und PSD-95 wurden durch den polyklonalen Shank<sub>PDZ</sub>-Antikörper bzw. den monoklonalen PSD-95-Antikörper detektiert und dienten aufgrund ihrer starken Expression im Gehirn als Ladekontrollen. Die Ergebnisse der Western-Blot Analysen sind in Abbildung 3.9 dargestellt.



**Abb. 3.9:** Nachweis der IRSp53-Defizienz im Hirnlysat homozygter Mäuse. Es wurden Proteinlysate aus dem Gehirngewebe homozygoter IRSp53 *knock out-* und Wildtyp-Mäuse hergestellt, diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Der Nachweis von IRSp53 erfolgte durch einen IRSp53<sub>SH3</sub> - Antikörper. Shank und PSD-95 dienten aufgrund ihrer hohen Expressionsrate im Gehirn als Ladekontrollen und wurden durch einen Shank<sub>PDZ</sub>-Antikörper bzw. PSD-95-Antikörper detektiert.

IRSp53 war in den Gehirnlysaten der homozygoten Mäuse nicht mehr nachweisbar, während in den Gehirnlysaten der Wildtyp-Mäuse eine deutliche Proteinbande von IRSp53 zu sehen war. Die gehirnspezifischen Proteine Shank und PSD-95 waren sowohl in den Gehirnlysaten der Wildtyp-Mäuse als auch in denen der IRSp53 *knock out*-Mäuse detektierbar. Die Belichtung der Röntgenfilme erfolgte über einen längeren Zeitraum (ca. 4 Minuten), um sicherzustellen, dass kein IRSp53 im Hirnlysat der homozygoten Mäuse vorhanden war.

## 3.3.4. Nachweis der Expression des *Gene-Trap* Fusionsproteins in verschiedenen Geweben homozygoter IRSp53 *knock out*-Mäuse

Das *Gene-Trap* Fusionsprotein in den transgenen IRSp53 *knock out*-Mäusen setzt sich aus den N-terminalen 93 Aminosäuren der IRSp53 IM-Domäne, den Enzymen  $\beta$ -Galaktosidase und Neomycinphosphotransferase II zusammen. Die  $\beta$ -Galaktosidase dient dabei als Markerenzym und ermöglicht eine einfache Analyse der Regionen in denen IRSp53 normalerweise exprimiert ist.

Zur Identifizierung der Expression des *Gene-Trap* Fusionsproteins wurden eine homozygote Maus und ein Wildtyp-Geschwistertier mit Paraformaldehyd perfundiert und Gehirn, Leber, Niere, Milz, Herz sowie Hoden zur Weiterbehandlung entnommen. Nach Inkubation der perfundierten Organe im ansteigenden Saccharosegradienten folgte die Schockgefrierung auf Trockeneis und die anschließende Kryokonservierung bei -80 °C. Mit Hilfe eines Kryotoms wurden 12 µm dicke Schnitte der perfundierten Mausgewebe hergestellt und diese einem  $\beta$ -*Galaktosidase-Assay* unterzogen. Das im *Gene-Trap* Fusionsprotein enthaltene Enzym  $\beta$ -Galaktosidase spaltet das zugegebene Substrat XGal zu einem blauen Farbstoff, so dass eine genaue Lokalisierung des Fusionsproteins in den Geweben der homozygoten Mäuse möglich war.

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Assay führte bei den Hirnschnitten der homozygoten IRSp53 knock out-Mäuse zu einer deutlichen Blaufärbung im Hippokampus, im Cortex und in den Purkinje-Zellen des Cerebellums (Abb. 3.10). Der Hippokampus zeigte anhand der Blaufärbung eine so starke Expression des Fusionssproteins, dass einzelne hippokampale Zellen oder Zellschichten nicht voneinander zu unterscheiden waren und der Hippokampus als eine zusammenhängende dunkel gefärbte Masse erschien. Im Cortex und im Cerebellum war die Expression des Fusionsproteins weniger stark, so dass nach dem  $\beta$ -Galaktosidase-Assay einzelne gefärbte Zellen erkennbar waren. Die Blaufärbung beschränkte sich dabei auf das Cytoplasma der Neurone, in den Dendriten war kein durch die  $\beta$ -Galaktosidase umgesetztes Substrat detektierbar (Abb. 3.10B, C).



Abb. 3.10: Nachweis der Expression des *Gene-Trap* Fusionsproteins im Hippokampus, Cortex und Cerebellum der IRSp53 knock out-Mäuse. Nach Perfusion der IRSp53 knock out-Mäuse wurden koronale Kryoschnitte verschiedener Gehirnregionen einem  $\beta$ -Galaktosidase-Assay unterzogen. Die blaue Färbung (hier schwarz dargestellt) gibt somit die Lokalisation des *Gene-Trap* Fusionsproteins an. A: Übersichtsbild der Großhirnhemisphäre. B: eine Vergrößerung aus dem Übersichtsbild in A, die mit einem 63x-Objektiv aufgenommen wurde. C: ein Teilbereich des Cerebellums (schwarzer Balken = 1 mm, weißer Balken = 10 µm, gelber Balken = 250 µm).

In den Kryoschnitten von Hoden und Nebenhoden der homozygoten Mäuse wurde ebenfalls eine deutliche Expression des Fusionsproteins anhand der β-Galaktosidase Aktivität nachgewiesen (Abb. 3.11). Der blaue Farbstoff lokalisierte in den Hodenzellen, die den Rand eines Gangsystems bildeten. Durch die Anfärbung der Zellkerne mit Hematoxylin wurden die Spermien im Gangsystem sichtbar. Der Spermienkopf war der Zellschicht am Gangrand zugewandt und die Spermienschwänze waren ins Ganglumen gerichtet, so dass diese Hodenzellen als Sertoli-Zellen ("Ammenzellen") identifiziert wurden. Im Gangsystem des Nebenhodens wurden ebenfalls Zellen identifiziert, die das *Gene-Trap* Fusionsprotein exprimierten. Im Inneren des Gangsystems war nach Kernfärbung mittels Hematoxylin die ungeordnete Anhäufung von Spermien detektierbar.



Abb. 3.11: Identifizierung der Expression des *Gene-Trap* Fusionsproteins in den Kryoschnitten von Hoden und Nebenhoden der homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse. Der  $\beta$ -*Galaktosidase-Assay* führte zu einer Blaufärbung (hier schwarz dargestellt) in den Zellen des Hodens und Nebenhodens. Durch Anfärbung der Kryoschnitte mit Hematoxylin (HE) wurden die Zellkerne sichtbar (weißer Balken = 1 mm).

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Assay resultierte bei den Kryoschnitten des Nierengewebes homozygoter Tiere in einer weitaus geringeren Anzahl blau gefärbter Zellen als bei den Gehirn- und Hodenschnitten. Der blaue Farbstoff war nur vereinzelt in einigen Tubuli des Nierenquerschnitts sichtbar. Zur Identifizierung der Tubuli-Art wurden diese Schnitte zusätzlich mit einem monoklonalen Megalin-Antikörper gefärbt. Megalin ist ein Markerprotein für den proximalen Tubulus der Niere. Die mikroskopische Auswertung dieser Kofärbung zeigte, dass die Blaufärbung immer mit dem Fluoreszenzsignal der Megalinfärbung kolokalisierte. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des *Gene-Trap* Fusionsproteins war dagegen nicht in jedem durch die Megalinfärbung identifizierten proximalen Tubulus nachweisbar (Abb. 3.12).



Abb. 3.12: Nachweis der Expression des *Gene-Trap* Fusionsproteins im proximalen Tubulus der Niere homozygoter Mäuse. A: Die Expression des *Gene-Trap* Fusionsproteins wurde in den Kyoschnitten der Niere durch die Bildung eines blauen Farbstoffs (hier schwarz dargestellt, siehe Pfeil) mit Hilfe des  $\beta$ -*Galaktosidase*-*Assays* lokalisiert. B: Megalin, ein Markerprotein für den proximalen Tubulus der Niere wurde mit einem monoklonalen Megalin-Antikörper (rot) detektiert (schwarzer Balken = 100 µm).

Die Kryoschnitte des homozygoten Milzgewebes lieferten als Resultat des  $\beta$ -Galaktosidase-Assays eine ähnlich geringe Menge blau gefärbter Zellen wie die des Nierengewebes. Die Expression des Gene-Trap Fusionsproteins war nur in einigen wenigen Regionen der Milz nachzuweisen. In den Kryoschnitten von Leber und Herz der homozygoten Mäuse war keine  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität des Gene-Trap Fusionsproteins anhand des blauen Farbstoffs in den Zellen detektierbar. Die aus den Wildtyp-Mäusen stammenden Kryoschnitte aller hier getesteten Organe dienten als Negativkontrolle und zeigten im  $\beta$ -Galaktosidase-Assay keinerlei Blaufärbung.

## 3.3.5 Biochemischer Nachweis der Expression von IRSp53 in verschiedenen Geweben der Wildtyp-Maus

Bereits der Nachweis des *Gene-Trap* Fusionsproteins durch den  $\beta$ -Galaktosidase-Assay in den homozygoten Mäusen identifizierte eine Reihe von Geweben, die in der Wildtyp-Maus IRSp53 exprimieren würden. Um herauszufinden wie stark die IRSp53-Expression im Mausorganismus vertreten ist, wurden Proteinextrakte aus den verschiedensten Geweben der Wildtyp-Maus hergestellt und auf ihren Gehalt an IRSp53 untersucht. Alle der in Abbildung 3.13 aufgelisteten Gewebe wurden mit DOC-Puffer homogenisiert und identische Proteinmengen des jeweiligen Homogenats in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von IRSp53 erfolgte mit einem polyklonalem IRSp53-Antikörper im Western-Blot. In allen getesteten Geweben, mit Ausnahme des Muskelgewebes war IRSp53 deutlich nachweisbar (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13: Expression von IRSp53 in verschiedenen Geweben der Wildtyp-Maus**. Gleiche Proteinmengen (10 µg) der in der Abbildung aufgelisteten Gewebelysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und IRSp53 mit einem polyklonalem Antikörper im Western-Blot detektiert.

Besonders stark zeigte sich die Expression im Gehirn, der Lunge, Leber, Niere und des Hoden während IRSp53 in den Geweben von Herz, Samenblase und Nebenhoden wesentlich schwächer exprimiert wurde. Im Fettgewebe war mit Abstand die geringste Menge des IRSp53 zu detektieren. Die Analysen verdeutlichten, das IRSp53 in fast allen Geweben des Mausorganismus vorhanden ist und daher, mit Ausnahme des Muskelgewebes, von einer ubiquitären Expression gesprochen werden kann.

## 3.4. Anatomische Untersuchungen der IRSp53-defizienten Gehirne

Die Analyse der Gehirne von homozygoten IRSp53 knock out-Mäusen im Vergleich zu den Gehirnen von Wildtyp-Mäusen erfolgte mit Hilfe des Elektronenmikroskops und sollte Aufschluss darüber geben, ob die knock out-Gehirne anatomische Unterschiede bezüglich der Wildtyp-Gehirne aufweisen. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde eine homozygote IRSp53 knock out-Maus und ein Wildtyp-Geschwistertier mit 4% Paraformaldehyd perfundiert, die Gehirne entnommen und über mehrere Schritte im ansteigenden Saccharosegradienten inkubiert. Die Herstellung der Gehirnschnitte und der elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Böckers im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Ulm. Bei Betrachtung der Bilder waren sowohl in den Gehirnschnitten der Wildtyp-Mäuse als auch in denen der homozygoten IRSp53 knock out-Mäuse einzelne Synapsen deutlich zuerkennen. In der Präsynapse der homozygoten IRSp53 knock out-Mäuse waren die synaptischen Vesikel und Mitochondrien sichtbar, in der Postsynapse wurde die lang gezogene, elektronendichte Struktur als postsynaptische Dichte identifiziert (Abb. 3.14). Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen waren in den Gehirnschnitten der homozygoten Mäuse keine anatomischen Abnormalitäten des Synapsenaufbaus detektierbar.

Die anatomischen Untersuchungen der IRSp53-defizienten Gehirne waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen, da sie weiterer statistischer Auswertungen bedurften, um eine klare Aussage über mögliche Abnormalitäten treffen zu können.



Abb. 3.14: Elektronenmikroskopische Darstellung einer Synapse aus dem Gehirn homozygoter IRSp53 *knock out*-Mäuse. Die homozygote Maus wurde mit 4% Paraformaldehyd perfundiert, das Gehirn entnommen und im ansteigenden Saccharosegradienten inkubiert. Die Herstellung der Gehirnschnitte und die Elektronenmikroskopie fanden in der AG Böckers im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Ulm statt. In der Synapse sind das Endoplasmatische Retikulum (ER), der synaptische Spalt, die synaptischen Vesikel und die postsynaptische Dichte (PSD) gut zu erkennen.

# 3.5 Untersuchungen zur Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte im Gehirn von Wildtyp- und homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäusen

## 3.5.1 Vergleich der Proteinzusammensetzung der PSD von Wildtyp- und IRSp53 *knock out*-Gehirnen mit Hilfe des Coomassie-gefärbten Gels

IRSp53 ist durch seine vielfältigen Interaktionspartner und durch den Einfluss, den es auf die Neuronenmorphologie ausübt, ein wichtiges Mitglied der postsynaptischen Dichte. Da es bei den IRSp53 *knock out*-Mäusen zu einem vollständigen Funktionsverlust des Proteins kommt, ergibt sich die Frage, ob dieser Zustand einen Einfluss auf die Integration anderer Proteine in die PSD hat. Zur Untersuchung dieser Frage wurde die postsynaptische Dichte aus den Gehirnen von homozygoten *knock out*- und Wildtyp-Mäusen präpariert. Die Präparation umfasst mehrere Aufreinigungsschritte, bei denen aus dem Gehirnhomogenat (Ho) durch

Zentrifugation Fraktionen gewonnen werden, die Mitochondrien sowie Synaptosomen (P), ausschließlich die Synaptosomen (Syn) und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit vorheriger Tritonbehandlung nur noch die postsynaptische Dichte (PSD) enthalten. Die Proteinmenge der einzelnen Aufreinigungsschritte wurde nach Bradford bestimmt und eine genau definierte Menge in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Färbung des Gels war für jede Fraktion der PSD-Präparation ein spezifisches Bandenmuster der in ihnen enthaltenen Proteine sichtbar (Abb. 3.15A). Beim visuellen Vergleich der Bandenmuster zwischen den PSD-Fraktionen der Wildtyp- und der homozygoten IRSp53 *knock out*-Gehirne wurde kein Unterschied in den Bandenintensitäten und der Bandenanzahl detektiert (Abb. 3.15B).



Abb. 3.15: Vergleich des Proteinbandenmusters der einzelnen Aufreinigungsschritte der PSD-Präparation aus den Gehirnen der Wildtyp-(wt) und homozygoten *knock out*-Mäuse (ko) im Coomassie-gefärbten Gel. A: Die Aufreinigung der postsynaptischen Dichte erfolgte aus dem Gehirnhomogenat (Ho) der Mäuse. Nach mehreren Zentrifugations- und Homogenisierungsschritten wurden zwei Überstände (Ü1, Ü2), sowie eine Pellet-Fraktion erhalten, die Synaptosomen und Mitochondrien enthielt (P). Die weitere Zentrifugation des resuspendierten Pellets über einen Saccharosedichtegradienten führte zur Gewinnung der Synaptosomen-Fraktion (Syn), aus der nach Tritonbehandlung die postsynaptische Dichte (PSD) isoliert wurde. B: vergrößerte Darstellung der PSD-Fraktionen der Wildtyp- und *knock out*-Gehirne.

## 3.5.2 Vergleich des Proteingehalts bestimmter postsynaptischer Proteine in der PSD der Wildtyp- und der homozygoten IRSp53 *knock out*-Gehirne mit Hilfe des Western-Blots

Da keine detektierbaren Unterschiede der Proteinzusammensetzung im Gehirn der Wildtypund der homozygoten *knock out*-Mäuse mit Hilfe des Coomassie-gefärbten Gels zu erkennen waren, wurde die Menge bestimmter Proteine in der PSD von Wildtyp- und *knock out*-Mäusen mit Hilfe einer sensitiveren Detektionsmethode, den Western-Blot Analysen verglichen.

Abbildung 3.16 zeigt die einzelnen Aufreinigungsschritte der PSD-Präparation aus dem Gehirn der Wildtyp-Maus und den Nachweis von IRSp53 durch einen polyklonalen IRSp53<sub>SH3</sub>-Antikörper Western-Blot (Abb. 3.16A). IRSp53 im war in allen Präparationsfraktionen der Wildtyp-Gehirne detektierbar. In der PSD-Fraktion war die Proteinbande von IRSp53 allerdings wesentlich stärker als in den anderen Fraktionen, obwohl in jeder Laufspur identische Mengen Protein aufgetragen wurden. Dies zeigte die Anreicherung von IRSp53 in der postsynaptischen Dichte an. Tubulin wurde durch einen monoklonalen Tubulin-Antikörper nachgewiesen und war in allen Fraktionen als nahezu gleichstarke Proteinbande sichtbar. Der Nachweis des Tubulin im Western-Blot dient als Ladekontrolle. Da Tubulin normalerweise nicht Bestandteil der postsynaptischen Dichte ist, bei der Präparation aber als gleichmäßige Verunreinigung in der PSD-Faktion auftritt, gibt die Tubulinbande außerdem einen Hinweis auf die aufgetragene Proteinmenge pro Laufspur.



Abb. 3.16: Nachweis von IRSp53 in den einzelnen Fraktionen der PSD-Präparation aus Wildtyp- und *knock out*-Mäusen mit Hilfe der Western-Blot Analysen. Aus dem Gehirnhomogenat (Ho) der Mäuse wurde nach mehreren Zentrifugations- und Homogenisierungsschritten eine Pellet-Fraktion erhalten, die Synaptosomen und Mitochondrien enthielt (P). Die weitere Zentrifugation des resuspendierten Pellets mit Hilfe eines Saccharosedichtegradienten führte zur Gewinnung der Synaptosomen-Fraktion (Syn), aus der nach Tritonbehandlung die postsynaptische Dichte (PSD) isoliert wurde. Nach Auftrennung der Fraktionen in der SDS-PAGE erfolgte der Nachweis von IRSp53 bzw. Tubulin im Western-Blot durch einen polyklonalen IRSp53<sub>SH3</sub>-Antikörper bzw. einem monoklonalen Tubulin-Antikörper.

Um für die nachfolgenden Analysen sicherzustellen, dass in den PSD-Fraktionen der IRSp53 *knock out*-Gehirne kein IRSp53 vorhanden war, wurden die einzelnen Fraktionen im Western-Blot auf den Gehalt von IRSp53 überprüft. IRSp53 war mit dem polyklonalen IRSp53<sub>SH3</sub>-Antikörper nicht detektierbar, während Tubulin als Ladekontrolle mit einem monoklonalen Tubulin-Antikörper in denselben Fraktionen deutlich nachweisbar war (Abb. 3.16B). In der PSD-Fraktion der Wildtyp-Gehirne war oberhalb der IRSp53-Bande immer noch eine weitere Bande detektierbar, die auch in der PSD-Fraktion der *knock out*-Gehirne auftrat. Diese Bande stellt ein nicht zu benennendes Protein dar, das von dem polyklonalen IRSp53<sub>SH3</sub>-Antikörper unspezifisch erkannt wird.

Die Shank-Proteinfamilie erfüllt durch ihre vielfältigen Protein-Protein-Interaktionsdomänen eine wichtige Aufgabe als vernetzendes Protein bei der Ausbildung der postsynaptischen Dichte. Es geht mit seiner prolinreichen Region unter anderem eine direkte Interaktion mit der SH3-Domäne von IRSp53 ein. Zur Identifizierung möglicher Unterschiede der Menge des in die PSD eingebauten Shanks bei den homozygoten IRSp53 knock out-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren wurde die Intensität der entsprechenden Proteinbanden im Western-Blot miteinander verglichen. Um auch sehr geringe Intensitätsunterschiede erkennen zu können, wurden jeweils identische Proteinmengen der PSD-Fraktionen der knock out- und Wildtyp-Mäuse eingesetzt. Die Präparation der postsynaptischen Dichte erfolgte sowohl aus den Gehirnen zwei Wochen alter Mäuse (= PSD jung) als auch aus den Gehirnen zwei Monate alter Mäuse (= PSD alt). Bei Verwendung des Shank<sub>PDZ</sub>-Antikörpers war kein Unterschied in der Bandenintensität der PSD-Fraktion der IRSp53 knock out-Mäuse und der PSD-Fraktion der Wildtyp-Mäuse nachzuweisen. Das Ergebnis wurde sowohl für die PSD-Fraktionen der zwei Wochen alten Mäuse als auch für die der zwei Monate alten Mäuse bestätigt (Abb. 3.17A links). Die identische Bandenstärke des Tubulins in diesen Fraktionen bestätigte die Verwendung gleicher Proteinmengen pro Laufspur. Die Wiederholung dieses Experiments mit dem Shank3-Antikörper, welcher spezifisch Shank3 erkennt, zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen den PSD-Fraktionen der knock out- und Wildtyp-Gehirne der zwei Monate alten Mäuse (Abb. 3.17A rechts). Bei den PSD-Fraktionen der zwei Wochen alten Mäuse konnte keine einheitliche Beobachtung zum Proteingehalt gemacht werden. In der Hälfte der getesteten Fraktionen war eine stärkere Proteinbande in der knock out-PSD-Fraktion detektierbar, während in der anderen Hälfte der getesteten PSD-Fraktionen der Proteingehalt zwischen Wildtyp- und knock out-PSD-Fraktion entweder gleich war oder die Wildtyp-PSD-Fraktion eine stärkere Proteinbande aufwies. Die Unterschiede waren damit nicht signifikant.



Abb. 3.17: Untersuchungen zur Proteinmenge der Shank-Proteinfamilie und speziell Shank3 in der PSD der Wildtyp- und der homozygoten IRSp53 knock out-Mäuse. A: Identische Proteinmengen der PSD-Fraktionen der zwei Monate alten Wildtyp (wt)- und knock out-Mäuse (ko) wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und Shank mit einem Shank<sub>PDZ</sub>-Antikörper bzw. Shank3 mit einem Shank3-Antikörper im Western-Blot detektiert. Der Nachweis des Tubulin erfolgte mit dem Tubulin-Antikörper und bestätigte die Verwendung identischer Proteinmengen. B: Die densitometrische Analyse der Proteinbanden von Shank3 wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt und die Daten in Excel graphisch dargestellt. Der densitometrische Quotient wurde nach folgender Formel berechnet:

(BI der ko-PSD-Fraktion)/(BI der entsprechenden Tubulinkontrolle)

(BI der wt-PSD-Fraktion)/(BI der entsprechenden Tubulinkontrolle)

BI = densitometrischer Messwert der Bandenintensität. \* p < 0,04: nicht signifikant, \*\* p < 0,004: signifikant.

Zur quantitativen Erfassung dieser Beobachtungen wurde die Intensität der Proteinbanden im Western-Blot mit dem Programm ImageJ densitometrisch vermessen. Die graphische Darstellung der Messergebnisse erfolgte nach folgender Formel:

BI der ko-PSD-Fraktion/BI der entsprechenden Tubulinkontrolle

BI der wt-PSD-Fraktion/BI der entsprechenden Tubulinkontrolle

BI = densitometrischer Messwert der Bandenintensität

Alle Werte > 1 zeigten damit eine stärkere Proteinbandenintensität in der PSD-Fraktion der IRSp53 *knock out*-Maus an und alle Werte < 1 eine stärkere Proteinbandenintensität in der PSD-Fraktion der Wildtyp-Maus. Lag kein Unterschied in der Proteinbandenintensität der PSD-Fraktion von Wildtyp- und *knock out*-Gehirn vor, wurde dies durch einen Wert = 1 dargestellt. Die Bestimmung der Bandenintensitäten erfolgte jeweils an n = 8-15 PSD-Fraktionen aus je zwei verschiedenen Präparationschargen der jungen und alten Mäuse.

Die densitometrische Auswertung der Proteinbandenintensitäten von Shank3 ergab für die PSD-Fraktionen der jungen Mäuse den Wert 1,8, was auf eine verstärkte Menge des Proteins in den *knock out*-Mäusen hindeutete. Die Standardabweichung lag in dieser Analyse bei 1,6

und die Überprüfung der statistischen Signifikanz mittels des T-Test ergab den Wert p < 0,04, so dass der Unterschied zum Wert 1 als nicht signifikant bezeichnet werden musste. Nach der Analyse der Shank3-Bandenintensitäten in den PSD-Fraktionen der alten Mäuse zeigte der densitometrische Wert von 1, dass keine Veränderung zwischen Wildtyp- und *knock out*-Maus vorlag (Abb. 3.17B).

Bei der Untersuchung der Proteinmenge des Densin-180, einem neurospezifischen LAP-(*leucine rich repeat and PDZ*) Protein und Interaktionspartner der Shank-Proteinfamilie, zeigte sich dagegen ein eindeutiges Ergebnis. Der Densin-180-Antikörper detektierte in der PSD-Fraktion des homozygoten IRSp53 *knock out*-Gehirns eine stärkere Proteinbande als in der PSD-Fraktion des Wildtyp-Gehirns. Die stärkeren Proteinbanden wurden in den PSD-Fraktionen der jungen und der alten IRSp53 *knock out*-Mäuse nachgewiesen (Abb. 3.18A)



Abb. 3.18: Untersuchung zur Proteinmenge von Densin-180 in der PSD der Wildtyp- und der homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse. A: Densin-180 wurde in den PSD-Fraktionen der zwei Wochen bzw. zwei Monate alten Wildtyp (wt)- und *knock out*-Mäuse (ko) mit einem polyklonalen Densin-180-Antikörper im Western-Blot detektiert. Der Nachweis des Tubulin erfolgte mit einem monoklonalen Tubulin-Antikörper. B: Die densitometrische Analyse der Proteinbanden erfolgte wie in Abb. 3.17 bereits erklärt. \* p < 0,0006, \*\* p < 0,002: signifikanter Unterschied zum Wert 1.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.18B zeigt die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten von Densin-180 in den PSD-Fraktionen der homozygoten IRSp53 *knock out-* im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Die Werte lagen bei den Analysen der zwei Wochen alten und zwei Monate alten Mäuse bei 1,4 bzw. 1,7 und somit deutlich über 1, was eine Anreicherung des Proteins in der PSD der *knock out-* im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen anzeigt.

Des weiteren wurde untersucht, ob die Menge des NMDA-Rezeptors in der postsynaptischen Dichte der *knock out*-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verändert ist. Ein funktionsfähiger NMDA-Rezeptor besteht aus mindestens einer NMDA-RezeptorUntereinheit 1 (NR1) und einer oder mehrerer der vier NMDA-Rezeptor-Untereinheiten 2 (NR2A-D). Die Western-Blot Analysen erfolgten mit spezifischen Antikörpern für NR1, NR2A, und NR2B, die keinerlei Kreuzreaktivität zwischen den jeweiligen Untereinheiten eingehen.

NR2B ist über die Interaktion mit PSD-95 indirekt mit sämtlichen Signalmolekülen der postsynaptischen Dichte verknüpft und geht außerdem eine direkte Interaktion mit der CaMKII, einem Mediator der Calcium-abhängigen Signaltransduktion ein. Die Interaktion von NR2B mit Aktin-assoziierten Proteinen resultiert in einer indirekten Verbindung mit dem Cytoskelett (Robinson et al. 2005, Leonard et al. 2002, Wechsel und Teichberg 1998, Wyszynski et al. 1997, Kornau et al. 1995). Die Western-Blot Analysen von NR2B wiesen eine stärkere Bande in der PSD-Fraktion der homozygoten IRSp53 *knock out*-Gehirne als in den PSD-Fraktionen der Wildtyp-Gehirne nach. Diese Beobachtung wurde für die PSD-Fraktionen der zwei Wochen sowie für die der zwei Monate alten Mäuse gemacht. Die Intensitätsgleichheit der Tubulinbanden im Western-Blot bestätigte den Einsatz identischer Proteinmengen (Abb. 3.19A).



Abb. 3.19: Untersuchung zur Proteinmenge der NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2B in der PSD der Wildtyp- und der homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse. A, B: Die Analyse und Quantifizierung erfolgte analog zu den Beschreibungen in Abb.  $3.17 * p < 5.4 \times 10^{-05}$ , \*\* p < 0.003: signifikanter Unterschied zum Wert 1.

Die densitometrische Analyse der Bandenintensität von NR2B in der PSD der zwei Wochen alten Mäuse detektierte mit dem Wert von 3,8 eine äußerst starke Anreicherung dieser Untereinheit in der postsynaptischen Dichte der homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse. In der PSD der zwei Monate alten *knock out*-Mäuse war ebenfalls eine Anreicherung von NR2B nachweisbar. Der Proteingehalt dieser Untereinheit war mit dem densitometrischen
Quotienten von 1,4 allerdings nicht so deutlich hochreguliert wie in der PSD der jungen *knock out*-Mäuse (Abb. 3.19B).

NR2A ist ebenso wie NR2B durch die Bindung an PSD-95 indirekt mit sämtlichen Signaltransduktionen der PSD assoziiert und durch die Interaktion mit dem Aktin-bindendem Protein Spectrin an das Cytoskelett gekoppelt. NR2A zeigt im Gegensatz zu NR2B keine Bindungsaffinität zur CaMKII (Robinson et al. 2005, Wechsel und Teichberg 1998, Wyszynski et al. 1997, Kornau et al. 1995). Die Banden von NR2A waren bei den Western-Blot Analysen der PSD-Fraktionen von jungen und alten IRSp53 *knock out*-Mäusen immer stärker als die der Wildtyp-Mäuse (Abb. 3.20A). Sie zeigten aber eine hohe Variabilität in der Bandenintensität, was sich anschließend in der densitometrischen Auswertung bemerkbar machte.



Abb. 3.20: Untersuchung zur Proteinmenge der NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2A in der PSD der Wildtyp- und der homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse. A, B: Die Analyse und Quantifizierung erfolgte analog zu den Beschreibungen in Abb. 3.17 \* p < 0.06: kein signifikanter Unterschied zum Wert 1.

Bei der densitometrischen Analyse der Proteinbanden von NR2A wurde in der postsynaptischen Dichte der jungen Mäuse der Quotient 1,5 bestimmt und in der PSD der alten Mäuse der Quotient 2,0. Die Werte wiesen damit eine Anreicherung von NR2A in der postsynaptischen Dichte der *knock out*-Mäuse nach (Abb. 3.20B). Der Proteingehalt war im Gegensatz zu den anderen NMDA-Rezeptor-Untereinheiten 1 und 2B in der PSD der alten Mäuse stärker als in der PSD der jungen *knock out*-Mäuse hochreguliert. Allerdings wurde im Vergleich zu den densitometrischen Quotienten der anderen NMDA-Rezeptor-Untereinheiten ein hoher Fehlerindikator sowohl für die Quotienten der jungen als auch für die der alten *knock out*-Mäuse von 0,5 bzw. 1,2 nachgewiesen. Daher muss der Unterschieds zum Wert 1 mit p < 0,06 als nicht signifikant eingestuft werden.

Für NR1 wurde ebenso wie für NR2B die Assoziation mit der durch die CaMKII vermittelten Signaltransduktion und mit dem F-Aktin-Cytoskelett nachgewiesen. Sie zeigt allerdings keine Interaktion mit dem postsynaptischen Gerüstprotein PSD-95, ist aber für die Assemblierung eines funktionalen NMDA-Rezeptors obligat (Robinson et al. 2005, Leonard et al. 2002, Wechsel und Teichberg 1998, Wyszynski et al. 1997). Die Detektion dieser Untereinheit durch die Western-Blot Analysen der PSD-Fraktionen von *knock out*- und Wildtyp-Mäusen zeigte ebenfalls stärkere Proteinbanden in den Fraktionen der *knock out*-Mäuse. Der vermehrte Gehalt der NMDA-Rezeptor-Untereinheit 1 war sowohl für die postsynaptische Dichte der jungen als auch für die der alten *knock out*-Mäuse nachweisbar (Abb. 3.21A).



Abb. 3.21: Untersuchung zur Proteinmenge der NMDA-Rezeptor-Untereinheit 1 in der PSD der Wildtypund der homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse. A, B: Die Analyse und Quantifizierung erfolgte analog zu den Beschreibungen in Abb. 3.17. \* p < 0,002, \*\* p < 0,0005: signifikanter Unterschied zum Wert 1.

Für die Bandenintensitäten der NMDA-Rezeptor-Untereinheit 1 in der PSD der zwei Wochen alten Mäuse wurde ein densitometrischer Quotient von 1,9 bestimmt. Bei den zwei Monate alten Mäusen ergab sich für die Proteinbande der Untereinheit 1 der Quotient 1,2 (Abb. 3.21B). In beiden Altersstufen der Mäuse kam es im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zu einer deutlichen Anreicherung der NMDA-Rezeptor-Untereinheit 1 in der PSD der homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse. Die *knock out*-Mäuse im Alter von zwei Wochen zeigten dabei einen stärkeren Anstieg des Gehalts an NR1 als die Mäuse im Alter von zwei Monaten. Die Überprüfung der Signifikanz erfolgte durch den T-Test und lag bei p < 0,0005 und p < 0,002.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die NMDA-Rezeptor-Untereinheiten NR1, NR2A und NR2B alle in der postsynaptischen Dichte der homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse angereichert waren und deshalb von einer Hochregulation des NMDA-Rezeptors in diesen Mäusen ausgegangen werden kann. Der Unterschied zwischen den einzelnen Untereinheiten lag lediglich in der Stärke der Anreicherung.

Weiterhin wurde die Menge aller in Tabelle 3.1 aufgelisteten Proteine in der postsynaptischen Dichte der Wildtyp- und der homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse durch Western-Blot Analysen bestimmt und miteinander verglichen. Die untersuchten Proteine umfassten die direkten Interaktionspartner von IRSp53 oder Shank, GTPasen sowie weitere postsynaptische Proteine, denen eine wichtige Funktion in der PSD zugeordnet wurde. Für keine der analysierten Proteine war ein Unterschied in der postsynaptischen Dichte der Wildtyp- und der *knock out*-Mäuse detektierbar.

Tab. 3.1: Auflistung der untersuchten Proteine, deren Proteingehalt in der PSD der homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nicht verändert war.

Interaktions- partner von IRSp53	Interaktionspartner der Shank-Familie	Glutamat-Rezeptor- Untereinheiten	GTPasen	Weitere Signaltrans- duktoren der PSD
PSD-95	SAPAP1/GKAP	Glutamat-Rezeptor- Untereinheit 1	Rho	Abi-1
Mena	Sharpin	Glutamat-Rezeptor- Untereinheit 5	Rap1	Sos-1
WAVE2	Homer		Ras	δ-Catenin
F-Aktin	Cortactin		Cdc42	Arc
Eps8	a-Fodrin/a-Spectrin		Rac	PAK
Cdc42	Abp1/SH3P7/HIP-55			CaMKII
Rac	β-ΡΙΧ			CaMKII (Thr286)- phospho

# 3.6 Untersuchung der Funktion von IRSp53 mittels primärer, kultivierter Hippokampusneurone der IRSp53 *knock out*-Mäuse

## 3.6.1 Effekte der IRSp53-Defizienz auf die Morphologie primärer, kultivierter Hippokampusneurone der Maus

IRSp53 wurde eine wichtige Funktion in bezug auf die neuronale Morphologie zugeordnet, da die Überexpression des IRSp53-Gesamtkonstruktes in primären Hippokampusneuronen der Ratte zu einem vierfachen Anstieg der dendritischen Verzweigungen im Vergleich zu den untransfizierten Neuronen führte (Kapitel 3.1.1). Zur Untersuchung möglicher Auswirkungen des Funktionsverlusts von IRSp53 auf die neuronale Morphologie wurden Hippokampusneurone aus dem Gehirn homozygoter Mäuse am Postnataltag 1 präpariert und 14 Tage kultiviert. Als Vergleichswert dienten Hippokampusneurone, die ebenfalls an

Postnataltag 1 aus Wildtyp-Mäusen der Linie C57Bl gewonnen wurden. Die Anfärbung der Dendriten erfolgte mit einem monoklonalen MAP2-Antikörper, da MAP2 mit Mikrotubuli assoziiert in den Neuronen vorliegt und die Dendriten zu einem großen Anteil aus Mikrotubuli bestehen. Die gefärbten Neurone wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und anschließender Bildbearbeitung in Adobe Photoshop 6.0 dokumentiert. Bei Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der kultivierten Hippokampusneurone der homozygoten IRSp53 *knock out*-Mäuse zeigten diese eine sehr schlichte Morphologie. Im Vergleich zu den kultivierten Wildtyp-Neuronen waren die *knock out*-Neurone durch deutlich weniger Primärdendriten und dendritische Verzweigungen gekennzeichnet (Abb. 3.22A).



Abb. 3.22: Morphologie der kultivierten Hippokampusneurone der IRSp53 *knock out*-Mäuse. A: Die Dendriten von Wildtyp (wt)- und homozygoten IRSp53 *knock out (ko)*-Neuronen wurden am T*iv*14 mit einem monoklonalen MAP2-Antikörper (rot) angefärbt (weißer Balken = 10  $\mu$ m). B: Für die Quantifizierung der Primärdendriten sowie Verzweigungen pro Dendrit wurden n = 200 Neurone der Wildtyp- und *knock out*-Mäuse aus vier verschiedenen Präparationschargen ausgezählt. \*p < 7 x 10<sup>-6</sup> \*\*p < 4 x 10<sup>-5</sup>: signifikanter Unterschied zum Wert der Wildtyp-Neurone.

Die quantitative Auswertung dieser Beobachtungen erfolgte durch Auszählung der Dendriten und der dendritischen Verzweigungspunkte des Neurons. Dazu wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Neuronen gemacht, bei denen der Zellkörper in der Mitte eines Bereichs von 175 x 175 µm platziert war. Anschließend wurde die Anzahl der Verzweigungen pro Dendrit bestimmt und durch das Programm Excel graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung umfasste die Analyse von insgesamt 200 Neuronen aus vier verschiedenen Präparationschargen und die Bestimmung der Signifikanz mittels des T-Tests.

3

Die Auszählung der Wildtyp-Neurone, welche die Kontrollsituation darstellten, ergab bei den hier gewählten Versuchsbedingungen einen durchschnittlichen Wert von 5 Verzweigungen pro Dendrit. Für die Neurone der IRSp53 *knock out*-Mäuse wurden unter denselben Versuchsbedingungen 1,7 Verzweigungen pro Dendrit detektiert. Sie zeigten somit eine Reduktion der dendritischen Verzweigungen um 66% im Vergleich zu den Neuronen der Wildtyp-Mäuse (Abb. 3.22B).

Die Auszählung der Primärdendriten führte bei den kultivierten Wildtyp-Neurone zu einem Wert von durchschnittlich 4,6 Primärdendriten pro Zellkörper. Bei den Neuronen der *knock out*-Mäuse wurden dagegen 3 Primärdendriten pro Zelle nachgewiesen. Damit war die Anzahl der Primärdendriten bei den kultivierten Neuronen der *knock out*-Mäuse verglichen mit denen der Wildtyp-Mäuse um 35 % reduziert (Abb. 3.22C).

Der Funktionsverlust des Proteins IRSp53 hatte somit bei den kultivierten Hippokampusneuronen eine morphologische Veränderung zur Folge, die sich in der verminderten Anzahl dendritischer Verzweigungen und der Primärdendriten äußerte.

## 3.6.2 Effekte der Überexpression von IRSp53 auf die Morphologie homozygoter IRSp53 *knock out*-Neurone

Da der Funktionsverlust von IRSp53 in den homozygoten knock out-Mäusen zu einer Reduktion dendritischer Verzweigungen und Primärdendriten der kultivierten Hippokampusneurone führte, stellte sich die Frage, ob dieser Phänotyp durch die Überexpression von IRSp53 in den knock out-Neuronen kompensiert werden kann. Zur Prüfung dieser Fragestellung wurden primäre Hippokampusneurone homozygoter knock out-Mäuse an Tiv 7 sowie an Tiv 1 mit dem Expressionskonstrukt pcDNA6IRSp53(1-521) transfiziert und nach 14 Tagen in Kultur fixiert. Die Anfärbung der Dendriten verlief unter Verwendung des monoklonalen MAP2-Antikörpers. Die Aufnahmen der gefärbten Neurone wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops durchgeführt und mit dem Programm Adobe Photoshop bearbeitet. Wie in Abbildung 3.23A dargestellt war die Morphologie der IRSp53 überexprimierenden kultivierten knock out-Neurone im Vergleich zu den kultivierten Wildtyp-Neuronen durch eine deutlich vermehrte Anzahl dendritischer Verzweigungen gekennzeichnet. Dieser Phänotyp wurde sowohl für die an Tag 1 nach Präparation als auch für die an Tag 7 nach Präparation transfizierten knock out-Neurone nachgewiesen.



Abb. 3.23: Effekte der Überexpression von IRSp53 auf die Morphologie der kultivierten Neurone der homozygoten IRSp53 knock out-Mäuse in Abhängigkeit des Transfektionszeitpunktes. A: IRSp53 knock out-Neurone am Tiv 1 sowie am Tiv 7 mit dem Konstrukt pcDNA6IRSp53<sub>(1-521)</sub> transfiziert und nach 14 Tagen in Kultur fixiert. Die Anfärbung der Dendriten erfolgte mit einem monoklonalen MAP2-Antikörper (rot) und die Detektion von IRSp53 mit einem IRSp53<sub>SH3</sub>-Antikörper (grün), (weißer Balken = 10 µm). B: Die Quantifizierung der Verzweigungen pro Dendrit erfolgte durch Auszählung von n = 20 transfizierten Neuronen aus zwei verschiedenen Präparationschargen \*p < 2 x 10<sup>-5</sup>: signifikanter Unterschied zum Wert der Wildtyp-Neurone.

Die quantitative Bestimmung der dendritischen Verzweigungspunkte erfolgte anhand von 20 transfizierten Neuronen aus zwei verschiedenen Präparationschargen. Um vergleichbare Datensätze zu erhalten wurden die Bilder zur Analyse ausschließlich im roten Kanal mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops aufgenommen und der Zellkörper in der Bildmitte eines Bereichs von 175 x 175 µm platziert. Die Auszählung der dendritischen Verzweigungen der an Tag 7

nach Präparation mit dem Konstrukt pcDNA6IRSp53(1-521) transfizierten knock out-Neurone ergab 21 Verzweigungen pro Dendrit. Dieser Wert überstieg den Wert von 5 Verzweigungen pro Dendrit der untransfizierten Wildtyp-Neurone um das 4-fache. Die an Tag 1 nach Präparation transfizierten knock out-Neurone zeigten mit durchschnittlich 18 Verzweigungen pro Dendrit eine 3,6-fach höhere Anzahl der Verzweigungen als die der Wildtyp-Neurone (Abb. 3.23B). Für die untransfizierten knock out-Neurone wurden 1,7 Verzweigungen pro Dendrit ausgezählt. Die Überexpression von pcDNA6IRSp53(1-521) in den knock out-Neuronen steigerte diesen Wert um das 10-12-fache (Abb. 3.23B). Die Überexpression des Konstrukts pcDNA6IRSp53<sub>(1-521)</sub> in den Neuronen der homozygoten IRSp53 knock out-Mäuse resultierte damit in einer Kompensation der verminderten Verzweigungspunkte der untransfizierten knock out-Neurone. Die Morphologie der IRSp53 überexprimierenden knock out-Neurone ähnelte aber nicht denen der Wildtyp-Neurone in Kultur, sondern war durch weitaus stärkere Verzweigungen gekennzeichnet. Die Transfektion der knock out-Neurone mit äußerst geringen Mengen des pcDNA6IRSp53-Konstrukts (0,25-2,5 µg/18 mm well) führte ebenfalls zu einer erhöhten Zunahme der Verzweigungen pro Dendrit, die den Normalwert von 5 Verzweigungen pro Dendrit der Wildtyp-Neurone bei weiten überstieg (Daten nicht gezeigt).

Bei Betrachtung der Primärdendriten der an Tag 7 nach Präparation mit dem Konstrukt pcDNA6IRSp53<sub>(1-521)</sub> transfizierten *knock out*-Neurone zeigte sich im Vergleich zu den untransfizierten *knock out*-Neuronen kein Unterschied in der Anzahl der Primärdendriten. Für die an Tag 1 nach Präparation mit dem Expressionskonstrukt pcDNA6IRSp53<sub>(1-521)</sub> transfizierten *knock out*-Neurone waren dagegen mehr Primärdendriten pro Zellkörper zu beobachten als für die untransfizierten *knock out*-Neurone (Abb. 3.23A und 3.22 A).

Die Auszählung der Primärdendriten erfolgte wie bereits für die Quantifizierung der dendritischen Verzweigungen beschrieben. Sie ergab für die an Tag 7 nach Präparation transfizierten *knock out*-Neurone 2,8 Primärdendriten pro Zellkörper. Dieser Wert lag weit unter dem Normalwert von 4,6 Primärdendriten pro Zelle der Wildtyp-Neurone. Die an Tag 7 transfizierten *knock out*-Neurone hatten fast genauso viele Primärdendriten pro Zellkörper (2,8) wie die untransfizierten *knock out*-Neurone (3), so dass ein Effekt der IRSp53-Überexpression ab T*iv* 7 auf die Ausbildung der Primärdendriten in den kultivierten *knock out*-Neurone nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.24A). Für die an Tag 1 nach Präparation mit dem pcDNA6IRSp53<sub>(1-521)</sub>-Konstrukt transfizierten *knock out*-Neurone wurden durchschnittlich 4,4 Primärdendriten pro Zellkörper bestimmt. Dieser Wert kam dem Wert von 4,6 Primärdendriten pro Zellkörper der Wildtyp-Neurone sehr nahe (Abb. 3.24A).



Abb. 3.24: Quantifizierung der Anzahl der Primärdendriten homozygoter IRSp53 knock out-Neurone in Abhängigkeit des Transfektionszeitpunktes. A: Die Quantifizierung erfolgte wie in Abb. 3.23 bereits beschrieben. \* $p < 4 \ge 10^{-5}$  signifikanter Unterschied zum Wert der Wildtyp-Neurone. B: Kumulative Darstellung der Anzahl der Primärdendriten.

Die kumulative Darstellung der Anzahl der Primärdendriten pro Zellkörper in Abbildung 3.24B bestätigte den morphologischen Unterschied zwischen den Wildtyp-Neuronen und den untransfizierten IRSp53 *knock out*-Neuronen (Abb. 3.24B, dunkelblaue und rote Linien). Die Verteilung der Primärdendritenanzahl der *knock out*-Neurone, die an Tag 7 in Kultur mit einen IRSp53-Expressionskonstrukt transfiziert wurden, war der entsprechenden Verteilung der untransfizierten *knock out*-Neurone sehr ähnlich (Abb. 3.24B, hellblaue und rote Linien). Eine Annäherung der Primärdendritenanzahl der transfizierten *knock out*-Neurone an die der Wildtyp-Neurone wurde durch die Transfektion des IRSp53-Konstrukts an T*iv*7 nicht erreicht (Abb. 3.24B, hellblaue und dunkelblaue Linie). Erst durch die Überexpression von pcDNA6IRSp53<sub>(1-521)</sub> an T*iv*1 in den kultivierten *knock out*-Neurone zu kompensieren.

Die *knock out*-Neurone erreichten durch Transfektion von IRSp53 an Tag 1 *in vitro* den Wildtyp-Level der Primärdendritenanzahl (Abb. 3.24B, gelbe und dunkelblaue Linie).

### 3.6.3. Vergleich der Bildung von PSD-95-*Clustern* in homozygoten IRSp53 *knock out*und Wildtyp-Neuronen

PSD-95 ist in der postsynaptischen Dichte stark angereichert und bildet in der reifen Synapse *Cluster* aus (Kim et al. 2004, Kornau et al. 1995). Aus diesem Grund gilt es als Markerprotein der PSD und kann nach immuncytochemischer Anfärbung die Lokalisation der Postsynapse anzeigen. Des weiteren ist es ein Interaktionspartner von IRSp53 und vermutlich an der Rekrutierung des Proteins in die postsynaptische Dichte beteiligt (Hori et al. 2005, Soltau et al. 2004). Die Analyse der PSD-95-*Cluster* kann somit Hinweise auf mögliche Unterschiede in der Synapsenbildung von homozygoten IRSp53 *knock out*- und Wildtyp-Mäusen geben.

Die Detektion der endogenen PSD-95-*Cluster* erfolgte in Wildtyp- und homozygoten *knock out*-Neuronen nach 7, 11, 14, 18 und 21 Tagen *in vitro* mit einem monoklonalen PSD-95-Antikörper. Die Dendriten der Neurone wurden durch den polyklonalen MAP2-Antikörper sichtbar gemacht. Die Darstellung der gefärbten Neurone geschah mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops und die Bearbeitung der Bilder mit dem Programm Adobe Photoshop 6.0 (Abb. 3.25A).

Die Quantifizierung der Beobachtungen erfolgte durch Auszählung der PSD-95-*Cluster* von je 10 verschiedenen Neuronen aus zwei Präparationschargen. Es wurden vier Dendritenabschnitte von 25 µm Länge pro Neuron ausgezählt. In Abbildung 3.25B ist die PSD-95-*Cluster*-Bildung der kultivierten Hippokampusneurone der Wildtyp- und *knock out*-Mäuse über einen Zeitraum von 21 Tagen graphisch dargestellt. In den Neuronen der Wildtyp- und *knock out*-Mäuse waren nach sieben Tagen *in vitro* fast keine PSD-95-*Cluster* nachzuweisen (Abb. 25A). Nach 11 Tagen *in vitro* wurden für die Wildtyp-Neurone sehr deutlich PSD-95-Cluster detektiert und dabei ein Wert von 12,4 *Clustern* pro 25 µm Dendrit bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren die PSD-95-*Cluster* bei den *knock out*-Neuronen nur sehr vereinzelt zu identifizieren (1,6 *Cluster* pro 25µm). Ab Tag 14 *in vitro* wurden bei den Wildtyp-Neuronen ungefähr 14 PSD-95-*Cluster* pro 25 µm Dendritenlänge detektiert. Dieser Wert blieb nach einer weiteren Woche in Kultur unverändert und damit war die Bildung der PSD-95-*Cluster* bei den Wildtyp-Neuronen nach 14 Tagen in Kultur in eine Sättigungsphase eingetreten.



Abb. 3.25: Bildung der PSD-95-*Cluster* bei Wildtyp- und homozygoten IRSp53 *knock out*-Neuronen *in vitro* über einen Zeitraum von 21 Tagen. A: Die primären Hippokampusneurone wurden nach 7, 11, 14, 18 sowie 21 Tagen *in vitro* (T*iv*) fixiert und PSD-95 mit einem monoklonalen PSD-95-Antikörper (rot) nachgewiesen. Die Dendriten wurden durch einen polyklonalen MAP2-Antikörper angefärbt (grün), (weißer Balken =  $5\mu$ m). B: Die Auszählung der PSD-95-*Cluster* erfolgte nach 7, 11, 14, 18 und 21 Tagen *in vitro* (T*iv*) anhand von je n = 10 Wildtyp- und *knock out*-Neuronen aus zwei verschiedenen Präparationschargen.

Bei den *knock out*-Neuronen waren nach 14 Tagen in Kultur zum ersten Mal deutliche PSD-95-*Cluster* nachweisbar (Abb. 3.25A). Es wurden ca. 10 PSD-95-*Cluster* pro 25 µm Dendritenabschnitt gezählt. Das waren ungefähr 3 *Cluster* weniger als bei den Wildtyp-Neuronen zum selben Zeitpunkt. Die PSD-95-*Cluster*-Bildung erreichte bei den *knock out*-Neuronen erst nach 18 Tagen *in vitro* die Sättigungsphase, bei der durchschnittlich 12 PSD-95-*Cluster* pro 25 µm Dendritenlänge gezählt wurden. Die Anzahl der PSD-95-*Cluster* erreichte bei den primären Neuronen der *knock out*-Mäuse bis Tag 21 *in vitro* nicht den Wert der Wildtyp-Neurone. Die Ergebnisse zeigen eine zeitlich verzögerte Synapsenbildung der *knock out*-Neurone im Vergleich zu den Wildtyp-Neuronen *in vitro* an. Des weiteren war die Synapsenanzahl der *knock out*-Neurone nach 21 Tagen in Kultur um 12 % niedriger als die der Wildtyp-Neurone.

### 4. Diskussion

Nach dem momentanen Wissensstand ist IRSp53 maßgeblich an Umstrukturierungen des Aktin-Cytoskeletts beteiligt, die zu morphologischen Veränderungen der Zelle führen. Diese Funktion des Proteins wurde erstmals in nicht neuronalen Zelllinien identifiziert, bei denen IRSp53 für die durch Rac induzierte Ausbildung membranöser Ausstülpungen essentiell ist (Miki et al. 2000). Hinweise auf eine neuronale Funktion von IRSp53 gab Soltau (2003) durch die Überexpression von IRSp53 in Hippokampusneuronen, was zu einem vermehrten Auswachsen von Neuriten und einer Cdc42-abhängigen Verlängerung dendritischer spines führte. Morphologische Veränderungen eines Neurons resultieren aus Umstrukturierungen des Cytoskeletts und können unterschiedliche Ziele verfolgen. Sie dienen unter anderem der Ausbildung von Dendriten und Synapsen während der Entwicklung junger Neurone, sind aber auch Voraussetzung für die synaptische Plastizität reifer spines bzw. Synapsen. Die Beobachtungen von Soltau (2003) führten zu der Fragestellung, welche Rolle IRSp53 in der Morphogenese von Neuronen spielt. Zur Untersuchung dieser Frage wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen eingesetzt. Zum einen diente die Überexpression verschiedener IRSp53-Deletionskonstrukte der Charakterisierung einzelner Proteindomänen in bezug auf ihre morphologische Bedeutung. Zum anderen ermöglichte das knock out-Mausmodell die Untersuchung der morphologischen Funktion von IRSp53 in einem nicht artifiziellen System unter Einflussnahme sämtlicher, natürlich im Mausorganismus existierender Signalprozesse.

Zuerst wurden die strukturellen Voraussetzungen von IRSp53 für die morphologischen Veränderungen der Neurone im Detail analysiert. Die Überexpression des gesamten Proteins in Hippokampusneuronen der Ratte zeigte einen sehr deutlichen morphologischen Effekt, der sich durch die starke Zunahme dendritischer Verzweigungen und der Primärdendriten im Vergleich zu den GFP-transfizierten Kontrollneuronen äußerte (siehe 3.1.1). IRSp53.1 besitzt vier putative Protein-Protein-Interaktionsdomänen (IMD, CRIB, SH3, PDZ-BD, Abb. 3.1) für die bisher insgesamt 16 verschiedene Interaktionspartner identifiziert wurden. Da sie alle neuronal exprimiert sind, Bestandteile unterschiedlicher Signalwege darstellen und zum Teil mit dem Aktin-Cytoskelett assoziieren, ergibt sich eine Vielzahl von Möglichkeiten, welcher IRSp53-vermittelte Mechanismus diesen morphologischen Veränderungen der Neurone unterliegt. Die Überexpression der einzelnen Domänen von IRSp53 in Hippokampusneuronen sollte erste Hinweise auf ihre Funktion innerhalb des Gesamtproteins geben und damit Rückschlüsse auf die Regulation von IRSp53 in bezug auf die Änderungen der neuronalen

Morphologie zulassen. Die Überexpression der isolierten IM-Domäne, welche die ersten Nterminalen 250 Aminosäuren von IRSp53 umfasst induzierte ein vermehrtes Auswachsen von Primärdendriten und die Zunahme dendritscher Verzweigungen. Dieser Effekt ähnelte dem der Überexpression des gesamten Proteins und bewies, dass die IMD allein die Fähigkeit besitzt morphologische Veränderungen in Neuronen auszulösen. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Untersuchungen von Yamagishi et al. (2004), die das durch die IMD induzierte Auswachsen von Filopodien in HeLa-Zellen beobachteten. Kristallstrukturanalysen zeigten, dass zwei IMD-Monomere ein Zeppelin-förmiges Dimer bilden. Ein Monomer formt dabei eine *coiled-coil* Struktur aus drei lang gestreckten  $\alpha$ -Helices und einer kurzen Helix, die im inneren Teil des Dimers liegt. Die Aminosäuren Lysin 142, 143 sowie 146, 147 der IMD sind an der Bindung an filamentöses Aktin beteiligt und die gesamte IMD zeigt F-Aktin-Bündelungsaktivität. Das Bündeln von Aktinfilamenten ist eine Voraussetzung für die Bildung von Filopodien, so dass die von Yamagishi et al. (2004) gezeigte Akkumulation der IM-Domänen die Funktion von IRSp53 bei der Bildung von Filopodien erklären könnte (Millard et al. 2005, Yamagishi et al. 2004).

Die weiter C-terminal liegende CRIB-Domäne von IRSp53 interagiert mit der kleinen Rho-GTPase Cdc42. Für diese Bindung sind die Aminosäuren 238-292 von IRSp53 essentiell und sie enthalten im Bereich 268-280 genau genommen eine unvollständige CRIB-Domäne mit der Aminosäuresequenz ISLP(X)<sub>8</sub>V (Krugmann et al. 2001, Govind et al. 2001). Eine vollständige CRIB-Domäne besteht dagegen aus der Sequenz ISXP(X)<sub>4</sub>FXH(X)<sub>2</sub>HVG (Burbelo et al. 1995). Die kleinen GTPasen sind über den GTPase-Zyklus in ihrer Aktivität regulierbar und binden in ihrer GTP-gebundenen aktiven Form eine Vielzahl von Effektorproteinen. Die Aktivierung der Effektorproteine verläuft bei den Rho-GTPasen häufig durch die Aufhebung einer intramolekularen autoinhibitorischen Interaktion des Effektors. Die Überexpression des IRSACRIB-Konstruktes in Neuronen machte die Bindung von Cdc42 unmöglich und führte zu einer Steigerung der dendritischen Verzweigungen, die den Verzweigungswert der IMD und des IRSp53-Gesamtkonstruktes bei weitem überstieg (siehe 3.1.1). Möglicherweise ist IRSACRIB durch die fehlende CRIB-Domäne nicht mehr in der Lage die autoinhibitorische Konformation einzunehmen, so dass es permanent in der offenen Konformation vorliegt und damit für viele Interaktionspartner zugänglich ist. Dies würde die Hypothese unterstützen, dass IRSp53 durch kleine GTPasen von einer inaktiven in eine aktive Konformation überführt und damit reguliert wird (Soltau et al. 2002). Da IRSACRIB Nterminal die vollständige IMD besitzt, wird das vermehrte Auswachsen der Dendriten möglicherweise durch diese Domäne induziert oder zumindest durch seine F-AktinBündelungsaktivität unterstützt. Außerdem beinhaltet IRSACRIB im C-terminalen Bereich die SH3-Domäne, welche mit einer Vielzahl von F-Aktin-assoziierten Proteinen wie Mena, Shank, WAVE2 oder Eps8 interagiert. Die Bindung an Mena könnte die F-Aktin-Polymerisation stimulieren, da Mena durch die Interaktion mit G-Aktin und Profilin für die Bereitstellung des G-Aktins am Ort der F-Aktin-Assemblierung sorgt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, das IRSp53, Cdc42 und Mena als Komplex die Filpodienformation in Fibroblasten auslösen. Außerdem wird Mena sowohl im sich entwickelnden als auch zu einem geringeren Grad im adulten Gehirn exprimiert. Es ist an der Ausbildung von neuronalen Wachstumskegeln und dem Auswachsen von Axonen beteiligt (Lebrand et al. 2004, Krugmann et al. 2001, Lanier et al. 1999). Die Interaktion der SH3-Domäne von IRSACRIB mit WAVE2 könnte ebenfalls ein Erklärungsmodell für das Auswachsen der Dendriten sein. WAVE2 ist ein NPF (nucleation-promoting factor) der Klasse I, der G-Aktin bindet und den Arp2/3-Komplex aktiviert, welcher wiederum die Aktin-Nukleation als Vorausetzung für die F-Aktin-Polymerisation initiiert (Machesky et al. 1999). Die Bindung von WAVE2 an die SH3-Domäne von IRSp53 erfolgt in Abhängigkeit der kleinen Rho-GTPase Rac1, die vermutlich die Aufhebung der autoinhibitorischen Form von IRSp53 vermittelt und damit das Auswachsen von Lamellipodien in Fibroblasten induziert (Miki et al. 2002). WAVE2 ist im Gehirn exprimiert und lokalisiert sowohl im Leitsaum als auch in der Spitze auswachsender Filopodien des neuronalen Wachstumkegels (Suetsugu et al. 1999, Nozumi et al. 2003). Die Bindestelle von Rac1 ist nicht mit der von Cdc42 identisch, sondern befindet sich im N-Terminus von IRSp53 und überlappt mit der IM-Domäne. Die Rac-Bindestelle ist somit im IRSACRIB Protein vorhanden. Bisher ist noch nicht geklärt welche der GTPasen, Cdc42 oder Rac1, die durch IRSp53 vermittelten Effekte auf das Aktin-Cytoskelett auslösen. Vermutlich regulieren die GTPasen, zu welchem Grad IRSp53 als Gesamtprotein in der offenen Konformation vorliegt, während IRS-IMD und IRSACRIB eine geschlossene Konformation erst gar nicht annehmen können und damit konstitutiv aktiv sind. Die Vielzahl der Interaktionspartner der SH3-Domäne von IRSp53, die mit dem Aktin-Cytoskelett assoziiert sind, geben erste Hinweise auf die Bedeutung dieser Domäne für die Ausbildung von Dendriten. Die nähere Untersuchung der Domäne durch die Überexpression eines IRSp53-Konstruktes mit deletierter SH3-Domäne äußerte sich anhand einer deutlichen Reduktion der dendritischen Verzweigungen der Neurone im Vergleich zur Kontrollsituation (siehe 3.1.1). Aufgrund der fehlenden SH3-Domäne ist die Interaktion von z. B. Mena, Eps8 oder WAVE2 mit IRSASH3 unmöglich und damit die Umstrukturierug des Cytoskeletts als Voraussetzung der Ausbildung von Dendriten nicht durchführbar.

Die Überexpression von IRSp53 und der Deletionskonstrukte wirkte sich nicht nur auf die dendritschen Verzweigungen, sondern auch auf die spines aus. Ihre morphologischen Veränderungen korrelierten mit denen der Dendriten. Die spines der mit IRSp53 transfizierten Neurone zeigten eine filopodienartige Struktur und eine Zunahme in ihrer Anzahl, die sich durch eine Verdichtung der spines auf den Dendriten bemerkbar machte (siehe 3.1.2). Die Überexpression von IRS-IMD resultierte in einer weiteren Verlängerung sowie Verdichtung der filopodienartigen Ausläufer, was durch IRSACRIB noch weiter gesteigert wurde. Das Fehlen der SH3-Domäne im IRSASH3-Konstrukt führte auch hier zu einer deutlich verminderten Anzahl der spines auf den Neuronen. Da sowohl der Bildung als auch den morphologischen Veränderungen der dendritischen Dornen Umstrukturierungen des F-Aktin-Cytoskeletts zu Grunde liegen, gelten die oben angeführten Erklärungsansätze für die veränderte Morphologie der Dendriten auch für die der spines. Es muß allerdings beachtet werden, dass die Morphogenese der dendritischen Dornen auch sehr stark durch die Proteine der postsynaptischen Dichte beeinflusst wird. Eps8 ist nur sehr schwach in der PSD exprimiert und deshalb wahrscheinlich unbedeutend für die Ausbildung der spines. Shank ist dagegen ein sehr prominentes Protein der PSD, was mit vielen Cytoskelett-assoziierten Proteinen interagiert. Die Überexpression von Shank in Neuronen fördert die Reifung der dendritischen Dornen und führt zur Ausbildung vergrößerter spine-Köpfe (Sala et al. 2001). WAVE2 ist über die Interaktion mit der IRSp53-SH3-Domäne ein weiterer möglicher Mediator der spine Morphogenese, da das Protein ebenfalls in der postsynaptischen Dichte vorhanden ist.

Ein weiterer Effekt, der bei der Überexpression des IRSp53-Gesamtkonstruktes in den Neuronen nachgewiesen wurde, ist die verminderte Anzahl der PSD-95-*Cluster* entlang des Dendriten (siehe 3.1.3). Möglicherweise wirkt sich die Zunahme der dendritischen Verzweigungen sowie die Verdichtung und Verlängerung der *spines* negativ auf die Ausbildung funktionaler Postsynapsen aus. IRSp53 interagiert über seinen C-Terminus mit PSD-95 und wird über diese Interaktion NMDA-Rezeptor-abhängig in die postsynaptische Dichte rekrutiert (Soltau et al. 2004, Hori et al. 2005). Die Überexpression von IRSp53 und die daraus resultierende diffuse Lokalisation des Proteins innerhalb der ganzen Zelle könnte in einem verminderten Einbau von PSD-95 in das postsynaptische Kompartiment resultieren. Weiterhin wäre es möglich, dass durch die verstärkte Präsenz von IRSp53 ein Großteil des endogenen PSD-95 mit IRSp53 interagiert und damit für andere Interaktionspartner nicht mehr zur Verfügung steht. Dadurch könnte z. B. die durch PSD-95 vermittelte Bindung des postsynaptischen Transmembranproteins Neuroligin an das präsynaptische Neurexin in der

PSD reduziert sein. Die Interaktion von Neuroligin mit Neurexin ist für die Ausbildung der Synapse notwendig, da eine Blockierung dieser Interaktion zu einer verminderten Synapsenanzahl führt (Chih et al. 2005). Anhand der Ergebnisse konnte allerdings nicht bestimmt werden, ob der gesamte Proteinlevel von PSD-95 verringert ist oder ob PSD-95 diffus verteilt vorliegt und damit durch den Antikörper nicht mehr detektierbar ist.

IRSp53 hat die Möglichkeiten über die IMD oder die SH3-Domäne auf die neuronale Morphologie einzuwirken. Welcher der SH3-Domänen-Interaktionspartner als Effektor von IRSp53 das Auswachsen der Dendriten und spines auslöst, kann nicht bestimmt werden. Vermutlich ist es eine Kombination verschiedener Interaktionspartner, die durch IRSp53 entwicklungsabhängig flexibel aktiviert werden. Da IRSp53 wiederum mit den kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 interagiert, stellte sich die Frage ob die neuronalen GEFs PIX, Kalirin-7 und Intersectin regulatorisch auf die IRSp53-Interaktionsaktivität wirken. β-PIX wird durch die Bindung an Shank in die räumliche Nähe von IRSp53 gebracht und stellt durch seine Eigenschaft Cdc42 sowie Rac1 zu aktivieren einen potentiellen Kandidaten für einen upstream Effektor von IRSp53 dar (Park et al. 2003). Durch die Charakterisierung des Proteinkomplexes aus GTI1, PIX, Rac und PAK in Neuronen wurde die Rac-aktivierende Funktion von PIX mit der spine Morphogenese sowie der Ausbildung von Synapsen in Verbindung gebracht (Zhang et al. 2005). Kalirin-7 und IRSp53 interagieren beide mit dem Gerüstprotein PSD-95 und sind damit zusammen in der postsynaptischen Dichte lokalisiert. Kalirin-7 ist über die durch Rac1 vermittelte Reorganisation des Cytoskeletts für die Ausbildung von *spines* absolut notwendig, da die Überexpression eines dominant-negativen Konstruktes in einer verminderten spine Dichte und einer reduzierten Anzahl präsynaptischer Endigungen resultiert (Penzes et al. 2001). Der Cdc42 spezifische GEF Intersectin ist ebenfalls in den spines von Neuronen lokalisiert. Erst kürzlich wurde eine Funktion für Intersectin zusammen mit den Proteinen Numb und EphrinB1 in bezug auf die spine Entwicklung und die synaptische Funktion identifiziert (Nishimura et al. 2006). Die Untersuchungen zur aktivierenden oder möglicherweise hemmenden Funktion dieser GEFs auf die Interaktion von Shank und IRSp53 führte in dem hier verwendeten HEK293-Zellsystem zu dem Ergebnis, das diese GEFs keinerlei Einfluss auf die Shank/IRSp53-Interaktion ausüben (siehe 3.2). Vermutlich sind andere GEFs für die indirekte Aktivierung von IRSp53 verantwortlich, wie zum Beispiel Tiam1 als Rac-spezifischer GEF und Interaktionspartner von IRSp53. Dies würde mit der Hypothese von Connolly et al. (2005) korrelieren, die Tiam1 eine richtungsbestimmende Funktion in bezug auf die Rac1/IRSp53vermittelte Umstrukturierung des Aktin-Cytoskeletts zuschreiben. IRSp53 würde dann nach

Aktivierung durch Rac1 über die Bindung an z. B. WAVE2 und den Arp2/3-Komplex die neuronale Morphologie verändern (Connolly et al. 2005). Tiam1 ist im sich entwickelnden Gehirn exprimiert und dort in die neuronale Migration involviert (Ehler et al. 1997). Eps8 ist im Komplex mit Abi-1 und Sos-1 ebenfalls ein Rac-spezifischer GEF, der die Aktivierung von IRSp53 bewirken kann. Eps8 ist im sich entwickelnden Gehirn exprimiert und reguliert das Überleben entstehender Neurone, indem es die durch Wachstumsfaktoren induzierte Signaltransduktion beeinflusst (Yoshida et al. 2004). Allerdings sind sowohl Eps8 als auch Shank Bindungspartner der SH3-Domäne von IRSp53, was möglicherweise zu einer Kompetition der beiden Proteine im Falle einer Interaktion führen könnte. Bisher ist es noch fraglich welche GEFs jeweils *upstream* der GTPasen Cdc42 sowie Rac1 und des Effektors IRSp53 wirken (Abb. 4.1).



Abb. 4.1: Schematische Darstellung der zwei Möglichkeiten die F-Aktin-Polymerisation durch die Interaktion von IRSp53 mit Mena oder WAVE2 zu stimulieren. Noch nicht identifizierte GEFs sorgen für die Aktvierung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1, die daraufhin in der Lage sind IRSp53 in eine offene Konformation zu überführen. IRSp53 kann nun über seine SH3-Domäne z. B. Mena oder WAVE2 binden und damit durch zwei unterschiedliche Mechanismen die Polymerisation des filamentösen Aktins stimulieren.

Des weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Nachweis der präzipitierten Proteine durch die Western-Blot Analysen nicht sensitiv genug war um leichte Unterschiede in der Menge des kopräziptierten IRSp53 nachzuweisen. Außerdem spiegelt das HEK293-Zellsystem nicht die endogenen Bedingungen im Säugergehirn wider, in dem IRSp53 und

Shank normalerweise miteinander interagieren. Möglicherweise wurde in den HEK293-Zellen die IRSp53/Shank-Interaktion nicht über die kotransfizierten GEFs, sondern über spezifische Faktoren der HEK-Zellen reguliert.

Da die Überexpression eines Proteins im Zellsystem immer eine unnatürliche Situation darstellt, wurden weiterführende Analysen zur Funktion von IRSp53 in bezug auf die neuronale Morphologie mit Hilfe des knock out-Mausmodells durchgeführt. IRSp53 war in der knock out-Maus auf Proteinebene nicht mehr nachweisbar (siehe 3.3.3). Der vollständige Funktionsverlust von IRSp53 äußerte sich in kultivierten hippokampalen Mausneuronen durch eine deutlich verminderte Anzahl dendritischer Verzweigungen und Primärdendriten (siehe 3.6.1). Die IRSp53-Defizienz wirkt sich vermutlich auf die Morphologie der Neuronen des Hippokampus besonders deutlich aus, da das Protein in diesem Hirnareal normalerweise stark exprimiert wird (siehe 3.3.4). Die Ergebnisse zeigen die Bedeutung von IRSp53 für eine normale Ausbildung der neuronalen Morphologie. Aufgrund seines Funktionsverlustes kann weder die durch Rac/IRSp53/WAVE2 vermittelte noch die durch Cdc42/IRSp53/Mena vermittelte Aktin-Polymerisation als Voraussetzung für das Auswachsen von Dendriten stimuliert werden. Möglicherweise führt die IRSp53-Defizienz zusätzlich zu einer Destabiliserung der Mikrotubuli, da das Protein unter Wildtyp-Bedingungen mit mDia, einem downstream Effektor der GTPase RhoA interagiert (Fujiwara et al. 2000). mDia reguliert die Ausbildung und Orientierung der stabilen Mikrotubuli als wichtige Bestandteile der Dendriten (Ishizaki et al. 2001, Palazzo et al. 2001). Bei der Entstehung der Dendriten wachsen Mikrotubuli zur Stabilisierung in diese hinein, so dass der reife Dendrit hauptsächlich aus Mikrotubuli und einer Schicht aus Aktin nahe der Plasmamembran besteht (Cline 2001, Van Aelst und Cline 2004).

Der Versuch das verminderte Auswachsen der Primärdendriten aus dem Zellkörper der *knock out*-Neurone durch Überexpression von IRSp53 auszugleichen zeigte, dass dies nur bei Transfektion des Konstruktes in einer sehr frühen Entwicklungsphase des Neurons möglich war. Dabei konnte der *knock out*-Phänotyp bis zum Wildtyp-Niveau kompensiert werden. Erfolgt die Transfektion des IRSp53-Konstruktes später (nach 7 Tagen in Kultur) konnte die Ausbildung der Primärdendriten durch die Expression von IRSp53in den *knock out*-Neuronen nicht mehr beeinflusst werden (siehe 3.6.2). Die neuronale Morphogenese der sich entwickelnden Neurone wird in mehrere Stadien unterteilt. Nach 12 Stunden in Kultur bilden die Neurone erste Neuriten aus, während nach 36 Stunden die Polarisierung der Zelle durch das Auswachsen des Axons bestimmt wird. Erst nach vier Tagen in Kultur beginnen die Neuriten Verzweigungen auszubilden und zu Dendriten zu differenzieren (Dotti et al. 1988,

Higgins et al. 1997). Vermutlich ist IRSp53 in den ersten 36 Stunden nach Entstehung des Neurons an der Ausbildung der ersten Neuriten beteiligt und bestimmt damit maßgeblich die Anzahl der Primärdendriten des differenzierten Neurons. Möglicherweise wird es durch Cdc42 aktiviert und veranlasst durch die Interaktion mit Mena die Ausbildung sowie Bündelung radialer Aktinfilamente. Die daraus entstehenden Filopodien wachsen anschließend zu Primärdendriten heran. Die Koexpression von IRSp53 und Mena in einen Tag alten Rattenneuronen und zu diesem Zeitpunkt noch nicht exprimiertes Shank bestätigten diese Hypothese (Soltau, Dissertation 2003). Außerdem bewirkt die vollständige Abwesenheit von Mena im Mausorganismus eine Störung der Wegfindung auswachsender Axone in bestimmten Regionen des Gehirns (Lanier et al. 1999). Einen Hinweis auf die regulatorische Funktion von Cdc42 bei der neuronalen Polarität gaben Schwamborn et al. (2004). Sie bewiesen, dass eine Mutante des Cdc42, welche autonom zwischen der GTP- und GDPgebundenen Form wechselt, ein vermehrtes Auswachsen von Axonen induziert. Eine konstitutiv aktive Mutante des Cdc42 konnte diesen Effekt nicht auslösen. Vermutlich wird die Axon-Bildung durch die kleine GTPase Rap1B initiiert, die dann bei der weiteren Entwicklung des Axons auf Cdc42 und den Par-Proteinkomplex wirkt (Schwamborn et al. 2004). Nach vier Tagen in Kultur wird das weitere Ausbilden der Primärdendriten wahrscheinlich durch die Expression bestimmter entwicklungsspezifischer Faktoren verhindert. Die Überexpression von IRSp53 in diesem Stadium kann somit die am Anfang der Differenzierung des knock out-Neurons festgelegte Anzahl der Primärdendriten nicht mehr verändern. Die verminderte Anzahl der dendritischen Verzweigungen in den knock out-Neuronen wurde dagegen sowohl durch die Überexpression von IRSp53 am ersten Tag als auch am 7. Tag in Kultur kompensiert. Die transfizierten Neurone waren sogar stärker verzweigt als die Wildtyp-Neurone (siehe 3.6.2). Damit zeigt sich, das IRSp53 die dendritische Morphologie sehr deutlich beeinflussen kann und eine zentrale Aufgabe bei der Ausbildung der Dendriten einnimmt. Da das Auswachsen der dendritischen Verzweigungen in den knock out-Neuronen auch noch nach sieben Tagen in Kultur durch IRSp53 induziert wird, ist es nicht nur an der Entstehung, sondern auch an den Veränderungen des dendritischen Netzwerks zu späteren Zeitpunkten beteiligt. Damit ist das Protein möglicherweise in die synaptische Plastizität und daraus resultierend in Prozesse des Lernens und Erinnerns involviert.

Die Ausbildung von Synapsen ist eine Voraussetzung um Erinnerungen zu formen und ihre Anzahl kann die Stärke der synaptischen Transmission beeinflussen. In den kultivierten IRSp53 *knock out*-Neuronen führte die Defizienz des Proteins zu einer Verzögerung der Synapsenbildung und zu einer leichten Verminderung der Synapsenanzahl während der Entwicklung. Die Identifizierung der Synapsen erfolgte anhand der PSD-95-Cluster, die sich während der synaptischen Reifung in der exzitatorischen Postsynapse ausbilden (siehe 3.6.3). PSD-95 interagiert in der reifen Synapse mit den NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2A/B und sorgt für das Clustering der Rezeptoren in der postsynaptischen Membran (Kornau et al. 1995, Niethammer et al. 1996). Die Verankerung dieser Rezeptoren erfolgt durch die indirekte Interaktion von PSD-95 mit Shank, welche z. B. über die GKAP-Proteinfamilie oder IRSp53 verläuft (Kim et al. 1997, Naisbitt et al. 1999, Tu et al. 1999, Soltau et al. 2004). Der Unterschied zwischen den beiden Interaktionsmöglichkeiten in der postsynaptischen Dichte besteht darin, dass die Bindung des IRSp53/PSD-95-Komplexes an Shank durch Cdc42 reguliert werden kann. Bei der Synapsenreifung kommt es möglicherweise zu einer Signalkaskade, bei der das aktivierte Cdc42 IRSp53 in eine offene Konformation überführt, die dann mit Shank interagiert. Bei den IRSp53 knock out-Neuronen kann dieser Signalweg aufgrund der IRSp53-Defizienz nicht aktiviert werden und die Verankerung von PSD-95 mit Shank wird lediglich über GKAP sowie einige andere Proteine vermittelt. Möglicherweise ist das ein Grund für die verzögerte Synapsenbildung in den knock out-Neuronen. Die verspätete Interaktion von PSD-95 und Shank könnte sich auch auf das durch PSD-95 vermittelte Clustering des Neuroligin/Neurexin-Komplexes als Voraussetzung für die Synapsenbildung auswirken. Das verzögerte Clustering könnte sowohl die verzögerte Reifung als auch die leicht verminderte Anzahl der Synapsen in den knock out-Neuronen erklären.

Anhand der immuncytochemischen Analyse der *knock out*-Neurone konnte nicht bestimmt werden, ob die Menge des PSD-95 insgesamt leicht abgenommen hat oder ob das Protein aufgrund seiner diffusen Lokalisation im Cytosol durch den Antikörper nicht mehr nachweisbar war. Falls die *knock out*- im Vergleich zu den Wildtyp-Neuronen einen geringeren PSD-95-Gehalt in der postsynaptischen Dichte aufweisen, hat sich möglicherweise das Verhältnis der exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen verändert. Eine reduzierte Konzentration von PSD-95 in der Zelle resultiert in einer Zunahme der inhibitorischen und Reduktion der exzitatorischen Synapsen bei gleichbleibender Synapsengesamtzahl (Prange et al. 2004). In diesem Experiment waren durch die Anfärbung der PSD-95-Cluster nur die exzitatorischen Dichte aus dem Gehirn der *knock out*-Mäuse konnte allerdings keine Reduktion im Gehalt des PSD-95 nachgewiesen werden, so dass die Menge des Proteins unter endogenen Bedingungen in den *knock out*-Mäusen vermutlich unverändert ist (siehe 3.5.2). Die IRSp53-Defizienz in diesem Kompartiment wurde biochemisch nachgewiesen (siehe

3.5.2). Selbst das Gene-Trap Fusionsprotein war nicht in der postsynaptischen Dichte der knock out-Mäuse lokalisiert, was durch die Detektion des Fusionsproteins im Zellkörper und nicht in den Dendriten der Purkinje- sowie cortikalen Zellen bestätigt wurde (siehe 3.3.4). In der PSD der Wildtyp-Mäuse ist IRSp53 allerdings im Vergleich zu den Synaptosomen besonders hoch konzentriert (siehe Dennoch der 3.5.2). war anhand elektronenmikroskopischen Analyse die Existenz der PSD in den Synapsen der homozygoten knock out-Maus nachweisbar und strukturelle Veränderungen nicht zu detektieren. Da bisher keine weiterführenden elektronenmikroskopischen Analysen zum Aufbau der postsynaptischen Dichte gemacht wurden, ist die Beobachtung zur PSD-Struktur wenig aussagekräftig und muss durch quantitative Untersuchungen mehrerer Mäuse näher analysiert werden (siehe 3.4).

Die biochemische Analyse der postsynaptischen Dichte von knock out- und Wildtyp-Mäusen zeigte, dass der Gehalt der Shank-Proteinfamilie, als eines der bedeutensten Komponenten der PSD, weder in den jungen noch in den älteren Mäusen durch die IRSp53-Defizienz verändert war. Bei dem hier verwendeten Shank<sub>PDZ</sub>-Antikörper war es leider unmöglich die einzelnen Mitglieder der Shank-Proteinfamilie separat zu untersuchen, um damit leichte Unterschiede in der Proteinmenge zu detektieren. Allerdings konnte auch die Analyse eines einzelnen Mitglieds der Shank-Familie, Shank3 keinen Unterschied seines Proteingehalts in der reifen PSD der knock out-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen detektieren (siehe 3.5.2). IRSp53 ist damit für die Lokalisation der Shank-Proteine in der postsynaptischen Dichte nicht notwendig. Da die Shank-Proteinfamilie durch seine multiple Domänenstruktur mit vielen verschiedenen Proteinen und damit Signalwegen in Kontakt steht, würde eine Veränderung des Shank-Proteingehalts in der postsynaptischen Dichte vermutlich einen zu großen Einfluss auf die Organisation des postsynaptischen Kompartiments ausüben, der für den Organismus der Maus nicht tragbar wäre. Dies würde die Hypothese stützen, dass Shank eine Plattform bildet, die als Ausgangspunkt für die Konstruktion des massiven Proteinnetzwerks der PSD dient und damit einen grundlegenden Bestandteil der korrekten Formation der postsynaptischen Dichte darstellt (Baron et al. 2006).

Densin-180 ist als Interaktionspartner von Shank1-3 über die Bindung an die CaMKII indirekt mit den NMDA-Rezeptoren verbunden. Das Protein fungiert damit als Gerüstprotein und kann zu einer stabilen Verankerung der Rezeptoren in der postsynaptischen Membran beitragen. IRSp53 interagiert ebenso wie Densin-180 mit der prolinreichen Region von Shank und kann die NMDA-Rezeptoren über die Bindung an PSD-95 mit Shank verankern. Dadurch befinden sich IRSp53 und Densin-180 in unmittelbarer Nähe innerhalb der postsynaptischen

Dichte (Quitsch, Dissertation 2004). In den IRSp53 *knock out*-Mäusen zeigte sich, dass Densin-180 verstärkt in der PSD angereichert ist (siehe 3.5.2). Diesem Phänomen könnte ein Kompensationsmechanismus zu Grunde liegen, der versucht die Folgen der IRSp53-Defizienz in der PSD auszugleichen. Möglicherweise ist die Verankerung der Rezeptoren durch den Funktionsverlust von IRSp53 geschwächt, so dass die Stabilisierung der Rezeptoren durch die verstärkte Präsenz von Densin-180 gewährleistet werden soll.

Densin-180 hat außerdem eine Funktion in bezug auf die neuronale Morphologie, da seine Überexpression in Neuronen zu einer verstärkten Zunahme dendritischer Verzweigungen führt. Die Koexpression von Shank verhindert das Auswachsen der Dendriten und blockiert die Interaktion des Densin-180 mit dem Protein S-Catenin, das ebenfalls dendritische Verzweigungen induziert. Nach einem Modell von Quitsch et al. (2005) führt die Interaktion von Densin-180 mit δ-Catenin an der Zellperipherie über einen noch unbekannten Signalweg zur Ausbildung dendritischer Verzweigungen. Die Bindung von Shank an Densin-180 löst eine Konformationsänderung des Densin-180 aus, was die Interaktion des Proteins mit δ-Catenin aufhebt, damit die Ausbildung dendritscher Verzweigungen verhindert und zur Rekrutierung des Proteins in die postsynaptische Dichte führt (Quitsch et al. 2005). Die Anreicherung des Densin-180 in den IRSp53 knock out-Mäusen könnte in einer vermehrten Bindung des Proteins an  $\delta$ -Catenin resultieren und möglicherweise das Auswachsen von Dendriten induzieren. Damit würde die in den kultivierten knock out-Neuronen nachgewiesene Reduktion dendritischer Verzweigungen und Primärdendriten (siehe 3.6.1) in den Gehirnen der knock out-Mäuse kompensiert werden. Diese Hypothese müsste allerdings durch weitere Analysen z. B. zur anatomischen Struktur des IRSp53 knock out-Gehirns belegt werden.

Die Verankerung der NMDA-Rezeptoren mit Shank in der postsynaptischen Dichte kann über verschiedene Proteinkomplexe erfolgen. Zum einen kann sie über die Interaktion mit der CaMKII und Densin-180 oder über PSD-95 und IRSp53 stattfinden. Außerdem besteht die Möglichkeit den NMDA-Rezeptor über die Bindung von PSD-95 mit GKAP und Shank zu stabilisieren (Abb. 4.2). Die IRSp53-Defizienz resultierte in einer Anreicherung der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2A, B und 1 in der postsynaptischen Dichte der *knock out*-Mäuse (siehe 3.5.2). Die schwächere Anreicherung von NR2A in den zwei Wochen alten *knock out*-Mäusen verglichen mit den zwei Monate alten Tieren ist vermutlich auf die geringe Expression dieser Untereinheit in den ersten zwei Lebenswochen zurückzuführen (Kew et al. 1998). Da die Verankerung der NMDA-Rezeptoren in der PSD der *knock out*-Mäuse nur noch durch die PSD-95/GKAP- bzw. CaMKII/Densin-180-Interaktion erfolgen kann, ist die

4



Abb. 4.2: Schematische Darstellung von drei Möglichkeiten zur Verankerung der NMDA-Rezeptoren mit Shank in der postsynaptischen Dichte

Anreicherung des NMDA-Rezeptors möglicherweise eine Konsequenz der Anreicherung von Densin-180 in diesem Kompartiment (siehe 3.5.2). Im Widerspruch hierzu steht allerdings die Beobachtung, dass die Proteinmenge der CaMKII in der PSD der *knock out*-Mäuse unverändert zu sein scheint (siehe 3.5.2). Vermutlich war die leichte Anreicherung der CaMKII durch den verwendeten Antikörper im Western-Blot nicht detektierbar, da die CaMKII 7,4% der gesamten Proteinmasse der PSD umfasst und damit den größten Anteil aller PSD-Proteine ausmacht (Kennedy et al. 1983, Cheng et al. 2006).

Die Anreicherung der NMDA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran der knock out-Mäuse könnte auch in einer verminderten Internalisierung der NMDA-Rezeptoren begründet sein. Dies gäbe einen Hinweis darauf, dass IRSp53 möglicherweise die Internalisierung der NMDA-Rezeptoren in der Wildtyp-Maus stimulieren kann und damit direkt die Effizienz der synaptischen Transmisson beeinflusst. In einem Modell für diese Hypothese kann IRSp53 in seiner inaktiven Konformation PSD-95 binden, aber nicht mit Shank interagieren und somit die Verankerung des NMDA-Rezeptors mit Shank verhindern. Da bereits gezeigt wurde, dass die durch PSD-95 vermittelte Stabilisierung der NMDA-Rezeptoren die Internalisierung hemmt (Roche et al. 2001, Prybylowski et al. 2005), könnte IRSp53 in seiner geschlossenen Konformation durch die Bindung von PSD-95 die Verankerung der NMDA-Rezeptoren destabilisieren. IRSp53 würde damit stimulierend auf die Clathrin-vermittelte Internalisierung der Rezeptoren wirken (Abb. 4.3). Die Internalisierung des NMDA-Rezeptors erfolgt hauptsächlich über die NR2B-Untereinheit, da sie das Bindemotif YEKL für das Clathrin Adaptorprotein AP-2 und weiter upstream die PDZ-Bindedomäne für die Bindung an PSD-95 besitzt (Roche et al. 2001, Prybylowski et al. 2005). Vermutlich ist darin auch die besonders deutliche Anreicherung der NR2B-Untereinheit im Vergleich zu den anderen Untereinheiten in der PSD der knock out-Mäuse begründet. Nach Aktivierung von IRSp53 durch Cdc42 oder 4

Rac1 kann der IRSp53/PSD-95-Komplex den NMDA-Rezeptor mit Shank verankern, damit stabilisierend wirken und die Internalisierung hemmen (Abb. 4.3).



Abb. 4.3: Modell zur Beteiligung von IRSp53 an der Internalisierung von NMDA-Rezeptoren. In der geschlossenen Konformation destabilisiert IRSp53 die Verankerung der NMDA-Rezeptoren mit Shank und stimuliert damit die Clathrin-vermittelte Internalisierung. In der offenen Konformation verankert IRSp53 die NMDA-Rezeptoren mit Shank, so dass die Internalisierung gehemmt wird.

IRSp53 würde somit als Regulator der durch Clathrin vermittelten Internalisierung der NMDA-Rezeptoren fungieren und wäre durch seine Affinität zu den GTPasen Rac1/Cdc42 schnell und lokal begrenzt aktivierbar. Da in den *knock out*-Mäusen die Stabilisierung der NMDA-Rezeptoren durch IRSp53 nicht mehr reguliert werden kann, sind die Rezeptoren möglicherweise mit Hilfe der Gerüstproteine wie z. B. PSD-95 und GKAP sehr fest verankert. Die NMDA-Rezeptoren wären damit für die Internalisierung unzugänglich, was zu einer Anreicherung in der postsynaptischen Membran führen würde. Die Hypothese zur Beteiligung von IRSp53 an der Internalisierung von NMDA-Rezeptoren wird durch die Beobachtungen von Hori et al. (2005) unterstützt. Er konnte zeigen, dass die Stimulation der NMDA-Rezeptoren mit Glutamat zu einer Translokation von diffus im Dendriten verteilten IRSp53 an die postsynaptische Membran führt. Die Translokation des IRSp53 war von der Phosphorylierung durch die Proteinkinase C abhängig und hatte einen Anstieg der EPSC-Amplitude zur Folge. IRSp53 ist somit direkt in die synaptische Aktivität involviert und durch die Proteinkinase C, welche einen wichtigen Bestandteil der Langzeitpotenzierung darstellt regulierbar (Hori et al. 2005, Soderling et al. 2000).

Der Transport der Clathrin-bedeckten Vesikel während der Internalisierung verläuft vermutlich auch in Neuronen mit Hilfe des Motorproteins Myosin6 entlang der Aktinfilamente von der Membran weg in das Innere der Zelle (Hasson et al. 2003, Osterweil et al. 2005). Die Fähigkeit von aktiviertem IRSp53 die F-Aktin-Polymerisation zu stimulieren und Aktinfilamente zu bündeln wäre eine weitere Möglichkeit des Proteins die Internalisierung der NMDA-Rezeptoren zu fördern. Außerdem wird der Regulation der durch vermittelten Aktin-Polymerisation eine wesentliche Bedeutung Arp2/3bei der Internalisierung von Vesikeln zugeschrieben (Schafer et al. 2002). IRSp53 könnte durch die Interaktion mit WAVE2 den Arp2/3-Komplex aktivieren, dadurch die Aktin-Polymerisation und daraus resultierend die Internalisierung stimulieren. In den homozygoten knock out-Mäusen fehlt die durch IRSp53 vermittelte Regulation der F-Aktin-Polymerisation. Möglicherweise führt dies zu einer Hemmung der Clathrin-vermittelten Internalisierung und bewirkt die Anreicherung der NMDA-Rezeptoren in der postsynaptischen Dichte. Da die Langzeitpotenzierung von der Verfügbarkeit postsynaptischer Rezeptoren abhängt wäre IRSp53 in diesen Prozess involviert und damit an Vorgängen des Erinnerns und Lernens beteiligt. Die durchgehend stärkere Anreicherung der NR1- sowie NR2B-Untereinheit in der PSD der zwei Wochen alten IRSp53 knock out-Mäuse verglichen mit den zwei Monate alten Tieren könnte darin begründet sein, dass sich die Maus im Alter von zwei Wochen in einer sehr lernaktiven Entwicklungsphase befindet.

Insgesamt konnte in den neuronalen Analysen der homozygoten *knock out*-Mäuse festgestellt werden, dass die IRSp53-Defizienz eine Reduktion der Dendriten, eine verzögerte Synapsenbildung und eine Anreicherung der NMDA-Rezeptoren sowie des Proteins Densin-180 in der postsynaptischen Dichte bewirkt. Die getesteten Mäuse zeigten trotz dieser Defizite keine offensichtlichen Einschränkungen in ihrer Lebensfähigkeit und waren fertil. Möglicherweise wird ein Teil der detektierten Defizite wie z. B. die Reduktion der dendritischen Verzweigungen der Neurone in Kultur durch die vielfältigen Signalwege im Mausorganismus kompensiert. Ein schwerwiegender Phänotyp der IRSp53 *knock out*-Mäuse äußerte sich anhand der Geburtenrate homozygoter Tiere. Es wurden nur ca. 20% der zu erwartenden homozygoten Mäuse geboren, so dass vermutlich 80% der Mäuse pränatal sterben (siehe 3.3.2). Dies ist wahrscheinlich auf die starke Expression des Proteins in allen wichtigen Organen der Maus zurückzuführen (siehe 3.3.4, 3.3.5) und gibt Hinweise auf die Beteiligung von IRSp53 an vielen, zum Großteil vermutlich noch unbekannten Signalwegen des Mausorganismus.

#### 5. Zusammenfassung

IRSp53 induziert Veränderungen in der Organisation des Aktin-Cytoskeletts und nimmt dadurch direkten Einfluss auf die Morphogenese von Zellen. Das Protein ist im Gehirn und besonders in der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen angereichert. Es interagiert mit den Shank-Proteinen, die eine Verankerung verschiedener Glutamat-Rezeptoren mit dem Cytoskelett vermitteln. Die Bindung von IRSp53 an PSD-95 verknüpft das Protein mit den NMDA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Überexpression von IRSp53 das vermehrte Auswachsen dendritischer Verzweigungen und spines in Neuronen induziert. Dabei war die Ausbildung postsynaptischer Proteinkomplexe stark beeinträchtigt, was anhand der PSD-95-Cluster nachgewiesen wurde. Die isolierte IM-Domäne von IRSp53 war allein in der Lage morphologische Veränderungen des Neurons hervorzurufen, während das Fehlen der Cdc42/Rac1-Bindestelle (CRIB-Domäne) innerhalb von IRSp53 zu einem unkontrollierten, sehr starken Auswachsen filopodienartiger Ausläufer führte. Upstream von Cdc42 sowie Rac1 und ihrem Effektor IRSp53 agierende GEFs konnten anhand von Kopräzipitationen aus HEK293-Zellen nicht identifiziert werden. Die neuronale Überexpression eines dominantnegativen Konstrukts (IRSASH3), das die weitere Interaktion des Proteins mit Aktinassoziierten Proteinen wie z.B. Mena, WAVE2 und Shank unmöglich machte, resultierte in einer Reduktion der Dendriten und spines. Der vollständige Funktionsverlust von IRSp53 führte ebenfalls zu einer verminderten Anzahl dendritischer Verzweigungen und Primärdendriten, was anhand von Neuronen einer durch Gene-Trap Mutagenese hergestellten IRSp53 knock out-Maus gezeigt wurde. Die Reduktion der dendritischen Verzweigungen konnte durch Überexpression von IRSp53 sowohl in der frühen als auch in der späten Differenzierungsphase der knock out-Neurone kompensiert werden. Dies war bei der reduzierten Primärdendritenanzahl nur in der frühen neuronalen Entwicklungsphase möglich. Die verminderte Anzahl der PSD-95-Cluster in den homozygoten knock out-Neuronen ließ auf eine verzögerte Synapsenbildung der IRSp53 knock out-Mäuse schließen.

Proteinbiochemische Analysen detektierten eine Anreicherung des Proteins Densin-180 und des NMDA-Rezeptors in der postsynaptischen Dichte der *knock-out* Mäuse. Möglicherweise ist das ein erster Hinweis auf eine Beteiligung von IRSp53 an der Internalisierung von NMDA-Rezeptoren. Die Expression des Proteins in fast allen Gewebetypen und die außergewöhnlich geringe Geburtenrate homozygoter *knock out*-Mäuse zeigte die Bedeutung von IRSp53 für die Funktionalität des Mausorganismus.

5

### 6. Literaturverzeichnis

- Abbott, MA, Wells, DG and Fallon, JR. (1999) The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J Neurosci*, **19**: 7300-7308.
- Ahnert-Hilger, G, Holtje, M, Grosse, G, Pickert, G, Mucke, C, Nixdorf-Bergweiler, B, Boquet, P, Hofmann, F and Just, I. (2004) Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *J Neurochem*, **90**: 9-18.
- Alberts, B, Bray, D, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Watson, JD. (Hrsg.) (1994) Molecular Biology of the Cell (3. Aufl.). *Garland Publishing, Inc., New York*
- Baron, MK, Boeckers, TM, Vaida, B, Faham, S, Gingery, M, Sawaya, MR, Salyer, D, Gundelfinger, ED and Bowie, JU. (2006) An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science*, **311**: 531-535.
- Becker, LE, Armstrong, DL and Chan, F. (1986) Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann Neurol*, **20**: 520-526.
- Bockmann, J, Kreutz, MR, Gundelfinger, ED and Bockers, TM. (2002) ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53. *J Neurochem*, **83**: 1013-1017.
- Boeckers, TM, Liedtke, T, Spilker, C, Dresbach, T, Bockmann, J, Kreutz, MR and Gundelfinger, ED. (2005) C-terminal synaptic targeting elements for postsynaptic density proteins ProSAP1/Shank2 and ProSAP2/Shank3. *J Neurochem*, **92**: 519-524.
- Boeckers, TM, Mameza, MG, Kreutz, MR, Bockmann, J, Weise, C, Buck, F, Richter, D, Gundelfinger, ED and Kreienkamp, HJ. (2001) Synaptic scaffolding proteins in rat brain. Ankyrin repeats of the multidomain Shank protein family interact with the cytoskeletal protein alpha-fodrin. *J Biol Chem*, **276**: 40104-40112.
- Boeckers, TM, Winter, C, Smalla, KH, Kreutz, MR, Bockmann, J, Seidenbecher, C, Garner, CC and Gundelfinger, ED. (1999) Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem Biophys Res Commun*, 264: 247-252.
- Boeckers, TM, Kreutz, MR, Winter, C, Zuschratter, W, Smalla, KH, Sanmarti-Vila, L, Wex, H, Langnaese, K, Bockmann, J, Garner, CC and Gundelfinger, ED. (1999) Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZdomain protein highly enriched in the postsynaptic density. *J Neurosci*, **19**: 6506-6518.
- Bonhoeffer, T and Yuste, R. (2002) Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron*, **35**: 1019-1027.

- Bradford, MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248-254.
- Bradke, F and Dotti, CG. (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science*, **283**: 1931-1934.
- Brown, MD, Cornejo, BJ, Kuhn, TB and Bamburg, JR. (2000) Cdc42 stimulates neurite outgrowth and formation of growth cone filopodia and lamellipodia. *J Neurobiol*, **43**: 352-364.
- Brewer, GJ, Torricelli, JR, Evege, EK and Price, PJ. (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, **35**: 567-576.
- Burbelo, PD, Drechsel, D and Hall, A. (1995) A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem*, **270**: 29071-29074.
- Cheng, D, Hoogenraad, CC, Rush, J, Ramm, E, Schlager, MA, Duong, DM, Xu, P, Wijayawardana, SR, Hanfelt, J, Nakagawa, T, Sheng, M and Peng, J. (2006) Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol Cell Proteomics*, 5: 1158-1170.
- Chih, B, Engelman, H and Scheiffele, P. (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*, **307**: 1324-1328.
- Cho, KO, Hunt, CA and Kennedy, MB. (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, **9**: 929-942.
- Choi, J, Ko, J, Racz, B, Burette, A, Lee, JR, Kim, S, Na, M, Lee, HW, Kim, K, Weinberg, RJ and Kim, E. (2005) Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *J Neurosci*, 25: 869-879.
- Cline, HT. (2001) Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, **11**: 118-126.
- Connolly, BA, Rice, J, Feig, LA and Buchsbaum, RJ. (2005) Tiam1-IRSp53 complex formation directs specificity of rac-mediated actin cytoskeleton regulation. *Mol Cell Biol*, **25**: 4602-4614.
- Dailey, ME and Smith, SJ. (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci*, **16**: 2983-2994.
- Dean, C and Dresbach, T. (2006) Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci*, **29**: 21-29.

- Deng, J and Dunaevsky, A. (2005) Dynamics of dendritic spines and their afferent terminals: spines are more motile than presynaptic boutons. *Dev Biol*, **277**: 366-377.
- Dotti, CG, Sullivan, CA and Banker, GA. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, **8**: 1454-1468.
- Du, Y, Weed, SA, Xiong, WC, Marshall, TD and Parsons, JT. (1998) Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol Cell Biol*, 18: 5838-5851.
- Dunaevsky, A and Mason, CA. (2003) Spine motility: a means towards an end? *Trends Neurosci*, **26**: 155-160.
- Dunaevsky, A, Blazeski, R, Yuste, R and Mason, C. (2001) Spine motility with synaptic contact. *Nat Neurosci*, **4**: 685-686.
- Ehler, E, van Leeuwen, F, Collard, JG and Salinas, PC. (1997) Expression of Tiam-1 in the developing brain suggests a role for the Tiam-1-Rac signaling pathway in cell migration and neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*, **9**: 1-12.
- Ehlers, MD. (2003) Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci*, **6**: 231-242.
- Engert, F and Bonhoeffer, T. (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, **399**: 66-70.
- Fischer, F, Kneussel, M, Tintrup, H, Haverkamp, S, Rauen, T, Betz, H and Wassle, H. (2000) Reduced synaptic clustering of GABA and glycine receptors in the retina of the gephyrin null mutant mouse. *J Comp Neurol*, **427**: 634-648.
- Fischer, M, Kaech, S, Knutti, D and Matus, A. (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, **20**: 847-854.
- Fisher, JL and Macdonald, RL. (1998) The role of an alpha subtype M2-M3 His in regulating inhibition of GABAA receptor current by zinc and other divalent cations. *J Neurosci*, **18**: 2944-2953.
- Fujiwara, T, Mammoto, A, Kim, Y and Takai, Y. (2000) Rho small G-protein-dependent binding of mDia to an Src homology 3 domain-containing IRSp53/BAIAP2. *Biochem Biophys Res Commun*, 271: 626-629.
- Funato, Y, Terabayashi, T, Suenaga, N, Seiki, M, Takenawa, T and Miki, H. (2004) IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. *Cancer Res*, **64**: 5237-5244.
- Giesemann, T, Schwarz, G, Nawrotzki, R, Berhorster, K, Rothkegel, M, Schluter, K, Schrader, N, Schindelin, H, Mendel, RR, Kirsch, J and Jockusch, BM. (2003) Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link

to the microfilament system. J Neurosci, 23: 8330-8339.

- Govind, S, Kozma, R, Monfries, C, Lim, L and Ahmed, S. (2001) Cdc42Hs facilitates cytoskeletal reorganization and neurite outgrowth by localizing the 58-kD insulin receptor substrate to filamentous actin. *J Cell Biol*, **152**: 579-594.
- Hall, A. (1994) Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, **10**: 31-54.
- Harris, KM. (1999) Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, **9**: 343-348.
- Harris, KM and Kater, SB. (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, **17**: 341-371.
- Hasson, T. (2003) Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. J Cell Sci, 116: 3453-3461.
- Hayashi, K, Ohshima, T and Mikoshiba, K. (2002) Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons. *Mol Cell Neurosci*, **20**: 579-594.
- Higgins, D, Burack, M, Lein, P and Banker, G. (1997) Mechanisms of neuronal polarity. *Curr Opin Neurobiol*, **7**: 599-604.
- Holmes, DS and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, **114**: 193-197.
- Hori, K, Yasuda, H, Konno, D, Maruoka, H, Tsumoto, T and Sobue, K. (2005) NMDA receptordependent synaptic translocation of insulin receptor substrate p53 via protein kinase C signaling. J Neurosci, 25: 2670-2681.
- Hori, K, Konno, D, Maruoka, H and Sobue, K. (2003) MALS is a binding partner of IRSp53 at cell-cell contacts. *FEBS Lett*, **554**: 30-34.
- Husi, H and Grant, SG. (2001) Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain. *J Neurochem*, **77**: 281-291.
- Hussain, NK, Jenna, S, Glogauer, M, Quinn, CC, Wasiak, S, Guipponi, M, Antonarakis, SE, Kay, BK, Stossel, TP, Lamarche-Vane, N and McPherson, PS. (2001) Endocytic protein intersectin-l regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol*, **3**: 927-932.
- Inoue, A and Okabe, S. (2003) The dynamic organization of postsynaptic proteins: translocating molecules regulate synaptic function. *Curr Opin Neurobiol*, **13**: 332-340.
- Irie, F and Yamaguchi, Y. (2002) EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat Neurosci*, **5**: 1117-1118.
- Ishizaki, T, Morishima, Y, Okamoto, M, Furuyashiki, T, Kato, T and Narumiya, S. (2001) Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat*

*Cell Biol*, **3**: 8-14.

- Kasai, H, Matsuzaki, M, Noguchi, J, Yasumatsu, N and Nakahara, H. (2003) Structure-stabilityfunction relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*, **26**: 360-368.
- Kemper, TL and Bauman, M. (1998) Neuropathology of infantile autism. J Neuropathol Exp Neurol, 57: 645-652.
- Kennedy, MB, Beale, HC, Carlisle, HJ and Washburn, LR. (2005) Integration of biochemical signalling in spines. *Nat Rev Neurosci*, **6**: 423-434.
- Kennedy, MB, McGuinness, T and Greengard, P. (1983) A calcium/calmodulin-dependent protein kinase from mammalian brain that phosphorylates Synapsin I: partial purification and characterization. *J Neurosci*, **3**: 818-831.
- Kew, JN, Richards, JG, Mutel, V and Kemp, JA. (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. J Neurosci, 18: 1935-1943.
- Kim, E and Sheng, M. (2004) PDZ domain proteins of synapses. Nat Rev Neurosci, 5: 771-781.
- Kim, E, Naisbitt, S, Hsueh, YP, Rao, A, Rothschild, A, Craig, AM and Sheng, M. (1997) GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol*, **136**: 669-678.
- Kirsch, J, Langosch, D, Prior, P, Littauer, UZ, Schmitt, B and Betz, H. (1991) The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem*, **266**: 22242-22245.
- Kneussel, M and Betz, H. (2000) Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol*, 525 Pt 1: 1-9.
- Kneussel, M and Betz, H. (2000) Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci*, 23: 429-435.
- Kornau, HC, Schenker, LT, Kennedy, MB and Seeburg, PH. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, 269: 1737-1740.
- Krugmann, S, Jordens, I, Gevaert, K, Driessens, M, Vandekerckhove, J and Hall, A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol*, **11**: 1645-1655.
- Kutsche, K, Yntema, H, Brandt, A, Jantke, I, Nothwang, HG, Orth, U, Boavida, MG, David, D, Chelly, J, Fryns, JP, Moraine, C, Ropers, HH, Hamel, BC, van Bokhoven, H and Gal, A. (2000) Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet*, 26: 247-250.

- Lanier, LM, Gates, MA, Witke, W, Menzies, AS, Wehman, AM, Macklis, JD, Kwiatkowski, D, Soriano, P and Gertler, FB. (1999) Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron*, 22: 313-325.
- Lebrand, C, Dent, EW, Strasser, GA, Lanier, LM, Krause, M, Svitkina, TM, Borisy, GG and Gertler, FB. (2004) Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron*, **42**: 37-49.
- Leonard, AS, Bayer, KU, Merrill, MA, Lim, IA, Shea, MA, Schulman, H and Hell, JW. (2002) Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II docking to N-methyl-Daspartate receptors by calcium/calmodulin and alpha-actinin. *J Biol Chem*, **277**: 48441-48448.
- Levinson, JN and El-Husseini, A. (2005) New players tip the scales in the balance between excitatory and inhibitory synapses. *Mol Pain*, **1**: 12.
- Lim, S, Naisbitt, S, Yoon, J, Hwang, JI, Suh, PG, Sheng, M and Kim, E. (1999) Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development. *J Biol Chem*, **274**: 29510-29518.
- Lu, YM, Taverna, FA, Tu, R, Ackerley, CA, Wang, YT and Roder, J. (2000) Endogenous Zn(2+) is required for the induction of long-term potentiation at rat hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Synapse*, **38**: 187-197.
- Machesky, LM, Mullins, RD, Higgs, HN, Kaiser, DA, Blanchoin, L, May, RC, Hall, ME and Pollard, TD. (1999) Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 3739-3744.
- Mackie, S and Aitken, A. (2005) Novel brain 14-3-3 interacting proteins involved in neurodegenerative disease. *Febs J*, **272**: 4202-4210.
- Maletic-Savatic, M, Malinow, R and Svoboda, K. (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*, **283**: 1923-1927.
- Matsuzaki, M, Honkura, N, Ellis-Davies, GC and Kasai, H. (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, **429**: 761-766.
- McWilliams, RR, Gidey, E, Fouassier, L, Weed, SA and Doctor, RB. (2004) Characterization of an ankyrin repeat-containing Shank2 isoform (Shank2E) in liver epithelial cells. *Biochem J*, **380**: 181-191.
- Miki, H and Takenawa, T. (2002) WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**: 93-99.
- Miki, H, Yamaguchi, H, Suetsugu, S and Takenawa, T. (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*, 408: 732-735.

- Millard, TH, Bompard, G, Heung, MY, Dafforn, TR, Scott, DJ, Machesky, LM and Futterer, K. (2005) Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. *Embo J*, **24**: 240-250.
- Miyahara, A, Okamura-Oho, Y, Miyashita, T, Hoshika, A and Yamada, M. (2003) Genomic structure and alternative splicing of the insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53-kDa protein. *J Hum Genet*, **48**: 410-414.
- Naisbitt, S, Kim, E, Tu, JC, Xiao, B, Sala, C, Valtschanoff, J, Weinberg, RJ, Worley, PF and Sheng, M. (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*, **23**: 569-582.
- Nakanishi, S and Masu, M. (1994) Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **23**: 319-348.
- Nakayama, AY, Harms, MB and Luo, L. (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, **20**: 5329-5338.
- Nakayama, AY and Luo, L. (2000) Intracellular signaling pathways that regulate dendritic spine morphogenesis. *Hippocampus*, **10**: 582-586.
- Nicholls, JG, Martin, AR, Wallace, BG, (Hrsg.) (2002) Vom Neuron zum Gehirn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Niethammer, M, Kim, E and Sheng, M. (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci*, **16**: 2157-2163.
- Nishimura, T, Yamaguchi, T, Tokunaga, A, Hara, A, Hamaguchi, T, Kato, K, Iwamatsu, A, Okano, H and Kaibuchi, K. (2006) Role of numb in dendritic spine development with a Cdc42 GEF intersectin and EphB2. *Mol Biol Cell*, **17**: 1273-1285.
- Nozumi, M, Nakagawa, H, Miki, H, Takenawa, T and Miyamoto, S. (2003) Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone. *J Cell Sci*, **116**: 239-246.
- Oda, K, Shiratsuchi, T, Nishimori, H, Inazawa, J, Yoshikawa, H, Taketani, Y, Nakamura, Y and Tokino, T. (1999) Identification of BAIAP2 (BAI-associated protein 2), a novel human homologue of hamster IRSp53, whose SH3 domain interacts with the cytoplasmic domain of BAI1. *Cytogenet Cell Genet*, **84**: 75-82.
- Okamoto, K, Nagai, T, Miyawaki, A and Hayashi, Y. (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci*, **7**: 1104-1112.
- Okamumoho, Y and Yamada, M. (1999) [Cloning and characterization of cDNA for DRPLA interacting protein]. *Nippon Rinsho*, **57**: 856-861.

- Okamura-Oho, Y, Miyashita, T, Ohmi, K and Yamada, M. (1999) Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein interacts through a proline-rich region near polyglutamine with the SH3 domain of an insulin receptor tyrosine kinase substrate. *Hum Mol Genet*, **8**: 947-957.
- Okamura-Oho, Y, Miyashita, T and Yamada, M. (2001) Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**: 957-960.
- Osterweil, E, Wells, DG and Mooseker, MS. (2005) A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J Cell Biol*, **168**: 329-338.
- Palazzo, AF, Cook, TA, Alberts, AS and Gundersen, GG. (2001) mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol*, **3**: 723-729.
- Papa, M, Bundman, MC, Greenberger, V and Segal, M. (1995) Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J Neurosci*, 15: 1-11.
- Park, E, Na, M, Choi, J, Kim, S, Lee, JR, Yoon, J, Park, D, Sheng, M and Kim, E. (2003) The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. J *Biol Chem*, 278: 19220-19229.
- Parnass, Z, Tashiro, A and Yuste, R. (2000) Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*, **10**: 561-568.
- Penzes, P, Johnson, RC, Kambampati, V, Mains, RE and Eipper, BA. (2001) Distinct roles for the two Rho GDP/GTP exchange factor domains of kalirin in regulation of neurite growth and neuronal morphology. *J Neurosci*, **21**: 8426-8434.
- Penzes, P, Johnson, RC, Sattler, R, Zhang, X, Huganir, RL, Kambampati, V, Mains, RE and Eipper, BA. (2001) The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domaincontaining proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron*, **29**: 229-242.
- Philibert, RA, Winfield, SL, Sandhu, HK, Martin, BM and Ginns, EI. (2000) The structure and expression of the human neuroligin-3 gene. *Gene*, **246**: 303-310.
- Prange, O, Wong, TP, Gerrow, K, Wang, YT and El-Husseini, A. (2004) A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 13915-13920.
- Prybylowski, K, Chang, K, Sans, N, Kan, L, Vicini, S and Wenthold, RJ. (2005) The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron*, **47**: 845-857.
- Qualmann, B, Boeckers, TM, Jeromin, M, Gundelfinger, ED and Kessels, MM. (2004) Linkage of the actin cytoskeleton to the postsynaptic density via direct interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank family. *J Neurosci*, **24**: 2481-2495.

- Quitsch, A, Berhorster, K, Liew, CW, Richter, D and Kreienkamp, HJ. (2005) Postsynaptic shank antagonizes dendrite branching induced by the leucine-rich repeat protein Densin-180. *J Neurosci*, **25**: 479-487.
- Quitsch, A. (2004) Die Funktion postsynaptischer Proteinkomplexe in der neuronalen Morphogenese von Säugern. *Dissertation, Universität Hamburg*
- Redecker, P, Gundelfinger, ED and Boeckers, TM. (2001) The cortactin-binding postsynaptic density protein proSAP1 in non-neuronal cells. *J Histochem Cytochem*, **49**: 639-648.
- Robison, AJ, Bartlett, RK, Bass, MA and Colbran, RJ. (2005) Differential modulation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II activity by regulated interactions with Nmethyl-D-aspartate receptor NR2B subunits and alpha-actinin. *J Biol Chem*, **280**: 39316-39323.
- Robison, AJ, Bass, MA, Jiao, Y, MacMillan, LB, Carmody, LC, Bartlett, RK and Colbran, RJ. (2005) Multivalent interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with the postsynaptic density proteins NR2B, densin-180, and alpha-actinin-2. *J Biol Chem*, 280: 35329-35336.
- Roche, KW, Standley, S, McCallum, J, Dune Ly, C, Ehlers, MD and Wenthold, RJ. (2001) Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci*, **4**: 794-802.
- Rubenstein, JL and Merzenich, MM. (2003) Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav*, **2**: 255-267.
- Sala, C, Roussignol, G, Meldolesi, J and Fagni, L. (2005) Key role of the postsynaptic density scaffold proteins Shank and Homer in the functional architecture of Ca2+ homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci*, **25**: 4587-4592.
- Sala, C, Piech, V, Wilson, NR, Passafaro, M, Liu, G and Sheng, M. (2001) Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*, **31**: 115-130.
- Sambrock, J, Fritsch, EF, Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning A Laboratorial Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schafer, DA. (2002) Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, **14**: 76-81.
- Schwamborn, JC and Puschel, AW. (2004) The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci*, **7**: 923-929.
- Sensi, SL, Yin, HZ, Carriedo, SG, Rao, SS and Weiss, JH. (1999) Preferential Zn2+ influx through Ca2+-permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 2414-2419.

Sheng, M and Kim, MJ. (2002) Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. Science, 298:

776-780.

- Shi, J, Scita, G and Casanova, JE. (2005) WAVE2 signaling mediates invasion of polarized epithelial cells by Salmonella typhimurium. *J Biol Chem*, **280**: 29849-29855.
- Soderling, TR and Derkach, VA. (2000) Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci*, **23**: 75-80.
- Sola, M, Bavro, VN, Timmins, J, Franz, T, Ricard-Blum, S, Schoehn, G, Ruigrok, RW, Paarmann, I, Saiyed, T, O'Sullivan, GA, Schmitt, B, Betz, H and Weissenhorn, W. (2004) Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *Embo J*, 23: 2510-2519.
- Soltau, M, Berhorster, K, Kindler, S, Buck, F, Richter, D and Kreienkamp, HJ. (2004) Insulin receptor substrate of 53 kDa links postsynaptic shank to PSD-95. *J Neurochem*, **90**: 659-665.
- Soltau, M. (2003) Untersuchung zur Funktion des humanen Proteins Shank1 in der Synaptogenese von Säugern. *Dissertation, Universität Hamburg*
- Soltau, M, Richter, D and Kreienkamp, HJ. (2002) The insulin receptor substrate IRSp53 links postsynaptic shank1 to the small G-protein cdc42. *Mol Cell Neurosci*, **21**: 575-583.
- Steward, O and Schuman, EM. (2003) Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron*, **40**: 347-359.
- Suetsugu, S, Miki, H and Takenawa, T. (1999) Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun*, **260**: 296-302.
- Takai, Y, Sasaki, T and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, **81**: 153-208.
- Takashima, S, Becker, LE, Armstrong, DL and Chan, F. (1981) Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Res*, **225**: 1-21.
- Takenawa, T and Miki, H. (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci*, **114**: 1801-1809.
- Tashiro, A, Minden, A and Yuste, R. (2000) Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex*, **10**: 927-938.
- Tobaben, S, Sudhof, TC and Stahl, B. (2000) The G protein-coupled receptor CL1 interacts directly with proteins of the Shank family. *J Biol Chem*, **275**: 36204-36210.
- Tu, JC, Xiao, B, Naisbitt, S, Yuan, JP, Petralia, RS, Brakeman, P, Doan, A, Aakalu, VK, Lanahan, AA, Sheng, M and Worley, PF. (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95
complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. Neuron, 23: 583-592.

- Van Aelst, L and Cline, HT. (2004) Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr Opin Neurobiol*, **14**: 297-304.
- Van Aelst, L and D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, **11**: 2295-2322.
- Vogt, K, Mellor, J, Tong, G and Nicoll, R. (2000) The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, **26**: 187-196.
- Wechsler, A and Teichberg, VI. (1998) Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *Embo J*, **17**: 3931-3939.
- Wyszynski, M, Lin, J, Rao, A, Nigh, E, Beggs, AH, Craig, AM and Sheng, M. (1997) Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature*, 385: 439-442.
- Yamagishi, A, Masuda, M, Ohki, T, Onishi, H and Mochizuki, N. (2004) A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. J Biol Chem, 279: 14929-14936.
- Yao, I, Hata, Y, Hirao, K, Deguchi, M, Ide, N, Takeuchi, M and Takai, Y. (1999) Synamon, a novel neuronal protein interacting with synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein. J Biol Chem, 274: 27463-27466.
- Yeh, TC, Ogawa, W, Danielsen, AG and Roth, RA. (1996) Characterization and cloning of a 58/53-kDa substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **271**: 2921-2928.
- Yoshida, E, Atkinson, TG and Chakravarthy, B. (2004) Neuroprotective gene expression profiles in ischemic cortical cultures preconditioned with IGF-1 or bFGF. *Brain Res Mol Brain Res*, 131: 33-50.
- Zhang, H, Webb, DJ, Asmussen, H, Niu, S and Horwitz, AF. (2005) A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. J *Neurosci*, 25: 3379-3388.
- Zitzer, H, Honck, HH, Bachner, D, Richter, D and Kreienkamp, HJ. (1999) Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. *J Biol Chem*, **274**: 32997-33001.
- Ziv, NE and Smith, SJ. (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, **17**: 91-102.
- Zoghbi, HY. (2003) Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? *Science*, **302**: 826-830.

# 7. Anhang

Konstrukt	Primer/Bezugsquelle	Acc
Cdc42 in pCDNA3T7	Cdc42.for Cdc42.rev	NM001791
Intersectin-1 in pRK5 <i>Flag</i>	PS. McPherson McGill University, Montreal, Canada	NM003024
IRSp53fl in pCMV26- <i>3xFlag/Myc</i>	HH. Hönck, UKE, Hamburg	NM017450
IRSp53 in pCDNA6/Myc-His.C	IRSp53.1.for1 IRSp53.1.rev3	NM017450
IRSp53-IMD in pCMV26-	HH. Hönck, UKE, Hamburg	NM017450
3xFlag/Myc		
IRSp53∆SH3 in pCMV26-	M. Soltau, Strathmann Biotec AG,	NM017450
3xFlag/Myc	Hamburg	
IRSp53∆CRIB in	HH. Hönck, UKE, Hamburg	NM017450
pCMV26/3xFlag/Myc		
IRSp53 <sub>353-521</sub> in pGEX-4T-2	IRSp53.1.for4 IRSp53.1.rev3	NM017450
Kalirin-7 in pEAK 10/His-Myc	P. Penzes, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA	NM032062
β-Pix in pCMV <i>Flag</i>	K. Kutsche, UKE, Hamburg	NM003899
α-Pix in pCDNA3T7	K. Kutsche, UKE, Hamburg	AF207831
Shank1-EGFP in pEGFP.C.1	HH. Hönck, UKE, Hamburg	AF163302

## 7.1 Tabelle der verwendeten Expressionskonstrukte

### 7.2 Tabelle der verwendeten primer

Primer	Schnittstelle	Sequenz	
Cdc42.for	BamHI	TTT.GAA.TTC.ATG.CAG.ACA.ATT.AAG.TGT.GTT.G	
Cdc42.rev	XhoI	TTT.CTC.GAG.TCA.TAG.CAG.CAC.ACA.CCT.G	
IRSp53.1.for1	HindIII	CG.CAA.GCT.TCT.CCG.TCC.TGC.TGC.CGT.TA	
IRSp53.1.rev3	EcoRI	A.CGA.ATT.CCA.GCG.TCC.TCA.CAC.TGT.GG	
IRSp53.1.for4	BamHI	ATA.GGA.TCC.TAT.GCC.ACC.ACC.GAG.AAC	
Primer für die Genotypisierung der Mäuse			
Primer	Sequenz 5'>>3'		
XGfor1	CCTGTGAGCT	GCTCCTGGT	
XGfor2	GCCACTGCAG	TGAGCAAGG	
XGfor3	GCTGTCTACCO	GCTATCACC	
XGfor4	GGCTGACTCA	CTGCCTTGG	
XGfor5	CCGTAAGGTG	GTGATGGCA	
XG6for	CAGGGCTCTA	AGGAACTTGG	
XGfor7	CATGGCTTGC	AGGCAAAGAC	
XGfor8	CAGCAGCCAC	TGTGGAACAG	
XGfor9	GCCACCTGCA	TACAGACCAC	
XGfor10	GAGGAGGTCA	GTGAAGTCATC	
XGfor11	CTCTGTGTGTAG	CCCTGGCTG	

7

XGfor12	CTAGCCAGTATCTGGGACTC
XG6.2rev	GTCTACGTTCCAGCGTCTCC
βgalrev	GTCACGACGTTGTAAAACGACGGG

\_\_\_\_\_

### Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften:

- Quitsch, A, Berhorster, K, Liew, CW, Richter, D and Kreienkamp, HJ. (2005) Postsynaptic shank antagonizes dendrite branching induced by the leucine-rich repeat protein Densin-180. *J Neurosci*, **25**: 479-487.
- Soltau, M, Berhorster, K, Kindler, S, Buck, F, Richter, D and Kreienkamp, HJ. (2004) Insulin receptor substrate of 53 kDa links postsynaptic shank to PSD-95. *J Neurochem*, **90**: 659-665.
- Giesemann, T, Schwarz, G, Nawrotzki, R, Berhorster, K, Rothkegel, M, Schluter, K, Schrader, N, Schindelin, H, Mendel, RR, Kirsch, J and Jockusch, BM. (2003) Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J Neurosci*, **23**: 8330-8339.

Posterpräsentationen auf Kongressen:

Berhörster, K, Soltau, M, Kindler, S, Buck, F, Richter, D, Kreienkamp, HJ. The cdc42 target IRSp53 regulates spine morphology and assembly of synaptic protein complexes; 44th annual meeting of the American Society of Cell Biology (ASCB), Washington DC, USA. Dezember 2004

1st Westerburg Symposium: Spinogenesis and synaptic plasticity, Westerburg. August 2004

24th Blankenese Conference: From genes to therapy, Hamburg. Mai 2004

### Danksagung

Die Promotionsarbeit wurde in der Zeit von April 2003 bis Januar 2005 im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (IZKN) und in der Zeit von Februar 2005 bis Juni 2006 im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dietmar Richter für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im IZKN und für die Bereitstellung der finanziellen Mittel bedanken, die mir die Teilnahme an mehreren, auch ausländischen Konferenzen ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. Andreas Gal danke ich für die Aufnahme unserer Arbeitsgruppe und der Bereitstellung des Labors im Institut für Humangenetik. Des Weiteren bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und die stete Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp für die qualifizierte Betreuung dieser Arbeit sowie die fachlichen Diskussionen und Ratschläge. Außerdem möchte ich mich für das freundschaftliche Arbeitsverhältnis und für die Möglichkeit zu selbständigen, wissenschaftlichem Arbeiten bedanken.

Für die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die fachlichen Diskussionen bedanke ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kreienkamp; insbesondere bei Katrin Falley, Hans-Hinrich Hönck, Gwendlyn Kollmorgen, Arne Quitsch, Felix Francke und Wolf Wente.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik danke ich für die freundliche Aufnahme unserer Arbeitsgruppe im Institut, den regen fachlichen Austausch und die Bereitschaft zu kooperativem Arbeiten. Mein besonderer Dank gilt dabei der Arbeitsgruppe Kutsche für die Bereitstellung diverser Antikörper und Stefan Jacobs für die Hilfe bei den Maus-Perfusionen.