

# **Wechselwirkungen postsynaptischer Proteine aus Mensch und Ratte**

**Dissertation**

des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Marie Germaine Mameza**

aus Kamerun

Hamburg, Januar 2003

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. Dr. RICHTER

Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. H. BRETTING

Tag der Disputation: 14. Februar 2003

Hamburg, den 01. Februar 2003



A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Udo Wienand".

Professor Dr. U. Wienand  
Dekan

*Meiner lieben Mutter Thérèse Pagning gewidmet*

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn **Prof. Dr. Dietmar Richter** in der Zeit von April 2000 bis Februar 2003 am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg durchgeführt.

---

---

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Strukturelle und funktionelle Organisation der postsynaptischen Dichte.....	4
1.1.1	Die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteinfamilie .....	7
1.1.1.2	Ankyrin <i>repeats</i> -Domäne .....	15
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>19</b>
2.1.1	Chemikalien, Feinchemikalien und Verbrauchsmaterial .....	19
2.1.2	Geräte.....	20
2.1.3	Vektoren.....	21
2.1.4	Tiere.....	21
2.1.5	Antikörper.....	21
2.1.6	Enzyme.....	22
2.1.7	Bakterien- und Hefestämme.....	22
2.1.8	Zelllinie.....	22
2.1.9	cDNA-Banken.....	22
2.1.10	Verwendete Kits.....	23
2.1.11	Lösungen und Medien.....	23
2.1.12	Medien.....	26
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>28</b>
2.2.1.1	Kultivierung von HEK293-Zellen.....	28
2.2.1.2	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen.....	28
2.2.1.3	Zellfixierung für die Immuncytochemie.....	29
<b>2.2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.2.2.2	DNA-Gelelektrophorese.....	30
2.2.2.3	Isolierung von DNA-Molekülen aus Agarosengelen.....	31
2.2.2.4	Restriktionsverdau von DNA.....	31
2.2.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
2.2.2.6	Herstellung kompetenter Bakterien.....	31
2.2.2.7	Transformation.....	32
2.2.2.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	32
2.2.2.9	Automatische DNA-Sequenzierung.....	32
<b>2.2.3</b>	<b>Das Hefe-Zwei-System.....</b>	<b>33</b>
2.2.3.1	Prinzip der Methode.....	33

2.2.3.2	Transformation von Hefe-Zellen.....	34
2.2.3.3	Hefe-Zwei-Hybrid- <i>screen</i> (Mating).....	34
2.2.3.4	Galaktosidase-Filtertest.....	35
2.2.3.5	Plasmidisolierung aus Hefezellen.....	35
<b>2.2.4</b>	<b>Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>36</b>
2.2.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	36
2.2.3.2	Western Blot Analyse.....	36
2.2.4.3	Expression und Reinigung von Fusionsproteinen.....	37
2.2.4.4	Reinigung von His- <i>tag</i> -Fusionsproteinen.....	37
2.2.4.5	Reinigung von GST-Fusionsproteinen.....	38
2.2.4.6	Proteinbestimmung.....	38
2.2.4.7	Dialyse.....	38
2.2.4.8	Kopplung von Proteinen an aktivierten NHS-Sepharose.....	38
2.2.4.9	Aufreinigung von Membranfraktionen aus Rattengehirnen.....	39
2.2.4.10	Isolierung von Ankyrin <sub>SSTRIP</sub> His <sub>6</sub> bindenden Proteinen.....	40
2.2.4.11	Vorbereitung der Proben für die massenspektrometrische Analyse.....	41
2.2.4.11	<i>Pulldown assay</i> mit gereinigten Fusionsproteinen.....	41
2.2.4.12	Immunpräzipitation.....	42
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Identifizierung und Charakterisierung von <math>\alpha</math>-Fodrin als Interaktionspartner der Ankyrin <i>repeats</i>-Domäne von SSTRIP und ProSAP2.....</b>	<b>44</b>
3.1.1	Reinigung von Ankyrin <sub>SSTRIP</sub> -His <sub>6</sub> bindenden Proteinen aus Rattengehirnen.....	44
3.1.1.1	Reinigung von Ankyrin <sub>SSTRIP</sub> -His <sub>6</sub> und Kopplung an NHS-Sepharose.....	44
3.1.1.2	Isolierung von Ank <sub>SSTRIP</sub> -His <sub>6</sub> bindenden Proteinen aus Rattengehirnen.....	45
3.1.2	Identifizierung von $\alpha$ -Fodrin als Bindungspartner für die Ankyrin <i>repeats</i> -Domäne von SSTRIP und ProSAP2.....	46
3.1.2.1	Massenspektrometrische Analyse der angereicherten Proteine.....	46
3.1.2.2	Western Blot Analyse des Eluats der Ank <sub>SSTRIP</sub> -His <sub>6</sub> -Sepharose.....	47
3.1.2	Weitere Charakterisierung der Interaktion zwischen $\alpha$ -Fodrin und SSTRIP und ProSAP2.....	47
3.1.2.1	<i>In vitro</i> Bindungsversuch mit rekombinanten Fusionsproteinen der Interagierenden Domänen.....	47
3.1.3.2	Colokalisierungsexperimente in transfizierten HEK-Zellen.....	49
3.1.3.3	Coimmpräzipitation aus transfizierten HEK-Zellen.....	49
3.1.3.4	Untersuchung der Interaktion zwischen $\alpha$ -Fodrin und SSTRIP/ProSAP2 <i>in vivo</i> . .....	51
<b>3.2</b>	<b>Identifizierung einer regulatorisch-intramolekularen Interaktion zwischen dem N-terminalen Segment und der Ankyrin <i>repeats</i>-Region von SSTRIP und ProSAP2.....</b>	<b>55</b>
3.2.1	Yeast-Two-Hybrid <i>screen</i> und Eingrenzung der Bindungsdomäne in der Hefe.....	55
3.2.2	Das N-terminale Segment interagiert intramolekular mit der Ankyrin <i>repeats</i> - Region in der Hefe.....	57
3.2.3	Coaffinitätspräzipitation aus HEK-Zellen.....	59
3.2.4	Das N-Segment von SSTRIP bindet an die Ankyrin <i>repeats</i> -Region in	

	HEK-Zellen .....	60
3.2.5	Das N-Segment und die Ankyrin <i>repeats</i> -Region interagieren intramolekular in HEK-Zellen.....	63
3.2.7	Untersuchung des Einflusses der intramolekularen Interaktion auf die Bindung von $\alpha$ -Fodrin und Sharpin an die Ankyrin <i>repeats</i> -Domäne von SSTRIP.....	66
3.2.7.1	Die intermolekulare Assoziation des N-Segments mit der Ankyrin <i>repeats</i> -Region hat keinen Einfluß auf die Bindung von $\alpha$ -Fodrin an die Ankyrin <i>repeats</i> -Domäne von ProSAP2.....	66
3.2.7.2	Die Bindung von Sharpin an SSTRIP wird durch die intramolekulare Interaktion des N-Segments mit der Ankyrin <i>repeats</i> -Region negativ reguliert.....	68
3.2.7.3	Die Wechselwirkung des N-Segments mit der Ankyrin <i>repeats</i> -Region hemmt die Bindung von Sharpin an SSTRIP nur in einer intra- nicht aber Intermolekularen Art.....	69
3.2.8	Die verstärkte Bindung des N-Segments und Sharpin an SSTRIP nach Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration könnte auf eine Phosphorylierung zurück zu führen sein.....	72
3.2.8.1	Die intramolekulare Interaktion des N-Segments mit der Ankyrin <i>repeats</i> -Domäne wird durch einen Kinaseinhibitor stark gehemmt.....	72
3.2.8.2	Die Sharpin-Bindung an die Ankyrin <i>repeats</i> -Domäne von SSTRIP wird durch einen Kinaseinhibitor gehemmt.....	74
3.2.9	Lokalisierung von Phosphorylierungstellen auf dem SSTRIP <sub>72-774</sub> -Protein.....	76
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>
4.1	Identifizierung von $\alpha$ -Fodrin als Bindungspartner für die Ankyrin <i>repeats</i> -Domäne von SSTRIP und ProSAP2.....	79
4.2	Identifizierung einer intramolekularen Wechselwirkung zwischen dem N-terminalen Segment und der Ankyrin <i>repeats</i> -Region von SSTRIP und ProSAP2.....	85
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>96</b>

---

## Abkürzungen

---

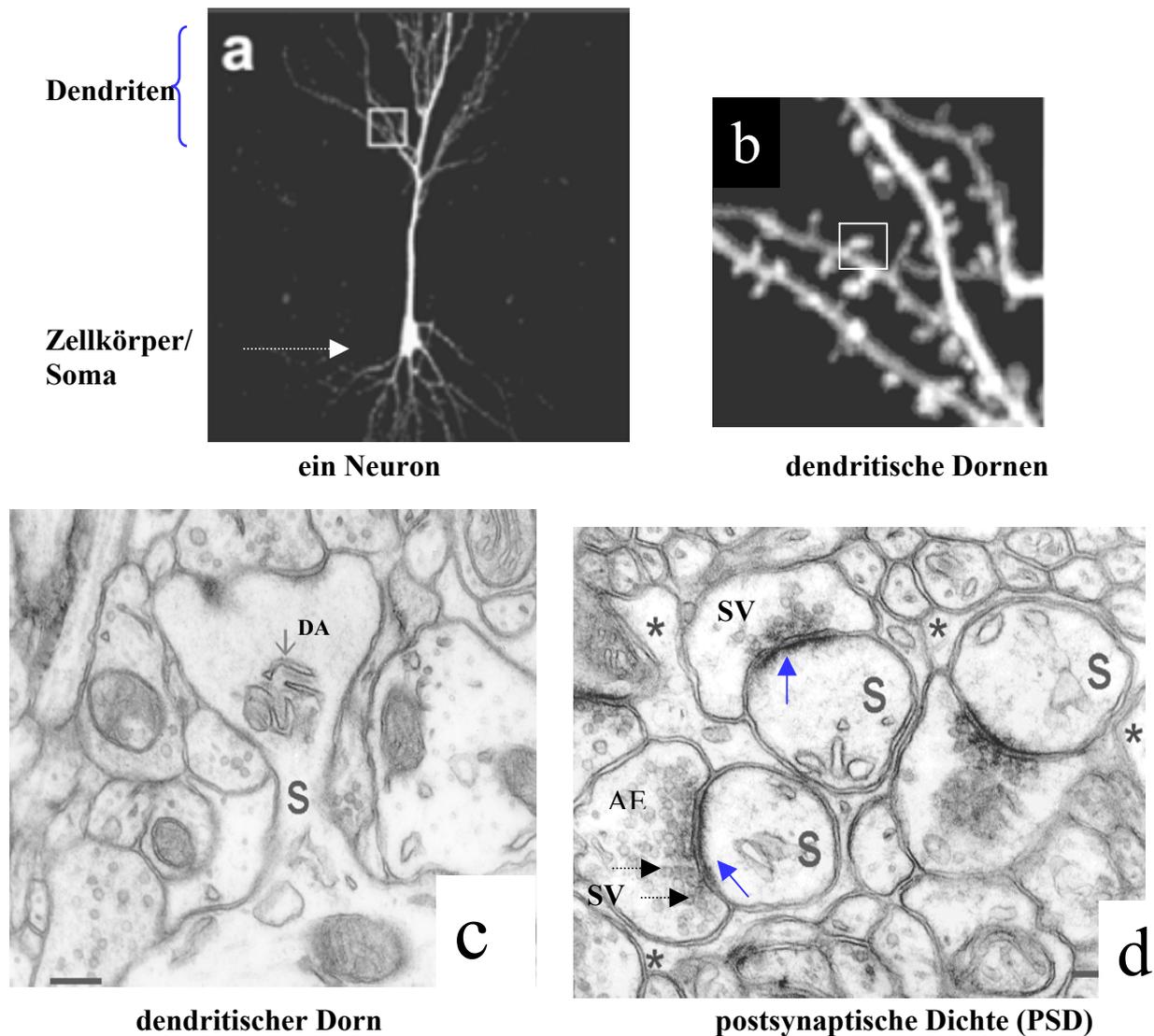
Abb.	Abbildung
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-priopionate
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
$\beta$ -Gal- <i>assay</i>	$\beta$ -Galaktosidase-Filtertest
BES	N,N-bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
Bp	Basenpaar
cDNA	Komplementäre DNA
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
dNTPs	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Verbessertes grünfluoreszierendes Protein ( <i>Enhanced green fluorescence protein</i> )
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
h	Stunde
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
HBSS	Hanks' gepufferte Salzlösung ( <i>Hanks buffered salt solution</i> )
HEPES	2,4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kb	Kilobase
$\mu$ m	mikrometer
min	minute

MS	Massenspektrometrie
mRNA	Boten-RNA (Messenger RNA)
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NMDA	N-methyl-d-aspartat
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	postsynaptische Dichte
pSer	Phosphoriliertes Serin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat–Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TLCK	Tosyl-l-Lysin chlormethylketon
UTR	untranslatierte Region
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D- galaktopyranoside

## 1. Einleitung

Das *Nervensystem* ist für die Steuerung und Koordinierung aller Vitalfunktionen des Organismus und für die Verarbeitung der von außen kommenden, über die Sinnesorgane aufgenommenen Reize verantwortlich. Um seine vielfältigen Aufgabe zu erfüllen, besitzt das Nervengewebe die Fähigkeit Informationen zu erwerben, zu verarbeiten, weiterzuleiten und zu speichern. Ein *Neuron* oder eine Nervenzelle besteht aus einem Zellkörper (Soma) mit einer Vielzahl weit verästelter Fortsätze, die für den Erregungsempfang benötigten *Dendriten*, und den *Axonen*, die die Erregung abgeben (Abb. 1.1a).

Innerhalb der Nervenzellen wird Information durch Aktionspotentiale fortgeleitet. Ihre Weitergabe von einer Zelle zur nächsten geschieht an morphologisch speziell ausgebildeten Kontaktstellen, den *Synapsen*. Ein *Aktionspotential* depolarisiert die präsynaptische Membran und erzeugt dort einen Strom, der bei elektrischen Synapsen direkt über spezielle Zellzell-Verbindungen, die GAP-Junktions an die postsynaptischen Zelle weitergegeben werden kann. Im Gegensatz dazu erfolgt die Weiterleitung des Stromes bei chemischen Synapsen über meist niedermolekulare chemische Verbindungen, die sogenannten *Neurotransmitter*. Abhängig von der chemischen Natur des Neurotransmitters und den entsprechenden postsynaptischen Neurotransmitter-Rezeptoren können Synapsen erregend, hemmend oder modulierend wirken. Inhibitorische Neurotransmitter sind beispielsweise  $\gamma$ -Amino-buttersäure (Engl.  $\gamma$ -Amino butyric acid; GABA) und Glycin, modulierend wirken unter anderem Noradrenaline, Serotonin (5-HT), Dopamine, Acetylcholine und die Neuropeptide. Die meisten Synapsen im Gehirn von Säugetieren sind jedoch exzitatorisch und benutzen *Glutamat* als Neurotransmitter (Garnier et al., 2002). Diese Synapsen werden an den Dornfortsätzen der Dendriten gebildet. *Dornfortsätze* sind kleine röhren- oder pilzförmige Strukturen von ca. 1 bis 3  $\mu\text{m}$  Länge und einem Durchmesser von weniger als 1  $\mu\text{m}$ , die aus den dendritischen Schäften oder aus dem Soma hervorsprossen (Kennedy et al., 2000). Sie bestehen aus einem Knollenkopf (Volumen  $0.001\text{-}1 \mu\text{m}^3$ ) und einem dünnen Hals (Durchmesser 0.1  $\mu\text{m}$ ) der sie mit den Neuronen verbindet (Abb. 1.1c; Nimchinsky et al., 2002). Jedes Neuron macht synaptische Kontakte mit einer Vielzahl anderer Nervenzellen. Die Gesamtzahl der Synapsen, die durch die etwa  $10^{10}\text{-}10^{11}$  Neuronen des menschlichen Gehirns gebildet werden, liegt bei etwa  $10^{15}$  (Gundelfinger et al., 2000).



### Abbildung 1.1 Schematische Darstellung einer Nervenzelle und ihrer Feinstrukturen

Ein Neuron (a) besteht aus einem Zellkörper und einer Vielzahl weit verästelter Fortsätze, den Axonen und den für den Erregungsempfang benötigten Dendriten. Die meistens exzitatorischen Synapsen des zentralen Nervensystems (ZNS) werden an den Dornfortsätzen der Dendriten (b) gebildet. Diese pilzförmigen Strukturen(c) bestehen aus einem Kopf und einen meist dünnen Hals und enthalten manchmal einen Dornenapparat (DA). Synapsen bestehen aus einer prä- und einer postsynaptischen Membran und dem synaptischen Spalt. In der Nähe der präsynaptischen Membran sind zahlreiche synaptische Vesikel (SV) angehäuft. Unterhalb der postsynaptischen Membran befindet sich eine elektronendichte Struktur, die als postsynaptische Dichte (PSD, mit blauen Pfeilen markiert) bezeichnet wird. AE, Axonende; S, dendritischer Dorn (spine). Balken = 100  $\mu\text{m}$  (a), 40  $\mu\text{m}$  (b), 300 nm (c), 250 nm (d). (Abbildungen aus Nimchinsky et al., 2002 entnommen).

Synapsen sind komplexe asymmetrische Zellzell-Kontaktstellen. Sie bestehen aus einer **präsynaptischen Struktur** für die Freisetzung des Neurotransmitters, und der **postsynaptischen Membran** der Zielzelle, die auf den Empfang des Neurotransmittersignals spezialisiert ist. Die synaptische Membranen sind durch den **synaptischen Spalt** voneinander getrennt. Dies ist eine spezialisierte extrazelluläre Zone von ca. 20-30 nm Breite. Ein

Nervenimpuls, der das Axon entlang-wandert und das Ende eines Neurons erreicht, kann den schmalen Spalt nicht überwinden. Er bewirkt jedoch die Ausschüttung von Neurotransmittern aus dem Axonende, die zur postsynaptischen Membran hinüberdiffundieren und dort einen weiteren elektrischen Impuls auslösen können. Neurotransmitter werden nach ihrer Synthese in **synaptischen Vesikel** (SV) gespeichert. Eine typisches Axon-Ende enthält hunderte dieser Vesikel, die in der Nähe der präsynaptischen Membran angehäuft sind (Abb.1.1d).

Unterschiedliche Cytoskelett-assoziierte Strukturen sind auf beiden Seiten der synaptischen Verbindung anzutreffen. Die präsynaptische **Cytomatrix der aktiven Zone (CAZ)** bestimmt und organisiert den Freisetzungsort der Neurotransmitter. In der **postsynaptischen Dichte (PSD)** sind die Neurotransmitter-Rezeptoren, die Ionenkanäle und die Apparate der Signaltransduktion geclustert und verankert. Die Ultrastruktur der CAZ wird durch eine dichte Matrix aus Eiweißmolekülen charakterisiert, die sich aus der Plasmamembran tief in die präsynaptischen Verdickungen erstrecken (Lamdis et al., 1988; Garner et al., 2000). Die PSD ist eine kleine amorphe, faserige Struktur von ungefähr 1µm Durchmesser, die unterhalb der postsynaptischen Membran lokalisiert ist und im Elektronenmikroskop als Verdickung der postsynaptischen Membran erscheint (Abb.1.1d, Kennedy, 1997; 2000). **Zelladhäsionsmoleküle** verbinden durch direkte Interaktion die Prä- und Postsynapse miteinander und sind selber am subsynaptischen Cytoskelett verankert (Abb. 1.2; Murase et al., 1999). CAZ und PSD können biochemisch aufgereinigt werden und enthalten eine große Vielfalt struktureller Proteine, die für die Organisation der Membran-Spezialisierung verantwortlich sind (Garner et al., 2002; Gundelfinger et al., 2000).

Fortschritte in der Charakterisierung und Identifizierung von Proteinen der CAZ und PSD haben neue Einsichten in die molekulare Organisation und Zusammensetzung der synaptischen Neurotransmissions-Apparatur geliefert. Den Proteinen **Bassoon und Piccolo** wird eine entscheidende Funktion als **Gerüstproteine der CAZ** zugeschrieben. Abgesehen von Bassoon und Piccolo wurden bisher nur wenige andere Proteine identifiziert, die für die CAZ spezifisch sind. Die meisten der charakterisierten Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der Organisation der synaptischen Vesikel und in der Speicherung und Freisetzung der Neurotransmitter. Der CAZ wird eine entscheidende Funktion in der Aufrechterhaltung und Regulation der synaptischen Vesikel sowie der räumlichen Koordination der Exo- und Endocytose-Kompartimente zugeschrieben.

## 1.1 Molekulare und funktionelle Organisation der postsynaptischen Dichte

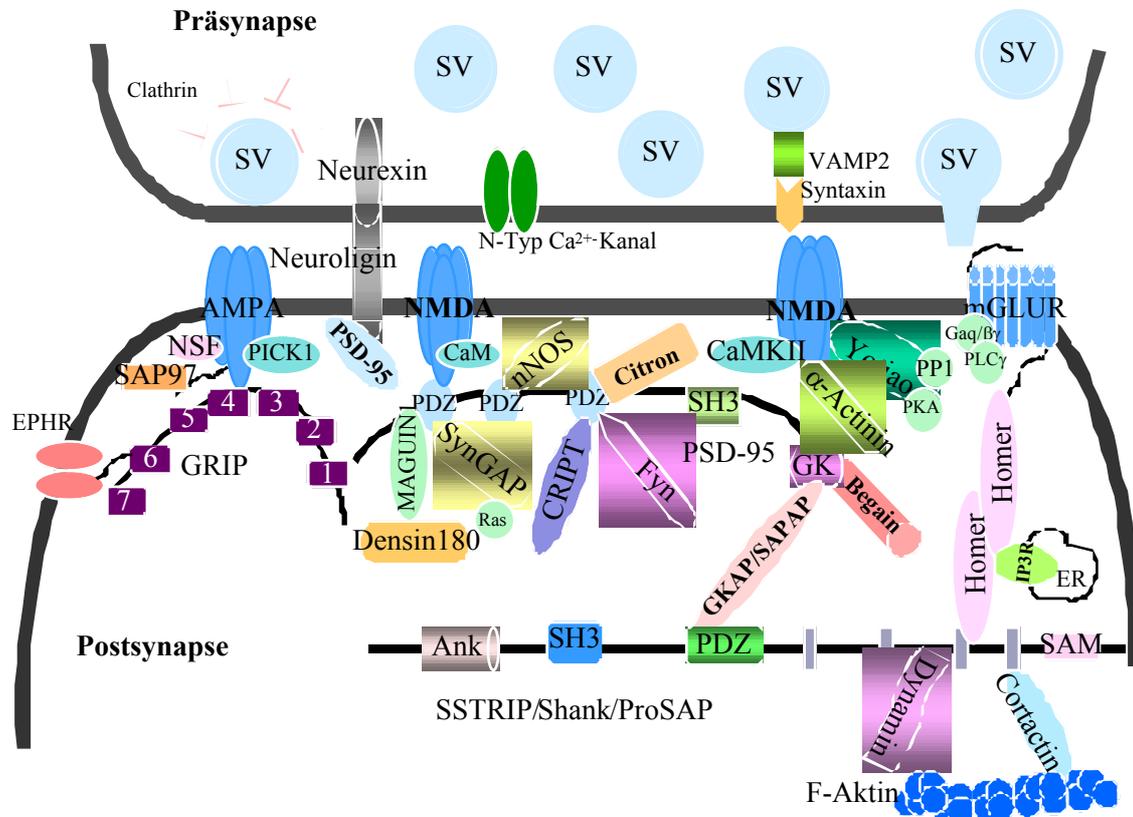
Die Empfangs-Apparatur für Neurotransmitter, liegt direkt gegenüber der Neurotransmitter Freisetzungsstelle. Hier sind die Rezeptoren der Neurotransmitter dicht gepackt, an dem submembranösen Cytoskelett verankert. Zudem sind sie mit den Komponenten des intrazellulären Signaltransduktionsweges verbunden. Unterschiedliche Typen von **Glutamat-Rezeptoren (GluR)** sind an diesen Synapsen dicht verankert: die metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR), die die transmembrane Signaltransduktion über heterotrimere G-Proteine vermitteln, und die ionotropen GluR (iGluR), Neurotransmitter-abhängige Kationenkanälen, (Seeburg et al., 1993; Hollmann et al., 1994; Nakanishi et al., 1994) bei denen die Bindung eines Ligandes eine Konformationsänderung hervorruft, die zur Öffnung des Ionenkanals führt. Ionotrope-Rezeptoren übersetzen somit ein chemisches Signal in einen Ladungsfluß über die Membran. Subtypen von iGluRs unterscheiden sich in ihrer Antwort auf Glutamat und in ihrer Ionenselektivität und werden aus Untereinheiten zusammengesetzt, die von unterschiedlichen Subfamilien der iGluR-Gene kodiert werden. Sie werden entsprechend den exogenen Agonisten als  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA)-, Kainate-, und N-methyl-d-aspartat (NMDA)-Rezeptoren klassifiziert. NMDA-Rezeptoren setzen sich aus den Untereinheiten NR1 und NR2 (NR2A,-B, -C, -D) zusammen, höchst wahrscheinlich in einer tetrameren Stöchiometrie. Die AMPA-Rezeptoren werden aus den Untereinheiten GluR1-4 zusammengesetzt (Dingledine et al., 1999; Hollmann et al., 1994)). AMPA Rezeptoren antworten sofort auf die präsynaptische Glutamat-Freisetzung und sind primär für  $\text{Na}^+$ -Ionen permeabel. Die Aktivierung des Rezeptors ermöglicht  $\text{Na}^+$ -Einstrom und  $\text{K}^+$ -Ausstrom über die Membran, was zu einer kurzen und kleinen Depolarisation führt, die **exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP)** genannt wird (Kennedy, 2000). NMDA-Rezeptoren werden erst nach einer starken Depolarisierung der postsynaptischen Membran (als Ergebnis der vorherigen Aktivierung der AMPA-Rezeptoren) aktiviert und leiten primär  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die ihrerseits intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzen können. Die starke Depolarisierung ist notwendig, um extrazelluläre Magnesium-Ionen zu entfernen, die den Kanal blockieren. Das gemeinsame Wirken von AMPA- und NMDA-Rezeptoren wird als Schlüsselmechanismus für die Induktion der **synaptischen Plastizität** angesehen (Malenka et al., 1993). Es wird angenommen, dass sich längere und kurzfristige plastische Veränderungen auf die Modifikation und Restrukturierung der postsynaptischen Aufnahmeapparatur auswirken. Die Hochfrequenzstimulierung von exzitatorischen Synapsen des Gehirns löst eine langandauernde Zunahme in der Wirksamkeit der synaptischen

Übertragung aus, die **Langzeit-Potenzierung** (Engl. long term potentiation, LTP) genannt wird; der Gegeneffekt wird als **Langzeit-Depression** (Engl. long term depression LTD) bezeichnet. Von diesen nimmt man an, dass sie an wichtigen Phänomenen wie dem **Lernen** und dem **Gedächtnis** beteiligt sind. Die LTP geht mit strukturellen Veränderungen der dendritischen Dornen und der PSD einher (Muller et al., 2000). Die Identifikation und Charakterisierung der Komponenten, aus denen sich diese Strukturen (PSD, dendritische Dornen) zusammensetzen, ist daher für das molekulare Verständnis der synaptischen Funktion und Plastizität entscheidend.

Obwohl die Kainate, mGlu- NMDA- und AMPA-Rezeptoren in den gleichen exzitatorischen Synapsen vorkommen, binden sie eine Reihe unterschiedlicher cytoplasmatischer Proteine. Die meisten Interaktionen der NMDA- und AMPA-Rezeptoren werden jedoch über die Bindung ihrer intrazellulären C-Termini an Proteine mit PDZ-Domänen (PSD-95, Disc Large, Zona Ocluda-1) vermittelt. SAP90/PSD-95 (*synapse-associated protein 90* bzw. *postsynaptic density protein 95*) sind Mitglieder einer Subfamilie der **Membran-assoziierten Guanylatkinase Homologen (MAGuK)**. Die MAGuK sind Multidomänenproteine, die drei PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne (Src-homology 3) und eine Guanylatkinase-ähnliche (GuK)-Domäne besitzen. Vier Mitglieder dieser Familie sind in Säugetieren beschrieben worden (SAP90/PSD-95, SAP97/hDlg, Chapsyn-110/PSD93 und SAP102) (Fujita et al., 2000; Garner et al., 2000b).

Erste Hinweise auf die Funktion der MAGuK innerhalb der strukturellen Organisation der PSD lieferten die Beobachtung, dass ihre PDZ-Domänen 1 und 2 mit den C-Termini der NR2 Untereinheit des NMDA-Typs von iGluRs und verschiedenen Kalium-Kanälen interagieren (Kornau et al., 1995; Kim et al., 1995; Müller et al., 1996). Neuere Studien haben gezeigt, dass Kainat- Rezeptoren ebenfalls durch die MAGuK-Proteine gebündelt und verankert werden können (Garcia et al., 1998). SAP97 bindet außerdem an die GluR1-Untereinheit der AMPA-Rezeptoren (Valtschanoff et al., 2000). Über die MAGuK-Proteine werden eine Reihe cytoplasmatischer Proteine indirekt mit den NMDA-Rezeptoren assoziiert. Diese sind:

**Zelladhäsionsmoleküle.** Es konnte gezeigt werden, dass das postsynaptische Zelladhäsionsmolekül Neurologin an die PDZ3-Domäne von SAP90/PSD-95 bindet und dadurch mit dem NMDA-Rezeptor co-lokalisiert (Irie et al., 1997). Adhäsionsmoleküle scheinen eine wichtige Rolle in der Synaptogenese, der Bildung neuer Synapsen zu spielen.



**Abbildung 1.2 Proteinkomplexe der Postsynapse.** PDZ-Domänen-enthaltende Proteine bilden makromolekulare Signalkomplexe in der Postsynapse und definieren dadurch die postsynaptische Dichte. Zelladhäsionsmoleküle wie Neurexin und Neuroligin verbinden Prä- und Postsynapse miteinander. In der PSD bilden PDZ-Domänen-enthaltende Proteine wie die Membran-assoziierte Guanylatkinase Homologen (MAGuK) der SAP90/PSD95 Familie und dem Glutamat-Rezeptor interagierenden Protein (GRIP), Komplexe um die ionotropen Glutamat-Rezeptoren und verbinden sie durch weitere Wechselwirkungen mit den Komponenten der Signaltransduktion (wie die neuronale Stickstoffsynthase, nNOS) und dem Cytoskelett. Der NMDA-Rezeptor/PSD95-Komplex ist über Multidomänenproteine wie die GKAP/SAPAP und die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine mit dem metabotropen Glutamat-Rezeptor/Homer-Komplex verbunden. SV, synaptische Vesikel, PKA, Proteinkinase A; PP1 Phospholipase1; ER, endoplasmatisches Retikulum; IP3R, Inositol-triphosphat-Rezeptor; EphR, Ephrin-Rezeptor; CaMKII, Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-abhängige Protein Kinase II; NSF, N-ethylmaleimide-sensitiver Faktor; PICK1, Proteinkinase C bindendes Protein; 1-7, PDZ-Domänen 1 bis 7 von GRIP. (Einzelheiten im Text).

**Komponenten des Cytoskeletts.** Weitere Interaktionspartner sind cytoskelettale Elemente wie die Mikrotubuli-assoziierte Proteine Cript und MAP1 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1), die an den PDZ3-Domäne bzw. GuK-Domänen der PSD95 Proteinfamilie binden und die NMDA-Rezeptoren dadurch mit Mikrotubuli verbinden (Abb.1.2 ; Niethammer et al., 1998).

**Komponenten der Signaltransduktion.** Die MAGuK verankern zusätzlich Komponenten der postsynaptischen Signaltransduktion an der PSD. Diese sind beispielsweise die neuronale Stickstoffoxid-Synthase (nNOS), ein durch Calcium reguliertes Enzym, das über eine

PDZ/PDZ-Domänen-Interaktion mit PSD-95 assoziiert ist (Brenman et al., 1996), und Regulatoren kleiner GTPasen wie SynGAP, ein GTPase-aktivierendes Enzym für Ras (rasGAP).

Interaktionspartner der GuK-Domäne sind unter anderem die SAPAP/GKAP (*synapse-associated protein-associated protein* bzw. *guanylate kinase-associated protein*), eine Familie von vier Proteinen, die die NMDA-Rezeptoren mit weiteren Proteinliganden verbinden.

**Der AMPA-Rezeptor Komplex.** AMPA-Rezeptoren sind trotz ihrer Assoziation mit SAP97 weniger fest in der PSD verankert wie die NMDA-Rezeptoren. Weiterhin bindet die Untereinheit GluR2/3 der AMPA-Rezeptoren die GRIP/ABP-Proteine (*glutamate receptor interacting protein* bzw. *AMPA-receptor binding protein*), die aus 6-7 PDZ Domänen bestehen und deren Funktion bislang unklar ist (Dong et al., 1997; Wyszynski et al., 1998). Sie spielen vermutlich eine Rolle in der Verankerung oder dem Austausch der AMPA-Rezeptoren (Bruckner et al., 1999; Wyszynski et al., 1996). Das Konzept der Mobilität von synaptischen AMPA-Rezeptoren an *stillen Synapsen*, die durch Einfügen von AMPA-Rezeptoren aktiviert werden, wird diskutiert (Malenka et al., 1997).

Diese Beobachtungen zeigen, dass die MAGuK Adapter-Proteine sind, die direkt mit synaptischen Membranproteinen interagieren, und eine entscheidende Rolle in der Organisation der PSD spielen (Gundelfinger et al., 2000). Die Suche nach weiteren Interaktionspartnern von Membranrezeptoren und Proteinen der PSD hat zur Identifizierung einer neuen Familie von postsynaptischen Proteinen geführt, der **SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteinfamilie** (Sheng et al., 2000), die als Hauptgerüst-Proteine der PSD angesehen und hier näher beschrieben werden.

### 1.1.1 Die /SSTRIP/ Shank /ProSAP-Proteinfamilie

Die SSTRIP/Shank/ProSAP bilden eine weitere Familie von postsynaptischen Proteinen, die kürzlich aufgrund ihrer Interaktion mit verschiedenen cytoplasmatischen Proteinen und Membranproteinen von unabhängigen Arbeitsgruppen identifiziert wurden und folglich unterschiedlich benannt wurden. Eine Übersicht der gebräuchlichsten Namen ist in Tabelle 1.1 gegeben. In der Arbeitsgruppe von Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie in Hamburg rde mit Hilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems **SSTRIP** entdeckt, ein humanes Homolog zu Shank1. Dabei wurde der C-

Terminus des Somatostatin-Rezeptors Subtyp 2 (SSTR2) als Köder eingesetzt, um eine humane cDNA Gehirn-Bibliothek zu durchsuchen. Das gefundene Protein wurde folglich SSTRIP für *Somatostatin Rezeptor Interacting Protein* genannt (Zitzer et al., 1999). Abbildung 1.3A enthält eine Übersicht der bisher charakterisierten Mitglieder dieser Familie.

**Tabelle 1.1 Alternative Namen der Mitglieder der SSTRIP/Shank/ProSAP Proteinfamilie**

Gene/Proteine	Andere Namen	Ableitung der Namen/Referenzen
Shank1		SH3 domain and <i>ankyrin</i> repeat containing protein (Lim et al., 1999; Naisbitt et al., 1999; Tu et al., 1999)
	SSTRIP	Somatostatin receptor interacting protein (Zitzer et al., 1999a,b)
	Synamon	Yao et al., 1999
	Spank-1	GenBank AF159046
Shank2	ProSAP1	<i>Prolin-rich synapse-associated protein</i> (Böckers et al., 1999)
	CortBP1	<i>Cortactin-binding protein</i> (Lim et al., 1999; Du et al., 1998)
	Spank-3	
Shank3	ProSAP2	<i>Prolin-rich synapse-associated protein</i> (Böckers et al., 1999)
	Spank-2	GenBank AF159047

Es handelt sich um Multidomänenproteine, welche mehrere Spleißvarianten aufweisen. Die längste Spleißvariante enthält am N-Terminus 6 bis 7 Ankyrin-Wiederholungen (*repeats*), gefolgt von einer *src homology 3* (SH3) -Domäne, einer PSD-95/Dlg/Z.O1 (PDZ)-Domäne, einer Polyhistidine-Sequenz in der Mitte des Proteins, einer Region reich an Prolin-Resten, die mehr als die Hälfte des Proteins ausmacht, und einer C-terminalen *sterile alpha motif* (SAM)-Domäne (Abb.1.3A). Alle diese Domänen sind potentielle Protein/Protein-Interaktionsdomänen. Abgesehen von Shank2/ProSAP1, das keine Ankyrin *repeats*-Domäne enthält, besitzen die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine alle die gleiche Domänenstruktur. Homologe Domänen in verschiedenen Proteinen weisen eine Identität von 63 bis 72% in der Aminosäuresequenz auf (Sheng et al. 2000).

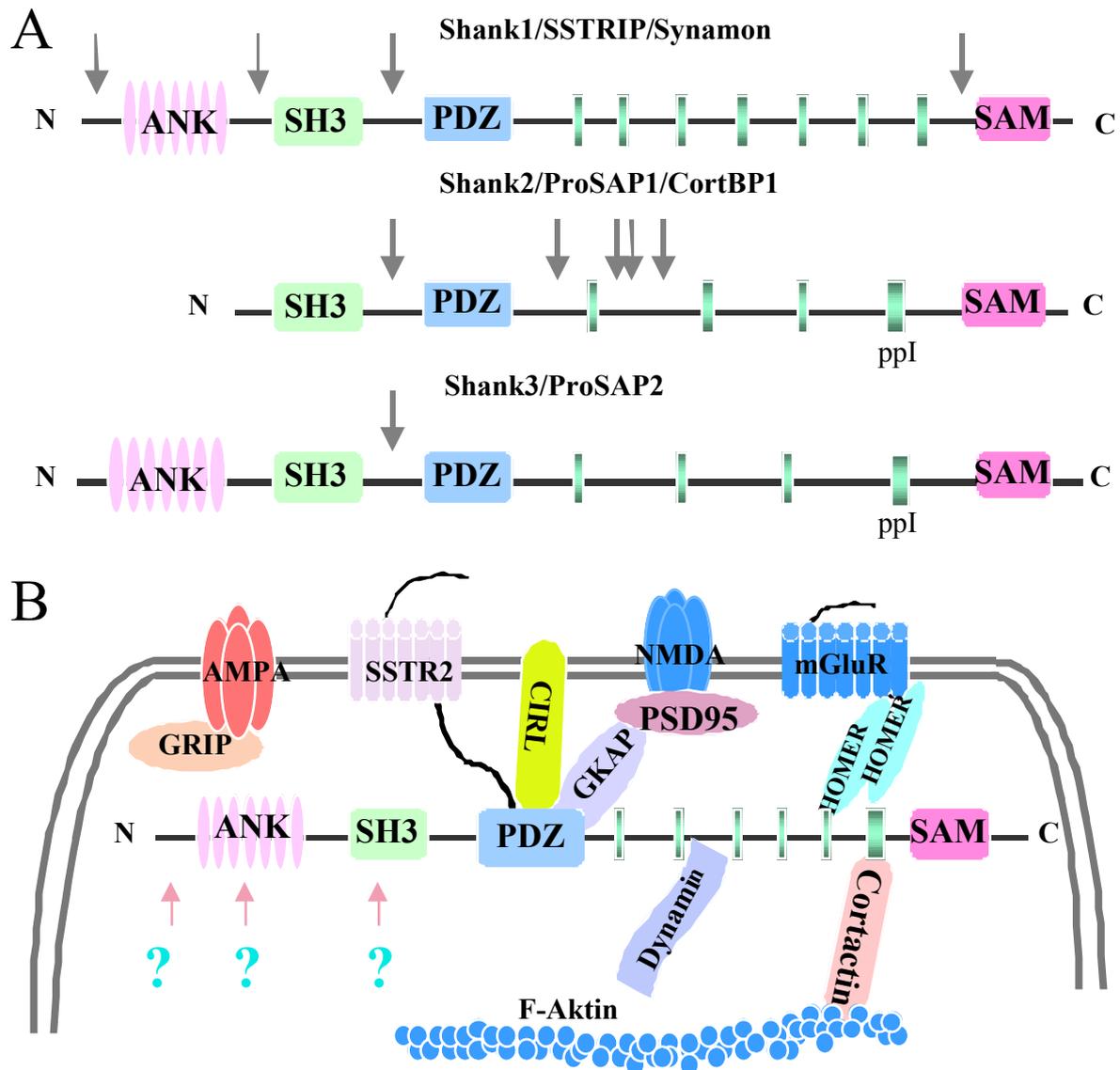
Für die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine ist eine spezifische Lokalisierung an der postsynaptischen Dichte von exzitatorischen, jedoch nicht inhibitorischen Synapsen durch Immunfärbung und Immunelektronenmikroskopie kultivierter Hippocampus-Neuronen gezeigt worden (Naisbitt et al., 1999; Böckers et al., 1999a). Eine detaillierte Auswertung der Immunogold-Partikel zeigte außerdem, dass die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine in ca. 30 nm Abstand von der Membran in der PSD konzentriert sind und damit unterhalb von PSD-95 (5-

10 nm) liegen, bei einer durchschnittlichen **PSD-Dicke von 40-50 nm** (Naisbitt et al., 1999). Die dendritische Lokalisierung ihrer mRNA konnte nachgewiesen werden (Zitzer et al., 1999). Da die Proteinsynthese-Apparatur in den Dendriten vorhanden ist (Tiedge et al., 1996), deutet dies auf eine dendritische Translation der mRNA der SSTRIP/Shank/ProSAP als Antwort auf eine lokale Stimulierung hin.

Bis jetzt sind vier **alternative Spleißstellen** in SSTRIP/Shank1 und ProSAP1/Shank2 sowie eine in ProSAP2/Shank3 identifiziert worden. Die meisten davon liegen zwischen Proteindomänen (Böckers et al. 1999a; Lim et al., 1999; Yao et al., 1999; Zitzer et al., 1999a). Abbildung 1.3A gibt eine Darstellung dieser Stellen wieder. Die meisten Spleißstellen enthalten kurze Abschnitte zusätzlicher Aminosäuren, andere weisen alternative Start- oder Stop-Codons auf. Bisher wurden keine Isoformen von ProSAP1/Shank2 identifiziert, die eine Ankyrin *repeats*-Domäne besitzen. Die funktionelle Relevanz des alternativen Spleißens ist noch unbekannt, das Vorhandensein von alternativen Start-/Stop-Codon deutet jedoch auf eine mögliche Regulation der Domänenstruktur und folglich der Proteinwechselwirkungen der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine durch alternatives Spleißen hin.

Alle drei Gene zeigen unterschiedliche **Expressionsmuster**. In der Ratte kommt SSTRIP/Shank1 mRNA fast ausschließlich im Gehirn vor. ProSAP1/Shank2 mRNA wird stark im Gehirn exprimiert, kommt aber auch in der Leber und in der Niere vor. ProSAP2/Shank3 dagegen wird stark im Herzen und weniger im Gehirn exprimiert (Lim et al., 1999; Yao et al., 1999; Zitzer et al. 1999a; Du et al. 1998). Im Gehirn findet sich eine überlappende Expression aller drei Mitglieder der SSTRIP/Shank/ProSAP-Familie vor allem im Cortex und im Hippocampus. **Immunoblot-Analysen** unter Verwendung von Shank1/SSTRIP- oder Shank2/ProSAP1-spezifischen Antikörpern haben eine bemerkenswerte Komplexität der SSTRIP/Shank/ProSAP-Polypeptide im Rattengehirn offenbart. Es wurden Proteine zwischen 120 kDa und 260 kDa detektiert (Böckers et al., 1999a; Du et al., 1998; Lim et al., 1999; Naisbitt et al., 1999; Tu et al., 1999).

Für die meisten Domänen der SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine wurden bereits **Bindungspartner** charakterisiert. Allerdings bleibt die funktionelle Bedeutung dieser Interaktionen zum größten Teil noch unklar. Durch die zahlreichen Interaktionen ihrer Domänen stehen die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine in Verbindung mit Zelloberflächenrezeptoren, dem Cytoskelett, Molekülen der Signaltransduktion und einem Element, das an verschiedenen Formen der Endo- und Exocytose sowie des Membranaustausches beteiligt ist.



### Abbildung 1.3 A. Domänenstruktur und Spleißisoformen der SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine.

Die SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine werden durch ein spezifisches Muster hoch-konservierter Protein-/Protein-Interaktions-Domänen definiert: Am N-Terminus befinden sich 6-7 Ankyrin *repeats* (ANK), gefolgt von einer SH3 (src homology)-Domäne und einer PDZ (PSD95/DLG/ZO-1)-Domäne. Bisher ist es unklar, ob Isoformen von Shank2/ProSAP1 existieren, die eine Ankyrin *repeats*-Domäne besitzen. Der C-Terminus ist durch zahlreiche prolinreiche Motive charakterisiert. Eines dieser Motive, ppI genannt vermittelt bei ProSAP1/Shank2 und ProSAP2/Shank3 die Wechselwirkung mit Cortactin. Am C-terminus besitzen alle Mitglieder eine SAM (*sterile alpha motif*)-Domäne. Die SSTRIP/Shank/ProSAP-Gene unterliegen zahlreichen alternativen Spleißen und/oder besitzen alternative Start-/Stop-Codons, die zu verschiedenen Isoformen führen. Die bisher identifizierte Spleißstellen sind mit Pfeilen markiert.

### B. Protein/Protein-Wechselwirkungen der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteinfamilie

Die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine sind ein Hauptbestandteil der PSD. Die PDZ-Domäne interagiert mit zahlreichen synaptischen Proteinen wie dem Somatostatin-Rezeptor Subtyp 2 (SSTR2), dem CIRL-Rezeptor (*calcium independent receptor for latrotoxin*) und den GKAP/SAPAP-Proteinen. Eine prolinreiche Region von Dynamin-2 interagiert mit einer serinreichen Sequenz der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine. In der prolinreichen Region interagieren die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine mit Homer und Cortactin. Die Interaktion mit Cortactin verankert den gesamten Komplex am Aktin-Cytoskelett. Die Domänen, für die noch keine Bindungspartner identifiziert wurden, sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.

Aufgrund ihrer subzellulären Lokalisierung im tieferen cytoplasmatischen Teil der PSD und ihrer zahlreichen Interaktionen mit unterschiedlichen Proteinen, werden die SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine als **Haupt-Gerüstproteine der PSD** angesehen (Sheng et al., 2000).

#### **Verbindung zum NMDA-Rezeptor/PSD95 Komplex**

**PDZ-Domäne.** Die Interaktion der C-Termini der SAPAP/GKAP-Proteine mit der PDZ-Domäne der SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine ist die am besten charakterisierte Wechselwirkung der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine. Da SAPAP/GKAP mit PSD-95 interagiert, werden die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine dadurch mit dem NMDA-Rezeptor/PSD95-Komplex verbunden (Böckers et al., 1999b; Tu et al. 1999). Überexpressionsexperimente zeigen, dass diese Interaktion für die synaptische Lokalisierung der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine wichtig sein könnte (Sheng und Kim, 2000). Die PDZ-Domäne der SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine interagiert zudem mit dem Somatostatin-Rezeptor Subtyp 2 (SSTR2), dem CIRL-Rezeptor (*Calcium Independent Receptor for  $\alpha$ -Latrotoxin*) und mGluR1 (Zitzer et al., 1999; Tu et al., 1999; Kreienkamp et al., 2000). Diese Interaktionspartner weisen an ihren C-Termini die Consensussequenz X-T/S-X-L/I auf, die von der PDZ-Domäne erkannt wird.

#### **Verbindung zum mGlu-Rezeptor Komplex**

**Die prolinreiche Region:** Bis jetzt wurden drei Interaktionspartner für die prolinreiche Region identifiziert. Prolinreiche Motive sind häufig Bindungsstellen für SH3-, EVH1- und WW- Domänen. **Homer**, enthält eine einzige EVH1-Domäne, die die Sequenz PPXXF der Zielproteine erkennt. Homer interagiert direkt mit SSTRIP/Shank1 und ProSAP2/Shank3, wobei die Sequenz -LVPPPEEFAN- von ProSAP2/Shank3 für die Bindung sehr wichtig ist. ProSAP1/Shank2 enthält potentielle Bindungsstellen für Homer, eine direkte Interaktion muß jedoch noch experimentell überprüft werden. Die Homer-Proteine bilden multivalente Komplexe, die an mGluRs der Gruppe I (mGluR1a, und 5) binden. Homer verbindet den Phospholipase-C gekoppelten mGluR mit seinem Effektor, dem Inositol 1,4,5-triphosphat (IP3)-Rezeptor, der eine effiziente Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern in das Cytosol nach Aktivierung des mGlu-Rezeptors, einleitet.

In dem vorangegangenen Kapitel wurde für die NMDA- und AMPA-Rezeptoren, Proteine beschrieben, die diese Rezeptoren in der PSD clustern. Die Wechselwirkung von SSTRIP/Shank/ProSAP mit Homer ermöglicht den mGluRs die Verankerung in der PSD durch ihre Verbindung mit dem NMDA-Rezeptor/PSD95-Komplex. Die Homer-

SSTRIP/Shank/ProSAP-Interaktion könnte daher für die Synaptogenese von Bedeutung sein. Zudem erlaubt sie eine räumliche Nähe zwischen den verschiedenen GluRs, die für ihre kooperative Funktionen wie beispielsweise die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) oder Phospholipase C (PLP C) wichtig ist. Die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine vernetzen somit die mGluRs, Homer und den NMDA-Rezeptor/PSD-95 Komplex in der PSD und spielen dadurch eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion sowohl von mGluRs als auch NMDA-Rezeptoren (Tu et al., 1999).

**Dynamin** ist eine 100 kDa große GTPase, die an der Endocytose und anderen Aspekten des Membranaustausches beteiligt ist (Obar et al., 1990). Für die Isoform 1 von Dynamin konnte eine wichtige Rolle bei der Rezyklisierung der synaptischen Vesikel gezeigt werden. Die prolinreiche Domäne von Dynamin 2 interagiert mit einer Teilregion von SSTRIP/Shank1, die 188 Aminosäuren (Aminosäuren 1603-1790) lang ist. Innerhalb dieser Sequenz ist ein für die Bindung verantwortliches Motiv, das in allen drei Mitgliedern der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteinen sehr identisch ist (72%; Okamoto et al., 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Endocytose von Glutamat-Rezeptoren in kultivierten Hippocampus-Neuronen durch Clathrin vermittelt wird und Dynamin-abhängig ist (Man et al., 2000; Wang et al., 2000). Die Bindung von SSTRIP/Shank/ProSAP an Dynamin2 könnte eine Art Sequestrieren des Dynamins durch diese Proteine sein, um es für die Phase von intensiven endocytotischen Aktivitäten aufzubewahren ( Okamoto et al., 2001).

ProSAP1/Shank2 und ProSAP2/Shank3 interagieren zudem mit der SH3-Domäne von **Cortactin**, welches eine F-Aktin bindendes Protein und Substrat der Src Tyrosinkinase ist (Du et al., 1998). Cortactin erkennt und bindet das Motiv -KPPVPPKP - in den ProSAP1/Shank2 und ProSAP2/Shank3-Proteinen (Naisbitt et al., 1999). Cortactin ist an der Kontaktstelle der Zellmatrix und Lamellipodia von kultivierten Zellen sowie in Wachstumskegeln von Neuronen angereichert (Du et al., 1998, Wu et al., 1993). Cortactin bewegt sich an der Zelloberfläche in einer Wachstumsfaktor- und Rac-abhängigen Art und verteilt sich in den Synapsen um, als Antwort auf eine Glutamat-Stimulierung (Weed et al., 1998; Nasibitt et al., 1999). Es spielt dadurch vermutlich eine wichtige regulatorische Rolle für das Aktin-Cytoskelett im Zellcortex und den dendritischen Dornen. Cortactin verbindet die SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine mit Aktin, das als **Hauptbestandteil des Cytoskeletts** in den dendritischen Dornen gilt.

Für die SAM-Domäne der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine ist eine **Dimerisierung** mit der SAM-Domäne weiterer SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine *in vitro* gezeigt worden (Naisbitt et al., 1999). Die SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine können Homo- und möglicherweise auch Heterodimere mit anderen SSTRIP/Shank/ProSAP Proteinen bilden, welches ihre Funktion als Gerüstproteine unterstreicht.

Durch ihre Wechselwirkung mit Homer und SAPAP/GKAP verbinden Die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine, die NMDA- und mGluR-Rezeptoren strukturell und möglicherweise auch funktionell miteinander. Eine direkte Verbindung des AMPA-Rezeptor/GRIP-Komplexes mit dem NMDA-Rezeptor/PSD95 Proteinkomplex wurde bisher nicht beschrieben. Das AMPA-Rezeptor interagierende Protein GRIP wurde in der Literatur als möglicher Bindungspartner der SH3-Domäne der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine postuliert, allerdings wurde diese Wechselwirkung bisher nicht weiter bestätigt. Für den N-terminalen Bereich (Ankyrin *repeats*-Domäne, SH3-Domäne) sowie die N-terminale Hälfte der prolinreichen Region der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine wurden bislang noch keine Interaktionspartner identifiziert. Unmittelbar vor der Ankyrin *repeats*-Domäne existiert ein Bereich von ca. hundert Aminosäuren, der im SSTRIP/Shank1 und ProSAP2/Shank3 sehr identisch ist und möglicherweise als Bindungsdomäne fungieren könnte. Es wäre von besonderem Interesse, die zeitliche und räumliche Sequenz der Akkumulation der verschiedenen Interaktionsproteine in der Synapse zu bestimmen.

### **SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine und morphologische Plastizität**

Synapsen sind dynamische Strukturen und es wird angenommen, dass Phänomene wie Lernen und Gedächtnis direkt mit morphologischen Veränderungen verbunden sind. Molekulare Mechanismen, die diesen Veränderungen zugrunde liegen, sind daher von besonderem Interesse. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich durch Sala et al. (2001) gezeigt werden, dass die Überexpression des Shank1-Proteines in kultivierten Hippocampus-Neuronen der Ratten zur Reifung, und zum Wachstum der dendritischen Dornen durch selektive Vergrößerung der Dornen-Köpfen führt. Die Dornfortsätze veränderten sich zu pilzförmigen Strukturen (*Mushroom*). Die Anzahl der Dornfortsätze und die Form der Dendriten wurde dabei nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu verursachte eine dominant-negative Form von Shank1 eine Abnahme der Dornenzahl und beeinflusste zudem ihre Form. Dieser Effekt der Shank Überexpression ist von der Bindung von Homer an Shank abhängig, welches Anlaß zu

der Vermutung gibt, dass das Rekrutieren des IP3-Rezeptors oder die lokale Konzentration der kleinen GTPasen die Signale dieser morphologischen Veränderungen darstellen. Die Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass die Shank1-Überexpression zu einer Veränderung in der molekularen und organellen Zusammensetzung der Dornfortsätze führte: eine Anhäufung von IP3-Rezeptoren, Homer, GKAP, F-Aktin und zu einem geringeren Grad von PSD-95, NR1 und GluR2/3 konnte festgestellt werden. Vor allem aber führte die Überexpression zu einer Zunahme der Neurotransmitter-Freisetzung aus den präsynaptischen Enden. In den vergrößerten Dornfortsätzen konnte außerdem das Vorhandensein von mehreren Synapsen (*multisynapse spines*), die vermutlich durch Teilung entstanden, festgestellt werden (Sala et al., 2001).

Es wurde gezeigt, dass das Wachstum von dendritischen Dornen und die Teilung von Synapsen mit dem Phänomen der Langzeit-Potenzierung einhergeht (Engelt et al. 1999; Maletic-Savatic et al., 1999). Diese Ergebnisse zeigen, dass die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine an den molekularen Mechanismen, die diesen Prozessen der Aktivitäts-abhängigen strukturellen Veränderungen zugrunde liegen, beteiligt sein könnten.

### **Rolle der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine in einer neurologischen Erkrankung**

Das ProSAP2-Gen ist auf dem Chromosom 22q13.3 lokalisiert und wurde kürzlich als ein Kandidat für das *neurologische Delektions-Syndrom* vorgeschlagen. Diese Krankheit wurde ursprünglich durch Watt et al. (1985) beschrieben und wird cytogenetisch durch eine Mikrodeletion des langen Armes von Chromosom 22 charakterisiert. Das Syndrom ist mit allgemeinen Entwicklungsstörungen, normalem oder beschleunigtem Wachstum, Hypotonie, starker Sprachverzögerung und milden unförmigen Gesichtszüge assoziiert (Nesslinger et al., 1994; Wong et al., 1997; Prasad et al., 2000). Auffallende Anhaltspunkte für einen genetischen Zusammenhang dieses Syndroms mit einem Defekt des ProSAP2/Shank3-Genes konnten durch Studien von Bonaglia et al. (2001) festgestellt werden. Die genetische Analyse eines Patienten mit den klinischen Symptomen des 22q13.3 Syndroms offenbarte eine balanzierte Translokation zwischen den Chromosomen 12 und 22, die zu einer Unterbrechung des ProSAP2/Shank3 Gens am Exon 21 führte. Die Haplo-Insuffizienz von ProSAP2/Shank3 stellt somit höchst wahrscheinlich die Ursache dieses pathologischen Zustandes dar. In Anbetracht ihrer Rolle als Haupt-Gerüstproteine, die an dynamischen Veränderungen der synaptischen Morphologie beteiligt sind (Sala et al. 2001), ist es nicht erstaunlich, dass Mutationen, die die SSTRIP/Shank/ProSAP-Mitglieder betreffen, zu pathologischen Veränderungen führen.

Die SSTRIP/ Shank/ProSAP Proteine bilden somit eine Familie von Gerüstproteinen, die die NMDA- und mGluR-Rezeptoren strukturell und vermutlich auch funktionell miteinander, mit dem Aktin Cytoskelett und Proteinen der Signaltransduktion verbinden. Diesen Proteine kommt dadurch eine entscheidende Funktion in der Organisation der PSD zu. Ihre Überexpression in kultivierten Hippocampusneuronen bewirkte Veränderungen in der molekularen und strukturellen Zusammensetzung der Dornfortsätze. Sie spielen daher höchst wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität und somit bei Phänomenen wie dem lernen und dem Gedächtnis. Die Identifizierung weiterer Interaktionspartner der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine, insbesondere für ihre Ankyrin *repeats*-Domäne, könnte eine noch tieferes Verständnis ihrer Funktionsweise liefern. Die Domänenstruktur der Ankyrin *repeats* wird im folgenden beschrieben.

### 1.1.1.2 Ankyrin *repeats*-Domäne

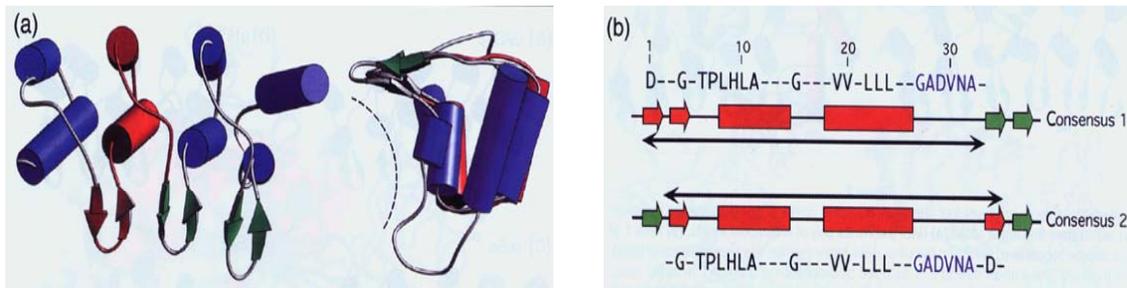
Das Ankyrin *repeat* ist ein häufig vorkommendes Protein-Sequenzmotiv, das 1987 zuerst von Breeden und Nasmyth (1987) als ein sich wiederholendes, 33 Aminosäure langes, repetitives Element in den Regulatoren des Hefe-Zellzyklus Swi6p und CDC10p beschrieben wurde. Die Entdeckung von 24 Kopien dieser *repeats* in dem cytoskelettalen Protein Ankyrin führte dazu, dass das Motiv Ankyrin *repeats* genannt wurde (Lux et al., 1990).

Ankyrin *repeats* kommen in unterschiedlichen Proteinen in nahezu allen Organismen vor. Diese Proteine erfüllen aufgrund ihrer Vielfalt verschiedene biologische Funktionen und kommen in unterschiedlichen Zellkompartimenten vor. Die Anzahl der „repeats“ variiert von Protein zu Protein, es sind Proteine bekannt, die nur aus Ankyrin *repeats* bestehen. Manche der Proteine mit Ankyrin *repeats* enthalten Insertionen von nicht Ankyrin (ANK) Elementen zwischen oder innerhalb der einzelnen *repeats*, während andere aus reinen ANK-*repeats* bestehen. Die Rolle der Ankyrin *repeats* in der Vermittlung von Protein-Proteinwechselwirkungen wurde gut beschrieben. Dabei binden sie im Gegensatz zu anderen Proteindomänen, die häufig bestimmte Sequenzmotive oder Domänen wie der SH3- oder SH2-Domäne erkennen, nicht an besondere Sequenzelemente und bevorzugen auch nicht bestimmte Klassen von Zielproteinen.

#### **Strukturelle Organisation**

Ankyrin *repeats* bestehen aus antiparallelen  $\alpha$ -Helix-Paaren, die Seite an Seite aneinander aufgereiht sind und durch eine Serie von dazwischenliegenden  $\beta$ -Faltblatt Strukturen miteinander verbunden sind. Die ausgestreckten  $\beta$ -Faltblätter projizieren von den Helix-

Paaren in nahezu rechten Winkeln ab. Dies führt dazu, dass L-förmige Querschnitte entstehen. Diese Strukturen können mit einer halboffenen Hand (*cupped hand*) verglichen werden, bei der die  $\beta$ -Faltblatt-Stränge die Finger und die konkave innere Oberfläche, die Helix-Bündel darstellen (Jakob et al. 1998). Die Ankyrin *repeats* können folglich als  $\beta$ -Faltblatt-Helix-Schleife-Helix ( $\beta_2\alpha_2$ ) Struktur definiert werden.



#### Abbildung 1.4 a) Strukturelle Organisation der Ankyrin *repeats*.

Eine Sicht von oben auf die Kristallstruktur von 53BP2 zeigt die Anordnung der  $\alpha$ -Helices (Zylinder) und der  $\beta$ -Faltblätter (Pfeile), die für die Architektur der Ankyrin *repeats* charakteristisch ist. Eine einzelne *repeat*-Einheit ist in rot hervorgehoben. Die  $\beta$ -Faltblätter projizieren weg von den Helices-Bündeln und bilden die Ankyrin-Furche. Die Furche ist durch den punktierte Bogen dargestellt (rechtes Bild).

**b) Die Consensussequenz der Ankyrin *repeats*-Domäne.** Ankyrin *repeats*-Domänen werden durch die Wiederholung eines aus 33 Resten bestehenden Sequenzmotivs gebildet. Die Consensussequenz 1 basiert auf der in rot hervorgehobenen Struktur und definiert die Ankyrin *repeat* als  $\beta_2\alpha_2$ -Struktur. In vielen Molekülen mit Ankyrin *repeats* finden sich Insertionen von Sequenzen (blaue) innerhalb des Bereiches, der Helix 2 mit dem ersten  $\beta$ -Faltblatt des benachbarten *repeats* verbindet. Die am häufigsten vorkommenden Grenzen der *repeats* sind in der Consensussequenz 2 dargestellt. Die Länge eines einzigen *repeats* ist in beiden Consensussequenzen durch einen schwarzen Pfeil markiert. Variationen können an jeder Stelle der Consensussequenz auftreten. Die gezeigte Sequenz wurde nur gewählt, um die strukturelle Rolle darzustellen, die durch die hochkonservierten Reste erfüllt wird.

#### Consensussequenz

Für die Ankyrin *repeats* wurde die in Abb. 1.4b gezeigte Consensussequenz identifiziert. Diese Consensussequenz kann eine große Variabilität an Aminosäure Substitutionen aufweisen (Michaely et al., 1992; Bork et al., 1993). Bestimmte Aminosäure-Reste die wichtige strukturelle Funktionen erfüllen, sind jedoch an spezifischen Stellen der Consensussequenz häufig anzutreffen. Abweichungen von der Consensus-Sequenz sind zwischen Orthologen sehr konserviert, dies suggeriert, dass sie für die beobachtete Spezifität der Funktion von Proteinen mit Ankyrin *repeats* verantwortlich sind. Die strukturelle Rolle der konservierten Reste in den Ankyrin *repeats*-Domänen kann eingeteilt werden in solche, die in der Bildung und Stabilisierung der einzelnen "*repeat*"-Einheiten beteiligt sind und solche, die die Grenzfläche zwischen den "*repeats*" bilden.



NMR- und Kristallstrukturen von bekannten Ankyrin *repeats*-Domänen weichen erheblich voneinander ab. Jedoch bleibt die Grundstruktur der Ankyrin *repeats* trotz dieser Variationen unverändert. Die am häufigsten vorkommende strukturelle Variation ist die Einführung von zusätzlichen sekundären Strukturelementen (Helices und Faltblätter), die zur Stabilisierung der Struktur der Ankyrin *repeats*-Domäne beitragen.

### ***Intermolekulare Interaktionen***

Der intermolekulare Bindungsmechanismus der Ankyrin *repeats*-Domänen mit ihren Partner-Proteinen variiert trotz der strukturellen Ähnlichkeit des Grundgerüsts stark. Für die Bindung an das Ankyrin *repeat* können die verschiedensten Oberflächen, herangezogen werden. Innerhalb der Ankyrin *repeats* ist die Kontaktstelle nicht auf ein besonderes Strukturelement beschränkt. Die bisher bestimmten Strukturen von Komplexen haben jedoch einige gemeinsame Eigenschaften im Bezug auf die molekularen Interaktionen gezeigt. In den meisten Fällen sind die nicht konservierten Reste der  $\beta$ -Faltblatt-Spitzen, in Analogie zur halboffenen Hand, und im besonderen die Reste der Ankyrin *repeats* -Furche an der Bindung beteiligt (Gorina et al., 1996). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der nicht konservierten Reste für die Spezifität der Bindung und macht den Unterschied zwischen den Resten, die für die Ausbildung der Grundstruktur wichtig sind, und denen, die an der Erkennung und Bindung des Ligands beteiligt sind, deutlich.

### ***Intramolekulare Interaktionen***

Bisher ist nur eine intramolekulare Interaktion unter Beteiligung der Ankyrin *repeats*-Domäne im das Protein Swi6 beschrieben worden (Foord et al., 1999). In diesem Fall interagiert eine an der Aktivierung der Transkription beteiligte Domäne mit einer Kern-Domäne aus 5 Ankyrin *repeats*. Die Bindungsstelle befindet sich, in Analogie zur halboffenen Hand, am hinteren Teil der Helices-Hand und der Finger und unterscheidet sich somit erheblich von der beschriebenen intermolekularen Interaktion. Dabei werden zum Teil nicht ANK-Elemente benutzt. Die Ankyrin *repeats* regulieren positiv und negativ die biologische Aktivität der flankierten Regionen und umgekehrt.

## 1.2 Aufgabenstellung

Zu Beginn dieser Arbeit war wenig über die Interaktionspartner der Ankyrin *repeats*-Domäne und der N-terminalen Region der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine bekannt. Daher bestand das Ziel der Arbeit darin Bindungspartner dieser Bereiche mit Hilfe von Affinitätschromatographie und dem Hefe-Zwei-Hybrid System zu finden. Die detektierten Wechselwirkungen sollten im weiteren Verlauf der Arbeit biochemisch durch Coimmunpräzipitationen und Bindungsversuche sowie durch Colokalisationsexperimente in heterologen eukaryontischen Zellsystemen weiter charakterisiert werden. Durch Coimmunpräzipitationen aus Membranfraktionen von Rattengehirnen sollte dann überprüft werden, ob die gefundenen Wechselwirkungen *in vivo* Relevanz haben. Anschließend sollte versucht werden, aufzuklären, wie dieser Interaktionen innerhalb der Synapsen reguliert werden. Diese Untersuchungen sollten zum besseren Verständnis des strukturellen Aufbaus der PSD und der molekularen Vorgänge innerhalb der Signaltransduktion der Postsynapse beitragen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Feinchemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ampicilin	Ratiopharm, Ulm
Bacitracin	Sigma, Deisenhofen
Broad Range Proteingewichtsmarker	New England Biolabs, Frankfurt am Main
BCIP	Calbiochem, Schwalbach
Coomassie G-250	Serva, Heidelberg
Desoxinukleotide	Amersham Biosciences, Freiburg
FCS	Gibco BRL, Karlsruhe
Ionomycin	Calbiochem, Schwalbach
Glutathion Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
H89	Calbiochem, Schwalbach
Leupeptin	Serva, Heidelberg
Lysozym	Serva, Heidelberg
NBT	Calbiochem, Schwalbach
Pepstatin A	Serva, Heidelberg
PMSF	Roth, Karlsruhe
Protein A/G Sepharose	Santa Cruz, Heidelberg
Rainbow Full Range Proteingewichtstandard	Amersham Biosciences, Freiburg
Trasylol	Bayer Vital, Leverkusen
Trypsin	Invitrogen, Life Technologies,
TLCK	Serva, Heidelberg

## Verbrauchsmaterial

Dialyse-Schläuche	Serva, Heidelberg
Eppendorfreaktionsgefäße und Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Falcon Micro Test II Assay Platten	Becton und Dickinson, Heidelberg
Faltenfilter	Schleicher und Schuell, Dassel
Filmmaterial	Kodak, Stuttgart
Filterpapier 3MM	Whatman, Maidstone, UK
HybondC, Nitrocellulose	Schleir und Schuell, Dassel
Sterile Plastikwaren für die Zellkultur	Greiner, Frickenhausen und Becton Dickinson, Heidelberg

Alle Chemikalien und Verbrauchsmaterial die nicht aufgeführt sind, wurden bei Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen ) bezogen.

### 2.1.2 Geräte

Agarosegelkammern	Amersham Biosciences, Freiburg
Blotapparatur: Min Trans-Blot Transfer Cell	BioRad, München
Elektrophoresekammer: Mini-Protean II System	Biorad, München
Elisa-Reader: Titertek Multiskan Plus	Flow Laboratories, Mannheim
Geldokumentationsanlage	Cybertech, Berlin
Heizblock: Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope:	
Fluovort	Leitz, Wetzlar
Aristoplan	Leitz, Wetzlar
LSM/Axiovert 100	Zeiss, Eching
PCR-Geräte:	
GeneAmp 2400	Perkin Elmer, Foster City, USA
T-Gradient	Biometra, Göttingen
PH-Meter: Calimatic 761	Knick, Berlin
Spektrophotometer	Novaspec, Cambridge, England
Sterilbank	Flow Laboratory, Mannheim

UV-Tisch: UVT 28 M	Herolab, Wiesloch
Zentrifugen:	
Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Minifuge T	Heraus, Hanau
L7 Ultrazentrifuge	Beckman, Fullerton, USA
Sorvall RC 5 B	Dupont, Bad Nauheim

### 2.1.3 Vektoren

PcDNA 3/ 3A/ 6A	Invitrogen, Leek, Niederlande
PGEX6P1/2/3	Amersham Biosciences, Freiburg
PGEX 4T2	Amersham Biosciences, Freiburg
PQE30	Qiagen, Hilden
PQE40	Qiagen, Hilden
PAS 2.1	Clontech, Palo Alto, CA, USA
PGBKT7	Clontech, Palo Alto, CA, USA
PACT 2	Clontech, Palo Alto, CA, USA
PEGFPC1/C2	Clontech, Palo Alto, CA, USA
PCMV.Tag.2B/2A/2C	Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande

### 2.1.4 Tiere

Wistar Ratten	VTH/UKE, Hamburg
NMRI Mäuse	VTH/UKE, Hamburg

### 2.1.5 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Kaninchen-anti-SSTRIP, polyclonal	VTH/UKE, Hamburg
Ziege-anti-Fodrin, polyclonal	Santa Cruz, Heidelberg
Maus-anti-Fodrin, monoclonaler Antikörper	Chemicon International, Hofheim
Peroxidase-konjugiertes anti-Kaninchen IgG	Amersham Biosciences, Freiburg
Maus-anti-EGFP, monoclonaler Antikörper	Covance Inc., Prince Town, New Jersey
Maus-anti-T7-tag, monoclonaler Antikörper	Novagen, Schwalbach

Maus-anti-Flag-tag, monoclonaler Antikörper Sigma, Deisenhofen  
Maus-anti-Myc-tag, monoclonaler Antikörper Sigma, Deisenhofen

### Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-konjugiert Amersham Biosciences, Freiburg  
Anti-Zieger-IgG, Peroxidase-konjugiert Amersham Biosciences, Freiburg  
Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-konjugiert Santa Cruz, Heidelberg  
Anti-Maus-IgG, AP-konjugiert Dianova, Heidelberg  
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Cy2 konjugiert Dianova, Heidelberg  
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3 konjugiert Dianova, Heidelberg

### **2.1.6 Enzyme**

T4 DNA Ligase MBI-Fermentas, St. Leon-Rot  
T4 DNA Polymerase MBI-Fermentas, St. Leon-Rot  
T4 Polynukleotidkinase MBI-Fermentas, St. Leon-Rot  
Restriktionsendonukleasen Gibco, Invitrogen, Fermentas  
Phosphatase MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

### **2.1.7 Bakterien- und Hefestämme**

Top10F' Invitrogen, Leek, Niederlande  
BL21DE Invitrogen, Leek, Niederlande  
CG1945 Clontech, Palo Alto, CA, USA  
AH 109 Clontech, Palo Alto, CA, USA

### **2.1.8 Zelllinie**

Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) ATCC, Rockville, MD, USA

### **2.1.9 cDNA-Banken**

Humane prätransformierte cDNA Gehirnbank Clontech, Palo Alto, USA

### 2.1.10 Verwendete Kits

Nucleobond AX	Macherey-Nagel, Düren
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
TOPO TA Cloning	Invitrogen, Leek, Niederlande
Endofree Maxi Prep Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX Gel Extration System	Qiagen, Hilden

### 2.1.11 Lösungen und Medien

Acrylamidlösung:	30%(w/v)	Acrylamid
	0.8%	Bisacrylamid
5x Agarose -Ladepuffer	30% (w/v)	Glycerin
	40 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	0.25%	Bromphenolblau
Ampicillin	100 mg/ml	Ampicillin
	1 M	Tris/HCl, pH 7.9
AP-Substratlösung	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0.41 mM	NBT
	0.38 mM	BCIP
	100 mM	Tris/HCl, pH 9.5
Blockierlösung	5%(w/v)	Milchpulver in TBS-T
Blotpuffer	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris
	20% (v/v)	Methanol
	0.02% (w/v)	SDS
Coomassie-Färbelösung	50%	Methanol
	10%	Essigsäure
	0.25%	Coomasie Brilliant Blue R-250
DOC-Puffer	50 mM	Tris/HCl, pH 9

	1%	Natriumdesoxycholat	
	50 mM	Natriumfluorid	
	20 $\mu$ M	Zinkchlorid	
	1mM	Natriumorthovanadat	
Elutionspuffer	50 mM	Tris/HCl pH 8.0	
	10 mM	red. Glutathion	
Entfärber	25%	Methanol	
	7.5%	Essigsäure	
2x HeBS	280 mM	NaCl	
	50 mM	HEPES	
	1.5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	10 mM	KCl	
	12 mM	Glucose	pH 7.05
Homogenisationspuffer A	20 mM	HEPES	
	125 mM	NaCl	
	10%	Glycerol	
	1 mM	EDTA	
	1 mM	EGTA	
	Protease	Complete	
	Inhibitor Mix		pH 7.4
5 x Lämmli-Probenpuffer	60 mM	Tris/HCl, pH 6.8	
	100 mM	DTT	
	2%	SDS	
	10%	Glycerol	
	0.1 %	Bromphenolblau	
Laufpuffer	192 mM	Glycin	
	25 mM Tris	Tris	
	0.1% (w/v)	SDS	
Lysozym	10 mg/ml	Lysozym in ddH <sub>2</sub> O	
Paraformaldehydlösung	4% (w/v)	Paraformaldehyd in PBS	
PBS	137 mM	NaCl	
	2.7 mM	KCl	

	0.7 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	8.8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	pH 7.4
Puffer A	4 mM	HEPES	
	0.32 M	Sucrose	pH 7.4
Puffer B	100 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	10 mM	Tris/HCl	
	6 M	Harnstoff	pH 8.0
Puffer C	Dito	Puffer B	pH 6.3
Puffer D	Dito	Puffer B	pH 4.5
RIPA Puffer	150 mM	NaCl	
	50 mM	Tris/HCl, pH 8.0	
	1% (w/v)	NP-40	
	0.5% (w/v)	Natriumdesoxycholat	
	0.1% (w/v)	SDS	
STE-Puffer	10 mM	Tris/HCl pH 7.4	
	150 mM	NaCl	
	1mM	EDTA	
		Proteaseinhibitoren	
STET-Puffer	50 mM	Tris/HCl	
	50 mM	EDTA	
	5%	Triton X-100	
	8%	Sucrose	pH 8.0
TAE-Puffer	100 mM	Tris/Acetat, pH 8.0	
	5 mM	EDTA	
TBS-T	150 mM	NaCl	
	50 mM	Tris/HCl, pH 7.9	
	0.2% (w/v)	Tween-20	
TELT-Lysispuffer	50 mM	Tris/HCl, pH 7.5	
	62.6 mM	EDTA	
	2.5 mM	LiCl	
	0.4% (v/v)	Triton X-100	
TFB I	10 mM	CaCl <sub>2</sub>	
	30 mM	KOAc	
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>	

	100 mM	RbCl	
	15% (v/v)	Glycerin	pH 5.8
TFB II	10 mM	RbCl	
	10 mM	MOPS	
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>	
	15% (v/v)	Glycerin	pH 7.0
Versene-Puffer	137 mM	NaCl	
	2.7 mM	KCl	
	8.8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	0.7 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	1 mM EDTA	EDTA	pH 7.4
Z-Puffer	10 mM	KCl	
	1 mM	MgSO <sub>4</sub>	
	40 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	60 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	0.27 % (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol	
	0.04%	X-Gal.	

### Proteaseinhibitoren (Stammlösungen)

Leupeptin	10 mg/ml	in H <sub>2</sub> O
Pepstatin A	1 mg/ml	in EtOH
Bacitracin	100 mg/ml	in H <sub>2</sub> O
PMSF	100 mM	in Isopropanol
TLCK	100 mM	in 1 mM HCl

### 2.1.12 Medien

#### Medien für die Zellkultur

HEK-293-Medium	DMEM mit	
	1g/l	Glucose
	5% (v/v)	FCS, inaktiviert (30 min, 56°C)
	100 U/ml	Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

### Medien für Bakterien

LB-Medium	10 g/l	Bacto-Pepton	
	10 g/l	NaCl	
	5 g/l	Hefe-Extrakt	pH 7.5
LB-Amp-Platten	15 g/l	Bacto-Agar in LB-Medium	
	100 µg/ml	Ampicillin	
LB-Kan-Platten	15 g/l	Bacto-Agar in LB-Medium	
	30 µg/ml	Kanamycin	pH 7.5

### Medien für Hefen

YPD-Medium	20 g/l	Bacto-Agar	
	20 g/l	Difco-Pepton	
	10 g/l	Hefe-Extrakt	
	2%	Glucose	pH 5.8
SD-Medium	20 g/l	Bacto-Agar	
	6.7 g/l	Difco-Hefe-Stickstoffbasis	
	2%	Glucose	pH 5.8
SD-Selektionsmedium	20 g/l	Bacto-Agar	
	6.7 g/l	Difco-Hefe-Stickstoffbasis	
	2%	Glucose	
	100 ml/l	10 x Dropout-Lösung	pH 5.8

## **2.2 Methoden**

Die Standardmethoden der Molekularbiologie, Proteinchemie und Zellbiologie wurden, sofern nicht anders angegeben, folgenden Laborhandbüchern entnommen:

Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Sambrook et al. (1989) CSH, New York.

Current Protocols in Molecular Biology; Ausubel et al. (1989) Greene Publishing Associates, New York.

Antibodies: A Laboratory Manual; Harlow und Lane (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York.

### **2.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Kultivierung von HEK293-Zellen**

Für Expressionsexperimente wurde die humane HEK293-Zelllinie (*Human Embryonic Kidney Cells*) verwendet. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium angereichert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin in 10 cm<sup>2</sup>-Zellkulturschalen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Zum Umsetzen konfluenten Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit Versene-Puffer gewaschen und 2 min in 1 ml 0.25% Trypsin inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Pipette dissoziiert und in frischem Medium in einer Verdünnung von bis zu 1:20 auf neue Kulturschalen verteilt.

#### **2.2.1.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen**

Am Tag vor der Transfektion wurden die HEK293-Zellen umgesetzt. Die transiente Transfektion erfolgte nach der Kalziumphosphat-Methode (Kreienkamp et al., 1994). Zu 5-10 µg Plasmid-DNA wurden 64 µl einer 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gegeben und das Volumen mit sterilem Wasser auf 500 µl gebracht. In einem 15 ml Greiner-Gefäß wurden 500 µl HeBS Lösung vorgelegt und das DNA/CaCl<sub>2</sub>-Gemisch langsam dazugetropft, wobei gleichzeitig mit Hilfe einer Pasteurpipette Luftblasen in der Lösung erzeugt wurden. Diese Mischung wurde

mit Hilfe einer Pipette vorsichtig auf die Kulturschale getropft. Nach einer Inkubation von 3-12 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen weitere 1-2 Tage kultiviert. Die transfizierten Zellen wurden entweder für einen immuncytochemischen Nachweis oder für die Immunpräzipitation verwendet.

Für die Immuncytochemie wurden transient transfizierte HEK-Zellen auf zuvor mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen in 24-Loch-Zellkulturschalen kultiviert. Dazu wurde das Medium von der Platte abgesaugt, die Zellen einmal mit Versene-Puffer gewaschen, mit 2 ml Trypsin-Lösung von der Platte gelöst und in 10 ml Medium aufgenommen. Nach der Zentrifugation (700 x g, 2 min, 4°C) wurde das Zellsediment in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und die Zellen wurden in einer geeigneten Dichte ausgesät.

### **2.2.1.3 Zellfixierung für die Immuncytochemie**

Das Kulturmedium wurde mit gleichen Volumen eiskalter 4%iger Paraformaldehydlösung versetzt und 3 min auf Eis inkubiert. Nach dem Absaugen folgte eine zweite Inkubation mit 4% Paraformaldehydlösung für 3 min. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit kaltem PBS gespült und für 3 min mit 0.1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Deckgläschen 1h mit Blockierlösung (2% FCS in PBS) inkubiert, um unspezifische Bindungstellen abzusättigen. Daran schloß sich eine 1-stündige Inkubation bei 37 °C mit dem entsprechenden ersten Antikörper verdünnt in Blockierlösung an. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit dem jeweiligen Fluoreszenzmarkierten Sekundärenantikörper in entsprechender Verdünnung in Blockierlösung.

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur enzymatischen Amplifikation von DNA angewendet. Ein Standardansatz sah wie folgt aus:

Matrizen cDNA	100-200 ng
Oligonukleotid 1	50 pmol
Oligonukleotid 2	50 pmol
Desoxyribonukleotide	400 $\mu$ M
10 x Puffer	10 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	
ddH <sub>2</sub> O ad 100 $\mu$ l	Ad 100 $\mu$ l
Taq Polymerase	1-2 U

Das PCR-Programm war abhängig von der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der eingesetzten Oligonukleotide sowie der Länge des erwarteten Produktes und des Temperaturoptimums der verwendeten Polymerase.

Die Schmelztemperatur läßt sich wie folgt abschätzen:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

Die benötigte Anlagerungstemperatur liegt 5°C unter der Schmelztemperatur.

Ein Standardprogramm ist hier wiedergegeben:

Reaktion	Temperatur (°C)	Dauer	Anzahl der Zyklen
Prädenaturierung	94	4 min	1
Denaturierung	94	30 sec	
Anlagerung der Oligonukleotide	53-60	30 sec	} 30 -35
Elongation	72	30 sec-3 min	
Abschließende Elongation	72	5 min	1

Die PCR-Produkte wurden entweder zuerst in den T/A-Klonierungsvektor TOPO II kloniert und anschließend umklontiert oder direkt in dem gewünschten Vektor kloniert. Dazu wurden sie mit Isopropanol gefällt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, aus dem Agarosegel mit Hilfe des Gelextraktionskits QIAX II-Kit isoliert und für die Ligationsreaktion eingesetzt.

#### 2.2.2.2 DNA-Gelelektrophorese

Zur Analysen von DNA-Präparationen, Restriktionsansätzen, PCR-Produkten und zur Isolierung von cDNA-Fragmenten wurde die DNA in Agarosengelen aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente, geschmolzen und mit 0.5  $\mu$ g/ml

Ethidiumbromid versetzt. Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe eines 356 nm- UV Leuchtisches.

### **2.2.2.3 Isolierung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen**

Nach Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurden die DNA-Fragmente der gewünschten Größe auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAEX Gelextraktions-System (Qiagen) entsprechend dem Herstellerprotokoll aus dem Gel isoliert.

### **2.2.2.4 Restriktionsverdau von DNA**

Plasmid-DNA oder PCR-Produkte wurden mit entsprechenden Enzymen nach Herstellerangaben verdaut. Die Enzymreaktionen wurden durch Zugabe von DNA-Ladepuffer gestoppt und die DNA auf einem Agarosegel analysiert.

### **2.2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten**

In einem Ligationsansatz wurden 10-100 ng Vektor mit den dreifachen molaren Mengen an DNA-Fragment mit Hilfe von 1U T4 DNA-Ligase entweder 3 h bei RT oder ü.N. bei 16 °C ligiert. PCR-Produkte mit A-Überhängen wurden mit dem TOPO II System nach Herstellerangaben in den TOPO II Vektor kloniert.

### **2.2.2.6 Herstellung kompetenter Bakterien**

Die Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation mit Plasmid-DNA erfolgte nach der RbCl-Methode. Dazu wurden 5 ml einer ü.N.-Kultur des verwendeten Bakterienstammes (Top10F') in 200 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0.6 bei 600 nm geschüttelt. Nach Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge, 4444 x g, 5 min, 4°C) wurden die Bakterien in 60 ml TFB I resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in TFB II resuspendiert und in Aliquot von 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **2.2.2.7 Transformation**

20  $\mu$ l Ligationsansatz bzw 10-50 ng Plasmid-DNA wurden zu 100  $\mu$ l kompetenten Zellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 70 sec einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, 1 min auf Eis inkubiert und in 400  $\mu$ l LB-Medium aufgenommen. Der Ansatz wurde für 50-60 min bei 37°C inkubiert und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 37 °C.

### **2.2.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Für eine Minipräparation von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Medium, dem das entsprechende Antibiotikum zugegeben wurde, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ü.N. bei 37 °C geschüttelt. Davon wurden 1.5 ml abzentrifugiert (2 min, 20800 x g, Eppendorf-Zentrifuge) und die Plasmid-DNA nach der Methode der Telt-Lyse (Homes und Quigley, 1981) isoliert. Der DNA-Niederschlag wurde in 50  $\mu$ l Wasser aufgenommen. Ein Aliquot davon wurde mit Restriktionsenzymen verdaut und im Agarosegel analysiert. Plasmid-DNA, die sequenziert werden sollte, wurde zunächst einmal mit zwei Volumen Phenol/Chloroform und ein zweites mal mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Das Extrakt wurde dann mit einem Volumen Isopropanol versetzt und zentrifugiert (30 min, 4°C, 20800 x g, Eppendorf-Zentrifuge). Der Niederschlag wurde in Wasser aufgenommen und ein Aliquot davon für die Sequenzierung verwendet.

Für eine Retransformation von Hefen wurde die Plasmid-DNA-Isolierung mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation KITs durchgeführt.

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde der KIT von Nucleobond AX 100 oder AX 500 verwendet. DNA zur Transfektion von Primärneuronen wurde mit Hilfe des Endofree-Maxi-Prep-Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

### **2.2.2.9 Automatische DNA-Sequenzierung**

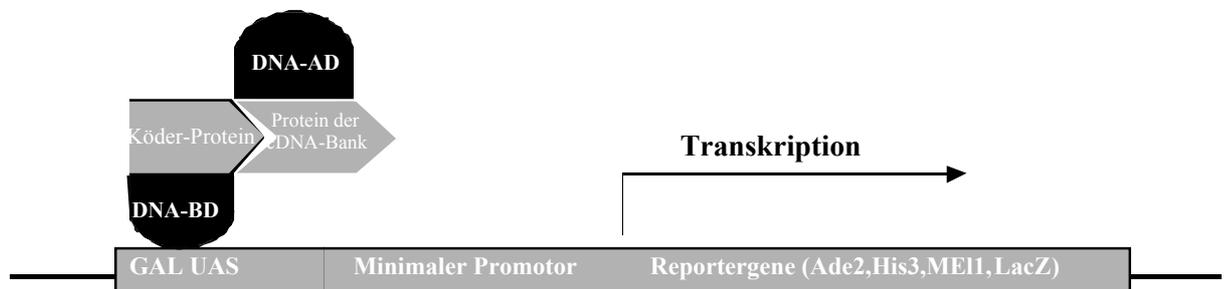
DNA-Sequenzierungen wurden vom Servicelabor des Institutes durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977) mit Hilfe des Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Heidelberg). Dazu wurden 500 ng gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt. Die Sequenzanalyse erfolgte auf dem Modell 370A DNA-Sequencing System (Applied Biosystems, Heidelberg).

## 2.2.3 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Die Durchführung des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens erfolgte nach dem Protokoll „Pretransformed Matchmaker libraries, User Manual“ von Clontech. Benutzt wurde die in den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* Y187 prätransformierte cDNA-Bibliothek von Clontech. Für die Transformation des Köderplasmids wurden die Hefe-Stämme AH109 und CG1945 verwendet. Die Hefe-Stämme (AH109 und Y187) sind Tryptophan-, Leucin-, Adenin- und Histidin-defizient (Trp-, Leu-, Ade- His-).

### 2.2.3.1 Prinzip der Methode

Das Gal4-Protein ist ein Aktivator der Transkription mit zwei essentiellen Domänen: eine am N-Terminus lokalisierte DNA-Bindungsdomäne (BD) und die andere am C-Terminus lokalisierte DNA-Aktivierungsdomäne (AD). In Gal4-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-Systemen wird die cDNA des Proteins für welches Bindungspartner gesucht werden, in Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne exprimiert, wohingegen andere Gene oder cDNA der Bibliothek in Fusion zur Gal4-DNA-Aktivierungsdomäne exprimiert werden. In der Hefe kommt es zur Synthese der Proteine der eingesetzten Gene. Bei der Interaktion eines Proteins der cDNA-Bibliothek mit dem Köder-Protein wird das Gal4 rekonstituiert und an den Gal4-Promotor gebracht, was zur Transkription der Reportergene (in diesem Fall ADE2, HIS3, MEL1, LacZ) führt (Abb. 2.1). Die Ade- und His3-Reportergene codieren für Enzyme, die an der Histidin- bzw Adeninsynthese beteiligt sind. Dies ermöglicht den Hefe-Zellen das Wachstum auf Selektionsmedien ohne Adenin und/oder Histidin. Die MEL1- und LacZ-Genprodukte  $\alpha$ -Galaktosidase bzw  $\beta$ -Galaktosidase ermöglichen eine Farbselektion.



**Abbildung 2.1 Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems**

Das Hybrid I besteht aus der Gal4-BD, fusioniert mit dem Köderprotein, Das Hybrid-Protein II setzt sich aus der Gal4-AD und variablen Proteinanteilen zusammen. Eine Interaktion des Köderproteins mit dem Hybridprotein II ergibt einen funktionellen Transkriptions-Aktivator, der zur Expression der Reportergene führt.

### 2.2.3.2 Transformation von Hefe-Zellen

50 ml YPD- oder SD-Medium wurden mit 1-2 Kolonien AH 109 oder CG 1945 angeimpft und ü.N. bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Ein Viertel Volumen dieser Vorkultur wurde zur Animpfung einer 50 ml Kultur verwendet. Nach 3-4 h Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen 3 min bei 1600 x g zentrifugiert (Eppendorf 5804 R), mit 25 ml Wasser gewaschen und in 3 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei 30 °C wurde das Lithiumacetat durch Zentrifugation entfernt und zu einem Zehntel des Zellsedimentes folgende Lösungen in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:

240  $\mu$ l PEG 3350

36  $\mu$ l 1M Lithiumacetat

50  $\mu$ l 2mg/ml Salmon Testes DNA

x  $\mu$ l (0.5-2  $\mu$ g) Plasmid DNA

25- x  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

Nach dem Mischen wurde die Suspension 20 min bei 30 °C inkubiert und für 20 min bei 42°C einen Hitzeschock unterzogen. Nach einer kurzen Zentrifugation (30 s, 20800 x g, Eppendorf 5417 R) wurde das Zellsediment in 0.5-1 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und ein Aliquot, gewöhnlich 50  $\mu$ l, auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden mehrere Tagen bei 30 °C inkubiert.

### 2.2.3.3 Hefe-Zwei-Hybrid-screen (Mating)

50 ml SD/-Trp-Medium wurde mit einer Köder-Plasmid enthaltende AH109 Kolonie angeimpft und ü.N. bei 30 °C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0.8-1 wurden die Zellen 3 min bei 1600 x g zentrifugiert (Eppendorf 5804 R). Ein 1 ml Aliquot der eingefrorenen cDNA-Bibliothek wurde in einem Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut und mit dem Zellsediment in einem 2 l Erlenmeyerkolben kombiniert. Das Volumen wurde mit 2 x YPD/Kan auf 50 ml gebracht und der „Matingansatz“ ü.N. bei 30 °C unter leichtem Schütteln (50 rpm) inkubiert.

Nach 24 Stunden Inkubation wurde der Ansatz 10 min bei 1600 x g zentrifugiert, in 10 ml 0.5 x YPD/Kan resuspendiert und auf 40 (-Trp-Leu -Ade-His ) sowie 10 (-Trp-Leu-His mit 35 mM 3AT)-Selektionsplatten ausplattiert.

Zur Bestimmung der Anzahl der Transformanten (Transformationseffizienz) wurden Aliquots des „Matingsansatzes“ in geeigneten Verdünnungen auf -Trp, -Leu, -Trp-Leu Platten ausgestrichen.

#### **2.2.3.4 $\beta$ -Galaktosidase-Filtertest**

Für die Durchführung des  $\beta$ -Galaktosidase-Filtertests wurden auf drei- oder vierfach-Platten frisch gewachsene Hefekolonien verwendet. Dazu wurde ein Stück Nitrocellulose-Membran für ca. 30 s auf die Kolonien aufgelegt und in flüssigen Stickstoff überführt, um die Zellen aufzuschließen. Der Filter wurde anschließend auf ein mit Z-Puffer getränktes Whatmanpapier mit der Koloniseite nach oben aufgelegt und bei 30 °C bis zur Blaufärbung der Kolonien inkubiert (30 min).

#### **2.2.3.5 Plasmidisolierung aus Hefezellen**

5 ml SD-Leu-Medium inklusive 1  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximid wurden mit einer entsprechenden Hefekolonie angeimpft und ü.N. bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 4444 x g zentrifugiert (Eppendorf 5804R) und das Sediment in 100  $\mu\text{l}$  STET-Puffer aufgenommen. Um die Zellen aufzuschließen, wurden sie nach Zugabe von Glasperlen 5 min bei 1400 rpm geschüttelt. Nach einer erneuten Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  STET-Puffer wurde der Ansatz 5 min bei 100 °C inkubiert und anschließend 20 min bei 20800 x g (Eppendorf 5417R) zentrifugiert. Zu 150  $\mu\text{l}$  Überstand wurden 75  $\mu\text{l}$  einer 7.5 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung gegeben und der Ansatz 1h bei -20°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationschritt (30 min, 4 °C, 20800 x g, Eppendorf 5417R)) wurde die DNA aus 150  $\mu\text{l}$  Überstand mit dem zweifachen Volumen Ethanol präzipitiert. Das DNA-Präzipitat wurde in 150  $\mu\text{l}$  QX1-Puffer (Qiagen) aufgenommen und mit 5  $\mu\text{l}$  QIAX II gebunden. Nach dem Waschen wurde die gebundene DNA 10 min bei 50 °C mit 20  $\mu\text{l}$ , 10 mM Tris pH 8.0 eluiert und für die Retransformation von kompetenten Bakterien verwendet.

Die Plasmidisolierung aus den Bakterien erfolgte mit dem Plasmid-Isolierungs Kit von Roche Diagnostics entsprechend den Herstellerangaben. Ein Aliquot der so isolierten DNA wurde sequenziert und der Rest für die Retransformation von Hefezellen verwendet.

## 2.2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte über die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Lämmli. Das Sammelgel enthielt 4,5 % Acrylamid und das Trenngel 7%-15% Acrylamid, je nach Größe der zu trennenden Proteine. Als Laufpuffer diente einfach konzentrierter SDS-Elektrophoresepuffer. Die Proben wurden im Auftragspuffer aufgenommen, 3-5 min gekocht und mit 100-180 V bei RT getrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurden die vorgefärbten Proteinmarker Broad Range (New England BioLabs) oder Rainbow (Amersham Pharmacia) verwendet.

- Comassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele in der Färbelösung 20 min unter leichtem Schütteln fixiert. Die Entfärbung erfolgte ü.N. auf dem Schüttler, anschließend wurden die Gele getrocknet.

### 2.2.4.2 Western Blot Analyse (Immunoblot)

Der elektrophoretische Transfer der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte nach dem Tank-Verfahren unter Verwendung des *Mini Trans-blot electrophoretic Transfer Cells* (BioRad) oder dem Semi-Dry Verfahren (*Semy Dry Transfer Cell SD*, BioRad).

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel kurz im Blotpuffer äquilibriert und der Blot mit Whatmann Papier und Membran zusammengebaut. Der Transfer erfolgte bei 4°C und konstanter Spannung (30 V ü.N. oder 100 V 1 h) bzw. bei RT, 25 V, 1 h unter Anwendung des Semy-Dry Verfahrens.

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu minimieren, wurde die Membran 30 min bei RT in Blockierungslösung geschüttelt und anschließend mit dem ersten Antikörper für 2 h bei RT oder ü.N. inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in Blockierungslösung in einem Verhältnis von 1: 2000 bis 1: 10.000. Die Membran wurde dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen und mit dem zweiten in TBS-T 1:2500 bis 1:5000 verdünnten Antikörper 1h bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Blotmembran einmal mit

Substratpuffer gewaschen. Die Entwicklung erfolgte im Substratpuffer unter Zugabe von NBT und BCIP, und zwar solange, bis Banden gewünschter Intensität sichtbar wurden. Die Farbreaktion wurde durch Überführung des Blots in 0.5 M EDTA gestoppt.

Bei der Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers, wurde die Blotmembran nach dem Waschen mit TBS-T in eine Filmkassette gelegt und mit Substratpuffer für die Peroxidase 1 min inkubiert. Anschließend wurde ein Film aufgelegt und für unterschiedlichen Zeiten exponiert und entwickelt.

### **2.2.4.3 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen**

Für die Expression der Proteine in Fusion mit dem (His)<sub>6</sub>-Peptid wurden die entsprechenden cDNA-Fragmente in die Vektoren pQE30 oder pQE40 kloniert. Nach der Expression in Bakterien wurden die Proteine über die Bindung an die Ni<sup>2+</sup>-Ionen der Agarose-Matrix gereinigt.

Für die Herstellung von *Glutathion-S-Transferase*(GST)-fusionierten Proteinen wurden die cDNA-Fragmente in den Vektoren pGEX6P1/2/3 kloniert. Die Reinigung erfolgte ebenfalls affinitätschromatographisch durch die Bindung der *Glutathion-S-Transferase* an die Glutathion-Sepharose-Matrix.

100 ml LB/Amp Medium wurden mit einer plasmidtragenden Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 200-1000 ml LB/Amp-Medium mit dieser Vorkultur in der Verdünnung 1:10 inokuliert und solange geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 erreicht war. Die Proteinsynthese wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kulturen für weitere 2-4 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 10 min bei 6924 x g abzentrifugiert (Sorvall A6.14) und das Zellsediment bei -20 °C bis zur weiteren Reinigung aufbewahrt.

### **2.2.4.4 Reinigung von His<sub>6</sub>-tag-Fusionsproteinen**

Das Zellsediment aus 2.2.4.3 wurde im Puffer B resuspendiert (5 ml Puffer / 250 ml Kultur) und zur Lyse der Zellen 20 min auf dem Rotator bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 20 min zentrifugiert (Sorvall A8.24, 23750 x g) und der Überstand auf die mit Puffer B äquilibrierte Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gegeben. Die Bindung erfolgte bei 4 °C unter leichtem Rotieren für 1 h. Die Agarose wurde viermal mit Puffer B und zweimal mit Puffer C gewaschen und die Proteine zweimal mit je 3 ml Puffer D eluiert und ü.N. dialysiert.

#### **2.2.4.5 Reinigung von GST-Fusionsproteinen**

Der Zellschlag aus 2.2.4.3 wurde in 10 ml STE-Puffer (10 ml/250 ml Kulturvolumen) mit 100  $\mu$ l Lysozym (10 mg/ml Stammlösung) und Proteaseinhibitoren resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis, wurden die Proteine durch Zugabe von 2% Triton-X-100, 20 min auf Eis extrahiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (32570 x g, 20 min, 4°C) entfernt und der Überstand auf 1 ml mit STE äquilibrierte Glutathion-Sepharose-Matrix gegeben und 1 h bei 4°C rotiert. Die nicht gebundenen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (Eppendorf 5804R, 178 x g, 1 min, 4°C) entfernt und die Matrix viermal mit je 15 ml STE Puffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden zweimal mit je 2 ml Elutionspuffer von der Sepharose eluiert und gegen PBS oder Kupplungspuffer dialysiert.

#### **2.2.4.6 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BCA-Bestimmungskit (Pierce) durchgeführt. Als Standard diente eine BSA-Lösung im Bereich von 0.1-1mg/ml. Die Messung erfolgte in Photometer bei 620 nm

#### **2.2.4.7 Dialyse**

Die Dialyse wurde zur Umpufferung von gereinigten Proteinen eingesetzt. Je nach Größe der Proteine wurden Dialyseschläuche mit einer Ausschlußgrenze von 3500 Da oder 12000-14000 Da verwendet. Vor ihrer Verwendung wurden die Schläuche mehrmals mit Wasser und dann mit der entsprechenden Pufferlösung gespült. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4°C gegen 1.5-5 l Puffer, der drei- bis viermal gewechselt wurde.

#### **2.2.4.8 Kopplung von Proteinen an aktivierte NHS-Sepharose**

Ein geeignetes Volumen NHS-Sepharose-Suspension im Isopropanol wurde dreimal mit eiskalter 1 mM HCl gewaschen. Dazu wurde die Sepharose 1 min bei 178 x g, 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zu koppelnde Protein wurde im Kopplungspuffer (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl pH 7.8) gelöst und zu dem Säulenmaterial gegeben. Nach dem Schütteln wurde eine Aliquot entnommen, zentrifugiert und der Überstand für die Bestimmung der Kopplungseffizienz aufbewahrt. Die Kopplung erfolgte 3 h bei RT oder ü.N. bei 4°C unter leichtem Rotieren. Danach wurde der Überstand entnommen und für

eine SDS-PAGE-Analyse oder HPLC-Messung (im Fall einer Peptidkopplung) zur Ermittlung der Kopplungseffizienz aufbewahrt. Anschließend wurden die eventuell noch vorhandenen freien Bindungsstellen des Gelmaterials durch eine einstündige Inkubation mit 0.1 M Tris, pH 8.0 abgesättigt. Die Sepharose wurde vier Waschzyklen alternierend mit folgenden Puffern unterworfen:

0.1 M Tris-HCl/0.5 M NaCl, pH 8.0; 0.1 mM NaHAc/0.5 M NaCl, pH 4.0. Zum Schluß wurde die Sepharose wieder mit 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 gewaschen und zur Langzeitlagerung 20 % Ethanol zugesetzt und bei 4°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde die Sepharose in dem jeweiligen Bindungspuffer äquilibriert.

Zur Ermittlung der Kopplungseffizienz wurden die entnommenen Überstände vor und nach der Kopplung mittels SDS-PAGE oder HPLC analysiert und verglichen.

#### **2.2.4.9 Aufreinigung von Membranfraktionen aus Rattengehirnen**

Für die Coimmunpräzipitationsexperimente mit Gehirnproteinen wurden Membranpräparationen von Ratten- oder Mäusegehirnen hergestellt, um die jeweiligen Proteine anzureichern. Die Präparation bestand in einer schrittweisen Fraktionierung der Gehirnmembranen in gesamte Membran (P2-Fraktion), synaptosomale Fraktion oder postsynaptische Dichte.

Die Schädel von 20 adulten Ratten oder Mäusen wurden geöffnet, die Gehirne vorsichtig herausgelöst und in 30-50 ml Homogenisationspuffer A auf Eis homogenisiert. Um die Zellkerne zu entfernen, wurde das Homogenat bei 1400 x g, 4°C, 10 min (Eppendorf 5804R) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde erneut mit 30 ml Homogenisationspuffer extrahiert (710 x g, 4°C, 10 min). Die Überstände wurden vereinigt und einem weiteren Zentrifugationsschritt unterworfen (13800 x g, 4°C, 20 min), um die gesamte Membranfraktion zu isolieren. Diese Rohfraktion (crude membrane, P2-Fraktion) wurde im Homogenisationspuffer A resuspendiert und entweder weiter aufgereinigt oder nach der Proteinbestimmung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die weitere Fraktionierung erfolgte über einen Saccharosegradienten. Dabei wurden in SW40 Zentrifugenröhrchen je 6 ml einer 1.2 M Saccharoselösung gegeben, und mit dem gleichen Volumen einer 1M Lösung überschichtet. Auf den Gradienten wurden jeweils 0.5-1 ml der Rohmembran-Fraktion vorsichtig aufgetragen. Die Röhrchen wurden anschließend zentrifugiert (Beckmann Zentrifuge, 25 000 rpm, 2 h, 4°C) und die entstehende Bande zwischen 1.2 und 1 M Sacharose mit einer Kanüle abgesaugt. Diese synaptosomale Fraktion wurde nach der Proteinbestimmung bei -70°C gelagert .

Für die Isolierung von PSD-Proteinen wurden die Proteine der synaptosomalen Fraktion für 15 min in 6 mM Tris-HCl pH 8.1, 0.16% Sucrose, 0.5% Triton X-100 solubilisiert. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment über einen Saccharosegradienten, der sich aus einer 1.5 M und 2 M Saccharoselösung zusammensetzte, wie oben beschrieben fraktioniert. Die Proteinbanden wurden mit einer Kanüle abgesaugt und nach der Proteinbestimmung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.4.10 Isolierung von Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub> bindenden Proteinen**

Um Interaktionspartner der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP zu isolieren, wurde das entsprechende cDNA-Fragment in den Vektor pQE30 kloniert und das His-tag Fusionsprotein in Bakterien exprimiert und gereinigt. Das gereinigte Protein wurde gegen 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/0.5 M NaCl dialysiert. Nach der Proteinbestimmung wurden 10 mg des Proteins wie unter 2.2.4.8 beschrieben an 5 ml NHS Sepharose gekoppelt. BSA wurde ebenfalls zu 5 mg/ml an NHS-Sepharose gekoppelt.

25 Rattengehirne wurden im Puffer A homogenisiert und die Proteine mit 1 % Triton X-100 1h bei 4 °C extrahiert. Nach der Zentrifugation (18 000 x g, 15 min, 4°C) wurde der Überstand mit einem Aliquot der BSA-Sepharose über Nacht bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungen an der Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sepharose zu reduzieren. Die BSA-Sepharose wurde durch Zentrifugation (2 min, 750 x g, 4°C) entfernt und 90 % des Extraktes auf die Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sepharose, und 10 % auf eine frische BSA-Sepharose zugegeben. Nach einer dreistündigen Inkubation wurden nicht gebundene Proteine durch Zentrifugation entfernt und die Sepharose mehrmals mit Puffer A /1% Triton X-100/0.5 % Nonidet P gewaschen. Es folgte ein zweiter Waschschrift mit Puffer A/1% Triton X-100. Die gebundenen Proteine wurden in zwei Schritten von der Sepharose eluiert: einmal mit Puffer A/1% Triton X-100/2.5 M Harnstoff und ein zweites Mal mit Puffer A/ 1% Triton X-100/ 4 M Harnstoff.

Die Proteine im Eluat wurden durch Zugabe von 20 % Trichloressigsäure gefällt. Nach der Zentrifugation (20800 x g, 20 min, 4°C) wurden die Niederschläge mit Ether/Ethanol (1:1) gewaschen und die Proteine in 100 mM Tris.HCl/1% SDS pH 8.8 aufgenommen. Die Auftrennung der isolierten Proteine erfolgte in einem 10%igen Polyacrylamidgel. Nach der Coomassie-Färbung wurden die Banden der angereicherten Proteinen ausgeschnitten, entsprechend dem Protokoll mit Trypsin verdaut und für die massenspektroskopische Analyse eingesetzt.

#### **2.2.4.11 Vorbereitung der Proben für die massenspektrometrische (MS) Analyse**

Der Proteingehalt der spezifischen Banden wurde abgeschätzt und die Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und zerkleinert; als Kontrolle diente ein Gelstück ohne Proteinbanden. Die Gelstücke wurden mit destilliertem Wasser so lange gewässert, bis der pH-Wert der Waschlösung dem des Waschwassers entsprach. Danach wurden die Proben in dem Speedvac vollständig getrocknet und im wenig Verdaupuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.5) aufgenommen. Nach Zugabe von Trypsin im Verhältnis 1:10 zur Proteinmenge, wurden die Ansätze 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke vollständig mit Verdaupuffer bedeckt und ü.N. bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proteine zweimal mit 10 % Trifluoressigsäure (TFA) 2 h bei 37°C extrahiert und über Sep-Pak-Säulchen gereinigt. Die Säulchen wurden zuerst mit Methanol, dann mit 0.1 % TFA äquilibriert. Nach dem Auftragen der Proben wurden die Säulchen mit 0.1 % TFA gewaschen. Die Elution erfolgte mit 80% Methanol in 0.1 % TFA. 150  $\mu$ l Eluate wurden in dem Speedvac getrocknet und für die MS-Analyse verwendet.

#### **2.2.4.12 *Pulldown assay* mit gereinigten Fusionsproteinen**

*In vitro* Bindungsversuche wurden durchgeführt, um die Interaktionen, die im Hefe-Zwei-Hybrid-*screen* oder bei der Affinitätsreinigung gefunden wurden, weiter zu untersuchen. Dadurch ließ sich überprüfen, ob die gefundene Interaktion direkt ist oder durch ein zweites Protein vermittelt wird.

GST-Fusionsproteine der EF-Hand oder der Spectrin *repeats* von  $\alpha$ -Fodrin wurden gereinigt und nicht von der Glutathion-Sepharose-Matrix eluiert. Ein Aliquot der Sepharose wurde durch SDS-PAGE überprüft und ein geeignetes Volumen Sepharose mit 35  $\mu$ g Ankyrin<sub>SSTRIPHis6</sub>- in 50 mM Tris, pH 7.4/0.1 % Triton X-100 versetzt. Der Ansatz wurde 2 h bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Bindungspuffer wurden die gebundenen Proteine durch Kochen im Lämmli-Puffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot unter Verwendung eines anti-Ankyrin *repeats*-Domänen Antikörpers in der Verdünnung 1:2500 analysiert.

### **2.2.4.13 Immunpräzipitation**

Die Immunpräzipitation wurde als weitere Methode zur Untersuchung der Interaktion von Proteinen angewendet. Die Proteinkomplexe wurden aus solubilisiertem Gewebe oder Zelllysaten mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert und die Zusammensetzung dieser Komplexe im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern untersucht.

#### ***Coimmunpräzipitation aus transfizierten HEK-Zellen***

1 bis 2 Tage nach der Transfektion mit den geeigneten Plasmiden wurden die Zellen im PBS gewaschen und in 1ml RIPA Puffer 20 min auf Eis lysiert. Die Zelltrümer wurden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand mit einem Antikörper (gegen eines der zu untersuchende Proteine, gewöhnlich 5  $\mu$ l bei polyklonalen Antikörpern) für 1h bei 4°C rotiert. Danach wurden 20-30  $\mu$ l Protein A/G Plus Sepharose zugegeben, um die Antikörper/Protein-Komplexe zu präzipitieren. Dieser Schritt fand 2h oder ü.N. bei 4°C statt. Die Matrix wurde 5 mal im RIPA-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine durch Kochen im Lämmli-Puffer von der Matrix abgelöst. Die Untersuchung der Präzipitate erfolgte durch Anwendung der Western-Blot Analyse unter Verwendung entsprechender Antikörper.

Alternativ wurde zur Präzipitation von PDZ-Domänen enthaltenden Proteine-Fragmenten der SSTRIP/Shank/ProSAP-Familie, das C-terminale Peptid (Sequence IYIPEAQTRL) des GKAP-Proteins verwendet, welches an NHS-Sepharose gekoppelt war. 50  $\mu$ l der 50%igen GKAP-Sepharose-Suspension wurden im RIPA-Puffer äquilibriert und zum Zell-Überstand gegeben. Die Inkubation fand 1.5 – 2 h bei 4°C statt, danach wurde die Sepharose gewaschen und die Proteine wie oben beschrieben weiter analysiert.

#### ***Coimmunpräzipitation aus solubilisierten Gehirnmembranen***

Sie wurde angewendet, um eine *in vivo* Interaktion von Proteinen nachzuweisen. Zunächst wurden die Membranproteine der Rattengehirnen im RIPA- oder DOC-Puffer solubilisiert. Dazu wurde ein Aliquot der Membranpräparation abzentrifugiert (Eppendorf, 20800 x g, 15 min, 4°C) und der Niederschlag im gleichen Volumen RIPA- oder DOC-Puffer resuspendiert. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C schloß sich eine 30minütige Inkubation auf Eis unter leichtem Schütteln an. Die nicht gelösten Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand mit dem entsprechenden Antikörper für 2 h bei RT inkubiert. Die

Immunkomplexe wurden durch Zugabe von 20-50  $\mu$ l Protein A/G Plus Sepharose  $\ddot{u}$ .N. präzipitiert. Nach fünfmaligen Waschen der Sepharose mit Bindungspuffer wurden die Immunkomplexe durch Kochen in einem geeigneten Volumen Lämmli-Puffer von der Matrix abgelöst und im Western Blot unter Verwendung der entsprechenden Antikörper analysiert.

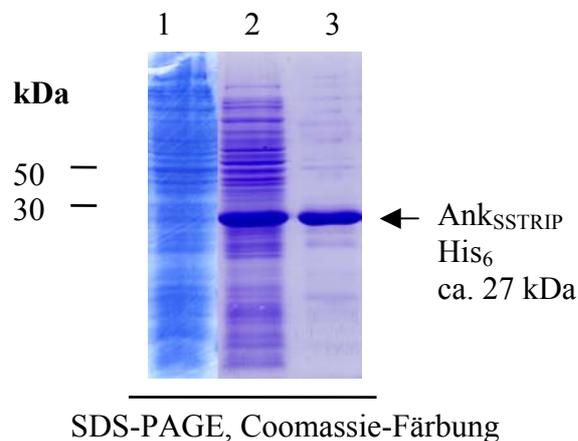
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung und Charakterisierung von $\alpha$ -Fodrin als Interaktionspartner für die Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP und ProSAP2

##### 3.1.1 Reinigung von Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub> bindenden Proteinen aus Rattengehirnen

###### 3.1.1.1 Reinigung von Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub> und Kopplung an NHS-Sepharose

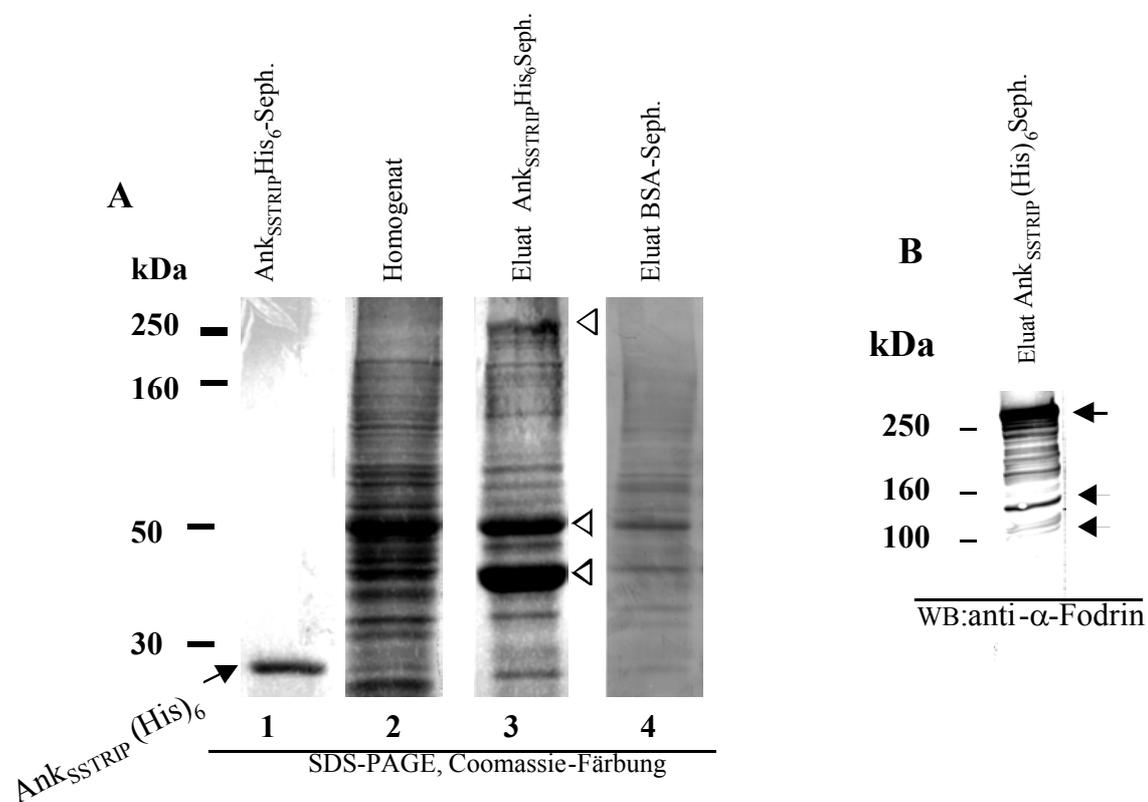
Die Isolierung von Interaktionspartnern der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP erfolgte durch Affinitätschromatographie an einer Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sepharose-Matrix. Dazu wurde die Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP (Aminosäurereste 189-399) wie im Methodenteil beschrieben als His-tag-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert, über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gereinigt und gegen Kopplungspuffer dialysiert. Eine SDS-PAGE-Auftrennung (Coomassie-Färbung) der verschiedenen Reinigungsschritte zeigt, dass die Expression des Fusionsproteins sich gut induzieren ließ (Abb. 3.1, Spur 2). Die Spur des Eluats (Spur 3) enthielt neben dem Fusionsprotein kaum Verunreinigungen durch andere bakterielle Proteine und war somit als Affinitätsligand geeignet. Neben dem Fusionsprotein wurde als Kontrolle auch BSA an aktivierten NHS-Sepharose gekoppelt (2 mg/ml bzw. 5 mg/ml).



**Abbildung 3.1 Reinigung des Ankyrin<sub>SSTRIP</sub> His<sub>6</sub>-Fusionsproteins.** Das cDNA-Fragment der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP (Aminosäurereste 189-399) wurde in den Vektor pQE30 kloniert und der *E. coli*-Stamm TOPF10' mit dem Plasmid transformiert. Das His<sub>6</sub>-fusionierte Protein wurde in TOPF10'-Bakterien exprimiert und an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose nach Herstellerangaben gereinigt. Spur 1, Bakterien-Lysate vor der Induktion; Spur 2, Lyse-Überstand nach der Induktion und Zentrifugation; Spur 3. Aliquot des gereinigten Proteins nach der Dialyse.

### 3.1.1.2 Isolierung von Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub> bindenden Proteinen aus Rattengehirnextrakte

Die Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose-Matrix wurde benutzt, um wie im Methodenteil beschrieben (Firestein und Bredt, 1999), bindende Proteine aus Rattenhirnextrakt zu isolieren. Die homogenisierten Gehirne (25 Stück) wurden vor der Inkubation mit der Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose zunächst mit BSA-Sephrose präabsorbiert, um unspezifische Bindungen der Proteine an der Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose zu reduzieren. Anschließend wurden 90% des Proteinextrakts mit Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose und 10% mit frischer BSA-Sephrose inkubiert. Nach dem Waschen, der Elution und Fällung wurden die Proteine in Tris/HCl Puffer (100  $\mu$ l) resuspendiert. Jeweils 4  $\mu$ l Eluat sowie 40  $\mu$ l Extrakt wurden mit SDS-PAGE (Coomassie Färbung) analysiert (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2. Affinitätsreinigung von Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-bindenden Proteinen aus Rattengehirnextrakt. A. SDS-PAGE der Eluate mit Coomassie-Färbung.** Proteinextrakte von 25 Rattengehirnen wurden mit Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>- oder BSA-Sephrose aufgetrennt. Nach der Elution wurden die Proteine durch SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung analysiert. Spur 1, Aliquot der Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose ohne Proteinextrakt, das Fusionsprotein wird unter denaturierenden Bedingungen teilweise von der Sepharose eluiert; Spur 2, Gehirnextrakt nach der Präabsorption mit BSA-Sephrose, 40  $\mu$ l von 200 ml; Spur 3, 4  $\mu$ l Eluat der Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose; Spur 4, 4  $\mu$ l Eluat der BSA-Sephrose. Die Lage der Banden, die für die MS-Analyse ausgeschnitten wurden, sind mit Pfeilspitzen markiert. **B. Western Blot Analyse** des mit der Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose affinitätsgereinigten Materials mit einem anti- $\alpha$ -Fodrin Antikörper. 1  $\mu$ l Eluat der Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose wurde für die Analyse verwendet. Die Membran wurde mit einem monoklonalen anti-

$\alpha$ -Fodrin-Antikörper entwickelt. Die Detektion der Banden erfolgte mit alkalischer Phosphatase. Die Pfeilspitzen zeigen die Positionen der  $\alpha$ -Fodrin Bande (260 kDa) und seiner Abbauprodukte (120 und 150 kDa).

In Spur 1 wurde ein Aliquot der Ank-SSTRIP-His<sub>6</sub>-Sephrose ohne Gehirnextrakt aufgetragen. Es zeigte sich, daß das Fusionsprotein unter den für die Reinigung herrschenden denaturierenden Bedingungen zum Teil von der Sepharose abgelöst wird. Im Vergleich zum Ausgangsmaterial und zur BSA-Kontrolle waren im Eluat der Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose drei Hauptbanden (ca. 250 kDa, 55 kDa, 45 kDa) sehr stark ausgeprägt (Spur 3). Die Proteine der 250 kDa- und der 45 kDa-Bande waren im Vergleich zum Ausgangsmaterial (Spur 2) deutlich angereichert (Spur 3). Die 250 kDa-Bande fehlte ganz in der Kontrolle (Spur 4) und im Extrakt (Spur 2). Die 55 kDa und 45 kDa-Banden waren in der BSA-Kontrolle zwar erkennbar (Spur 4), aber deutlich schwächer als im Eluat der Ankyrin-His<sub>6</sub>-SSTRIP-Sephrose. Somit handelte es sich bei der 250 kDa-Bande um ein an die Ankyrin-His<sub>6</sub>-SSTRIP-Sephrose spezifisch bindendes Protein.

### **3.1.2 Identifizierung von $\alpha$ -Fodrin als Bindungspartner für die Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP und ProSAP2**

#### *3.1.2.1 Massenspektrometrische (MS) Analyse der angereicherten Proteine*

Die drei stärksten Banden des Eluats aus der Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose wurden aus dem Gel ausgeschnitten, und mit Trypsin verdaut. Anschließend wurden die Proben im Labor von Dr. Christoph Weise (Berlin) mittels MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization time of flight*)-MS-Analyse untersucht. Das Trypsin spaltet nach Arginin und Lysin-Resten eines gegebenen Proteins, so dass sich die Produkte der Trypsin-Spaltung eines Proteins mit bekannter Sequenz theoretisch vorhersagen lassen. Ein Vergleich der durch die Trypsinspaltung erhaltenen und durch MS ermittelten Proteinfragmente mit der Datenbank ermöglicht die Identifizierung des Proteins (*Mass finger print*-Analyse).

Eine *mass finger print*-Analyse der angereicherten Proteine führte zu folgenden Ergebnissen: Das 250 kDa-Protein wurde als  $\alpha$ -Fodrin, das 55 kDa-Protein als  $\alpha$ -Tubulin und das 45 kDa-Protein als  $\beta$ -Aktin identifiziert.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Aktin ein  $\alpha$ -Fodrin bindendes Protein ist. Da die 55 kDa-Bande im Vergleich zur BSA-Kontrolle und zur Spur des Ausgangsmaterials nicht besonders stark war, wurde sich besonders auf Aktin und auf  $\alpha$ -Fodrin als mögliche Bindungspartner für die Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP konzentriert. Etwa zur gleichen Zeit wurde von Dr.

Tobias Böckers von der Universität Münster unter anderem  $\alpha$ -Fodrin als potentieller Interaktionspartner für die Ankyrin *repeats*-Domäne von ProSAP2 in einem Hefe-Zwei-Hybrid-*screen* identifiziert. Dabei setzte er die Ankyrin *repeats*-Domäne von ProSAP2 als *bait* (Köder) ein, um eine cDNA-Gehirnbibliothek der Ratte nach möglichen Interaktionspartnern zu durchsuchen und identifizierte einen Klon, der die Spectrin *repeats* 21, 22 und die zwei EF-Hand-Motive des  $\alpha$ -Fodrin Moleküls trug. Experimente zur Eingrenzung des Bindebereichs, die von ihm durchgeführt wurden, zeigten außerdem, dass der Spectrin *repeat* 21 von  $\alpha$ -Fodrin allein die Interaktion in der Hefe vermitteln kann. Im weiteren Verlauf wurden mit Dr. Böckers Arbeitsgruppe die molekularbiologischen Arbeiten (Dr. Böckers) und die proteinchemischen und biochemischen Arbeiten (unsere Arbeitsgruppe) in Kooperation durchgeführt.

### **3.1.2.2 Western Blot Analyse des Eluats aus der Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose**

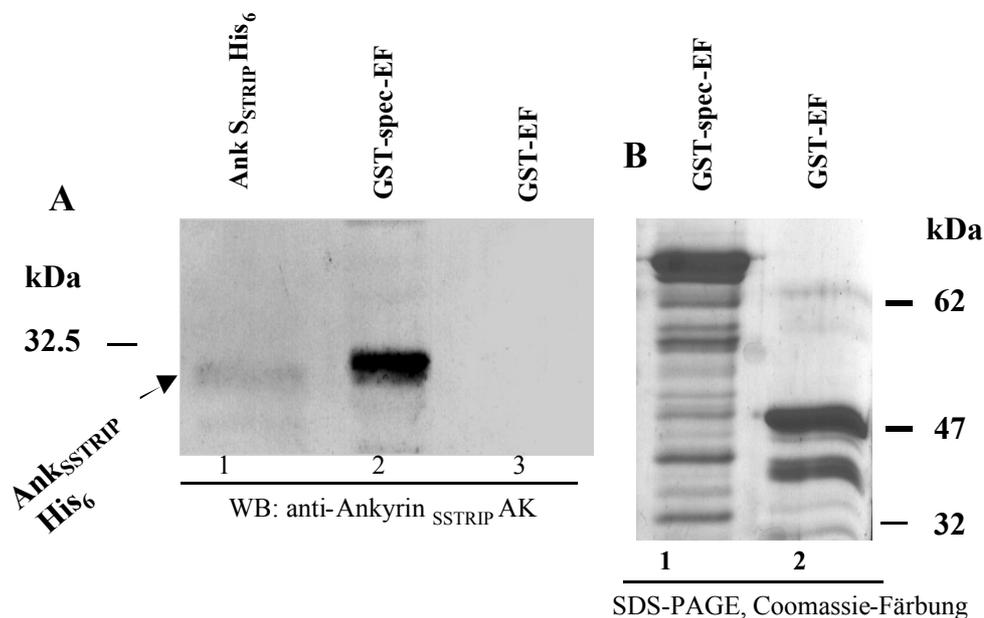
In Abb. 3.2.B ist ein Western Blot mit anti- $\alpha$ -Fodrin-Detektion dargestellt. Ein 1  $\mu$ L-Aliquot des Eluats der Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Sephrose wurde nach der SDS-PAGE-Auftrennung untersucht. Der monoklonale Antikörper gegen das  $\alpha$ -Fodrin erkannte das  $\alpha$ -Fodrin (260 kDa) sowie weitere kleinere Proteine. Da für  $\alpha$ -Fodrin eine aktivitätsabhängige Proteolyse *in vivo* nachgewiesen wurde, die zu Hauptabbauprodukten von ca. 120 und 150 kDa führen (Harris et al., 1990; Lynch et al., 1984), können die hier detektierten kleineren Proteine ebenfalls als Abbauprodukte interpretiert werden. Die identifizierte Wechselwirkung mußte nun biochemisch weiter charakterisiert werden.

## **3.1.2 Weitere Charakterisierung der Interaktion zwischen $\alpha$ -Fodrin und der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP und ProSAP2**

### **3.1.2.1 *In vitro* Bindungsversuch mit rekombinanten Fusionsproteinen der interagierenden Domänen**

Es wurde zunächst untersucht, ob die gefundene Interaktion zwischen  $\alpha$ -Fodrin und SSTRIP/ProSAP2 direkt ist oder durch ein zweites Protein wie das ebenfalls identifizierte Tubulin oder Aktin vermittelt wird. Dazu wurde ein *in vitro* Bindungsversuch mit gereinigten Fusionsproteinen der interagierenden Domänen durchgeführt. GST-Fusionsproteine der Spectrin *repeats* 21, 22 und der EF-Hand-Domäne(GST-spec-EF) sowie alleine von der EF-

Hand-Domäne (GST-EF) aus  $\alpha$ -Fodrin wurden dazu nach der Reinigung nicht von der Sepharose eluiert. Stattdessen wurden Aliquots der Sepharose direkt durch SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung überprüft, um annähernd die gleiche Menge an Protein für die Bindung zu verwenden. Ein His<sub>6</sub>-Fusionsprotein der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP<sub>199-389</sub> (Ank<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>) wurde ebenfalls gereinigt und gegen Bindungspuffer dialysiert. Geeignete Aliquots der GST-Fusionsprotein-Sepharose wurden mit 35  $\mu$ g Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub> 2 h bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die gebundenen Proteine im Western Blot unter Verwendung eines gegen die Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP gerichteten Antikörpers untersucht. Die Detektion der Banden erfolgte in einer alkalischen Phosphatase-Reaktion (Abb. 3.3).



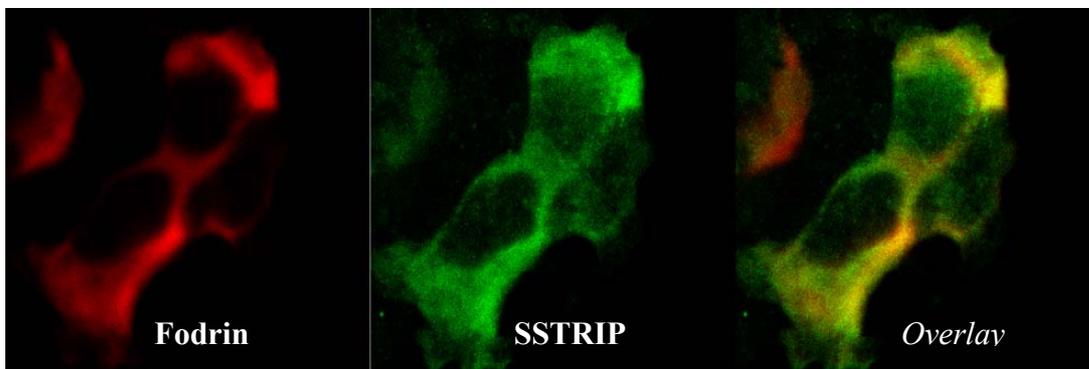
**Abbildung 3.3 In vitro Bindungsversuch mit rekombinanten Fusionsproteinen.** GST-Fusionsproteine der Spectrin *repeats* 21, 22, EF-Hand sowie der EF-Hand allein von  $\alpha$ -Fodrin wurden mit einem His<sub>6</sub>-Fusionsprotein der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden im Western Blot unter Verwendung eines anti-Ankyrin-Domäne Antikörpers analysiert. **A.** Spur 1, Aliquot des Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub> Fusionsproteins nach der Dialyse; Spur 2, Bindungsansatz mit der GST-Spec-EF Sepharose; Spur 3, Bindungsansatz mit der GST-EF-Hand-Sepharose (Kontrolle). **B.** SDS-PAGE der gereinigten GST-Fusionsproteine. Spur 1, Aliquot der GST-Spec-EF-Sepharose; Spur 2, Aliquot der GST-EF-Hand-Sepharose, die für die Bindung verwendet wurde.

In der ersten Spur wurde ein Aliquot des gereinigten Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Fusionsproteins aufgetragen. Der Antikörper erkannte bei GST-spec-EF (Spur 2) eine Bande, die auf der Höhe der Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub> liegt. Bei der EF-Hand-Probe dagegen war keine Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Bande nachweisbar (Spur 3). Das Ankyrin<sub>SSTRIP</sub>-His<sub>6</sub>-Fusionsprotein bindet somit an das GST-Fusionsprotein der Spectrin-*repeats*, nicht aber an das Kontrollprotein (EF-Hand). Dies

ist in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Einengungsversuche, die von Dr. Tobias Böckers im Hefe-Zwei-Hybrid-System durchgeführt wurden; danach wird die Interaktion von ProSAP2 mit  $\alpha$ -Fodrin durch das Spectrin-repeat 21 von  $\alpha$ -Fodrin vermittelt.

### 3.1.3.2 Colokalisationsexperiment in transfizierten HEK-Zellen

Um eine räumliche Nähe zwischen  $\alpha$ -Fodrin und SSTRIP/ProSAP2 als Nachweis einer Interaktion zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit cDNAs, die für  $\alpha$ -Fodrin und ein Fragment von SSTRIP (Aminosäurereste 1-1288, SSTRIP<sub>1-1288</sub>) kodieren, transient cotransfiziert. Die Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben vorbereitet und unter dem konfokalen Mikroskop untersucht (Abb. 3.4). Die  $\alpha$ -Fodrin-Fluoreszenz ist links und die SSTRIP-Immunfluoreszenz in der Mitte dargestellt. Aus der Überlagerung beider Signale war erkennbar, dass sie sich beinahe vollständig überdeckten (gelbe Färbung), was für eine weitgehende Colokalisierung beider Proteine spricht. Diese Colokalisierung ist sowohl eine Folge als auch eine Voraussetzung einer möglichen Interaktion, da nur Proteine, die räumlich nahe beieinander sind, in Wechselwirkung miteinander treten können.

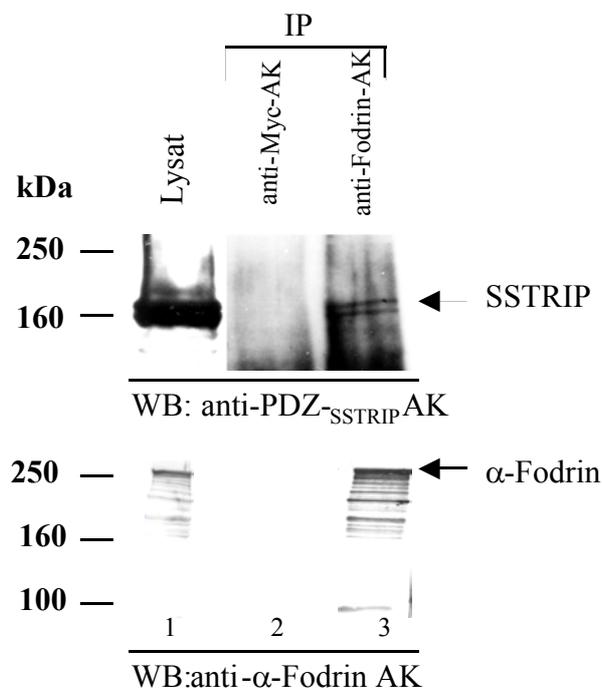


#### Abbildung 3.4 Colokalisierung von $\alpha$ -Fodrin und SSTRIP in transfizierten HEK-Zellen.

HEK Zellen wurden transient mit cDNA transfiziert, die für *Flag-tag- $\alpha$ -Fodrin* und SSTRIP<sub>1-1288</sub> codieren. Die linke Abbildung zeigt die Immunfärbung von Zellen die mit anti- $\alpha$ -Fodrin Antikörper markiert sind (rot). Die SSTRIP Immunfluoreszenz ist in der Mitte dargestellt und die Überlagerung beider Signale ist rechts zu sehen.

### 3.1.3.3 Coimmunpräzipitation aus transient transfizierten HEK293-Zellen

Im folgenden wurde untersucht, ob beide Interaktionskandidaten in einem eukaryontischen Zellsystem miteinander tatsächlich interagieren. Dazu wurde eine Coimmunopräzipitation mit Zellextrakten transfizierter HEK293-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit den gleichen Plasmiden wie im Abschnitt 3.1.3.2 cotransfiziert. Nach der Zellyse im RIPA-Puffer (1 ml) wurde die Hälfte des Überstandes nach der Zentrifugation mit 5  $\mu\text{g}$  anti- $\alpha$ -Fodrin und die zweite Hälfte mit einem anti-Myc-tag-Antikörper als Negativkontrolle für 1 h inkubiert. Die Immunkomplexe wurden mit Protein A/G Plus Sepharose für 2 h präzipitiert. Die Sepharose wurde nach dem Waschen im Lämmli-Puffer aufgeköcht um die Proteinkomplexe abzulösen. Diese wurden durch Western Blot unter Verwendung eines anti-PDZ<sub>SSTRIP</sub>-Antikörpers analysiert (Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5 Coimmunpräzipitation von  $\alpha$ -Fodrin und SSTRIP aus transfizierten HEK-Zellen.** HEK-Zellen wurden mit cDNAs transfiziert, die für *Flag-tag- $\alpha$ -Fodrin* und SSTRIP codieren. Nach der Lyse im RIPA-Puffer (Spur 1, 50  $\mu\text{l}$  Überstand nach der Zentrifugation) wurden die Proteinkomplexe mit einem anti Myc-Tag Antikörper (Spur 2) oder anti- $\alpha$ -Fodrin Antikörper (Spur 3) sowie Protein A/G Plus Sepharose präzipitiert und im Western Blot unter Verwendung eines anti-PDZ<sub>SSTRIP</sub> Antikörpers analysiert.

In der Spur 1 wurden 50  $\mu\text{l}$  des Zellysats aufgetragen.  $\alpha$ -Fodrin ließ sich im Zellextrakt und in dem Präzipitat mit seinem Antikörper nachweisen. Der anti-PDZ<sub>SSTRIP</sub>-Antikörper erkennt eine Doppelbande von SSTRIP<sub>1-1288</sub> im Bereich von 160 kDa (Spuren 1 und 3). Mit dem anti-

$\alpha$ -Fodrin-Antikörper ließ sich das SSTRIP ebenfalls präzipitieren (Spur 3). In der Kontrollspur war dagegen keine SSTRIP-Bande erkennbar. Dies bedeutet, dass die in Spur 3 zu sehende SSTRIP-Bande nicht aus einer unspezifischen Anlagerung des SSTRIP-Proteins an die Sepharose resultiert und dass  $\alpha$ -Fodrin und SSTRIP in HEK-Zellen miteinander interagieren.

### 3.1.3.4 Untersuchung der Interaktion zwischen $\alpha$ -Fodrin und SSTRIP/ProSAP2 *in vivo*

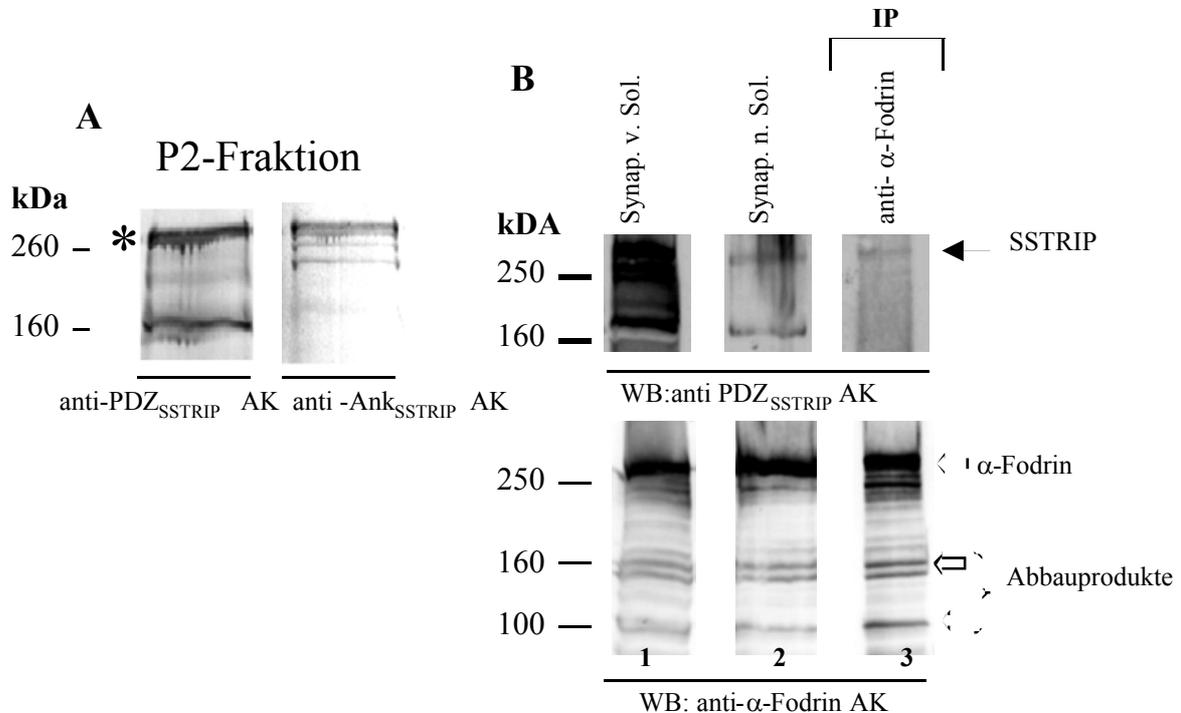
#### *Nachweis von SSTRIP in einer P2 Membranfraktion*

Um herauszufinden, ob  $\alpha$ -Fodrin mit SSTRIP und ProSAP2 auch im Gehirn von Ratten oder Mäusen interagiert, wurden Coimmunpräzipitationen aus solubilisierten Membranfraktionen von Ratten- und Mäusegehirnen durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine P2-Membranfraktion von Rattengehirnen präpariert und im DOC-Puffer solubilisiert. Ein Aliquot der Präparation wurde durch Western Blot unter Verwendung von zwei gegen SSTRIP gerichteten Antikörpern analysiert: ein Antiserum gegen ein His-tag-Fusionsprotein der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP und ein Antiserum gegen die PDZ-Domäne von SSTRIP. Das Ergebnis dieser Untersuchung (Abb. 3.6) läßt erkennen, dass das Antiserum gegen die PDZ-Domäne von SSTRIP eine Mischung verschiedener Banden erkannte, die alle im Bereich zwischen 150 kDa und 260 kDa liegen. Dies ist in Übereinstimmung mit bekannten Untersuchungen (Lim et al., 1999). Interessanterweise erkannte das Antiserum gegen die Ankyrin *repeats*-Domäne nur die größeren Varianten von SSTRIP im Bereich von 200 bis 260 kDa. Es ist anzunehmen, dass es sich bei diesen Varianten um solche handelt, die eine Ankyrin *repeats*-Domäne besitzen und deshalb von dem anti-Ankyrin-Antikörper detektiert werden.

#### *Coimmunopräzipitation von SSTRIP und $\alpha$ -Fodrin unter Verwendung eines gegen $\alpha$ -Fodrin gerichteten Antikörpers*

Die Proteine einer synaptosomalen Membranfraktion wurden im RIPA-Puffer solubilisiert und die Proteinkomplexe mit 5  $\mu$ g anti- $\alpha$ -Fodrin Antikörper und Proteine A/G Plus Sepharose präzipitiert. Die Analyse des Proteingemisches erfolgte im Western Blot unter Verwendung des anti-PDZ<sub>SSTRIP</sub> und des anti- $\alpha$ -Fodrin Antikörpers. Als Sekundärantikörper wurden an alkalischen Phosphatase gekoppelte anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen-Antikörper eingesetzt. Die Solubilisierung des SSTRIP-Proteins erwies sich als extrem schwierig. Es waren sehr viele Protein-Banden im Ausgangsmaterial vor der Solubilisierung nachweisbar. Nach der

RIPA-Extraktion waren jedoch nur noch zwei schwache Banden sichtbar (Abb. 3.6, Spuren 1 und 2).



**Abbildung 3.6 A. Nachweis von SSTRIP in einer P2-Membranfraktion.** Ein Aliquot einer P2-Membranfraktion von Mäusegehirnen wurde im DOC-Puffer solubilisiert. Die gelöste Proteine wurden durch eine 7%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot unter Verwendung eines anti-PDZ<sub>SSTRIP</sub> (Spur 1) und eines anti-Ankyrin<sub>SSTRIP</sub> (Spur 2) Antikörpers analysiert.

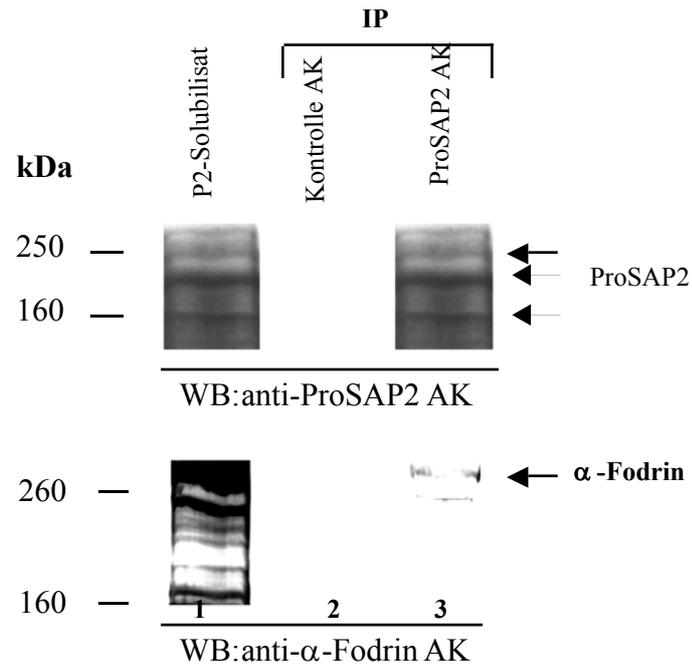
**B. Coimmunpräzipitation von  $\alpha$ -Fodrin und SSTRIP aus einer Membranfraktion der Rattengehirnen.** Eine synaptosomale Membranpräparation wurde im RIPA-Puffer solubilisiert. Die Proteinkomplexe wurden mit 5  $\mu$ g anti-  $\alpha$ -Fodrin Antikörper und Protein A/G Plus Sepharose präzipitiert und im Western Blot mit anti-PDZ<sub>SSTRIP</sub>-Antikörper (Blot 1) und anti  $\alpha$ -Fodrin (Blot 2) untersucht. Spuren 1 und 2, 50  $\mu$ l Ausgangsmaterial vor und nach der RIPA-Extraktion; Spur 3, Präzipitat. Im Präzipitat ließ sich die Ankyrin *repeats*-Domäne-enhaltende Variante von SSTRIP nachweisen.

Das  $\alpha$ -Fodrin ließ sich gut im Solubilisat und im Präzipitat durch seinen Antikörper nachweisen (Abb. 3.6, Spuren 2 und 3). Im Präzipitat konnte außerdem das SSTRIP nachgewiesen werden (Spur 3). Die geringere Intensität der SSTRIP-Bande im Präzipitat ist darauf zurückzuführen, daß das SSTRIP-Protein schlecht solubilisiert werden konnte. Es ist bemerkenswert, daß bei diesem Versuch nur die große Variante der SSTRIP-Proteine, jedoch nicht die kleine präzipitiert wurde. Die copräzipitierte Variante enthält im Gegensatz zu der

160 kDa-Variante eine Ankyrin *repeats*-Domäne (Vergleich dazu Abb. 3.6.A). Beide Varianten waren im Ausgangsmaterial nach der Solubilisierung nachweisbar (Spur 2). Gleichzeitig zeigt dieses Ergebnis, dass die detektierte Bande nicht aus einer unspezifischen Anlagerung des Proteins an der Sepharose resultiert, da in diesem Fall beide Banden in der Spur detektiert wären.  $\alpha$ -Fodrin und SSTRIP sind somit im Rattengehirn miteinander assoziiert und lassen sich mit einem ihrer Antikörper kreuzweise copräzipitieren.

#### *Coimmunpräzipitation von ProSAP2 und $\alpha$ -Fodrin unter Verwendung eines anti-ProSAP2 Antikörpers*

Da auch ProSAP2 als Interaktionspartner von  $\alpha$ -Fodrin gefunden wurde, wurde versucht diese Interaktion *in vivo* nachzuweisen. Dazu wurde eine P2 Membranfraktion von Mäusegehirnen im DOC-Puffer solubilisiert, da die Solubilisierung im RIPA-Puffer sich schwierig erwies und in vielen Fällen sehr wenig solubilisierte SSTRIP-Proteine beobachtet wurden (siehe vorherigen Abschnitt). Die Proteine wurden mit einem gegen den C-Terminus von ProSAP2 gerichteten Antikörper präzipitiert und das Immunpräzipitat mit anti- $\alpha$ -Fodrin- und anti-ProSAP2-Antikörpern im Immunoblot untersucht. Drei für ProSAP2 spezifische Banden konnten im Extrakt und im Präzipitat detektiert werden (Abb. 3.7, Blot 1, Spuren 1 und 3).  $\alpha$ -Fodrin wurde sowohl im Ausgangsmaterial als auch im ProSAP2-Präzipitat nachgewiesen (Blot 2, Spuren 1 und 3). Keines der beiden Proteine konnte durch einen Kontrollantikörper (anti c-Myc) präzipitiert werden (Blot 1 und 2, Spur 2). ProSAP2 und  $\alpha$ -Fodrin sind somit im Gehirn der Maus miteinander assoziiert und lassen sich mit einem gegen ProSAP2 gerichteten Antikörper als Komplex immunpräzipitieren.



**Abbildung 3.7 Coimmunpräzipitation von ProSAP2 und  $\alpha$ -Fodrin aus einer P2-Membranfraktion von Mäusegehirnen.** Die Membran wurde in DOC-Puffer solubilisiert (50  $\mu$ l von 4 ml des Ausgangsmaterials, Spur 1 von Blot 1 und 2) und mit einem Kontroll Antikörper (Spur 2) oder mit anti-ProSAP2 Antikörper (Spur 3) sowie Protein A/G Plus Sepharose inkubiert. Im Ausgangsmaterial und im Präzipitat konnten sowohl ProSAP2 (Blot 1, Spuren 1 und 3) als auch  $\alpha$ -Fodrin (Blot 2, Spuren 1 und 3) mit ihren jeweiligen Antikörper detektiert werden. AK, Antikörper; WB, Western Blot; IP, Immunpräzipitation.

### 3.2 Identifizierung einer regulatorisch-intramolekularen Interaktion zwischen dem N-terminalen Segment und der Ankyrin *repeats* Region von SSTRIP und ProSAP2

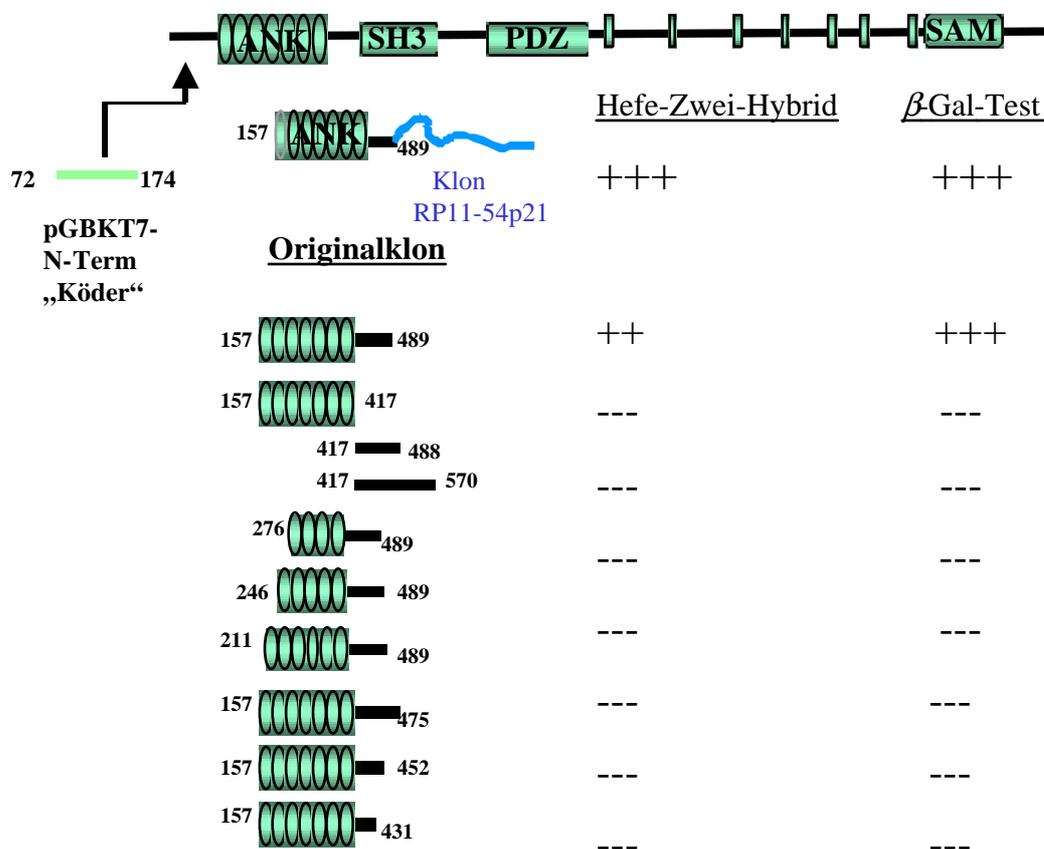
Auf der Suche nach weiteren Interaktionspartnern des SSTRIP-Proteins und möglichen Regulatoren der bisher charakterisierten Interaktionen der Ankyrin *repeats*-Domäne wurde der N-terminale Bereich unmittelbar vor der Ankyrin *repeats*-Domäne als *bait* in ein Hefe-Zwei-Hybrid-System eingesetzt. Das N-terminale Segment wurde gewählt, weil es zwischen SSTRIP und ProSAP2 konserviert ist (57 % Identität in der Aminosäuresequenz), und eventuell als Interaktionsdomäne betrachtet werden kann. Zudem könnten seine Bindungspartner die Wechselwirkungen der benachbarten Ankyrin *repeats*-Domäne regulieren. Am N-terminalen Ende des SSTRIP- und ProSAP2-Proteins existieren zwei Methionin-Reste, deren Nukleotide als Start-Codon fungieren könnten. Von den zwei Codons wurde nur das Zweite als Start-Möglichkeit in der Literatur beschrieben (Aminosäure 72). Ob Varianten von SSTRIP und ProSAP2 *in vivo* vorhanden sind, die bei Methionin eins anfangen, ist noch unbekannt. Für den hier beschriebenen *screen* wurde daher die cDNA der Aminosäure 72-174 verwendet.

#### 3.2.1 Yeast-Two-Hybrid *screen* und Eingrenzung der Bindungsdomäne in der Hefe

Die cDNA des N-terminalen Bereiches von SSTRIP (im Folgenden N-Term oder N-Segment genannt) wurde in den Vektor pGBKT7 kloniert und das resultierende Plasmid (pGBKT7-N-Term) in den Hefestamm AH109 transferiert. Dieses Plasmid wurde als *bait* eingesetzt, um eine im Hefestamm Y187 prätransformierte humane Gehirn-cDNA-Bank in dem Vektor PACT2, zu durchsuchen.

Insgesamt wurden zwanzig Millionen ( $2 \times 10^7$ ) Klone durchmustert, davon wuchsen dreiundzwanzig auf vierfach und dreifach-/35 mM 3-AT Selektionsplatten. Die *bait*-Plasmide wurden aus den dreiundzwanzig Klonen durch Cycloheximid-Selektion entfernt und die Plasmide der cDNA-Bibliothek nach der im Methodenteil beschriebenen Prozedur isoliert. Nach der Co-transformation der isolierten Klone mit dem *bait*-Plasmid in den Hefezellen wuchsen drei der dreiundzwanzig Klone auf vierfach Selektionsplatten wieder an. Zwei davon färbten sich im  $\beta$ -Galaktosidase-Test nur schwach blau. Die Sequenzierung der hieraus isolierten Plasmide und anschließende Datenbanksuche ergaben, dass sie für das Protein RanBP1 kodieren. Da die Färbung im  $\beta$ -Galaktosidase-Test nicht besonders stark war und RanBP in unserem Labor mehrmals als falsch-positiver Klon identifiziert wurde, wurden

diese Klone verworfen. Ein Klon war im  $\beta$ -Galaktosidase-Test sehr stark gefärbt, und die Sequenzierung zeigte, dass er ein Fragment von SSTRIP (Nukleotide 487-1487) umfaßte. Dieses Fragment war am 3'-Ende mit ca. 260 Nukleotiden der 3'-UTR und des PolyA-Schwanzes einer als Klon RP11-545p21 bezeichneten und in der Datenbank hinterlegten humanen cDNA-Sequenz fusioniert. Es handelte sich also um einen chimären Klon. Da der zweite Sequenzteil nicht innerhalb des kodierenden Bereiches von Klon RP11-54p21 lag, wurde ein neues Konstrukt des isolierten Klons ohne diesen Teil hergestellt und mit dem *bait*-Plasmid für eine Retransformation der Hefezellen eingesetzt. Eine spezifische Interaktion konnte zwar festgestellt werden, allerdings war diese etwas schwächer als bei dem ursprünglichen (chimären) Klon, was sich im langsamen Wachstum der Hefezellen auf den Selektionsplatten zeigte (Abb. 3.8).



**Abbildung 3.8 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen und Eingrenzung der Interaktionsbereiche in der Hefe.** Das N-terminale Segment von SSTRIP (Aminosäure 72-174) wurde als *bait* eingesetzt, um eine prätransformierte humane cDNA-Bibliothek zu durchsuchen. Der ursprünglich-identifizierte chimäre Klon setzte sich aus einer Teilsequenz von SSTRIP (Aminosäuren 157-489) und einem Teil der 3'-UTR sowie des PolyA-Schwanzes von Klon RP11-545p21 zusammen. Eine Interaktion dieses Klons mit dem N-Term-Segment bestand in der Hefe nach Deletion des RP11-545p21-Teils. Die Deletionskonstrukte von SSTRIP und ihre Fähigkeit zur Interaktion mit dem N-Term-*bait* sind dargestellt. +++, sehr starkes Wachstum bzw. sehr starke Färbung im  $\beta$ -Galaktosidase Test; --, kein Wachstum.

Es wurde jedoch keine Abnahme der Färbungsintensität im  $\beta$ -Galaktosidase Test festgestellt. Als Negativkontrollen wurden leere Vektoren mit jeweils einem der Konstrukte cotransformiert, d.h. pACT2 mit pGBKT7-N-Term sowie pGBKT7 mit dem Originalklon, wobei kein Wachstum auf den Selektionsplatten festgestellt werden konnte.

Um den Interaktionsbereich weiter einzuengen, wurden verschiedene Teilfragmente des Originalklons mit PCR amplifiziert und in den Vektor pACT2 kloniert. Diese Konstrukte wurden im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf ihre Fähigkeit getestet, mit dem N-Term-*bait* zu interagieren. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3.8 schematisch zusammengefasst. Keines der verkürzten Proteine führte zum Hefewachstum. Eine Interaktion in der Hefe ist somit nach der Verkürzung des Originalfragmentes nicht mehr möglich.

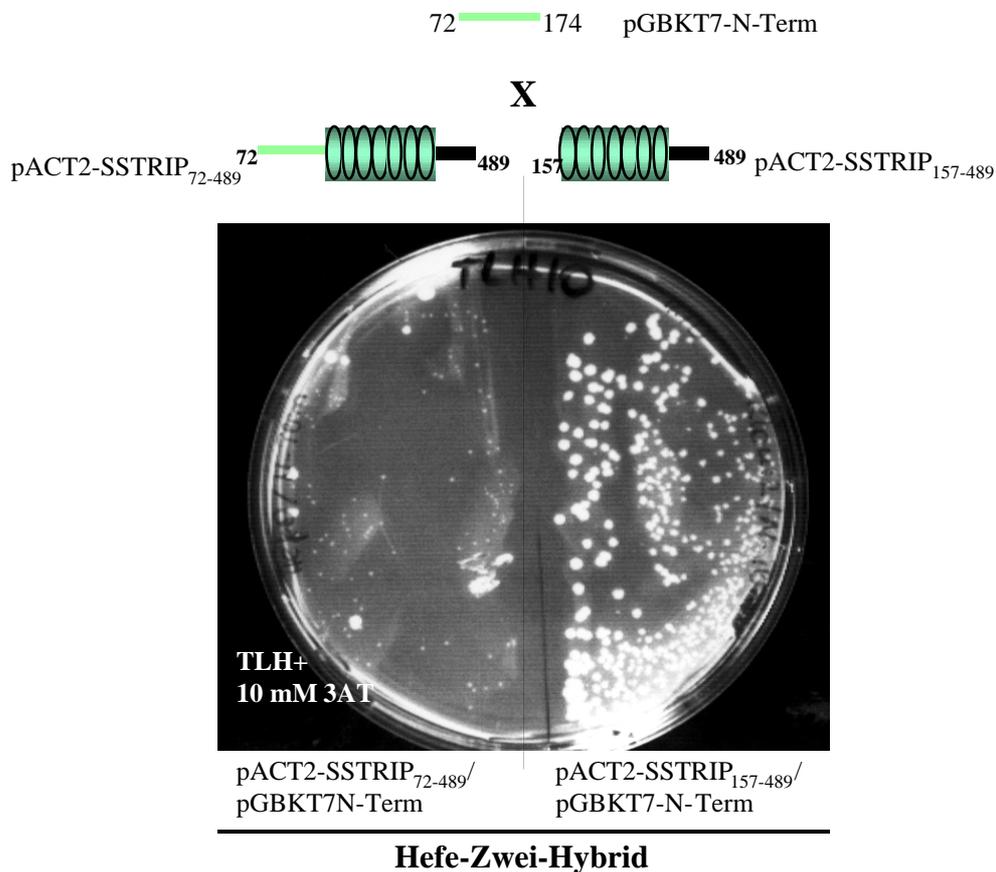
### 3.2.2 Das N-terminale Segment interagiert intramolekular mit der Ankyrin *repeats*-Region in der Hefe

Der im Hefe-Zwei-Hybrid-*screen* isolierte Bindungspartner des N-Segments setzte sich aus der Ankyrin *repeats*-Domäne und einem Bereich von ungefähr 90 Aminosäuren zusammen, der zwischen der Ankyrin *repeats*-Domäne und der SH3-Domäne lokalisiert ist. Dieser Interaktionsbereich wird im folgenden als Ankyrin *repeats*-Region bezeichnet, um ihn von der Ankyrin *repeats*-Domäne zu unterscheiden.

Da es sich hier um die Interaktion von zwei unterschiedlichen Bereichen des gleichen Proteins handelte, war zu überprüfen, ob es sich um eine intramolekulare Interaktion -innerhalb eines SSTRIP-Moleküls- oder eine intermolekulare Interaktion -zwischen zwei SSTRIP-Molekülen- handelt. Dazu wurde ein pACT2-Konstrukt hergestellt, welches die gesamten interagierenden Bereiche (N-Segment und Ankyrin *repeats*-Region) umfaßte: pACT-SSTRIP<sub>72-489</sub> (= *bait*, SSTRIP<sub>72-174</sub> + Originalklon, SSTRIP<sub>157-489</sub>). Dieser Klon wurde zusammen mit dem N-Term-*bait* für eine Cotransformation der Hefezellen verwendet. Als Positivkontrolle diente der Originalklon SSTRIP<sub>157-489</sub>. Als Negativkontrolle wurden leere Vektoren mit einem der Plasmide cotransformiert. Bei einer bevorzugt intramolekularen Bindung würde die Ankyrin *repeats*-Region des SSTRIP<sub>72-489</sub>-Moleküls durch die Assoziation mit seinem (internen) N-Segment blockiert sein und nicht mehr für eine intermolekulare Interaktion mit dem eingesetzten *bait* zur Verfügung stehen. Dies würde dazu führen, daß die Hefezellen auf Selektionsplatten nicht wachsen können.

Dies war auch hier der Fall. Bei einem Einsatz von pACT2-SSTRIP<sub>157-489</sub> mit dem N-terminalen *bait* N-Term-pGBKT7 wuchsen die Hefezellen nach der Retransformation

erwartungsgemäß auf dreifach Selektionsplatten mit 10 mM 3AT. Bei pACT2-SSTRIP<sub>72-489</sub> hingegen wuchsen nur noch sehr wenige Klone auf den Selektionsplatten. In den Negativkontrollen wurde kein Wachstum festgestellt. Dies deutete auf eine intramolekulare Assoziation der interagierende Domänen miteinander hin (Abbildung 3.9).

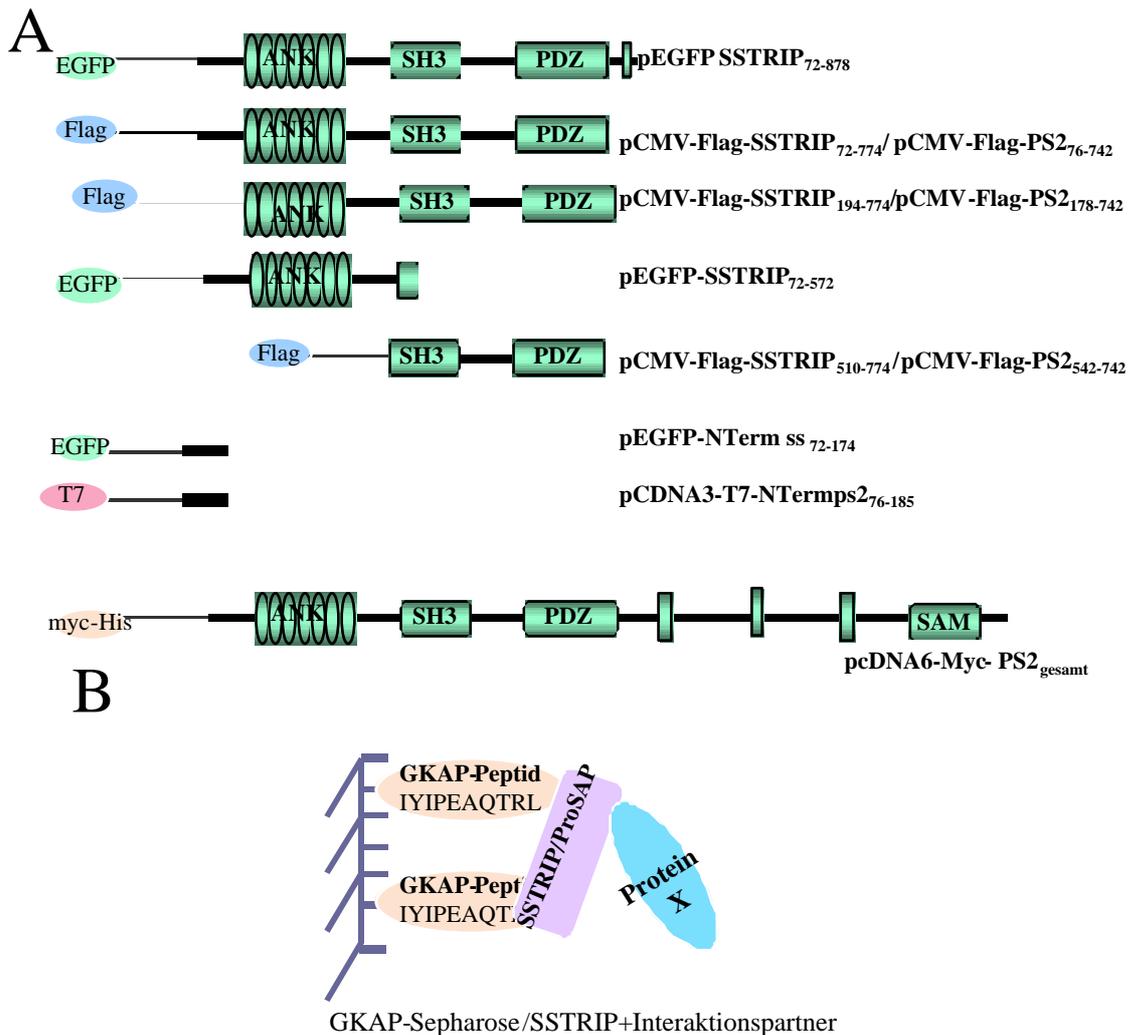


**Abbildung 3.9 Untersuchungen zum Bindungsmechanismus des N-Segments an die Ankyrin repeats- Region von SSTRIP.** Die Hefezellen wurden mit pGBKT7-N-Term als *bait*-Plasmid zusammen mit einem der folgenden Plasmiden transformiert: pACT-SSTRIP<sub>157-489</sub> dem Originalklon und pACT-SSTRIP<sub>72-489</sub> dem Konstrukt, das die cDNA der gesamten interagierenden Bereiche umfaßte. Bei pACT-SSTRIP<sub>72-489</sub>, dem Konstrukt mit dem N-Segment wuchsen im Vergleich zu pACT-SSTRIP<sub>157-489</sub> nur sehr wenige Zellen auf die Selektionsplatten.

### 3.2.3 Coaffinitätspräzipitationen (CoAP) aus HEK-Zellen

Die in dem Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierte Wechselwirkung wurde im Weiteren in einem Zellsystem höherer Eukaryonten untersucht. Dazu wurden Copräzipitationen mit rekombinanten Fusionsproteinen aus HEK-Zellextrakten durchgeführt. Zunächst wurden die cDNA der interagierenden Domänen in eukaryontische Expressionsvektoren kloniert und HEK-Zellen damit transfiziert. Es wurden Vektoren verwendet, die für Epitop-Tags kodieren, für die es kommerziell verfügbare Antikörper gibt. Eine Zusammenstellung der für diese Experimente verwendeten Konstrukte und ihrer jeweiligen Tags gibt Abbildung 3.10 A wieder. Es wurden Konstrukte hergestellt, die die PDZ-Domäne enthalten, diese bindet an den C-Terminus von GKAP/SAPAP. Diese Bindung wurde für die Copräzipitations-Experimente genutzt. Ein C-terminales GKAP-Peptid aus zehn Aminosäuren (IYIPEAQTRL) wurde synthetisiert (Fa. Genemed, USA) und an NHS-Sepharose gekoppelt. Die GKAP-Sepharose wurde für die Präzipitation der SSTRIP/ProSAP-Konstrukte mit PDZ-Domänen verwendet. Die GKAP-SSTRIP/ProSAP-Interaktion ist stark genug, um die bei dem Experiment herrschenden stringenten Bedingungen zu überstehen und gleichzeitig eine Copräzipitation der interagierenden Proteine zu ermöglichen (Coaffinitätspräzipitation; Abb. 3.10 B).

Für die nachfolgenden CoAP-Experimente wurden die HEK-Zellen nach der Transfektion im RIPA-Puffer (1 ml) lysiert und 20 min zentrifugiert. Für die Untersuchung des Calcium-Einflusses wurden die Zellen vor dem Ernten mit Ionomycin (14  $\mu\text{M}$ ) oder H89 (einem Kinaseinhibitor, 35  $\mu\text{M}$ ) für 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Der benutzte RIPA-Puffer enthielt im Fall einer Behandlung mit Ionomycin 4 mM Calcium und kein EDTA. Der Zell-Überstand wurde mit 50-60  $\mu\text{l}$  einer 50%igen GKAP-Sepharose Suspension 1,5-2 h bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Sepharose im Lämmli-Puffer 10 min aufgekocht, um die Proteinkomplexe abzulösen. Diese wurden in 8-15%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Blotmembranen übertragen und mit Antikörpern gegen die entsprechenden Tags detektiert. Ein Drittel des GKAP-Präzipitats wurde für den Nachweis von präzipitierten Erstproteinen verwendet. Der Rest wurde für die Detektion der copräzipitierten Proteine benutzt. Der Sekundärantikörper war an Peroxidase gekoppelt und die Entwicklung der Signale erfolgte mit dem ECL (*enhanced chemiluminescence*)-System.



**Abbildung 3.10 A) Zusammenstellung der für die CoAP-Versuche verwendete SSTRIP- und ProSAP2-Konstrukte.** Für die Coaffinitätspräzipitation wurden die gezeichnete cDNA-Abschnitte in den angegebenen Vektoren kloniert. Die Bezeichnungen der Plasmiden ist in der rechten Spalte angegeben. Die tiefgestellte Nummer bei den Namen geben die Positionen der ersten bzw der letzten Aminosäure an.

**B) Prinzip der Coaffinitätspräzipitation.** Ein synthetisches Peptid der C-terminalen zehn Aminosäuren (Sequenz IYIPEAQTRL) des GKAP-Proteins wurde an NHS-Sepharose gekoppelt und für die Präzipitation von PDZ-Domänen enthaltenden SSTRIP- und ProSAP-Fragmenten eingesetzt. GKAP bindet stark und spezifisch an die PDZ-Domäne der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine und ermöglicht dadurch die Copräzipitation von Proteinen, die an SSTRIP/Shank/ProSAP gebunden sind (CoAP).

### 3.2.4 Das N-Segment von SSTRIP bindet an die Ankyrin *repeats*-Region in HEK-Zellen

HEK-Zellen wurden mit Plasmiden cotransfiziert, die für das N-Segment (pEGFP-NTerm<sub>72-174</sub>) sowie für verschiedene SSTRIP-Fragmente kodieren: SSTRIP<sub>192-774</sub>, startet an der Ankyrin *repeats*-Domäne, SSTRIP<sub>310-774</sub> startet in der Mitte der Ankyrin *repeats*-Domäne und

SSTRIP<sub>551-774</sub> bei der SH3-Domäne. Die cDNA der SSTRIP-Proteine wurden im pCMV-Flag-Vektor kloniert, was die Synthese von *Flag-tag*-(MDYKDDDDK) Fusionsproteinen ermöglichte. Wie bereits erwähnt, enden alle diese Proteinfragmente bis auf das EGFP-N-Term an der PDZ-Domäne und wurden deshalb mit der GKAP-Sepharose präzipitiert.

Der untere Blot in Abbildung 3.11 wurde mit einem anti-Flag-Tag-Antikörper entwickelt, um die SSTRIP-Proteine zu detektieren. Diese ließen sich gut in den Zellextrakten (Ze) detektieren und wurden mit der GKAP-Sepharose gut präzipitiert (Prä, Blot 2, Spuren 1 bis 9).

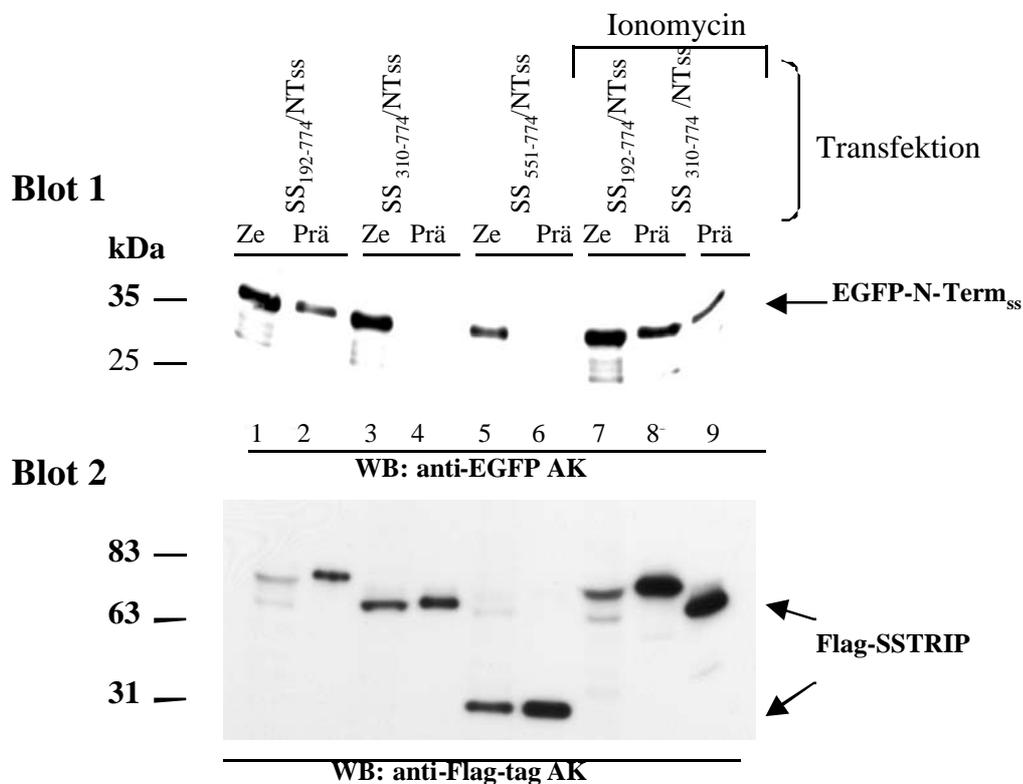
Der obere Blot wurde mit einem anti-EGFP-Antikörper gefärbt, um das N-Term Fusionsprotein nachzuweisen. EGFP-N-Term<sub>ss</sub> lief bei einer Größe von ungefähr 35 kDa und ließ sich sehr gut mit SSTRIP<sub>192-744</sub>, dem Konstrukt mit der Ankyrin *repeats*-Domäne, copräzipitieren (Spur 2). N-Term<sub>ss</sub> und SSTRIP<sub>192-744</sub> sind somit in HEK-Zellen miteinander assoziiert.

Mit SSTRIP<sub>310-774</sub>, dem Fusionsprotein, das in der Mitte der Ankyrin *repeats*-Domäne startet, ließ sich dagegen sehr wenig EGFP-N-Term präzipitieren. Dies bedeutet, daß der Anfang der Ankyrin *repeats*-Domäne für diese Interaktion wichtig ist (Spuren 3 und 4). Es ist hier anzumerken, daß mit SSTRIP-Fragmenten, die am N-terminalen Ende noch länger sind als SSTRIP<sub>310-774</sub>, überhaupt keine Interaktion mehr in der Hefe beobachtet wurde (Siehe dazu Abschnitt 3.2.1), was darauf hinweist, dass eine posttranslationale Modifikation womöglich die Interaktion reguliert.

Mit SSTRIP<sub>551-744</sub>, dem Konstrukt ohne Ankyrin *repeats*-Domäne konnte kein EGFP-N-Term Fusionsprotein präzipitiert werden, obwohl das SSTRIP selber gut im Präzipitat nachweisbar war (Blot2, Spur 2). Da sich SSTRIP<sub>192-774</sub> und SSTRIP<sub>551-774</sub> durch das Fehlen oder Vorhandensein der Ankyrin *repeats*-Region unterscheiden, bestätigen diese Ergebnisse, die Beobachtung, daß die Ankyrin *repeats* Region die gefundene Interaktion vermittelt, zudem unterstützten sie das Resultat des Hefe-Zwei-Hybrid-Experiments (Abschnitt 3.2.1).

Bei SSTRIP und ProSAP2 handelt es sich um Proteine der Postsynapse. Ihre Protein/Proteinwechselwirkungen könnten daher wie die einiger Proteine der Postsynapse durch Calcium reguliert werden. Die Depolarisierung der postsynaptischen Membran nach der Bindung eines Neurotransmitters bewirkt ein Einstrom von Ca<sup>2+</sup> in der Zelle. Das Calcium kann dann im nachhinein viele Prozesse steuern. Aus diesem Grund entstand die Vermutung, dass die identifizierte Interaktion eventuell durch Calcium reguliert werden kann. Daher wurde in einem parallel-verlaufenden Experiment, bei dem die Zellen mit den gleichen

Plasmiden transfiziert waren, das Ionomycin eingesetzt. Die HEK-Zellen wurden vor dem Ernten 3h mit 14  $\mu\text{M}$  Ionomycin behandelt. Das Ionomycin ist ein Zell-permeabel Carrier für divalente Kationen und ist sehr effektiv als mobiler Carrier für  $\text{Ca}^{2+}$ . Das Ionomycin bewirkt eine Zunahme der intrazellulären Calcium-Konzentration. Nach der Ionomycin-Behandlung wurde eine Zunahme der Menge an N-Term-Fusionsprotein sowohl in dem SSTRIP<sub>192-774</sub> als auch in dem SSTRIP<sub>310-774</sub>-Präzipitat festgestellt (Abb. 3.11, Vergleich Spuren 2 mit 8, sowie 4 mit 9). Dies weist auf eine mögliche Regulation der Interaktion durch Calcium hin. Dieser Effekt wurde in den darauf folgenden Experimente noch weiter untersucht und wird daher an den entsprechenden Stellen diskutiert.

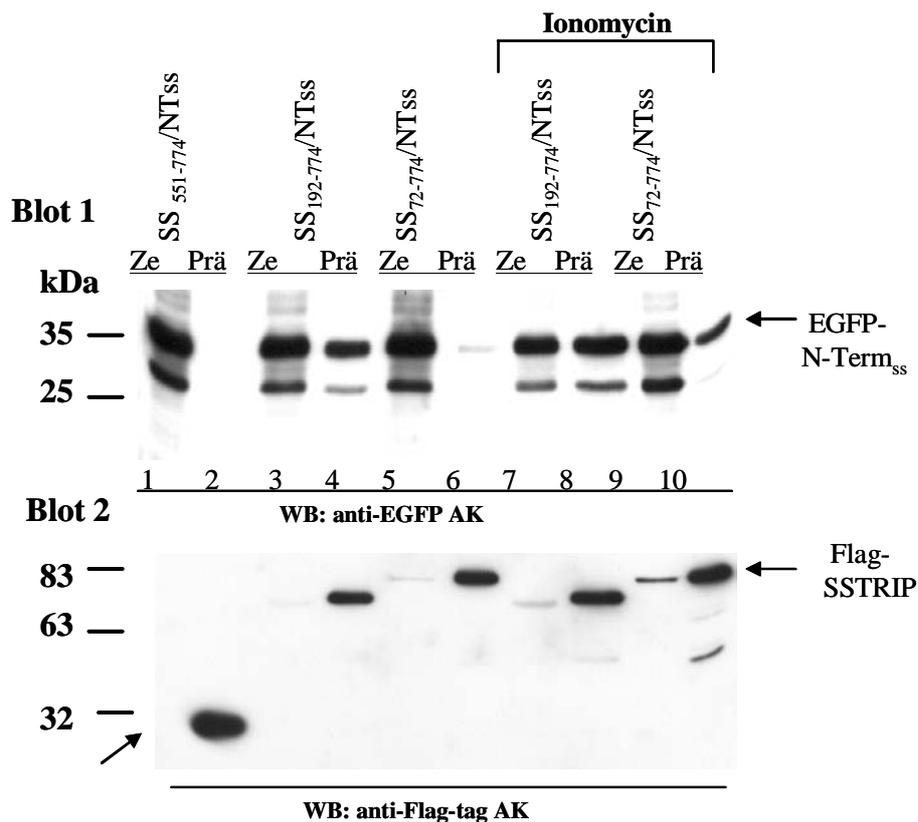


**Abbildung 3.11 Coaffinitätspräzipitation von EGFP-N-Term und Flag-SSTRIP aus HEK-Zellextrakten.** HEK-Zellen wurden mit pEGFP-NT<sub>ss</sub> und jeweils einem der folgenden Plasmiden mit der cDNA verschiedener SSTRIP-Bereiche transfiziert: pCMV-SSTRIP<sub>192-774</sub>, pCMV-SSTRIP<sub>310-774</sub>, und pCMV-SSTRIP<sub>551-774</sub>. Die SSTRIP-Proteine wurden mit GKAP-Sepharose präzipitiert und mit einem anti-Flag-Tag Antikörper detektiert (Blot 2). Im Blot 1 wurde das N-Term<sub>ss</sub>-Protein mit dem anti-EGFP-Antikörper nachgewiesen. Das N-Term<sub>ss</sub> Fusionsprotein wurde mit SSTRIP<sub>192-774</sub> gut (Spur 2), mit SSTRIP<sub>310-774</sub> nur schlecht (Spur 4) präzipitiert. Nach der Behandlung der Zellen mit Ionomycin, erhöht sich das N-Term<sub>ss</sub> Copräzipitat bei SSTRIP<sub>192-774</sub> und SSTRIP<sub>310-774</sub>. Ze, 30 $\mu\text{l}$  Zellextrakt von einem gesamten Volumen von ungefähr 1,2 ml; Prä, Präzipitat. Im Blot 1 wurden 2/3 des GKAP-Präzipitats und im Blot zwei, 1/3 aufgetragen.

### 3.2.5 Das N-Segment und die Ankyrin *repeats*-Region interagieren intramolekular in HEK-Zellen.

Um weiter aufzuklären, ob eine intramolekulare Interaktion gegenüber einer intermolekularen begünstigt wird, wurden HEK-Zellen mit Plasmiden cotransfiziert, die für das N-Term<sub>ss</sub>-Fusionsprotein (pEGFP-NT<sub>ss</sub>), sowie für SSTRIP-Fragmente kodieren, die das N-Segment (pCMV-SSTRIP<sub>72-774</sub>) bzw. kein N-Segment (pCMV-SSTRIP<sub>192-774</sub>) enthalten. Die Überlegung war hier die gleiche, wie im Fall des Hefe-Zwei-Hybrid-Experiments. Bei einer intramolekularen Assoziation, wäre die Ankyrin *repeats*-Region durch das N-Segment des SSTRIP<sub>72-774</sub>-Fusionsproteins blockiert und würde nicht mehr für eine intermolekulare Interaktion mit dem co-exprimierten N-Term<sub>ss</sub>-Fusionsprotein zur Verfügung stehen. Es ließ sich tatsächlich mit dem N-Segment enthaltenden SSTRIP-Konstrukt (SSTRIP<sub>72-774</sub>) viel weniger EGFP-N-Term präzipitieren (Abb. 3.12; Blot 1, Spur 6) als mit dem Konstrukt ohne N-Segment (Abb. 3.12; Blot 1, Spur 4). Mit dem SH3-Konstrukt wurde auch hier kein N-Term<sub>ss</sub> präzipitiert (Blot 1, Spur 2).

Die Menge an N-Term<sub>ss</sub>-Fusionsprotein im Präzipitat von SSTRIP<sub>72-774</sub> und SSTRIP<sub>192-774</sub> (Blot1, Spuren 8 und 10) war nach der Ionomycin-Behandlung erhöht, obwohl ohne und mit Ionomycin vergleichbare Mengen an SSTRIP<sub>72-774</sub> und SSTRIP<sub>192-774</sub> präzipitiert wurden (Vergleich Blot 2, Spuren 4, 6 mit 8,10). Das N-Segment auf SSTRIP<sub>72-774</sub> bindet ohne Ionomycin-Behandlung, bei einer niedrigen Calcium-Konzentration bevorzugt intramolekular an die Ankyrin *repeats*-Region und blockiert sie dadurch, so dass das mitexprimierte N-term-Fusionsprotein nur schwach oder gar nicht binden kann. Die Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt dazu, dass das EGFP-N-Term-Fusionsprotein besser an die Ankyrin *repeats* Region von SSTRIP<sub>72-774</sub> intermolekular binden kann. Dies ist nur möglich, wenn die Ankyrin *repeats*-Region nicht mehr intramolekular durch das N-Segment auf dem SSTRIP<sub>72-774</sub> Molekül maskiert ist. Die Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bewirkt also das Ablösen des N-Segments von der Ankyrin *repeats*-Region, so dass das EGFP-N-Term Fusionsprotein intermolekular interagieren kann. Dass das N-Term-Fusionsprotein sowohl an SSTRIP<sub>72-774</sub> als auch an SSTRIP<sub>192-774</sub> bei einer höheren Ca<sup>2+</sup>-Konzentration intermolekular besser binden kann, lässt sich dadurch erklären, dass der intramolekulare Bindungsmechanismus sich möglicherweise von dem Intermolekularen unterscheidet.

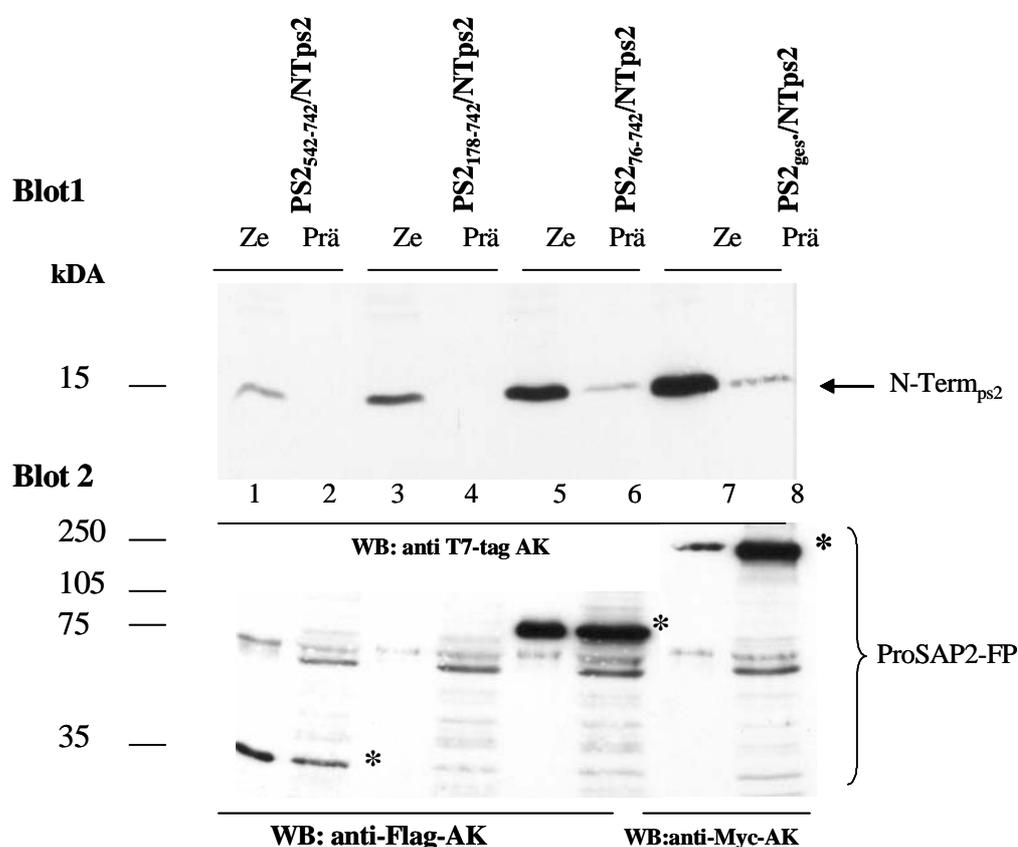


**Abbildung 3.12 Untersuchungen zum Bindungsmechanismus in HEK-Zellen** HEK-Zellen wurden mit pEGFP-NT<sub>ss</sub> und Plasmiden mit der cDNA verschiedener SSTRIP-Bereiche co-transfiziert: pCMV-SSTRIP<sub>72-774</sub>, pCMV-SSTRIP<sub>192-774</sub>, pCMV-SSTRIP<sub>551-774</sub>. Im Blot 2 wurden die SSTRIP-Proteine in den Zellextrakten und in ihren Präzipitaten mit einem anti-Flag-Tag Antikörper detektiert. Vergleichbare Mengen an SSTRIP<sub>72-774</sub>- und SSTRIP<sub>192-774</sub>-Protein wurden synthetisiert und auch präzipitiert. Blot 1 wurde mit dem anti-EGFP-Antikörper entwickelt. Die Menge an N-Term<sub>ss</sub>-Fusionsprotein war im Präzipitat von pCMV-SSTRIP<sub>72-774</sub> im Vergleich zu pCMV-Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub> stark herabgesetzt. Beide Fusionsproteine unterscheiden sich durch das Fehlen (Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub>) oder Vorhandensein (Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub>) des N-Segments. Mit dem Konstrukt der SH3-Domäne pCMV-SSTRIP<sub>551-774</sub> ließ sich kein N-Term<sub>ss</sub> präzipitieren. Nach der Behandlung der Zellen mit Ionomycin erhöht sich die Menge an N-Term<sub>ss</sub>-Protein im Präzipitat der SSTRIP<sub>72-774</sub> und SSTRIP<sub>192-774</sub> Fusionsproteine. Ze, 30µl Zellextrakt von einem gesamten Volumen von ungefähr 1,2 ml; Prä, Präzipitat.

### 3.2.6 Das N-terminale Segment von ProSAP2 interagiert mit seiner Ankyrin *repeats*-Region in HEK-Zellen.

Da ProSAP2 genauso wie SSTRIP eine Ankyrin *repeats*-Domäne besitzt, wurde untersucht, ob das N-Segment von ProSAP2 ebenfalls an seiner eigenen Ankyrin *repeats*-Region bindet. Dazu wurden die in Abbildung 3.10 bereits gezeigten Plasmide konstruiert und für die

Transfektion von HEK-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit pCDNA3-T7-N-Term<sub>ps2</sub> (Aminosäure 76-185) und jeweils einem der folgenden Plasmide cotransfiziert: pCMV-Flag-PS2<sub>76-742</sub>, pCMV-Flag-PS2<sub>178-742</sub>, pCMV-Flag-PS2<sub>542-742</sub>, und pCDN6-Myc-ProSAP2, das für die volle Länge von ProSAP2 kodiert. Hierbei unterscheidet sich PS2<sub>178-742</sub> durch das Fehlen des N-terminalen Segments von PS2<sub>76-742</sub>. PS2<sub>542-742</sub> startet an der SH3-Domäne und enthält daher keine Ankyrin *repeats*-Domäne. Die ProSAP2-Proteinfragmente wurden mit der GKAP-Sepharose präzipitiert und mit Antikörpern gegen die jeweiligen Tags detektiert. PS2<sub>178-742</sub>, das Konstrukt ohne N-Segment, konnte in HEK-Zellen nicht exprimiert werden (Abb. 3.13; Blot2, Spur 3). Mit Flag-PS2<sub>76-742</sub> und Myc-ProSAP2 konnten geringere Mengen des T7-N-Term<sub>ps2</sub>-Fusionsproteins präzipitiert werden (Blot 1, Spuren 6 und 8), wohingegen kein N-Term<sub>ps2</sub> im Präzipitat des SH3-Konstrukts nachweisbar war (Blot1, Spur2).



**Abbildung 3.13 Coaffinitätspräzipitation des N-Segments und der Ankyrin *repeats*-Region von ProSAP2 in HEK-Zellen.** HEK-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Die Präzipitation wurde mit GKAP-Sepharose durchgeführt. Blot 1 wurde mit einem anti-T7-Antikörper entwickelt, um das N-Term<sub>ps2</sub>-Fusionsprotein zu detektieren. Blot 2 wurde mit einem anti-Flag-Tag oder anti-Myc-Antikörper entwickelt. Das Flag-PS2<sub>178-742</sub>-Fusionsprotein wurde nicht exprimiert. Mit Flag-PS2<sub>76-742</sub> und Myc-ProSAP2-gesamt ließ sich das N-Term<sub>ps2</sub> copräzipitieren, wohingegen keine Präzipitation mit dem Konstrukt der SH3-Domäne möglich war. Ze, 30  $\mu$ l Zellextrakt; Prä, GKAP-Präzipitat.

Die Menge an präzipitierten N-Term<sub>PS2</sub> war im Fall von Flag-PS2<sub>76-742</sub> und Myc-ProSAP2 in etwa gleich. Dies ist ein Hinweis darauf, dass keine Regulation der Interaktion innerhalb der Proteinsequenz C-terminal zu der Ankyrin *repeats*-Region stattfindet.

Jedoch ist hier anzumerken, dass, obwohl es sich um eine intramolekulare Interaktion handelt, ein gewisser Anteil an nicht blockierter Ankyrin *repeats*-Region *in vivo* oder zumindest unter den Versuchsbedingungen vorhanden ist, der mit dem coexprimierten N-Term<sub>PS2</sub>-Fusionsprotein interagiert.

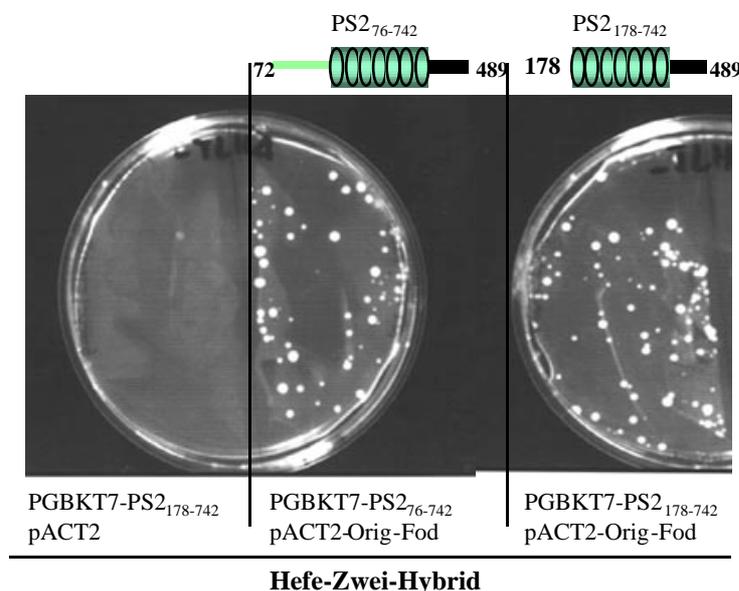
### **3.2.7 Untersuchung des Einflusses der intramolekularen Interaktion auf die Bindung von $\alpha$ -Fodrin und Sharpin an die Ankyrin *repeats* -Domäne von SSTRIP**

Da es nun sicher war, dass es sich um eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem N-Segment und der Ankyrin *repeats*-Region handelt, wurde untersucht, ob sie einen Einfluß auf die Bindung von  $\alpha$ -Fodrin und Sharpin an die Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP und ProSAP2 ausübt. Sharpin ist ein kürzlich identifizierter Interaktionspartner der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP und ProSAP2. Eine Hypothese war, dass bei SSTRIP und ProSAP2 die Ankyrin *repeats* Region in Abwesenheit eines Aktionspotentials durch das benachbarte N-Segment maskiert ist. Eine Aktivierung führt zur Depolarisierung der Zellen und darauffolgend zum Calcium-Einstrom. Die erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration bewirkt das Ablösen des N-Segments von der Ankyrin *repeats*-Region. Dies ermöglicht es, Proteine wie Sharpin und/oder  $\alpha$ -Fodrin an SSTRIP/ProSAP2 zu binden. Da es sich bei Sharpin vermutlich um ein Proteinkinase-C (PKC)-bindendes Protein handelt, würde ihre Bindung an SSTRIP die Aktivierung von PKC und nachfolgend die Phosphorylierung von Zielproteinen bewirken.

#### *3.2.7.1 Die intermolekulare Assoziation des N-Segments mit der Ankyrin repeats Region hat keinen Einfluß auf die Bindung von $\alpha$ -Fodrin an die Ankyrin repeats-Domäne von ProSAP2*

Um die Fragestellung bezüglich der Beeinflussung der Bindung von  $\alpha$ -Fodrin an die Ankyrin *repeats*-Domäne von ProSAP2 durch die intramolekulare Wechselwirkung aufzuklären, wurden Versuche in der Hefe durchgeführt.

Der von Dr. T. Böckers im Hefe-Zwei-Hybrid-*screen* isolierte  $\alpha$ -Fodrin-Klon (PACT2-Orig-Fod.) wurde mit jeweils einem der folgenden ProSAP2-Plasmiden für eine Cotransformation von Hefezellen eingesetzt: pGBKT7-PS2<sub>76-491</sub> und pGBKT7-PS2<sub>178-491</sub>. Als Negativkontrolle wurden die Hefezellen mit dem PACT2-Vektor und pGBKT7-PS2<sub>178-491</sub> transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf vierfachen- und zweifachen-Selektionsplatten ausgestrichen. Bei allen Ansätzen nahmen die meistens Zellen beide Plasmide auf, was am Wachstum auf den zweifachen Selektionsplatten erkennbar war. Eine Interaktion wurde jedoch nur bei den Transformationansätzen mit den ProSAP2-cDNAs, nicht aber in der Kontrolle festgestellt, da nur die Ansätze mit ProSAP2-cDNAs auf vierfachen Selektionsplatten wuchsen. Kein Unterschied bezüglich des Wachstumsverhaltens wurde bei den Transformationsansätzen mit den Plasmiden pGBKT7-PS2<sub>76-491</sub> und pGBKT7-PS2<sub>178-491</sub> festgestellt. Beide Fusionsproteine bewirkten gleich gut das Wachstum der Hefezellen. Beide Fusionsproteine unterscheiden sich durch das Fehlen (PS2<sub>178-491</sub>) oder Vorhandensein (PS2<sub>76-491</sub>) des N-Segments. Eine Hemmung der  $\alpha$ -Fodrin Interaktion durch die intramolekulare Wechselwirkung hätte dazu geführt, dass die Zellen bei dem Transformationsansatz mit PS2<sub>76-491</sub> weniger gut oder nicht wachsen könnten, was jedoch nicht der Fall war (Abb. 3.14).



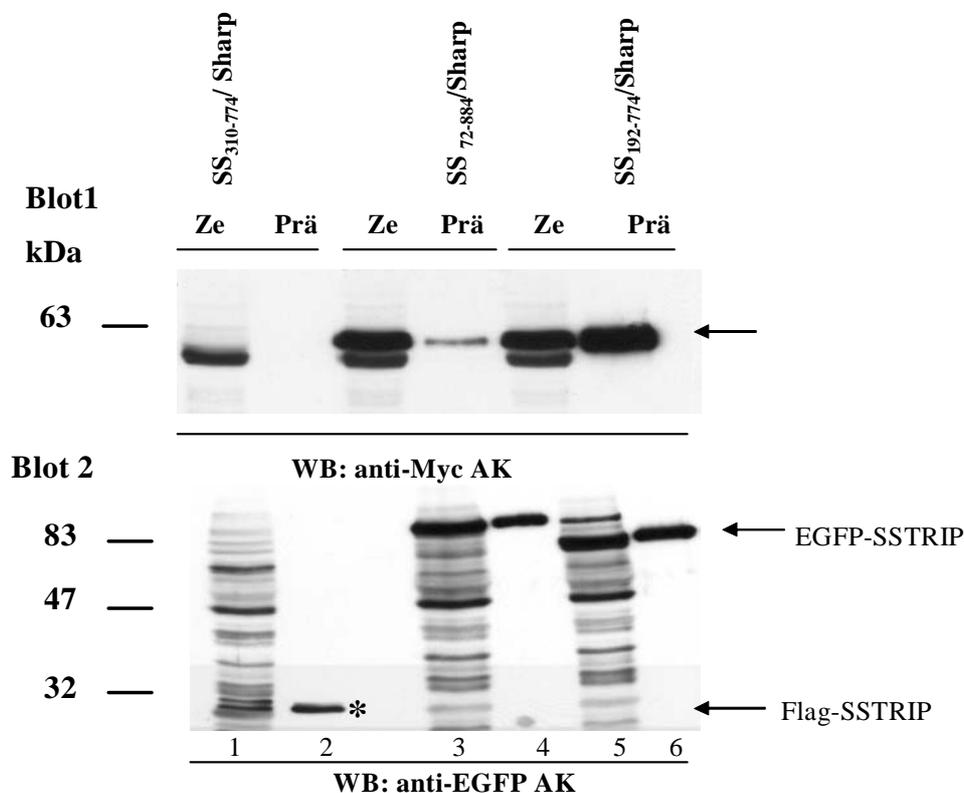
**Abbildung 3.14 Untersuchungen zum Einfluß der intramolekularen Interaktion auf die Bindung von  $\alpha$ -Fodrin an ProSAP2.** Die Transformation der Hefezellen erfolgte mit dem Originalklon von  $\alpha$ -Fodrin und jeweils einem der folgenden ProSAP2-Plasmide: pGBKT7-PS2<sub>76-491</sub>, pGBKT7-PS2<sub>178-491</sub>, die sich durch das N-Segment voneinander unterscheiden. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem pACT2-Vektor und pGBKT7-PS2<sub>178-491</sub> cotransformiert.

### 3.2.7.2 Die Bindung von Sharpin an SSTRIP wird durch die intramolekulare Interaktion des N-Segments mit der Ankyrin repeats -Region negativ reguliert

Die Untersuchung des Einflusses der intramolekularen Wechselwirkung auf die Sharpin-Bindung an SSTRIP fand in HEK-Zellen statt. Dazu wurden HEK-Zellen mit einem Sharpin-Klon in dem Vektor GW1 (freundliche Gabe von Dr. E. Kim) und Plasmiden mit der cDNA unterschiedlicher SSTRIP-Bereiche cotransfiziert: pEGFP-SSTRIP<sub>72-878</sub>, das das N-terminale Segment enthält und am Anfang der prolinreichen Region endet, pEGFP-SSTRIP<sub>192-774</sub>, der an der Ankyrin repeats-Domäne anfängt und an der PDZ-Domäne endet, und als Negativkontrolle SSTRIP<sub>551-774</sub>, das Konstrukt ohne Ankyrin repeats-Domäne. Sharpin wurde in Fusion mit dem cMyc-Tag und die SSTRIP-Proteine mit dem EGFP-Tag bzw. Flag-Tags synthetisiert und folglich mit anti-cMyc-, bzw anti-EGFP und anti-Flag Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3.15).

Das Myc-Sharpin-Fusionsprotein erschien als Doppelbande im Bereich von 62 kDA. Von diesen Banden wurde nur die obere hier copräzipitiert. Vergleichbare Mengen an EGFP-SSTRIP<sub>192-774</sub> und EGFP-SSTRIP<sub>72-878</sub> wurden synthetisiert und präzipitiert (Abb. 3.15; Blot 1). Mit SSTRIP<sub>551-774</sub>, dem Konstrukt der SH3-Domäne ließ sich Sharpin nicht präzipitieren (Blot 1, spur2). Dies unterstützt die von Kim *et al.* (2001) publizierten Ergebnisse, nach welchen die Ankyrin repeats-Domäne von Shank1/SSTRIP die Interaktion mit Sharpin vermittelt. Es ist jedoch anzumerken, dass die obere Sharpin-Bande in diesem Fall nicht nachweisbar exprimiert wurde. Sharpin ließ sich dagegen mit SSTRIP<sub>192-774</sub> und EGFP-SSTRIP<sub>72-878</sub> präzipitieren (Blot 1, Spuren 4 und 6). Allerdings wurde mit EGFP-SSTRIP<sub>72-878</sub>, dem Fragment mit dem N-Segment im Vergleich zu EGFP-SSTRIP<sub>192-774</sub> deutlich weniger Sharpin präzipitiert, obwohl in beiden Fällen vergleichbare Mengen an SSTRIP-Protein synthetisiert wurden. Die vorherigen Experimente haben gezeigt, dass das N-Segment bevorzugt intramolekular mit der Ankyrin repeats-Region interagiert. Die Resultate dieses Versuches verdeutlichen, dass die intramolekulare Assoziation des N-Segments des SSTRIP<sub>72-878</sub>-Moleküls mit seiner Ankyrin repeats-Region die Bindung von Sharpin an die Ankyrin repeats-Domäne behindert. SSTRIP<sub>72-878</sub> und SSTRIP<sub>192-774</sub> unterscheiden sich nicht nur durch das Fehlen oder Vorhandensein des N-Segments, sondern auch dadurch, dass SSTRIP<sub>72-878</sub> zusätzlich einen Teil der prolinreichen Region enthält. Daher wurde das gleiche Experiment mit SSTRIP-Fragmenten wiederholt, die sich nur um das N-Segment unterscheiden. Die Ergebnisse waren die gleichen wie hier beschrieben (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.7.3.). Auf Grund dieser Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die

intramolekulare Wechselwirkung des N-Segments von SSTRIP mit seiner Ankyrin *repeats* Region die Bindung von Sharpin an die Ankyrin *repeats*-Domäne reguliert. Wenn dem so ist, stellt sich die Frage, durch welchen Mechanismus und zu welchem Zeitpunkt das N-Segment von der Ankyrin *repeats*-Region abgelöst wird, damit Sharpin binden kann.



**Abbildung 3.15 Untersuchungen zum Einfluß der intramolekularen Bindung auf die Interaktion von Sharpin mit der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP.** Die Cotransfektion von HEK-Zellen erfolgte mit GW1-Myc-Sharpin und jeweils einem der folgenden SSTRIP-Plasmide: pEGFP-SSTRIP<sub>72-878</sub>, pEGFP-SSTRIP<sub>192-774</sub>, pEGFP-SSTRIP<sub>551-774</sub>. Die SSTRIP-Proteine konnten gut in den Zellextrakten und in den GKAP-Präzipitaten mit dem anti-EGFP-Antikörper detektiert werden (unterer Blot). Vergleichbare Mengen an EGFP-SSTRIP<sub>72-878</sub> und EGFP-SSTRIP<sub>192-774</sub> wurden synthetisiert und auch präzipitiert (Blot 2). In den Präzipitaten der SSTRIP-Fusionsproteine, die eine Ankyrin *repeats*-Domäne besitzen (SSTRIP<sub>72-878</sub>, SSTRIP<sub>192-774</sub>) konnte das Sharpin nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde mit EGFP-SSTRIP<sub>551-774</sub> kein Sharpin präzipitiert. Ze, 30  $\mu$ l Aliquot des Zellextrakt; Prä, Präzipitat; AK, Antikörper

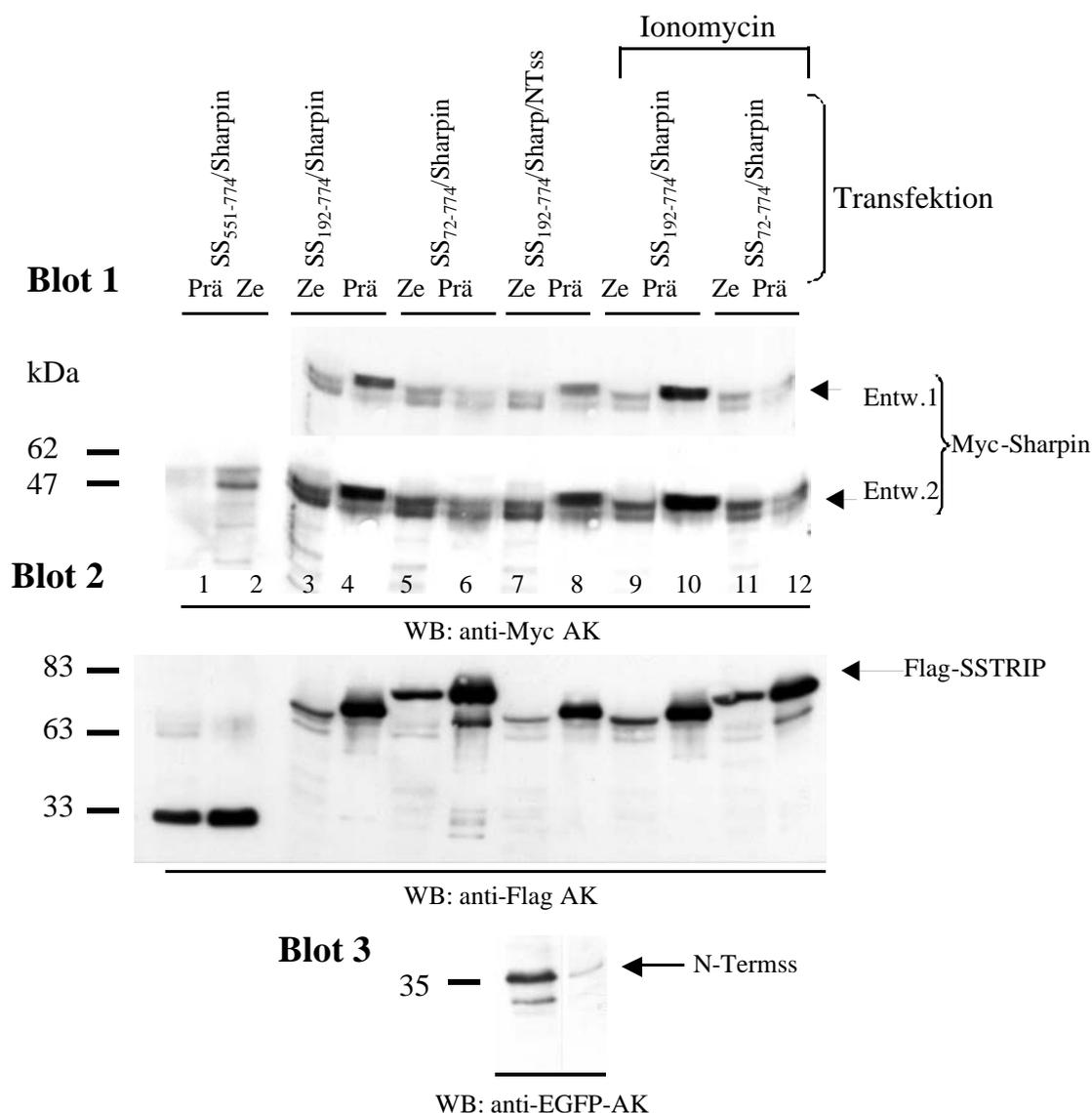
### 3.2.7.3 Die Wechselwirkung des N-Segments mit der Ankyrin *repeats* Region hemmt die Bindung von Sharpin an SSTRIP nur in einer intra- nicht aber intermolekularen Art.

Es wurde als nächstes untersucht, ob eine intermolekulare Assoziation des N-Segments mit der Ankyrin *repeats*-Region ebenfalls in der Lage ist, die Sharpin Bindung an SSTRIP zu hemmen. Dazu wurden HEK-Zellen mit GW1-Sharpin und jeweils einem der

unterschiedlichen SSTRIP-Plasmide cotransfiziert: pCMV-Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub>, pCMV-Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub>, pCMV-Flag-SSTRIP<sub>551-774</sub> sowie mit pCMV-Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub> + pEGFP-N-Term. Die letzte Cotransfektion war also eine Tripletransfektion von Sharpin mit einem SSTRIP-Fragment ohne N-Segment und ein N-Segment das nicht Teil des SSTRIP<sub>192-774</sub>-Moleküls war. Durch Vergleich der Intensität der Sharpin-Banden in den Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub> und in Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub> + pEGFP-N-Term-Präzipitaten sollte geklärt werden, ob das N-Segment die Sharpin-SSTRIP Interaktion nur hemmt, wenn es ein Teil des SSTRIP-Moleküls ist oder ebenso in einer intermolekularen Wechselwirkung die Sharpin Bindung inhibieren kann.

Die SSTRIP-Proteine wurden wiederum mit GKAP-Sepharose präzipitiert und mit anti-Flag-Tag Antikörper nachgewiesen. In Präzipitat wurde Sharpin mit anti-Myc-Antikörper detektiert. Zwei unterschiedliche Entwicklungszeiten sind für Blot 1 gezeigt, um den Unterschied in der Stärke der Banden deutlich darzustellen. Die Detektion des EGFP-N-Term-Fusionsproteins erfolgte mit einem anti-EGFP-Antikörper.

Wie im vorherigen Experiment ließ sich mit Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub>, dem Fusionsprotein ohne N-Segment, deutlich mehr Sharpin präzipitieren als mit Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub>, dem Fragment mit dem N-terminalen Segment (Abb. 3.16, Vergleich Spur 4 mit Spur 6, Blot 1). Bei der Tripletransfektion von GW1-Sharpin mit pCMV-Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub> + pEGFP-N-Term wurden alle drei Fusionsproteine synthetisiert (Abb. 3.16, Spur 7, Blot 1,2,3). In diesem Fall ließ sich weniger Myc-Sharpin präzipitieren wie bei der Doppeltransfektion von Sharpin mit SSTRIP<sub>192-774</sub> (Vergleich Spur 8 mit Spur 4), aber deutlich mehr als bei der Doppeltransfektion von Sharpin mit SSTRIP<sub>72-774</sub> (Vergleich Spur 6 mit 8). Die intermolekulare Bindung des Fusionsproteins des N-Segments hemmte demnach die Bindung von Sharpin an die Ankyrin *repeats*-Domäne weniger stark, wie das N-Segment im SSTRIP<sub>72-774</sub>-Moleküle (Spur 5 und 7). Die Abnahme der Intensität der Sharpin-Bande im Präzipitat der Tripletransfektion läßt sich dadurch erklären, dass das vorhandene Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub> sich in diesem Fall zwischen dem coexprimierten EGFP-N-Term und Myc-Sharpin verteilen mußte. Das N-Term-Fusionsprotien ließ sich auch mit Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub> in Gegenwart von Sharpin copräzipitieren (Blot 3, Spuren 7 und 8), allerdings wurde nur etwa ein Zwanzigstel der Probe für diesen Nachweis verwendet, um den Unterschied der Sharpin-Banden im Präzipitat der Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub> und Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub>, SSTRIP<sub>192-774</sub> + EGFP-N-Term-Proben nicht zu beeinflussen.



**Abbildung 3.16 Untersuchungen zum Mechanismus der Regulation der Bindung von Sharpin an die Ankyrin repeats-Domäne von SSTRIP.** Coimmunpräzipitationen von Sharpin mit unterschiedlichen SSTRIP-Fusionsproteine wurden in HEK-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit Sharpin und cDNA für Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub>, Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub>, Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub> + EGFP-N-Term transfiziert und die SSTRIP-Proteine mit GKAP-Sepharose präzipitiert. Bei der Tripletransfektion von Sharpin mit SSTRIP<sub>192-774</sub> und EGFP-N-Term wurde mehr Sharpin im Copräzipitat nachgewiesen, wie bei der Doppeltransfektion mit Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub> dem SSTRIP-Fragment, das das N-Segment enthält. Nach der Behandlung mit Ionomycin erhöhte sich das Präzipitat von Sharpin mit Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub>, wohingegen keinen Unterschied mit Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub> beobachtet wurde. ZE, 30 µl Aliquot des Zellextrakts von einem Gesamtvolumen von 1,2 ml; Prä, Präzipitat mit GKAP-Sepharose.

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt interpretieren: das coexprimierte EGFP-N-Term konkurriert zwar mit Sharpin um die Bindung an die Ankyrin repeats-Region von SSTRIP und läßt sich auch copräzipitieren. Es vermag aber nicht die Bindung von Sharpin an SSTRIP zu hemmen wie das N-Segment im SSTRIP<sub>72-774</sub>-Molekül (Blot 1, Spuren 5 und 6).

Vermutlich wirken auf das SSTRIP<sub>72-774</sub>-Molekül Wechselwirkungen anderer Natur, die die Interaktion der benachbarten Ankyrin *repeats*-Domäne zusätzlich regulieren. Dies bedeutet, dass die Hemmung der Bindung von Sharpin an SSTRIP nicht durch eine intramolekulare Assoziation zweier SSTRIP-Moleküle hervorgerufen wird. Vielmehr ist die negative Regulation nur wirksam, wenn das N-Segment ein Teil des SSTRIP-Moleküls ist. Diese Beobachtungen bestätigen die Untersuchung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems und die Coimmunpräzipitation aus 3.2.5

Nach der Behandlung mit Ionomycin ließ sich mit SSTRIP<sub>192-774</sub> mehr Sharpin präzipitieren als ohne Behandlung. Die Expression von Sharpin war sehr gering, so dass die Sharpin-Bande im Präzipitat von SSTRIP<sub>72-774</sub> kaum detektierbar war. Ein Vergleich der Sharpin-Banden im Präzipitat von SSTRIP<sub>72-774</sub> mit oder ohne Ionomycin-Behandlung ist aus diesem Grund nicht möglich. Da die Bindung von Sharpin an SSTRIP<sub>192-774</sub> nach der Ionomycin-Behandlung insgesamt besser wurde, kann angenommen werden, dass die intermolekularen Interaktionen der Ankyrin *repeats*-Region nach Erhöhung der Calcium-Konzentration insgesamt stärker werden.

### **3.2.8 Die verstärkte Bindung des N-Segments und Sharpin an SSTRIP nach Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration könnte auf eine Phosphorylierung zurückzuführen sein.**

Da weder Sharpin noch SSTRIP über eine EF-Hand oder andere Ca<sup>2+</sup>-bindende Motive verfügen, gab es die Überlegung, dass ihre beobachtete Calcium-abhängige Interaktion auf eine Phosphorylierung zurückzuführen sein könnte. Daher wurde überprüft, ob die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration nach dem Einsatz von Ionomycin zur Aktivierung von Proteinkinasen und folglich zur Phosphorylierung dieser Proteinen führt, die dann die Calcium-Effekte vermitteln. Die Coaffinitätspräzipitation wurden wie in den vorherigen Experimenten durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die Zellen vor dem Ernten für 3h mit einem Kinaseinhibitor (H89) behandelt wurden.

#### *3.2.8.1 Die intermolekulare Interaktion des N-Segments mit der Ankyrin repeats-Domäne wird durch einen Kinaseinhibitor stark gehemmt.*

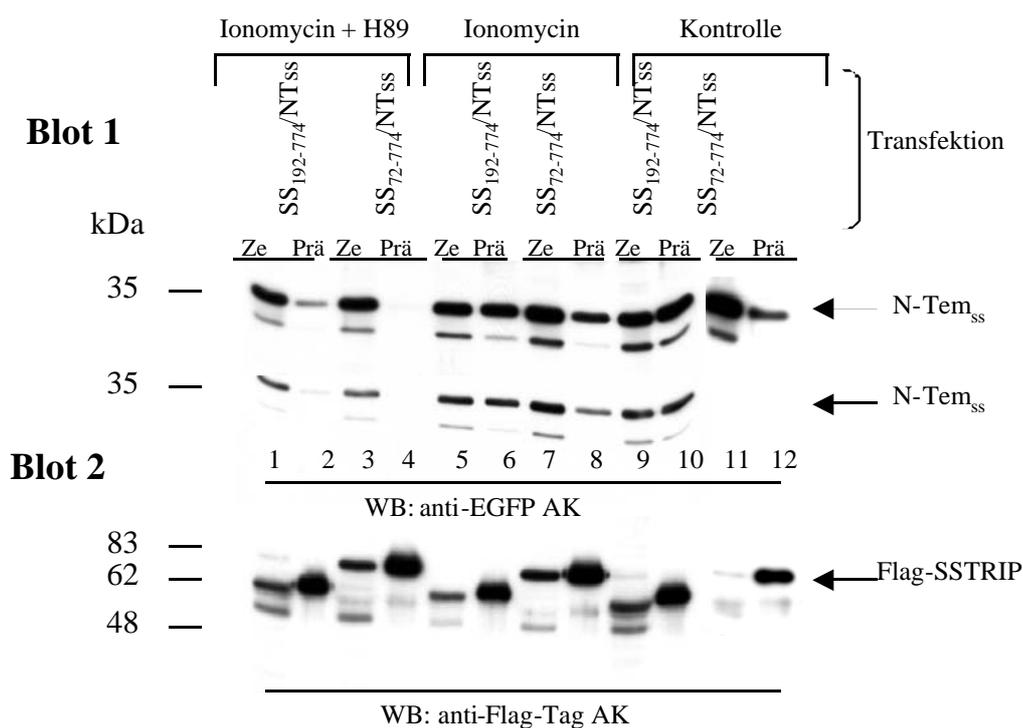
Die Transfektion der Zellen erfolgte mit pEGFP-N-Term und jeweils einem der folgenden SSTRIP-Plasmide in dreifachen Versuchsansätzen: pCMV-Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub>, pCMV-Flag-

SSTRIP<sub>192-774</sub>. Die Zellen wurden vor dem Ernten unterschiedlich behandelt: eine Kontroll-Transfektionsreihe erhielt keine Behandlung, eine zweite Transfektionsreihe wurde mit Ionomycin, und eine dritte Reihe mit Ionomycin und H89 behandelt.

Die dazugehörigen Blots sind in Abbildung 3.17 gezeigt. Mit SSTRIP<sub>72-774</sub>, Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub> ließ sich das N-Term-Fusionsprotein präzipitieren (Abb. 3.17, Blot1, Spuren 10 und 12). Allerdings ist in diesem Versuch mehr N-Term Fusionsprotein mit SSTRIP<sub>72-774</sub>, präzipitiert worden (Spur 12) als in den vorherigen Experimente. Dies könnte sich dadurch erklären lassen, dass das N-Segment auf dem SSTRIP<sub>72-774</sub>-Molekül sich unter bestimmten, bisher nicht genau definierten Bedingungen von der Ankyrin *repeats*-Region ablösen kann, so dass das coexprimierte N-Term- Fusionsprotein intermolekular binden kann. Jedenfalls war auch hier wie bei den anderen Versuchen die Menge an copräzipitierten N-Term-Fusionsprotein mit Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub>, geringer als mit Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub>. Nach der Ionomycin-Behandlung nahm sie in den gleichen Proben zu. Dies war in Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen.

Bei den Zellen, die gleichzeitig mit Ionomycin und H89 behandelt wurden, nahm die Menge an copräzipitierten N-Term-Fusionsprotein dagegen drastisch ab (Blot1, Spuren 2 und 4). Im Fall von SSTRIP<sub>72-774</sub> ließ es sich nicht mehr detektieren (Spur 4). Die Hemmung der Phosphorylierung führte also zu einer starken Inhibition der intermolekularen Interaktion zwischen dem N-Segment und der Ankyrin *repeats*-Region von SSTRIP. Dies könnte zwei Gründe haben: erstens eine Phosphorylierung ist für die intermolekulare Bindung wichtig, dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass die intermolekulare Bindung des N-Segments unter diesen Bedingungen nur zum Teil blockiert war (Siehe dazu Spur 2). Zweitens, die Ankyrin *repeats*-Region ist unter diesen Umständen vollständig intramolekular durch das benachbarte N-Segment auf dem SSTRIP<sub>72-774</sub>-Molekül blockiert und kann deshalb nicht intermolekular mit dem EGFP-N-Term Fusionsprotein interagieren. Diese Möglichkeit erscheint wahrscheinlicher als die erste und läßt sich besser mit der beobachteten Verbesserung der Bindungseigenschaft nach der Ionomycin-Behandlung vereinbaren. Es ist unter dieser Annahme allerdings nicht ganz klar, warum die intermolekulare Bindung an das SSTRIP<sub>192-774</sub> auch so stark gehemmt wird.

Das gleiche Experiment wurde durchgeführt, bei dem die Zellen nun nicht mehr gleichzeitig mit Ionomycin und H89, sondern nur noch mit H89 allein behandelt waren. Das Ergebnis war das gleiche wie bei diesem Experiment. Diese Befunde geben Anlaß zu der Annahme, dass die Phosphorylierung der transfizierten Proteine höchst wahrscheinlich ihre Interaktionen reguliert.

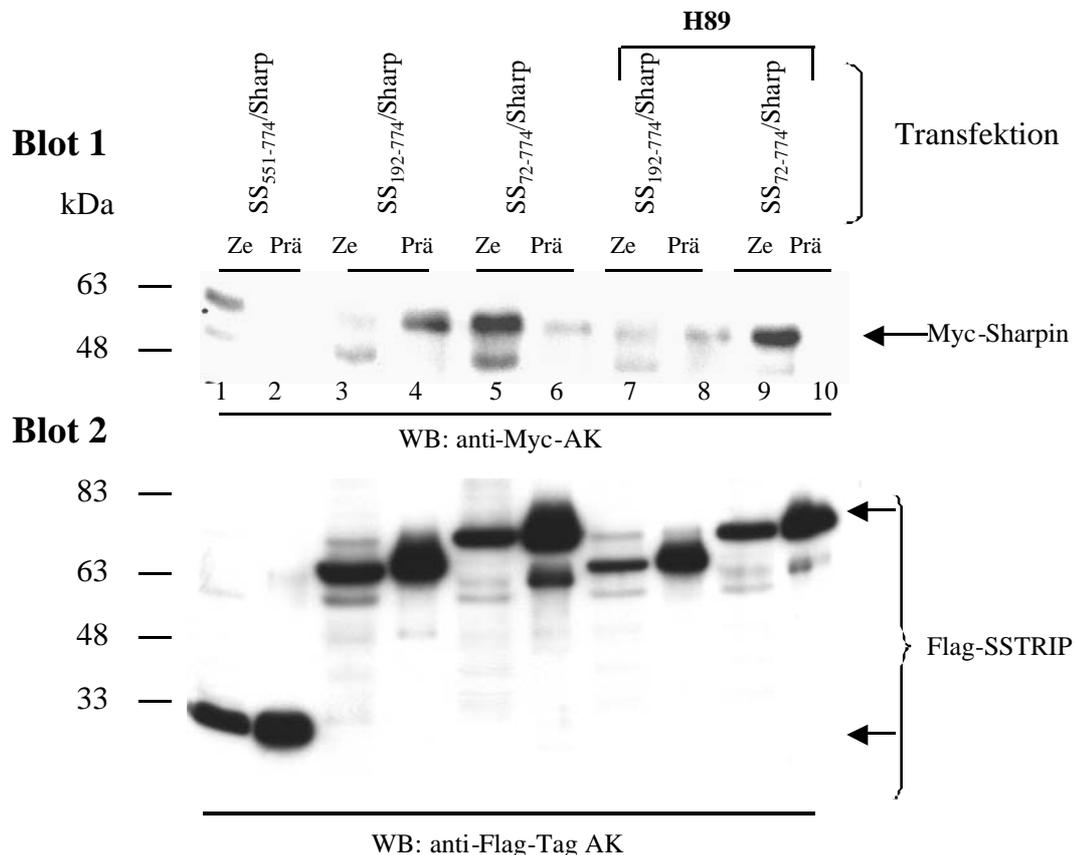


**Abbildung 3.17 Untersuchungen zur Regulation der intramolekularen Bindung des N-Segments an die Ankyrin *repeats*-Region** HEK-Zellen wurden mit pEGFP-N-Term zusammen mit einem dieser SSTRIP-Plasmide cotransfiziert SSTRIP<sub>72-774</sub>, pCMV-Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub>. Vor dem Ernten wurden die Zellen a) nicht behandelt b) mit Ionomycin oder c) mit Ionomycin und H89 für 3 h behandelt. Nach der Präzipitation der SSTRIP-Proteine mit GKAP-Sepharose wurden diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Bei den mit Ionomycin behandelten Proben, nahm das Copräzipitat des EGFP-N-Terms in beiden Fällen zu. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem Kinaseinhibitor bewirkte eine starke Abnahme in der Menge an copräzipitierten N-Term-Fusionsprotein. Ze, 30 µl Zelleextrakt von ca. 1,2 ml; Prä, GKAP-Präzipitat

### 3.2.8.2 Die Sharpin Bindung an die Ankyrin repeats-Domäne von SSTRIP wird durch einen Kinaseinhibitor gehemmt

Um zu testen, ob H89 auch einen Effekt auf die Bindung von Sharpin an SSTRIP hat, wurden die Untersuchungen aus 3.2.8.1 mit einem Sharpin-exprimierendem Plasmid wiederholt. Im Unterschied zu 3.2.8.1 wurden die Zellen jedoch nur mit H89 nicht aber gleichzeitig mit Ionomycin behandelt. Eine Vermutung war, dass die Phosphorylierung die Interaktion des N-Segments und Sharpin mit der Ankyrin *repeats*-Domäne unterschiedlich beeinflusst, damit beide Moleküle nicht gleichzeitig an die Ankyrin *repeats*-Region binden können.

Die Zellen wurden mit GWI-Sharpin und jeweils einem der folgenden SSTRIP-Plasmide cotransfiziert: pCMV-Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub>, pCMV-Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub> und pCMV-Flag-SSTRIP<sub>510-774</sub>. Die Sharpin Expression war sehr schwach, so dass es in den Zellextrakten kaum zu detektieren war (Abb. 3.18). Mit Flag-SSTRIP<sub>510-774</sub>, dem Konstrukt ohne Ankyrin *repeats*-Domäne, wurde auch in diesem Versuch kein Sharpin präzipitiert (Blot 1, Spur 2).



**Abbildung. 3.18 Untersuchungen zur Regulation der Bindung von Sharpin an die Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP in Gegenwart eines Kinaseinhibitors.**

HEK-Zellen wurden mit GWI-Myc-Sharpin zusammen mit einem dieser SSTRIP-Plasmide cotransfiziert: SSTRIP<sub>72-774</sub>, pCMV-Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub> und pCMV-Flag-SSTRIP<sub>510-774</sub>. Vor dem Ernten wurden die Zellen a) nicht behandelt b) mit H89 für 3 h behandelt. Nach der Präzipitation der SSTRIP-Proteine mit GKAP-Sepharose wurden die Proteinkomplexe durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die Behandlung der Zellen mit dem Kinaseinhibitor bewirkt eine starke Abnahme der Menge an copräzipitierten Myc-Sharpin bei SSTRIP<sub>72-774</sub>, und Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub>. Ze, 30  $\mu$ l Zellextrakt von ca. 1,2 ml; Prä, GKAP-Präzipitat

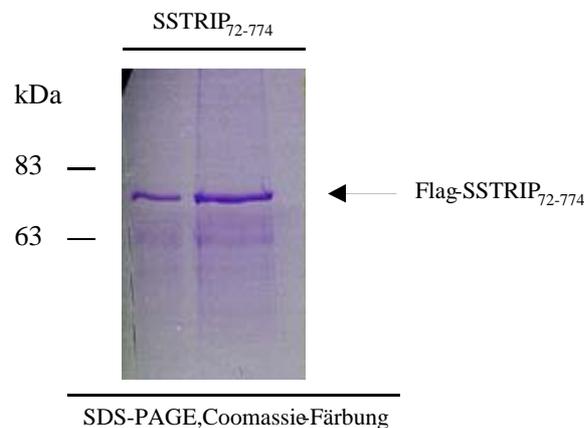
Mit pCMV-Flag-SSTRIP<sub>192-774</sub>, dem Fragment ohne N-Segment ließ sich erwartungsgemäß mehr Sharpin präzipitieren als mit pCMV-Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub>, wenn man die Menge an exprimierten Sharpin in beiden Fällen in Betracht zieht (Blot1, Vergleich Spuren 3,4 mit 5,6). Dies war in Übereinstimmung mit vorherigen Versuchen (Vergleich dazu 3.2.7.2).

Nach der Behandlung mit H89 nahm auch hier wie im Fall des N-Segments die Menge an copräzipitierten Sharpin in beiden Fällen stark ab (Spuren 8 und 10). Dies ist wiederum ein Hinweis darauf, dass die Hemmung der Phosphorylierung zu einer Störung der Interaktion in HEK-Zellen führen könnte.

Diese Ergebnisse lassen sich folgendermaßen interpretieren: Die Hemmung der Phosphorylierung bewirkt eine Stärkung der intramolekularen Interaktion des N-Segments mit der Ankyrin *repeats*-Region auf dem SSTRIP<sub>72-774</sub>-Molekül und hemmt aus diesem Grund die intermolekulare Bindung an Sharpin. Wie im Fall des N-Segments, ist es unter dieser Annahme nicht ganz klar, warum es zu einer partiellen Hemmung der Interaktion zwischen SSTRIP<sub>192-774</sub> und Sharpin kommt.

### 3.2.9 Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen auf dem SSTRIP<sub>72-774</sub>-Protein

Da der Einsatz des Kinaseinhibitors H89 die Interaktion des N-Segments und Sharpins mit der Ankyrin *repeats*-Region in HEK-Zellen beeinflusste, wurde versucht Phosphorylierungsstellen auf SSTRIP<sub>72-774</sub> zu lokalisieren. Dazu wurden HEK-Zellen mit dem pCMV-Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub>-Plasmid transfiziert. Das exprimierte SSTRIP<sub>72-774</sub>-Protein wurde mit Hilfe der GKAP-Sepharose präzipitiert, in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 3.19).

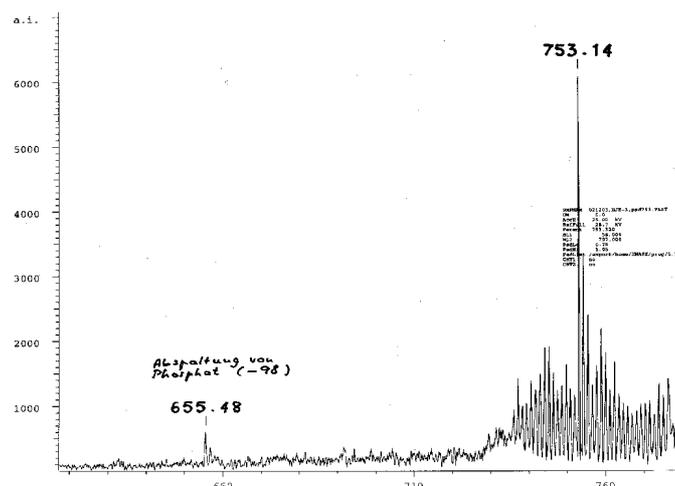


**Abbildung 3.19 Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen auf dem Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub> Protein, SDS-PAGE des gereinigten Proteins.** HEK-Zellen wurden mit pCMV-Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub> transfiziert und das Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub> Protein mit der GKAP-Sepharose präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch eine SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung analysiert. Die Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub> Banden wurden ausgeschnitten und mit MS analysiert.

Die Proteinbanden wurden aus dem Gel geschnitten, mit Trypsin verdaut und die resultierende Fragmente massenspektrometrisch analysiert (Dr. Christoph Weise, Freie

Universität Berlin). Das Prinzip der Analyse ist das gleiche wie bei der unter 3.1.2 erläuterten *Mass finger print*-Analyse. Der Unterschied besteht darin, dass das Protein sowie sein Verdauungsmuster bekannt sind. Zusätzlich treten im Spektrum nicht vorhergesagte Fragmente auf, deren Masse im Vergleich zu den erwarteten Peptidmassen um 80 (Masse der Phosphatgruppe) erhöht sind.

Eine zweite Fragmentierung ließ sich mit dem sogenannten PSD (*Post source decay*) erzielen, dadurch konnte die Phosphatgruppe und Wasser (Verhältnis der Masse zur Ladung,  $m/z$  98) abgespalten werden. Da die Spaltstellen des Trypsins bekannt sind, läßt sich aus der Masse des Peptidsfragments der Sequenzabschnitt angeben, an der die Phosphatgruppe sitzt. Im Fall des Vorhandenseins mehrerer phosphorylierbarer Reste innerhalb dieses Abschnitts ist eine genaue Angabe der phosphorylierten Aminosäuren nicht möglich. Mit Hilfe des Programms NetPhos ließ sich zusätzlich die mögliche Phosphorylierungsstelle und die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens vorhersagen. In Abbildung 3.20 ist ein solches MS-Spektrum für das Peptidfragment der Masse 753.3 gezeigt.



**Abbildung 3.20 Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen auf dem Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub> Protein**, Auszug aus einem MS-Spektrum der Verdauungsfragmente des Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub> Proteins (PSD-Spektrum). Die Masse 753.3 ist die der Peptidsequenz -ARSPSR-, bei der die Spaltstelle hinter dem ersten Arginin (R) überlesen wurde. An diesem Beispiel wird deutlich, dass die Spaltung der Phosphatgruppe die Masse des Peptids (Gipfel 753) um 98 herabsetzt (Gipfel 655).

Aus der MS-Analyse konnten die in Tabelle 3.1 angegebenen phosphorylierte Stellen lokalisiert werden. Die Stellen, die mit einer großen Genauigkeit identifiziert wurden, sind mit drei Sternen gekennzeichnet, die weniger sicheren sind mit zwei und die unsicheren mit einem Stern markiert.

Die Begrenzung der Methode liegt, daran, dass Peptidfragmente die eine m/z von weniger als 400 aufweisen nicht detektiert werden können. Im Bereich der Bindungsdomänen (N-Segment und Ankyrin *repeats*-Domäne) wurden keine phosphorylierten Reste detektiert; es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese vorhanden sein könnten.

### Tabelle 3.1 Lokalisierung von Phosphorylierungstellen auf dem SSTRIP<sub>72-774</sub>-Protein

Durch die MS-Analyse identifizierte phosphorylierten Aminosäuren (AS) auf dem Flag-SSTRIP<sub>72-774</sub> Protein

Sequenzabschnitt	durch MS ermittelte Massen	Index-Vorhersage mit NetPhos	Phosphorylierte AS
-GAARARSPSR- (AS 494-502)	753.32	0.998	S <sub>499</sub> <sup>***</sup> oder S <sub>501</sub> <sup>***</sup>
-KSYQAQEGEISL SKGEK- (AS 563-580)	1904	0.172, 0.664 und 0.955	S <sub>564</sub> <sup>*</sup> , S <sub>575</sub> <sup>*</sup> oder S <sub>577</sub> <sup>**</sup>

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Interaktionspartner für die Ankyrin *repeats*-Region der SSTRIP/Shank/ProSAP2-Proteine mit Hilfe der Affinitätschromatographie und des Hefe-Zwei-Hybrids zu identifizieren und biochemisch und molekularbiologisch zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte untersucht werden, wie diese Interaktionen innerhalb der Synapse im Gehirn reguliert werden.

### 4.1 Identifizierung von $\alpha$ -Fodrin als Bindungspartner für die Ankyrin *repeats*- Domäne von SSTRIP/Shank1 und ProSAP2/Shank3

Ein an NHS-Sepharose gekoppeltes His<sub>6</sub>-Fusionsprotein der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP wurde als Affinitätsmaterial eingesetzt, um Bindungspartner aus Rattengehirn-Extrakte zu isolieren. Die angereicherten Proteine des Eluats wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit der Massenspektrometrie analysiert. Das cytoskelettale Protein  $\alpha$ -Fodrin konnte durch *Mass Finger Print* Analyse und im Western Blot als Interaktionspartner der Ankyrin *repeats*-Domäne identifiziert werden. Der Hefe-Zwei-Hybrid-Screen, der von Dr. Böckers unter Verwendung der Ankyrin *repeats*-Domäne von ProSAP2 durchgeführt wurde, zeigte außerdem, dass die Ankyrin *repeats*-Domäne von ProSAP2 ebenfalls an  $\alpha$ -Fodrin bindet. Eine direkte Interaktion beider Proteine wurde durch einen *in vitro* Bindungsversuch gezeigt. Durch Colokalisations- und Coimmunopräzipitationsexperimente in HEK-293-Zellen konnte die Interaktion weiter bestätigt werden. Eine *in vivo* Wechselwirkung wurde durch Coimmunopräzipitation der Proteine aus Membranfraktionen von Ratten- und Mäusegehirnen unter Verwendung spezifischen Antikörper gezeigt.

Mit einem  $\alpha$ -Fodrin spezifischen Antikörper wurde die 250 kDa-Variante des SSTRIP-Proteins aus einer Membranfraktion des Rattengehirns copräzipiziert, jedoch nicht die 180 kDa-Variante, die keine Ankyrin *repeats*-Domäne enthält, obwohl beide Varianten im Ausgangsmaterial nachweisbar waren. Dieses Ergebnis unterstreicht die Annahme, dass die Ankyrin *repeats*-Domäne die Interaktion zwischen  $\alpha$ -Fodrin und SSTRIP vermittelt. Die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine weisen mehrere Spleißvarianten auf, unter anderem solche ohne Ankyrin *repeats*-Domäne. Die funktionelle Bedeutung des alternativen Spleißens konnte bislang nicht ermittelt werden. Die Beobachtung, dass  $\alpha$ -Fodrin spezifisch mit der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP und ProSAP2 interagiert, unterstützt die Hypothese, dass das alternative Spleiß die Interaktionen der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine regulieren könnte.

In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass ProSAP1 ursprünglich als Cortactin-bindendes Protein (CortBP1) vor der Charakterisierung der SSTRIP/Shank/ProSAP Familie identifiziert wurde (Du *et al.*, 1998). Erst später stellte sich heraus, dass es sich bei CortBP1 um ein Mitglied der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteinfamilie ohne Ankyrin *repeats*- und SH3-Domäne handelt (ProSAP1/Shank2). ProSAP1 sowie ProSAP2 enthalten in ihrer Prolinreichen Region ein Motiv (KPPVPPKP), das ppI genannt wird und die Interaktion mit Cortactin, einem Aktin-bindenden Protein vermittelt (Naisbitt *et al.*, 1999). Ein ähnliches Motiv existiert bei SSTRIP/Shank 1. Ob SSTRIP/Shank1 mit Cortactin interagiert, müsste noch experimentell überprüft werden. Unter der Annahme, dass SSTRIP/Shank1 nicht mit Cortactin interagiert, stellt seine Interaktion mit  $\alpha$ -Fodrin die einzige Möglichkeit der direkten Verankerung am Aktin-Cytoskelett dar. Diese Vermutung erscheint schlüssig zu sein und zeigt, wie in der Postsynapse, die Verbindung zum Cytoskelett für die unterschiedliche Mitglieder dieser Proteinfamilie sicher gestellt werden kann.

SSTRIP und ProSAP2 haben in der Aminosäuresequenz ihrer Ankyrin *repeats*-Domänen eine Identität von ungefähr 66% und scheinen ein ähnliches Verhalten in der PSD zu zeigen. Trotzdem ist nicht bekannt, ob beide Proteine gleiche oder unterschiedliche Rollen innerhalb der Organisation der PSD erfüllen. Die Entdeckung, dass  $\alpha$ -Fodrin an die Ankyrin *repeats*-Domäne sowohl von SSTRIP als auch ProSAP2 bindet, weist in diesem Zusammenhang auf eine ähnliche Funktion beider Proteine bei der Verankerung gebundener Proteine am Aktin-Cytoskelett hin.

Eingrenzungsexperimente in der Hefe führten weiterhin zur Erkenntnis, dass das Spektrin-repeat 21 von  $\alpha$ -Fodrin allein die Interaktion vermitteln kann.

$\alpha$ -Fodrin (nichterythroides Spektrin, Gehirn-Spektrin) ist ein Aktin bindendes Protein des Cytoskeletts. Es besteht aus zwei unterschiedlichen, jedoch sehr ähnlichen Untereinheiten (Die  $\alpha$ -Untereinheit hat ein Molekulargewicht von ca. 280 kDa, während die  $\beta$ -Untereinheit ca. 250 kDa groß ist), die antiparallele Heterodimere bilden können (Lundberg *et al.*, 1995). Zwei Heterodimere assoziieren Kopf an Kopf, um ein Tetramer zu bilden. Es wird angenommen, dass diese Tetramere die in der Zelle hauptsächlich vorliegende Form darstellen (Bennet *et al.*, 1993).

In der Kopfregion bilden der N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit und der C-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit die Dimer-Kontaktstelle. Die Schwanzregion besteht aus dem C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit und dem N-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit und enthält eine Bindungsstelle für Aktin, durch die die Spektrin-Tetramere Aktin quervernetzen können (Hartwig *et al.*, 1991).

Die  $\alpha$ -Untereinheit enthält 22 homologe *repeats* (Spektrin *repeats*) von ungefähr 106 Aminosäuren, zwei EF-Hand-Motive, die Calcium binden und eine SH3-Domäne (Lundberg *et al.*, 1995). Die  $\alpha$ -Untereinheit bindet Calmodulin an einer einzigen Stelle außerhalb der *repeats*, die etwa in der Mitte des Moleküls lokalisiert ist. In Erythrozyten existiert ein auf Spektrin basierendes Cytoskelett-Membrannetzwerk, das durch das Protein Ankyrin mit der Plasmamembran assoziiert ist.  $\alpha$ -Fodrin und Spektrin der Erythrozyten haben eine Ähnlichkeit in der Sequenz und Struktur, werden aber von unterschiedlichen Genen kodiert (Bennet *et al.*, 1990; Goodman *et al.*, 1988).

Die Beobachtungen, dass die Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP und ProSAP2 an das Spektrin-*repeat* 21 bindet, ist besonders bemerkenswert. Das Spektrin-*repeat* 21 ist zwischen unterschiedlichen Arten stark konserviert. Die Sequenz aus Ratten weist eine Identität von 100% zur humanen, Maus und zum Huhn, von 81% zu *Drosophila melanogaster* und von 79% zu *Caenorhabditis elegans* auf. Obwohl die Ankyrin *repeats*-Domäne keine besonderen Strukturelemente oder Consensussequenz bei ihren Bindungspartnern bevorzugen, unterstreicht diese Beobachtung die funktionelle Bedeutung des konservierten Sequenzmotivs des Proteins  $\alpha$ -Fodrin.

Die SSTRIP- und ProSAP2-Interaktion mit  $\alpha$ -Fodrin verbindet neben Cortactin die SSTRIP/Shank/ProSAP2-Proteine mit dem Aktin-Cytoskelett. Weitere charakterisierte Verbindungen der PSD-Proteine zum Aktin Cytoskelett stellen die Interaktion der NRI-Untereinheit des NMDA-Rezeptors mit  $\alpha$ -Actinin, einem Protein der Spektrin Familie, sowie die Wechselwirkung des NMDA-Rezeptors mit  $\alpha$ -Fodrin dar (Wechsler und Teichberg, 1998). Die Proteine der PSD werden somit an verschiedenen Stellen am Aktin-Cytoskelet verankert. Dies impliziert, dass das Aktin-Cytoskelett für die strukturelle und funktionelle Organisation der Postsynapse von großer Bedeutung ist.

Im Folgenden wird versucht, die funktionelle und strukturelle Bedeutung dieser Interaktion näher zu verstehen. Parallel dazu soll auf die Rolle von Aktin in der Organisation der PSD und dendritischen Dornen eingegangen werden.

Ein auffälliger Unterschied zwischen den dendritischen Dornen und den Dendriten stellt der hohe Gehalt der Dornen an Aktin dar. Licht- und elektronenmikroskopische Analysen zeigen eine starke Anreicherung von F-Aktin in den Dornen im Vergleich zum Rest der Dendriten (Matus *et al.*, 1982; Cohen *et al.*, 1985). Das Aktin liefert die hauptsächliche strukturelle Basis für die Organisation des Cytoskeletts innerhalb der Dornfortsätze, zudem sind die Aktin-Filamente für die Integrität der Dornen entscheidend, da die Dornen kaum Neurofilamente und Mikrotubuli besitzen (Harris *et al.*, 1994; Fifkova *et al.*, 1985; Rao *et al.*,

2000). Abgesehen von den Aktin-Filamenten sind andere Filamente, die vermutlich Aktin assoziierte Proteine wie Spektrin, Myosin enthalten, an der Organisation des Cytoskelett beteiligt, weil sie die Aktin-Filamente untereinander, zu der Plasmamembran der PSD und zum glatten endoplasmatischen Retikulum quervernetzen (Wilson et al., 1983; Landis et al., 1983; Shelley, 2000).

In Anbetracht der großen Bedeutung des Aktins für die Organisation des Cytoskelett ist es nicht erstaunlich, dass so viele Verbindungen zum Aktin und zu Aktin-bindenden Proteinen innerhalb der Postsynapse existieren. Die SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine liegen im tiefsten Teil der PSD und interagieren sowohl mit den Oberflächenrezeptoren als auch mit Proteinen der Signaltransduktion. Durch die Interaktion mit  $\alpha$ -Fodrin wird der gesamte PSD-Komplex durch die SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine am Aktin-Cytoskelett verankert und quervernetzt. Dies gibt der PSD und den Dornen ihre Stabilität und Formfestigkeit. Diese Beobachtungen unterstreichen noch einmal die Bedeutung der SSTRIP/Shank/ProSAP2 Proteine als Gerüstmoleküle der PSD.

Obwohl Aktin meist mit der Zellmotilität assoziiert ist, spielt es auch eine entscheidende Rolle in der Bildung stabiler Strukturen (Shelley, 2000). Die Zellen benutzen also eine stabile oder eine dynamische Variante des Aktins, um die Erfordernisse an Stabilität *versus* Dynamik zu erfüllen.

Aktin existiert entweder als polymerisierte Filamente (F-Aktin) oder als unpolymerisierte, globuläre Einheiten (G-Aktin). Aktin-Filamente in dendritischen Dornen zeigen eine komplexe Erscheinung. Auf der einen Seite sind die Filamente über mehrere Stunden stabil und haben eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Aktin-depolymerisierenden Substanzen wie Cytochalasin und Latunculin (Allison et al., 1998). Was zu der Schlussfolgerung führt, dass Aktin-Filamente in Dornen extrem stabil sind und eine rein strukturelle Funktion erfüllen. Dies erklärt die beobachtete Stabilität von individuellen Dornen über Stunden oder Tage (Dailey et al., 1996; Hosokawa et al., 1992).

Dendritische Dornen sind trotz ihrer Stabilität zugleich auch dynamische Strukturen, die ihre Zahl, Form und ihre Morphologie schnell verändern können. Die schnelle Motilität der Dornen hängt von dynamischem Aktin ab (Fischer et al., 1998). Studien mit GFP-Aktin synthetisierenden transgenen Mäuse haben gezeigt, dass das Aktin-Cytoskelett der dendritischen Dornen sich sehr schnell reorganisieren kann (Kaeck et al., 1999; Dunaevsky et al., 1999). Die Bedeutung von dynamischem Aktin für die synaptische Plastizität wird von den Beobachtungen stark unterstützt, dass Aktin-depolymerisierende Substanzen die Ausbildung von stabilen LTP in isolierten Hippocampi verhindern (Kim und Lisman, 1999).

Die SSTRIP- und ProSAP-Interaktion mit dem Aktin-interagierenden Protein  $\alpha$ -Fodrin stellt somit eine strukturelle Verbindung zwischen diesen Proteinen und der Dynamik des Aktins her, die für die Ausbildung der LTP entscheidend ist. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Überexpression der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine in kultivierten Hippocampus-Neuronen der Ratte zu strukturellen und organellen Veränderungen innerhalb der Dornfortsätze führte (Sala *et al.*, 2001). Von einigen der beschriebenen Veränderungen, wie z. B. die Teilung von Synapsen und dem Wachstum von dendritischen Dornen, wurde berichtet, dass sie allgemein mit dem Phänomen der Langzeitpotenzierung einhergehen (Engelt *et al.* 1999; Maletic-Savatic *et al.*, 1999). Die genaueren molekularen Mechanismen, durch welche die SSTRIP/Shank/ProSAP2-Proteine diese strukturellen Veränderungen bewirken, sind jedoch nicht bekannt. Die Interaktion von SSTRIP und ProSAP2 mit  $\alpha$ -Fodrin und ihre damit verbundene Verankerung am Aktin-Cytoskelett könnte eine der Möglichkeiten darstellen, wie diese Proteine über den Aktin-Dynamik diese Formänderungen bewirken können.

Die dynamische Aktin-Population wird sehr wahrscheinlich durch transmembrane Signale beeinflusst, die die Aktin-assoziierten Proteine regulieren (Shelley, 2000). In diesem Zusammenhang haben *In-vitro*-Studien gezeigt, dass  $\alpha$ -Fodrin Calcium- und Calmodulin-abhängig durch Calpain I gespalten werden kann. Die Calpain I-Spaltung in der Mitte der  $\alpha$ -Untereinheit führt zur Bildung von zwei Fragmenten von je 150 und 130 kDa. Die  $\beta$ -Untereinheit wird am C-terminalen Ende gespalten. In der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit gespaltenes  $\alpha$ -Fodrin verliert die Fähigkeit, Tetramere zu bilden und Aktin zu binden (Harris *et al.*, 1990). An der Postsynapse korreliert die  $\alpha$ -Fodrin-Proteolyse mit der Langzeitpotenzierung, und Behandlungen, die die  $\alpha$ -Fodrin Proteolyse hemmen, verhindern die Ausbildung der Langzeitpotenzierung (Lynch *et al.*, 1984). Durch *In-vivo*-Studien konnte weiter gezeigt werden, dass die Behandlung von Ratten mit Kainate oder NMDA die Menge an proteolytischen Produkten von  $\alpha$ -Fodrin durch Calpain erhöht (Siman *et al.*, 1989).

Die aktivitätsabhängige Spaltung von  $\alpha$ -Fodrin führt dazu, dass dieses nicht mehr an die SSTRIP und ProSAP2, sowie an das Aktin binden kann, obwohl diese Proteine weiter mit den Oberflächenrezeptoren assoziiert sind. Das Aktin wird durch diese Spaltung wahrscheinlich destabilisiert und dadurch anfälliger für Aktin-depolymerisierende Substanzen. Dies könnte ein möglicher Mechanismus sein, wie strukturelle Veränderungen in der PSD ablaufen und speziell durch die SSTRIP/Shank/Proteine vermittelt werden.

#### **4.2 Identifizierung einer intramolekularen Wechselwirkung zwischen dem N-terminalen Segment und der Ankyrin repeats Region von SSTRIP und ProSAP2**

Im zweiten Teil dieser Arbeit, wurde das N-terminale Fragment unmittelbar vor der Ankyrin *repeats*-Domäne des SSTRIP-Proteins als *bait* in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen eingesetzt, um Interaktionspartner dieses Bereiches zu identifizieren. SSTRIP und ProSAP2 haben eine Identität von 57% in der Aminosäuresequenz ihres N-Segments, daher wurde vermutet, dass Bindungspartnern dieses Bereiches eine regulatorische Rolle bei den Interaktionen der Ankyrin *repeats*-Domäne zukommt. Die Ankyrin *repeats*-Region wurde dabei als Bindungspartner des N-Segments identifiziert. Die Wechselwirkung wurde durch eine Coaffinitätspräzipitation aus HEK-Zellen bestätigt, die mit der cDNA der interagierenden Bereiche transfiziert war. Für die Präzipitation der SSTRIP/ProSAP-Proteinfragmente mit einer PDZ-Domäne wurde dabei das C-terminale Peptid von GKAP verwendet, welches an NHS-Sepharose gekoppelt war. GKAP bindet sehr stark und spezifisch an die PDZ-Domäne der SSTRIP/ProSAP-Proteine. Diese Methode der Copräzipitation über Peptidliganden hat sich sehr gut bewährt, da keine störende Antikörper-Banden mehr im Präzipitat zu sehen sind. Zudem erlaubt sie eine quantitative Präzipitation der SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine

Da es sich bei den interagierenden Domänen um unterschiedliche Bereiche des gleichen Proteins handelt, wurden Experimente durchgeführt, die zwischen inter- und intramolekularer Interaktion unterscheiden. Hierzu wurden Konstrukte hergestellt, die die gesamten interagierenden Bereiche (N-Segment und Ankyrin *repeats*-Region) in ihrer Sequenz umfassen. Diese Konstrukte wurden sowohl im Hefe-Zwei-Hybridsystem als auch in Coaffinitätspräzipitationsexperimenten auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit einem Fusionsprotein des N-Segments getestet. Als Kontrolle diente dabei ein Konstrukt, das nur die Ankyrin *repeats*-Region ohne N-Segment trug. Das Prinzip dieser Experimente beruhte auf einer Konkurrenz der intramolekularen mit der intermolekularen Wechselwirkung. Die Konstrukte, welche die Sequenz der gesamten interagierenden Domänen enthalten, zeigten im Vergleich zu den Kontrollkonstrukten nur eine sehr schwache intermolekulare Interaktion mit dem Fusionsprotein des N-Segments. Es handelt sich bei der identifizierten Interaktion somit hauptsächlich um eine intramolekulare. Eine schwache intermolekulare Bindung des Fusionsproteins des N-Segments an die Ankyrin *repeats*-Region des Konstrukts mit dem N-Segment und der Ankyrin *repeats*-Region wurde jedoch auch beobachtet, was ein Hinweis darauf ist, dass *in vivo* oder zumindest unter den Versuchsbedingungen ein gewisser Anteil an Ankyrin *repeats*-Regionen und N-Segmenten nicht vollständig durch die intramolekulare Interaktion blockiert sind.

Es zeigte sich, dass das N-terminale Segment des ProSAP2-Proteins ebenfalls an seiner Ankyrin *repeats*-Region bindet. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass beide Proteine ähnliche Funktionen innerhalb der Organisation der Postsynapse in den dendritischen Dornen erfüllen könnten.

Um einen Einblick in die Regulation der intramolekularen Wechselwirkung *in vivo* zu gewinnen, wurde bei den CoAP-Experimenten das Calcium-Ionophor Ionomycin eingesetzt, das zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt. Sowohl mit dem Konstrukt aus dem gesamten interagierenden Bereich (N-Segment + Ankyrin *repeats*-Domäne) als auch mit dem Konstrukt ohne N-terminales Segment wurde dabei eine Zunahme der Signalintensität des N-Segments festgestellt. Dies war ein Hinweis darauf, dass das Calcium die intramolekulare Bindung abschwächt und dadurch die intermolekularen Interaktionen verstärkt möglich werden. Bei allen mit Ionomycin durchgeführten Coaffinitätspräzipitationsexperimente wurde bei der intermolekularen Interaktion immer eine Verstärkung der Bandenintensität des N-Segments beobachtet. Es ist also anzunehmen, dass dieser Calcium-vermittelte Effekt eine Möglichkeit der *In-vivo*-Regulation der intramolekularen Bindung darstellt. Unter diesen Versuchsbedingungen war die Menge des N-Segment-Fusionsproteins bei einer Präzipitation mit dem Konstrukt der gesamten Domäne allerdings geringer als die des Kontrollkonstrukts ohne N-Segments. Es existieren vermutlich jedoch andere Mechanismen und/oder Signale, die das Ablösen des N-Segments von der Ankyrin *repeats*-Domäne regulieren, da die Erhöhung der intrazellulären Calcium Konzentration dies unter den Versuchsbedingungen nur zum Teil bewirkte.

Durch Versuche im Hefe-Zwei-Hybrid-System unter Verwendung von SSTRIP-Fusionsproteinen mit dem gesamten interagierenden Bereich sowie des Originalklons von  $\alpha$ -Fodrin konnten weiter gezeigt werden, dass die Interaktion des  $\alpha$ -Fodrins mit der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP und ProSAP2 durch die intramolekulare Wechselwirkung nicht beeinflusst wird. Das  $\alpha$ -Fodrin und das N-Segment binden offensichtlich an unterschiedlichen Stellen der Ankyrin *repeats*-Region. Dies ist theoretisch denkbar, da bei der Faltung der Ankyrin *repeats*-Region genügend Reste zur Verfügung stehen dürften, die dem Lösungsmittel zugänglich sind und für die Bindung benutzt werden können. Für die Bindungen an der Ankyrin *repeats*-Domäne kann jede Oberfläche herangezogen werden, weil die Kontaktstelle nicht auf ein besonderes Strukturelement beschränkt ist. Zudem könnte sich der intramolekulare Bindungsmechanismus des N-Segments von der intermolekularen Bindung des  $\alpha$ -Fodrins an die Ankyrin *repeats*-Region unterscheiden. Dies wurde bei der Ankyrin *repeats*-Domäne von Swi6 beobachtet (Sedgwick et al., 1998). Diese Ankyrin

*repeats*-Domäne ist an einer intramolekularen Wechselwirkung beteiligt und die dreidimensionale Struktur offenbart, dass der Bindungsmechanismus sich erheblich von dem der bisher beschriebenen intermolekularen Interaktion unterscheidet. Durch die Bestimmung der Struktur der Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP mit dem benachbarten N-Segment und, wenn möglich, der Interaktionspartnern könnte mehr Einsicht in die molekularen Bindungsmechanismen des N-Segments sowie des  $\alpha$ -Fodrins und/oder Sharpins mit der Ankyrin *repeats*-Region gewonnen werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss der intramolekularen Wechselwirkung auf die Interaktion von Sharpin mit der Ankyrin *repeats*-Domäne in Affinitätspräzipitationsversuchen untersucht. Eine starke Hemmung der Sharpin-Wechselwirkung wurde mit dem Konstrukt des gesamten interagierenden Bereichs beobachtet. Die Bindung von Sharpin wurde dabei durch das benachbarte N-Segment behindert. Diese Hemmung könnte auf eine direkte Bindung des N-Segments an die Ankyrin *repeats*-Domäne zurück zu führen sein und/oder durch eine Faltung verursacht werden, die zu einer sterischen Hinderung führt. Ein weiterer Versuch wurde durchgeführt, um aufklären zu können, ob eine intermolekulare Bindung des N-Segment-Fusionsproteins an die Ankyrin *repeats*-Region die Wechselwirkung von Sharpin mit SSTRIP ebenfalls inhibiert. Es zeigte sich, dass das N-Segment zwar mit Sharpin um die Bindung an die Ankyrin *repeats*-Domäne kompetiert, die Interaktion des Sharpins jedoch nur geringfügig beeinflusst.

Diese Beobachtungen unterstützen die Vorstellung, dass *in vivo* zusätzliche sekundäre Wechselwirkungen für diese Hemmung herangezogen werden. Sie zeigen zudem, dass diese Inhibierung regulatorischer Natur ist, die nicht nur durch eine einfache Bindung des N-Segments verursacht wird. Vielmehr ist eine gewisse Spezifität zu beobachten; da bei den hier durchgeführten Experimenten das N-Segment und die Ankyrin *repeats*-Domäne auf dem gleichen Molekül benachbart sein müssen, um mit der Interaktion von Sharpin und SSTRIP signifikant zu interferieren. Diese Experimente zeigen außerdem, dass  $\alpha$ -Fodrin und Sharpin durch unterschiedliche Bindungsmechanismen mit der Ankyrin *repeats*-Region interagieren.

Es ergibt sich aus der oben diskutierten Regulation der Sharpin-Interaktion mit SSTRIP die Frage nach den Mechanismen, die für das Ablösen des N-Segments von der Ankyrin *repeats*-Region verantwortlich sind, um das Binden von Sharpin zu ermöglichen. Außerdem bleibt die Frage, wie dies *in vivo* im Gehirn reguliert wird. Da der Einsatz von Ionomycin zum teilweisen Ablösen des N-Segments von der Ankyrin *repeats*-Region und zur vermehrten

intermolekulare Bindung des N-Segment-Fusionsproteins führte, wurden die CoAP-Experimente von Sharpin mit den SSTRIP-Fusionsproteinen in Gegenwart von Ionomycin durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Bindung von Sharpin an das SSTRIP-Fragment ohne N-Segment verstärkt war, wohingegen kein Unterschied bei dem SSTRIP-Protein mit N-Segment festgestellt werden konnte. Bei allen durchgeführten Experimenten wurde eine Verstärkung der Sharpin-Bindung immer nur an das SSTRIP-Konstrukt ohne N-Segment nicht aber an das Konstrukt der gesamten Domänen beobachtet. Es wäre zu erwarten gewesen, dass Calcium das Ablösen des N-Segments von der Ankyrin *repeats*-Region und eine stärkere Bindung von Sharpin bewirkt. Dies war jedoch nicht der Fall. Es existieren vermutlich andere Signale *in vivo*, die die Bindung von Sharpin an die SSTRIP-Moleküle zusätzlich regulieren.

Für die CoAP-Experimente wurde weiterhin ein Kinaseinhibitor eingesetzt, um aufzuklären, ob die beobachtete Calcium-vermittelten Effekte auf eine Phosphorylierung der Fusionsproteine zurück zu führen sind. Eine starke Hemmung sowohl der intra- als auch der intermolekularen Wechselwirkungen der Ankyrin *repeats*-Region wurde dabei für das N-Segment-Fusionsprotein und Sharpin beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung der Fusionsproteine höchst wahrscheinlich für die Calcium-Effekte verantwortlich ist. Dieser Regulationsmechanismus der intramolekularen Interaktion durch Phosphorylierung wurde auch bei einer *src*-Kinase beobachtet. Die Phosphorylierung des Tyr<sup>527</sup>-Restes der *src*-Kinase von Vögeln ermöglicht es dem Protein, intramolekular mit der SH2-Domäne zu interagieren (Pursglove *et al.* 2002). Unter der Annahme, dass die Phosphorylierung das Ablösen des N-Segments von der Ankyrin *repeats*-Region des SSTRIP-Konstrukts der gesamten Domänen bewirkt, so dass das Fusionsproteins des N-Segments besser binden kann, ist es jedoch nicht verständlich, warum die Hemmung der Phosphorylierung auch zu einer partiellen Hemmung der intermolekularen Bindung sowohl des N-Segments als auch von Sharpin an das SSTRIP-Molekül ohne N-Segment führte. Unklar ist auch, warum das Sharpin unter diesen Bedingungen nicht besser an das SSTRIP-Molekül mit N-Segment bindet. Während die Vermutung zutreffen könnte, dass die Phosphorylierung des Sharpins seine Bindungseigenschaft zusätzlich beeinflusst, lässt sich für das N-Segment keine passende Erklärung finden. Denkbar ist nur, dass die starke Konzentration des Kinaseinhibitors dazu führt, dass dieser mit anderen Prozessen in der Zelle interferiert, die die untersuchte Interaktion zusätzlich beeinflussen.

Daraufhin wurden Phosphorylierungsstellen auf einem SSTRIP-Fragment, das sich vom N-Terminus bis zum Ende der PDZ-Domäne erstreckt, durch MS lokalisiert. Es wurden keine

phosphorylierte AS-Reste im Bereich der interagierenden Bereichen festgestellt; dennoch könnte die phosphorylierte Stelle am Ende der verbindenden Region zwischen der Ankyrin *repeats*-Domäne und der SH3-Domäne (pSer 499) über eine Konformationsänderung die Interaktion der benachbarten Bereiche beeinflussen.

Wie auch immer das Ablösen des N-Segments von der Ankyrin *repeats*-Region und die Bindung des Sharpins reguliert werden: Es handelt sich bei der hier identifizierten intramolekulare Wechselwirkung unter Beteiligung der Ankyrin *repeats*-Region um ein bisher im Kontext der Synapse unbekanntes Phänomen. Die bisher beschriebenen intramolekulare Wechselwirkungen bei synaptischen Proteinen involvieren alle die SH3-Domäne, wie die folgenden Beispiele zeigen.

Die MAGuK sind eine Familie von Multidomänenproteinen die drei PDZ-Domäne eine SH3-Domäne und eine C-terminale GuK-Domäne besitzen. Über die GuK-Domäne interagieren sie mit GKAP/SAPAP. Eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen der SH3-Domäne und der GuK-Domäne von SAP97, einem Mitglied dieser Proteinfamilie, wurde identifiziert, die die Interaktion der GuK-Domäne mit GKAP reguliert. Eine Sequenz die vor der ersten PDZ-Domäne liegt, erleichterte die GKAP-Bindung durch Assoziation mit der SH3-Domäne, während die SH3-Domäne und Sequenzen zwischen der SH3-Domäne und der GuK-Domäne die GKAP Bindung reprimierten (Wu *et al.*, 2000). Eine weitere intramolekulare Interaktion wurde bei SAP90/PSD95 - einem weiteren Mitglied der MAGuK Proteinfamilie-, zwischen der SH3-Domäne und der GuK-Domäne identifiziert. Diese Wechselwirkung schien für das Cluster des Kalium-Kanals Kv1.4 durch PSD-95 wichtig zu sein (Shin *et al.* 2000).

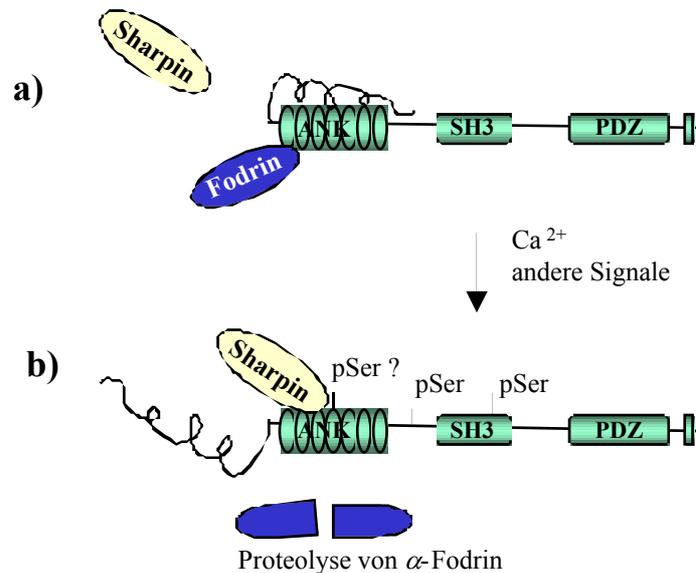
Intramolekulare Assoziationen benachbarter Domänen miteinander scheinen ein weit verbreiteter und wichtiger regulatorischer Mechanismus zu sein. Sie wurden ebenfalls in der Familie der TEC-Tyrosinkinasen zu der Txk, Bmx, Itk und Btk gehören, beschrieben. Diese intramolekulare Wechselwirkungen involvieren die SH3/SH2-Domänen und regulieren die Interaktion der entsprechenden Domänen mit ihren jeweiligen Liganden (Pursglove *et al.*, 2002; Andreotti *et al.* 1997). Die Kristallstrukturen der *src*-Kinase-Familie c-Src und Hck haben zudem gezeigt, dass sie durch zwei intramolekulare Interaktionen in einer inaktiven Form gehalten werden (Pursglove *et al.* 2002).

Die hier erwähnten intramolekulare Wechselwirkungen schließen alle die SH3-Domäne ein. Die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte intramolekulare Interaktion unter Beteiligung der Ankyrin *repeats*-Domäne stellt somit ein erstes Beispiel von intramolekularen

Wechselwirkung unter Beteiligung der Ankyrin *repeats*-Domäne bei Säugetieren dar. Die funktionelle Bedeutung dieser intramolekularen Interaktion könnte folgende sein:

1. Die intermolekulare Wechselwirkung könnte die Aktivität der interagierenden Domäne regulieren, indem sie beispielweise die Ankyrin *repeats*-Domäne in Abwesenheit eines Aktionspotentials maskiert, und seine Interaktion mit Sharpin dadurch hemmt. Diese Maskierung kann dann als Antwort auf spezifische Signale abgelöst werden, so dass die Wechselwirkung mit Sharpin stattfinden kann, die letztendlich zur Signaltransduktion innerhalb der Synapse führt. Dafür spricht die Beobachtung, dass das Ionomycin zur Verbesserung der intermolekularen Interaktion zwischen dem N-Segment und der Ankyrin *repeats*-Region führte. Denkbar wäre dies zum Beispiel bei stillen Synapsen.
2. Die intramolekulare Interaktion könnte für die Regulierung der Stärke der Interaktion zwischen Sharpin und SSTRIP von Bedeutung sein, um zur Regulation der Sharpin Bindung an PKC beizutragen. Die Beobachtung, dass ein Teil des N-Segments und der Ankyrin *repeats*-Region auf einem SSTRIP-Molekül mit beiden Domänen trotz der intramolekularen Interaktion immer für eine intermolekulare Interaktion zugänglich war, unterstützt diese Idee. Dies wurde auch bei der Tyrosinkinase Btk beobachtet; die intramolekulare Interaktion der SH3-Domäne mit der PRR-Region begrenzt die Wechselwirkung anderer Liganden und sorgt für eine basale enzymatische Aktivität (Patel *et al.* 1997).
3. Die zeitliche und räumliche Sequenz der Bildung eines postsynaptischen Funktionsapparates während der Synaptogenese ist bisher weitgehend ungeklärt. Es sind zwei grundsätzliche Mechanismen denkbar. Zum einem könnte der gesamte PSD-Komplex oder Teilkomplexe in extrasynaptischen Regionen wie dem Zellkörper gebildet werden und anschließend in Bereiche entstehender Synapsen transportiert werden. Zum anderen ist denkbar, dass PSD-Komponenten im wesentlichen einzeln in entwickelnde Synapsen rekrutiert werden und ausschließlich lokal zu den vollständigen synaptischen Funktionseinheiten zusammengesetzt werden. Die intramolekulare Assoziation könnte die Ankyrin *repeats*-Domäne während des Transportes oder der Rekrutierung der SSTRIP/Shank/ProSAP Proteine vom Syntheseort zum Ort entstehender Synapsen schützen, damit keine vorzeitigen Interaktionen mit den Bindungspartnern stattfinden können. Nach Einbau des Proteins in der Postsynapse kann diese Maskierung als Antwort auf spezifische Signale abgelöst werden, um das Binden von Proteinliganden zu ermöglichen. Diese Alternative wird von den Beobachtungen unterstützt, dass Antikörper gegen die Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP Ankyrin-*repeats* enthaltenden Variante in Membranfraktion von Rattengehirnen gut erkennen können, was letztendlich bedeutet, dass ihre Ankyrin *repeats*-Domäne frei ist.

Weiterführende Versuche sind erforderlich, um die genauere Mechanismen der Regulation der intramolekularen Interaktion zu bestimmen.



**Abbildung 4.1 Modell der intra- und intermolekulare Wechselwirkungen der Ankyrin repeats-Region und ihrer Regulation durch Phosphorylierung**

a) Die Ankyrin repeats-Region ist an ruhigen Synapsen oder Während des Transportes vom Synthesort des SSTRIP-Proteins zur Synapse durch das N-Segment maskiert. Unter diesen Bedingungen ist die Bindung von Sharpin nicht möglich, wohingegen  $\alpha$ -Fodrin binden kann.

b) Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration aktiviert bestimmten Kinasen, die das SSTRIP-Protein phosphorylieren, dadurch wird die intramolekulare Wechselwirkung teilweise oder vollständig unterbunden. Dies ermöglicht es Sharpin an die Ankyrin repeats Region zu binden. Calpain I wird durch Calcium aktiviert und spaltet  $\alpha$ -Fodrin ab.

## Zusammenfassung

Die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine bilden eine Familie von Multidomänenproteinen, die aufgrund ihrer direkten und indirekten Wechselwirkungen mit verschiedenen G-Proteingekoppelten Rezeptoren (SSTR2, mGluR5) und einigen Ionotropen-Glutamatrezeptoren der Postsynapse, eine entscheidende Funktion in der Organisation exzitatorischer Synapsen im zentralen Nervensystem spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, Interaktionspartner für den N-terminalen Bereich (N-Segment, Ankyrin *repeats*-Domäne) des SSTRIP-Proteins zu identifizieren und die Regulation dieser Wechselwirkungen aufzuklären.

Durch eine Affinitätsreinigung mit einem an NHS-Sepharose gekoppelten Fusionsprotein der Ankyrin *repeats*-Domäne konnte das cytoskelettale Protein  $\alpha$ -Fodrin als Bindungspartner für die Ankyrin *repeats*-Domäne von SSTRIP aus Rattengehirnextrakt isoliert werden. Eine direkte Interaktion wurde durch einen Bindungsversuch unter Verwendung gereinigter Fusionsproteine der interagierenden Bereiche gezeigt. Durch Colokalisierungs- und Coimmunpräzipitationsexperimente aus HEK-Zellen konnte eine Interaktion in einem heterologen Zellsystem bewiesen werden. Eine physiologische Relevanz der Wechselwirkung wurde durch eine Coimmunpräzipitation der Interaktionskandidaten aus Membranfraktionen von Mäusen- und Rattengehirnen gezeigt.  $\alpha$ -Fodrin ist ein Protein des Cytoskeletts und Bindungspartner von Aktin. Durch diese Interaktion verankern die SSTRIP/Shank/ProSAP-Proteine die Rezeptorkomplexe der postsynaptischen Dichte am Aktin-Cytoskelett.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der N-terminale Bereich (N-Segment) vor der Ankyrin *repeats*-Domäne als Köder in einem Hefe-Zwei-Hybrid-*screen* eingesetzt, um Interaktionspartner zu finden. Die Ankyrin *repeats*-Region von SSTRIP wurde dabei als Bindungspartner identifiziert. Die Interaktion wurde durch eine Copräzipitation entsprechender Fusionsproteine aus transfizierten HEK-Zellen weiter bestätigt. Copräzipitationen aus HEK-Zellen und Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente zeigten, dass es sich hauptsächlich um eine innerhalb desselben Moleküls stattfindende Wechselwirkung handelt (intramolekulare Wechselwirkung).

Des Weiteren wurde der Einfluss dieser Interaktion auf die Bindung von  $\alpha$ -Fodrin und Sharpin (ein kürzlich identifizierter Proteinligand der Ankyrin *repeats*-Domäne) untersucht. Es zeigte sich, dass die Wechselwirkung von  $\alpha$ -Fodrin mit der Ankyrin *repeats*-Domäne dadurch nicht beeinflusst wird, wohingegen eine sehr starke Hemmung der Sharpin-Interaktion beobachtet wurde. Das N-Segment mußte dabei als Teil des SSTRIP-Moleküls

sein, um mit der Wechselwirkung von Sharpin signifikant zu interferieren. Diese Untersuchungen lieferten den Anhaltspunkt für die Annahme, dass diese intramolekulare Wechselwirkung regulatorischer Natur ist. Die inter- und intramolekulare Interaktionen eines Fusionsproteins des N-Segments sowie von Sharpin mit der Ankyrin *repeats*-Region wurde nach der Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in HEK-Zellen verstärkt. Dagegen wurde eine starke Hemmung beobachtet, wenn der Kinaseinhibitor H89 für die Präzipitationsexperimente eingesetzt wurde. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Phosphorylierung des SSTRIP-Proteins die inter- und intramolekulare Interaktionen der Ankyrin *repeats*-Domäne reguliert. Durch die massenspektrometrische Analyse wurden schließlich einige phosphorylierte Aminosäurereste auf einem Fragment des SSTRIP-Moleküls lokalisiert, die möglicherweise für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Diese intramolekulare Wechselwirkung könnte für die Regulierung der Sharpin-SSTRIP-Interaktion bei ruhigen Synapsen oder während des Transportes des SSTRIP-Proteins vom Syntheseort zur Synapse von großer Bedeutung sein.

## 6. Literaturverzeichnis

- Allison, D.W.**, Gelfand V.I., Spector, I., Craig, A.M.(1998). Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J. Neurosci.* **18**, 2423-2436.
- Andreotti, A.H.**, Bunnell, S.C., Feng, S., Berg, L.J., Schreiber, S.L. (1997). Regulatory intramolecular association in a tyrosine kinase of the Tec family. *Nature* **385**, 93-97.
- Böckers, T.M.**, Kreutz, M.R., Winter, C., Zuschratter, W., Smalla, K.H., Sanmarti-Vila, L., Wex, H., Langnaese, K., Bockmann, J., Garner, C.C. and Gundelfinger, E.D. (1999a). Proline-rich synapse associated protein-1 is a PDZ-Domain protein highly enriched in the PSD. *J. Neurosci.* **19**, 6506-6518.
- Böckers, T.M.**, Winter, C., Malla, K.H. Kreutz, M.R., Bockmann, J. Seidenbecher, C., Garner C.C. and Gundelfinger E.D. (1999b). Proline-rich synapse-associated protein-1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 247-252.
- Bonaglia, M.C.**, Giorda, R., Borgatti, R., Felisari, G., Gagliardi, C., Selicorni, A., Zuffardi, O. (2001). Disruption of the ProSAP2 gene in a t (12, 22) (q 24.1, q13.3) is associated with the 22q 13.3 deletion syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 261-268.
- Bork, P.** (1993). Hundred of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally. *Proteins* **17** (4), 363-374.
- Breden, L.**, Nasmyth, K., (1987). Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*. *Nature* **329**, 651-659.
- Brenman, J.E.**, Chao, D.S., Gee, S.H., MacGee, A.W., Craven, S.E. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and Alpha-1 syntrophin mediated by the PDZ-domain. *Cell* **84**, 754-767.
- Brodin, L.**, Low, P., Gad. H., Gustafson, J., Pieribone, V.A., Shupliakov, O. (1997) *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2503-2511.
- Brenman, J.E.**, Topinka, R.J., Cooper, E.C., McGee, A.W., Rosen, J. (1998). Localisation of postsynaptic density-93 to dendritic microtubules and interaction with microtubule-associated protein 1A. *J. Neurosci* **18**, 8805-8813.
- Bruckner, K.**, Pablo Labrador, J., Scheiffele, P., Herb, A., Seeburg, P.H. (1999). Ephrin ligands recruit GRIP family PDZ adaptor protein into raft membran microdomains. *Neuron* **22**, 511-524.
- Cases-Langhoff, C.**, Voss, B., Garner, A.M., Appeltauer, U., Takei, K., Kindler, S., Veh, R.W., De Camilli, P., Gundelfinger, E.D., Garner, C.C. (1996). Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur. J. Cell, Biol.* **69**, 214-223.
- Carroll, R.C.**, Beattie, E.C., Xia, H.C.L.S, Altschuler, Y., Nicoll, R.A., Malemka, R.C. and Von Zastrow, M. (1999). Dynamin-dependant endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14112-14117.

- Chen**, H.J., Rojas-Soto, M., Oguni, A., Kennedy, M.B. (1998). A synaptic Ras-GTPase activating protein (P135, SynGAP) inhibited by CaM-Kinase II. *Neuron* **20**, 895-904.
- Dailey**, M.E., Smith, S.J. (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J. Neurosci.* **16**, 2983-2994.
- Dieck**, S. T., Sanmarti-Vila, L., Langnäse, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K.H., Kampf, U., Franzer, J.T., Stumm, M., Garner, C., Gundelfinger, E.D. (1998). Bassoon, a novel zink-finger (AG/glutamate-repeats) protein selectively localised at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J. Cell Biol.* **142**, 499-509.
- Dong**, H., O'Brien, R.J., Fung, E.T., Lanahan, A.A., worley, P.F. (1997). GRIP: a synaptic PDZ-domain containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature* **386**, 279-284.
- Dresbach**, T., Qualmann, B., Kessels, M.M., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D. (2001). The presynaptic cytoplasmic of brain synapses. *Cell Mol. Life Sci.* **58 (1)**, 94-116.
- Du**, Y., Weed, S.A., Xiong, W.C., Marshall, T.D. and Parsons, J.T. (1998). Identification of a novel cortactin SH3-domain binding protein and its localisation to growth cones of cultured neurons. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5838-5851.
- Dunaevsky**, A. tashiro, a., Majewska, A., Mason, S.m Yuste, R.(1999) Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13438-13443.
- Ehlers**, M.D., Fung, E.T., O'Brien, R.J., Haganair, R.L. (1998). Splices variants specific interaction of the NMDA-receptors subunit NR1 with neuronal intermediate-filamentes. *J. Neurosci.* **18**, 720-730.
- Fenster**, S.D., Chung, W.J., Zhai, R., Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, A.M., Kämp, U., Kindler, S., Gundelfinger, E.D., Garner, C.C. (2000). Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* **25**, 203-214.
- Fifková**, E. (1985). Actin in the nervous System. *Brain Res. Rev.* **9**, 187-215.
- Firestein**, B.L. and Bredt, D.S. (1999) Interaction of neuronal nitric-oxide synthase and phosphofructokinase-M. *J. Biol. Chem.* **274**, 10545-10550.
- Fischer**, M., Kaech, S., Knutti, D. Matus A.(1998). Rapid actin based plasticity in dendritic spines. *Neuron* **20**, 847-854.
- Foord**, R., Taylor, I.A., Sedgewick, S.G., Smerdon, S.J. (1999). X-Ray structural analysis of the yeast cell cycle regulator Swi6 reveals variations of the ankyrin fold and has implications for the Swi6 function. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 157-165.
- Garner**, C. C., Zhai, G., Gundelfinger, E.D., Ziv, N.E. (2002). Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* **25 (5)**, 243-251.
- Gorina**, S., Pavletisch, N.P. (1996). Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin- and SH3-domains of 53BP2. *Science* **274**, 1001-1005.

- Gundelfinger**, E.D., Dieck, S.T. (2000). Molekulare organisation of excitatory chemical synapse in the mammalian brain. *Naturwissenschaften* **87**, 513-523.
- Harris**, A., Morrow, J.S. (1990). Calmodulin and Calcium-dependant protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3009-3013.
- Harris**, K.M., Kater, S.B. (1994). Dendritic spines: cellular specialisations imparting both stability and flexibility to synapric function. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 341-371.
- Hayashi**, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J., C., Malinow, R. (2000). Driving AMPA receptors into synapse by LTP and CaMK II: requirement of GluR1 and PDZ-domain interaction. *Science* **287**, 2262-2267.
- Hirao**, K., Hata, Y., Ide, N. Takeuchi, M. Irie, M., Yao, I., Deguchi, M., Toyoda, A., Sudhof, T.C. And Takai, Y. (1998). A novel multiple PDZ domain-containing molecule interacting with NMDA-receptors and neuronal cell adhesion proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 21105-21110.
- Hosokawa**, T., Bliss, T.V., Fine, A. (1992). Persistence of individual dendritic spines in living brain slices. *NeuroReport* **3**, 477-480.
- Irie**, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T.W., Sudhof, T. C. (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* **277**, 1511-1515.
- Jakob**, M. D., Harrison, S.C. (1998). Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* **95**, 749-758.
- Kaech**, S., Brinkhaus, H. Matus, A.(1999). Volatile anesthetics block actin-based motility in dendritic spines. *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96** 10433-10437.
- Kennedy**, M. B. (1993). The postsynaptic density. *Curr. Opin. Neurobiol.* **3**, 732-737.
- Kennedy**, M.B. (1997). The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci.* **20** (6), 264-268.
- Kennedy**, M.B.(2000). Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* **290**, 750-753.
- Kim**, E., Naisbitt, S., Hsueh, Y.P., Rao, A. Rothschild, A., Craig, A.M. Sheng, M. (1997). GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of clustering molecules. *J. Cell Biol.* **136**, 669-678.
- Kim**, J.H., Liao, D., Lau, L.F., Haganir, R.L. (1998). SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95 SAP90 protein family. *Neuron* **20**, 683-691.
- Kornau** H.C., Schenker L.T., Kennedy M.B., Seeburg P.H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science.***269**(5231):1737-40.
- Kim**, C.H. and Lisman, J.E. (1999). A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. *J. Neurosci.* **19**, 4314-4324.

- Kreienkamp**, H.J., Zitzer, H., Gundelfinger, E. D., Richter, D., Böckers, T.M. (2000). The Calcium-independent receptor for alpha-latrotoxin from human and rodent brains interacts with members of the ProSAP/SSTRIP/Shank family of multidomain protein. *J. Biol. Chem.* **42**, 32387-32390.
- Landis**, D.M., Hall, A.K., Weinstein, L., Reese, T.S. (1988). The Organisation of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapses. *Neuron* **1**, 201-209.
- Landis**, D.M. D. and Reese T.S.(1983). Cytoplasmic organisation in cerebellar dendritic spines. *J. Cell Biol.* **97**, 169-1178.
- Lim**, S., Naisbitt, S. Yoon, J., Hwang, J.I., Suh, P.G., Sheng, M. and Kim, E. (1999). Characterisation of the Shank family of synaptic proteins, multiple genes, alternative splicing and differential expression in brain and development. *J. Biol. Chem.* **274**, 29510-29528.
- Lim** S., Sala C, Yoon J, Park S, Kuroda S, Sheng M, Kim E. (2001). Sharpin, a novel postsynaptic density protein that directly interacts with the shank family of proteins. *Mol Cell Neurosci.* **17**(2),385-97.
- Lin**, J.W., Wyszynski, M., Madhavan, R., Sealock, R., Kim, J.U. (1998). Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants of NMDA-receptors subunits NR1. *J. Neurosci* **18**, 2017-2027.
- Lux**, S.E. John, K.M., Bennett, V. (1990). Analysis of cDNA from human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue differentiation and cell cycle control proteins. *Nature* **344**, 36-42.
- Lynch**, G., Baudry, M. (1984).The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science* **224**, 1057-1063.
- Malenka**, R.C., Nicoll, R.A. (1997). Long-term potentiation- a decade of progress ? *Neuron* **19**, 473-476.
- Man**, Y.H., Lin, J.W., Ju, W.H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L.E., Sheng, M., Wang, Y.T. (2000). Regulation of AMPA receptors-mediated synaptic transmission by clathrin-dependant receptor internalisation. *Neuron* **25**, 649-662.
- Michaely**, P., Bennett,V. (1990) *Trends Cell Biol.* **2**, 127-129.
- Murase**, S., Schuman, E.M. (1999). The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 549-553.
- Nakayama**, A.Y., Harms, M.B., 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.
- Nimchinsky**, E.A., Sabatini, B.L., Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 313-353.
- Naisbitt**, S., Kim, E., Weinberg, R.J., Rao, A., Yang, F.C., Craig, A.M. and Sheng, M. (1997). Characterisation of guanylate kinase-associated protein, a postsynaptic density

protein at excitatory synapses that interacts directly with postsynaptic density 95/synapse associated protein 90. *J. Neurosci.* **17**, 5687-5696.

**Naisbitt**, S., Kim, E., Tu, J.C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R.J., Worley, P.F. 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.

**Nesslinger**, N.J., Gorski, J.L., Kurczynski, T.W., Shapira, S.K., Siegel-Bartelt, J., Dumanski, J.P., Cullen, R.F., French, B.N., McDermid, H. (1994). Clinical cytogenetic and molecular characterisation of seven patients with deletion of chromosome 22q 13.3. *Am. J. Hum. Genet.* **54**, 464-472.

**Obar**, R.A., Collins, C.A., Hammerback, J.A., Shpetner, H.S., Vallee, R.B. (1990). Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature* **347**, 256-261.

**Niethammer**, M., Valtschanoff, J.G., Kapoor, T.M., Allison, D.W., Weinberg, R.J. (1998). CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *Neuron* **20**, 693-707.

**Nishimune**, A., Isaac, J.T., Molnar, E., Noel, J., Nash, S.R., (1998). NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* **21**, 87-97.

**Okamoto**, P.M., Gamby, C., Wells, D., Fallon, J., Valle, R.B. (2001). Dynamin isoform-specific interaction with the Shank/ProSAP scaffolding proteins of the postsynaptic density and actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **276** (51), 48458-48465.

**Pawson**, T., Scott, J.D. (1997). Signaling through scaffolding, anchoring and adapter proteins. *Science* **278**, 2075-2080.

**Rosenmund**, C., Westbrook, G.L. (1993). Calcium-induced actin depolymerisation reduces NMDA channel activity. *Neuron* **10**, 805-814

**Sala**, C., Piech, V., Wilson, N.R., Passafaro, M., Liu, G., Sheng, M. (2001). Regulation of dendritic spines morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* **31**, 115-130.

**Shelley**, H. (2000). Actin and the agile spine: how and why do dendritic spines dance? *Trends Neurosci.* **23**, 141-146.

**Sedgwick**, S.G., Taylor, I.A., Adam, A.C., Spanos, A., Howell, S., Morgan, B.A., Treiber, M.K., Kanuga, N., Banks, G.R., Foord, R., Smerdon, S.J. (1998). Structural and functional architecture of the yeast cell-cycle transcription factor Swi6. *J. Mol. Biol.* **281**, 763-775.

**Sedgwick**, S.G., Smerdon, S.J. (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interaction on a common structural framework. *Trends in Biological Science* **24**, 311-316.

**Prasad**, C., Prasad, A.N., Chordiker, B.N., Lee, C., Dawson, A.K., Jocelyn, L.J., Chudley, A.E. (2000). Genetic evaluation of pervasive developmental disorders: the terminal 22q13 deletion syndrome may represent a recognizable phenotype. *Clin. Genet.* **57**, 103-109.

- Pursglove**, S.E., Mulhern, T.D., Mackay, J.P., Hinds, M.G., Booker, G.W. (2002). The solution structure and intramolecular association of the Tec-kinase SRC homology 3 domain. *J. Biol. Chemistry* **277**(1), 755-762.
- Shpetner**, H.S., Vallee, R.B. (1992). Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature* **355**, 733-735.
- Sheng**, M., Pak, D. (2000a). Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 755-778.
- Sheng**, M., Kim, E. (2000). The Shank family of scaffold proteins. *J. Cell. Sci* **113**, 1851-1856.
- Shin**, H., Hsueh, Y.P., Yang, F.C., Kim, E., Sheng, M. (2000). An intramolecular interaction between src homology 3 domain and guanylate kinase like domain required for channel clustering by PSD-95/SAP90. *J. Neurosci.* **20**(10) 3580-3587.
- Siman**, R.J., Noszek, J.C., Kegerise, C. (1989). Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J. Neurosci.* **9**, 1579-1590.
- Song**, I., Kamboj, S., Xia, J., Dong, H., Liao, D. (1998). Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA-receptors. *Neuron* **21**, 393-400.
- Srivastava**, S., Osten, P., Vilim, F., Khatry, L., Inman, G. (1998). Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptors binding protein ABP. *Neuron* **21**, 581-591.
- Takeuchi**, M., Hata, Y., Hirao, K., Toyoda, A., Irie, M., Takai, Y. (1997). SAPAPs a family of PSD-95/SAP 90-associated proteins localised at postsynaptic density. *J. Biol. Chem* **272**, 11943-11951.
- Tezuka**, T., Umemori, H., Akiyama, T., Nakanishi, S., Yamamoto, T. (1999). PSD-95 promotes Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of the NMDA-receptor subunit NR2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 435-440.
- Tiedge**, H., Brosius, J. (1996). Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J. of Neurosci.* **16** (22), 7171-7181.
- Torres**, R., Firestein, B.L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E.N. (1998). PDZ proteins bind, cluster and synaptically colocalize with the Eph receptors and their ligands. *Neuron* **21**, 1453-1463.
- Tu**, J.C., Xiao, B., Yuan, J.P., Lanahan, A.A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D.J., Worley, P.F. (1998). Homer binds a novel proline rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3-receptors. *Neuron* **21**, 717-726.
- Tu**, J.C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* **23**, 583-592.
- Wang**, Y.T., Linden, D.J. (2000). Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin mediated endocytosis. *Neuron* **25**, 635-647.

- Wang, Y.T., Salter, M.W. (1994).** Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature* **369**, 233-235.
- Watt, J.L., Oslon, I.A., Johnston, A.W., Ross, H.S., Couzin, D.A., Stephen, G.S. (1985).** A familial pericentric inversion of chromosome 22 with a recombinant subject illustrated a pure partial monosomy. *J. Med. Genet.* **22**, 283-287.
- Weed, S.A., Du, Y., Parsons, J.T. (1998).** Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by small GTPase Rac I. *J. Cell. Sci.* **111**, 2433-2443.
- Westphal, R.S., Tavalin, S.J., Lin, J.W., Alto, N.M., Iain D.,C. (1998).** Regulation of NMDA- receptor by an associated phosphatase kinase signaling complex. *Science* **285** (5424), 93-95.
- Wilson, C.J., Groves, P.M., Kitai, S.T., Linder, J.C. (1983)** Three-dimensional structure of dendritic Spines in the rat neostriatum. *J. Neurosci.* **3**(2), 383-388.
- Wechsler A. and Teichberg, V.I. (1998)** Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *Embo J.***17** (14), 3931-3939.
- Wong, A.C.C., Ning, Y., Flint, J., Clark, K., Dumanski, J.P., Ledbetter, D.H., McDermid, H. (1997).** Molecular characterisation of a 130 kb terminal microdeletion at 22q in a child with mild mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 113-120.
- Wu, H., Parsons, J.T. (1993).** Cortactin, an 80/85 kDa pp60 src substrate, is a filamentous actin binding protein enriched in the cell cortex. *J. Cell Biol.* **120**, 1417-1426.
- Wu, H., Reisner, C., Kuhlendahl, S., Coblenz, B., Reuver, S., Kindler, S., Gundelfinger, E.D., Garner, C.C. (2000).** Intramolekulare interaction regulates SAP 97 binding to GKAP. *Embo Journal* **19**(21), 5740-5751.
- Wyszynski, M., Lin, J., Rao, A., Nigh, E., Beggs, A.H. (1997).** Competitive binding of alpha actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* **385**, 439-442.
- Wyszynski, M., Kim, E., Yang, F.C., Sheng, M. (1998b).** Biochemical and immunocytochemical characterisation of GRIP a putative AMPA receptor anchoring protein in rat brain. *Neuropharm* **37**, 1335-1344.
- Wyszynski, M., Valtschanoff, J.G., Nasibitt, S., Dunah, A.W., Kim, E. (1999).** Association of AMPA receptor with a subset of glutamate receptors interacting proteins in vivo. *J. Neurosci.* **19**, 6528-6537.
- Xia, J., Zhang, X., Staudinger, J., Huganir, R.L. (1999).** Clustering of AMPA receptors by the synaptic containing protein PICK I. *Neuron* **22**, 179-187.
- Xiao, B., Tu, J.C., Petralia, R.S., Yuan, J.P., Doan, A., Breder, C.D., Ruggiero, A., Lanahan, A.A., wenthold, R.J. worley, P.F. (1998).** Homer regulates the association of glutamate receptors with multivalent complexes of homer related synaptic proteins. *Neuron* **21**, 707-716.

**Yao, I., Hata, Y., Hirao, K., Deguchi, M., Ide, N., Takeuchi, M., Takai, Y. (1999).** Synamon a novel neuronal proteins interactiong with synapse-associated protein 90/Postsynaptic density associated protein 95. *J. Biol. Chem.* **274**, 27463-27466.

**Zitzer, H., Hönck, H. H., Bächner, D., Kreienkamp, H.J. (1999a).** Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. *J. Biol. Chem.* **274**, 32997-33001.

**Zitzer, H., Richter, D., Kreienkamp H. J. (1999b).** Agonist-dependant interaction of the rat somatostatin receptor subtypes 2 with cortactin binding protein 1. *J. Biol chem.* **274**, 18153-18156.

## **Danksagungen**

Herrn Prof. Dr. D. Richter danke ich für die interessante Themenstellung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ich bedanke mich für sein stetes Interesse an dieser Arbeit, und die viele anregenden Gesprächen.

Bei Herrn Dr. Kreienkamp bedanke ich mich ganz herzlich für die gute Betreuung dieser Arbeit, sein großes Verständnis und unglaubliche Geduld, seine ständige Diskussionsbereitschaft und gute Laune und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre in seiner Arbeitsgruppe.

Hans-Hinrich Hönck und Chong Wee Liew möchte ich auch für die Durchführung einiger Klonierungsarbeiten und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Dr. F. Buck und dem ganzen Team des Servicelabors, danke ich für die Synthese der Oligonukleotide und Durchführung der Sequenzierarbeiten.

Bei der ganzen Arbeitsgruppe möchte ich mich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meinen Freunden Ruth-Maria Leiber und Dr. Volker Pfeiffer die mir bei der Durchsicht des Manuskripts bereitwillig geholfen haben.

Meiner Familie und ganz besonders meiner Mutter danke ich für ihre ständige Unterstützung, ohne die ich nie geworden wäre was ich bin.

Dem lieben Gott danke ich für die Kraft, Ausdauer, Geduld und den Erfolg, die Er mir während meiner Arbeit geschenkt hat. Bei Ihm konnte ich immer Trost und Frieden bei Schwierigkeiten mit den Menschen und der Arbeit finden, und ohne Ihn hätte ich es nie geschafft.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name Marie-Germaine Mameza  
Geburtsdatum 23.06.1971  
Geburtsort Dschang/Kamerun

### **Schulbildung**

1976 - 1984 Grundschule in Nkongsamba und Dschang  
1984 - 1991 Gymnasium in Nkongsamba und Dschang  
Juni 1991 Abitur

### **Studium**

1992 - 1993 Sprachausbildung in Chemnitz  
Okt. 1993 - Jan. 2000 Biochemie Studium an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen  
Okt. 1997 Diplomvorprüfung  
Mai 1999 Mündliche Diplomhauptprüfung  
Mai 1999 - Dec. 1999 Diplomarbeit am Max-Plank-Institut für  
Membranbiochemie unter der Leitung von Prof. P.  
Overath: Mechanismus der selektiven Toxizität von 10-  
(Propoxydecanoat (O-11)) auf *T. brucei* 221  
April 2000 – Feb. 2003 Promotion bei Prof. Dr. D. Richter, Institut für  
Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Universität  
Hamburg: Wechselwirkungen postsynaptischer Proteine  
aus Mensch und Ratte