



Universität Hamburg

**Expression und Funktion der
RING-Finger Protein-Familie RNF6/RLIM
während der Neuronalentwicklung in
*Mus Musculus***

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Biologie der
Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften an der
Universität Hamburg**

vorgelegt von

Baris Tursun

**Hamburg
November 2005**

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. I. BACH
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. E. PRATJE
Tag der Disputation: 25. November 2005

Hamburg, den 11. November 2005



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Für meine Familie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Baris Tursun, in Kenntnis der Strafbarkeit einer falschen Eidesstattlichen Erklärung, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich vor dieser Promotion keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Hamburg, den 13.10.2005

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Februar 2002 und August 2005 unter Anleitung von PD Dr. Ingolf Bach im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg durchgeführt.

Erster Gutachter: PD. Dr. Ingolf Bach
Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Elke Pratje

Teile der Dissertation wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Tursun,B., Schluter,A., Peters,MA., Viehweger,B., Ostendorff,HP., Soosairajah,J., Drung,A., Bossenz,M., Johnsen,S.A., Schweizer,M., Bernard,O., Bach,I.

The ubiquitin ligase Rnf6 regulates local LIM kinase 1 levels in axonal growth cones.
Genes Dev. 2005 Oct 1;19(19):2307-19.

Tursun,B., Ostendorff,HP., Cornils,K., Schluter,A., Drung,A., Güngör,C., Bach,I.
Dynamic expression of LIM cofactors in the developing mouse neural tube.
Dev Dyn., im Druck.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 1 |
| I. Einleitung | 3 |
| I.1 Das Ubiquitin-Proteasom (UP) System | 3 |
| I.1.1 Enzyme der Ubiquitinierungs-Reaktion | 5 |
| I.1.2 Das 26S Proteasom | 8 |
| I.1.3 Das UP-System greift zentral in multiple Funktionen der Zelle ein | 9 |
| I.2 LIM-Proteine | 11 |
| I.2.1 LIM-Proteine des Zellkerns | 12 |
| I.2.2 LIM-Proteine des Zytoplasmas | 15 |
| I.2.3 LIM-Kinasen sind katalytische LIM-Proteine des Zytoplasmas | 17 |
| I.3 Hippocampale Neuronen als Modellsystem | 19 |
| I.4 Die RING-Finger Proteine RLIM und RNF6 | 21 |
| I.5 Zielsetzung der Arbeit | 23 |
| II. Material und Methoden | 24 |
| II.1 Material | 24 |
| II.1.1 Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen | 24 |
| II.1.2 Vektoren | 24 |
| II.1.3 Lösungen und Medien | 25 |
| II.1.4 Zelllinien | 26 |
| II.1.5 Bakterienstämme | 26 |
| II.1.6 Zellkulturmedien | 26 |
| II.1.7 DNA-Oligonukleotide | 27 |
| II.1.8 Doppelsträngige RNA-Oligonukleotide | 28 |
| II.1.9 Antikörper | 28 |
| II.1.9.1 Primäre Antikörper | 28 |
| II.1.9.2 Sekundäre Antikörper und HRP-Portein A | 29 |
| II.2 Methoden | 30 |
| II.2.1 Arbeiten mit DNA und RNA | 30 |
| II.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse | 30 |
| II.2.1.1.1 Mini-Präparation | 30 |
| II.2.1.1.2 Maxi-Präparation | 31 |
| II.2.1.3 Phenol-/Chloroform-Extraktion | 31 |
| II.2.1.4 Ethanol-fällung | 31 |
| II.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (<i>PCR</i>) | 31 |
| II.2.1.6 Klonierung von <i>PCR</i> -Fragmenten | 32 |
| II.2.1.7 Elektrophorese in Agarosegelen | 33 |
| II.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 33 |

| | |
|---|-----------|
| II.2.1.9 Bestimmung von DNA-Konzentrationen | 33 |
| II.2.1.10 Restriktionsverdau | 33 |
| II.2.1.11 Präparation von Vektoren | 34 |
| II.2.1.12 Dephosphorylierungen von 5'-Enden | 34 |
| II.2.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren | 34 |
| II.2.1.14 Sequenzierung von DNA | 34 |
| II.2.1.15 Herstellung kompetenter Bakterien | 35 |
| II.2.1.16 Transformation von Bakterienzellen | 35 |
| II.2.1.17 Verwendung doppelsträngiger RNA-Oligonukleotide | 35 |
| II.2.2 Proteinbiochemische Arbeiten | 36 |
| II.2.2.1 Expression von Proteinen in Bakterien | 36 |
| II.2.2.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen | 36 |
| II.2.2.3 Aufreinigung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen | 37 |
| II.2.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford | 37 |
| II.2.2.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 37 |
| II.2.2.6 Färbung von SDS-PAGE-Gelen mit Coomassie Brilliant Blau | 38 |
| II.2.2.7 Western-Blot | 38 |
| II.2.2.7.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen | 38 |
| II.2.2.7.2 Ponceaurot-Färbung der Nitrozellulosemembran | 38 |
| II.2.2.7.3 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen | 38 |
| II.2.2.8 Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen <i>in vitro</i> | 39 |
| II.2.2.9 <i>In Vitro</i> -Ubiquitinierungen | 39 |
| II.2.2.10 Koimmunpräzipitation | 39 |
| II.2.3 Methoden der Zellkultur | 40 |
| II.2.3.1 Primärkultur von hippocampalen Neuronen | 40 |
| II.2.3.2 Kultur von Säugerzellen | 40 |
| II.2.3.3 Lagerung von Säugerzellen | 41 |
| II.2.3.4 Transfektion primärer hippocampaler Neuronen mit Lipofectamine® 2000 | 41 |
| II.2.3.5 Transfektion der Säugerzellen mit Polyethanolimin (PEI) | 41 |
| II.2.3.6 Immunocytochemische Detektion in primären Neuronen | 42 |
| II.2.3.7 Längenmessung der Axone von transfizierten hippocampalen Neuronen | 42 |
| II.2.3.8 Applikation des Proteasom-Inhibitors MG132 | 43 |
| II.2.4 Arbeiten mit Gewebeschnitten | 43 |
| II.2.4.1 Kryoschnitte von Maus-Gewebe | 43 |
| II.2.4.2 Vibratomschnitte von Maus-Gewebe | 43 |
| II.2.4.3 Immunhistochemie mit Kryoschnitten | 44 |
| II.2.4.4 Immunhistochemie mit Vibratomschnitten | 44 |
| III. Ergebnisse | 46 |
| III.1 Expression von RLIM im Neuralrohr von Mausembryonen | 46 |
| III.1.1 Expressionsprofil von RLIM und CLIM in der frühen Mausentwicklung | 46 |
| III.1.2 Expression von RLIM und CLIM in E12-12,5 Mausembryonen | 48 |
| III.1.3 Kolokalisation von RLIM mit CLIM und Lhx3 in Zellen des Neuralrohres | 50 |
| III.2 Expression und Funktion von RNF6 in Neuronen der Maus | 51 |
| III.2.1 Vergleich der Expression von RNF6 und RLIM in E13 Mausembryonen | 51 |
| III.2.1.1 Expression von RNF6 und RLIM im Neuralrohr von E13 Mausembryonen | 51 |

| | |
|---|------------|
| III.2.1.2 RNF6 ist in axonalen Projektionen des ventralen Neuralrohres lokalisiert | 53 |
| III.2.2 Expression von RNF6 in kultivierten Hippocampus-Neuronen | 54 |
| III.2.3 RNF6 reguliert das Axonwachstum hippocampaler Neuronen | 55 |
| III.2.3.1 Applikation von doppelsträngigen RNA-Oligonukleotiden | 55 |
| III.2.3.2 Expression von GFP-Fusionsproteinen in hippocampalen Neuronen | 58 |
| III.2.4 RNF6 interagiert mit LIMK1 <i>in vivo</i> | 60 |
| III.2.5 Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 in Neuronen | 62 |
| III.2.6 Proteasomale Regulation der LIMK1-Proteinmengen in Neuronen | 64 |
| III.2.6.1 Untersuchung der LIMK1-Proteinkonzentration nach Proteasom-Inhibition | 64 |
| III.2.6.2 Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 nach Inhibition des Proteasoms | 66 |
| III.2.7 Expression von UbcH5 in kultivierten hippocampalen Neuronen | 67 |
| III.2.8 RNF6 vermittelt die Polyubiquitinierung von LIMK1 <i>in vitro</i> | 68 |
| III.2.9 RNF6 reguliert LIMK1-Proteinmengen in axonalen Wachstumskegeln | 69 |
| III.2.9.1 Änderung der LIMK1-Proteinmengen in Neuronen durch RNAi gegen RNF6 | 70 |
| III.2.9.2 Expression von endogener LIMK1 und GFP-RNF6-Fusionsproteinen in axonalen Wachstumskegeln | 72 |
| III.2.10 Regulation der LIMK1-Proteinmengen durch RNF6 während der Entwicklung axonaler Projektionen | 73 |
| III.2.10.1 Applikation von siRNA zur Reduzierung von LIMK1-Proteinmengen | 73 |
| III.2.10.2 Messung der Axon-Längen nach Transfektion mit siRNA und Plasmid-DNA | 75 |
| III.2.10.3 Einfluss von RNF6 auf das Aktin-Zytoskelett in Wachstumskegeln | 83 |
| | |
| IV. Diskussion | 86 |
| IV.1 Regulation von CLIM durch RLIM im Neuralrohr der Mausembryonen | 86 |
| IV.2 Expression von RNF6 | 88 |
| IV.3 RNF6 interagiert mit LIMK1 und vermittelt dessen Polyubiquitinierung | 90 |
| IV.4 Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 in axonalen Wachstumskegeln | 91 |
| IV.5 RNF6 reguliert LIMK1-Proteinmengen in axonalen Wachstumskegeln während der Entwicklung der Axone | 92 |
| IV.6 LIMK1 und RNF6 sind in menschliche Krankheiten involviert | 98 |
| IV.7 Ubiquitin-Ligasen können verschiedene Substrat-Proteine ubiquitinieren | 100 |
| | |
| V. Anhang | 102 |
| V.1 Messergebnisse der Axon-Längen | 102 |
| V.2 Abkürzungsverzeichnis | 107 |
| | |
| VI. Literaturverzeichnis | 110 |
| | |
| Danksagung | 121 |

Zusammenfassung

Die Familie der LIM-Proteine ist eine sehr diverse Gruppe von sowohl zytoplasmatischen als auch nukleären Proteinen. Ihnen gemeinsam ist die LIM-Domäne, die aus zwei tandemartig wiederholten Zink-Finger-Strukturen bestehen und Protein-Protein-Interaktionsdomänen darstellen. Durch das Vorhandensein von häufig mehr als einer LIM-Domäne können die LIM-Proteine Multiproteinkomplexe mit verschiedenen Proteinen bilden. Zu den Vertretern im Zellkern gehören die LIM-Homöodomänen-Proteine (LIM-HD), die eine Funktion als Transkriptionsfaktoren besitzen, sowie die *LIM-only* (LMO) Proteine, die ebenfalls, wenn auch indirekt, an der Regulation der Genexpression beteiligt sein können. Die zytoplasmatischen LIM-Proteine spielen meist eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts. So ist die LIM-Kinase 1 (LIMK1) an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt und spielt in Neuronen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Axone.

Im Ubiquitin-Proteasom (UP) System werden Proteine durch die kovalente Modifizierung mit Ubiquitin für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert. Das 26S Proteasom ist ein großer Komplex bestehend aus vielen Proteinen, der in der Lage ist, ubiquitinierte Substrat-Proteine zu erkennen und diese daraufhin abzubauen. Anhand der Ubiquitin-Ligase RLIM übt das UP-System einen regulativen Einfluss auf die LIM-HD-Transkriptionsfaktoren aus. RLIM ist eine RING-Finger Ubiquitin-Ligase mit der Fähigkeit CLIM-Proteine, die als Kofaktoren für die Aktivität der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren unerlässlich sind, für den proteasomalen Abbau zu markieren.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollten zuerst die Expressionsprofile von CLIM und RLIM sowie des mit RLIM verwandten RING-Finger Proteins RNF6 während der Mausentwicklung ermittelt werden. Diese Untersuchungen konzentrierten sich auf das Neuralrohr, weil dort LIM-HD-Proteine essentielle Funktionen für die korrekte Entwicklung neuronaler Zellpopulationen übernehmen. Es stellte sich heraus, dass sowohl das Expressionsprofil als auch die Expressionsdynamik von RLIM und CLIM während der Entwicklung des Neuralrohres ähnlich ist. In Zellen des ventralen Bereichs des Neuralrohres ist RLIM mit CLIM und dem LIM-HD-Protein Lhx3 kolokalisiert. Hier spielen LIM-HD-Proteine wie Lhx3 oder Isl1 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung bestimmter Neuronentypen. Daher scheint auch RLIM an der Entwicklung dieser Zelltypen über die Regulation der Proteinmengen von LIM-HD-Kofaktoren beteiligt zu sein.

Der Vergleich des Expressionsprofils von RLIM und RNF6 im Neuralrohr zeigte, dass RNF6 entgegen unseren Erwartungen ein zytoplasmatisches Protein ist. RNF6 konnte in axonalen Projektionen von Neuronen nachgewiesen werden, wo es insbesondere in den Wachstumskegeln lokalisiert ist. Es konnte an kultivierten hippocampalen Primär-Neuronen gezeigt werden, dass RNF6 in Wachstumskegeln den proteasomalen Abbau des zytoplasmatischen LIM-Proteins LIMK1 vermittelt. Die Untersuchungen identifizierten ausserdem komplementäre Funktionen von RNF6 und LIMK1 für das Axonwachstum, die darauf hinweisen, dass die Regulation der LIMK1-Proteinmengen durch RNF6 im direkten Zusammenhang mit der Entwicklung der Axone steht. Diese Ergebnisse deckten sich mit den Beobachtungen anderer Gruppen, die bereits zuvor einen Einfluss von LIMK1 auf das Axonwachstum zeigen konnten. So konnte mit der Ubiquitin-Ligase RNF6 erstmals eine konkrete Rolle für das Ubiquitin-Proteasom System während der Entwicklung axonaler Projektionen beschrieben werden.

I. Einleitung

Jede Zelle eines Organismus muss die Aktivität, Lokalisation und Menge seiner Proteine beständig regulieren, um sich bestimmten äußeren Bedingungen anzupassen oder Abläufe definierter zellulärer Programme durchzuführen. Die Regulation der Protein-Aktivitäten bzw. -Mengen ist für den korrekten Ablauf fast aller zellulären Prozesse wie Zytokinese, Differenzierung, Stoffwechsel oder Apoptose unerlässlich. Proteine können durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen oder durch allosterisch wirkende Moleküle in ihrer Aktivität gehemmt werden. Auch die Änderung der Lokalisation eines Proteins in Bezug auf dessen Wirkungsstätte stellt eine Maßnahme zur Regulation der Aktivität dar. Eine weitere Möglichkeit bietet die posttranslationale Modifikation von Proteinen, wobei bestimmte Aminosäuren des Proteins mit spezifischen Signalen markiert werden. Bei solchen Markierungen handelt es sich in der Regel um kovalente Modifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Sumoylierung oder auch Ubiquitinierung. Letztere spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation zellulärer Proteinkonzentration durch den spezifischen Abbau von Proteinen. Bei dieser Art der selektiven Degradation zellulärer Proteine in eukaryotischen Zellen wird das Substrat-Protein durch Modifikation mit mehreren Ubiquitin-Molekülen markiert und hochkomplexen Proteolysemaschinen, den so genannten Proteasomen, zugeführt.

I.1 Das Ubiquitin-Proteasom (UP) System

Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein, das innerhalb der eukaryotischen Spezies hochkonserviert ist. Es wird in Form eines Fusionsproteins, das aus mehreren hintereinander angeordneten Ubiquitin-Einheiten besteht, translatiert (Ozkaynak *et al.*, 1984). Diese Vorläuferproteine werden durch Ubiquitin-spezifische Endoproteasen in die einzelnen Ubiquitine gespalten. Die Rolle von Ubiquitin beim selektiven Protein-Abbau wurde erstmals in einem *in vitro* System aus Retikulozytenextrakt gezeigt (Schlesinger *et al.*, 1975). In diesem System wird Ubiquitin kovalent an Proteine gebunden, die dadurch für den Abbau markiert werden. Die Übertragung von Ubiquitin-Molekülen auf ein Substrat-Protein erfordert das sequentielle Wirken von drei verschiedenen Enzymklassen (Abb.I.1), die als E1, E2 und E3 bezeichnet werden (Hershko und Ciechanover, 1992). Zunächst wird Ubiquitin

durch das Ubiquitin-Aktivierende-Enzym (E1) in einem ATP-abhängigen Schritt aktiviert. Dabei entsteht als Zwischenprodukt ein C-terminal adenyliertes Ubiquitin, welches dann mit einem konservierten Cystein-Rest des E1-Enzyms eine Thioesterbindung eingeht (Hershko, 1996). Im zweiten Schritt der Reaktionskaskade wird das Ubiquitin vom E1 auf das Cystein im aktiven Zentrum des Ubiquitin-Konjugierenden-Enzyms E2 (oder auch UBC, *ubiquitin conjugating enzyme*) übertragen (Jentsch, 1992). Für die Anheftung des Ubiquitins an das Substrat-Protein ist die Anwesenheit von E3-Proteinen, den Ubiquitin-Ligasen, notwendig. Sie vermitteln die Spezifität der Substrat-Ubiquitinierung. Sukzessive Konjugation mit Ubiquitin-Molekülen führt zu multi- oder polyubiquitinierten Substrat-Proteinen, die vom Proteasom spezifisch erkannt und abgebaut werden (Abb.I.1).

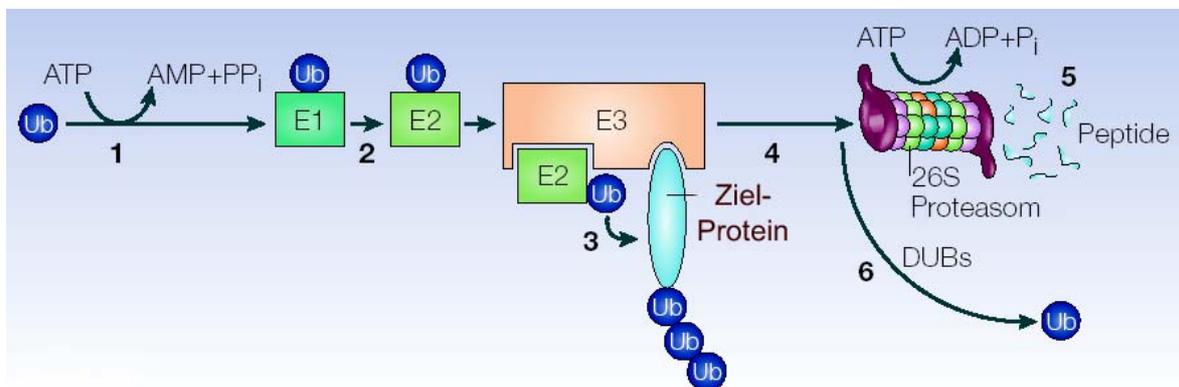


Abb.I.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System. Ubiquitin wird durch das Ubiquitin-Aktivierende-Enzym E1 ATP-abhängig aktiviert (1) und anschließend auf das Ubiquitin-Konjugierende-Enzym E2 übertragen (2). In den meisten Fällen bindet der E2-Ubiquitin-Komplex und das Substrat-Protein spezifisch an eine bestimmte Ubiquitin-Ligase E3, wodurch Ubiquitin auf das Substrat-Protein übertragen werden kann (3). Durch die sukzessive Konjugation von Ubiquitin-Molekülen entstehen Polyubiquitin-Ketten, die das Substrat-Protein für den Abbau durch das Proteasom markieren (4). Das Substrat wird zu kurzen Peptiden prozessiert (5), während das wiederverwendbare Ubiquitin durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs) freigesetzt werden (6) (modifiziert nach Welchmann *et al.*, 2005).

Polyubiquitin kann durch Verkettung anhand der unterschiedlichen Lysine K11, K29, K48 und K63 des Ubiquitins entstehen. Für den proteasomalen Abbau sind Ketten mit mindestens vier Ubiquitin-Molekülen, die über das K48 verkettet sind, relevant. Die über K29 verlaufende Ubiquitinierung ist weniger gut charakterisiert. Sie ist für den Abbau von Ubiquitin-Fusionsproteinen wichtig. Diese werden mit einem initialen Ubiquitin-Molekül modifiziert, welches eine K29-Verknüpfung aufweist. Diese Ubiquitinierung ist für den

proteasomalen Abbau nicht ausreichend, aber eine notwendige Voraussetzung für die nachfolgende UFD2 (*ubiquitin fusion degradation*) katalysierte Ubiquitinierung, die über das K48 verläuft und somit das Substrat-Protein zum Abbau markiert (Johnson *et al.*, 1995, Koegl *et al.*, 1999). Polyubiquitinierung anhand der übrigen Lysine oder auch Monoubiquitinierung führt zu anderen funktionellen Konsequenzen. Ubiquitine die über Lysin-63 verbunden sind, scheinen eine wichtige Abbau-unabhängige Rolle in diversen Prozessen wie Endozytose, Stressantwort und DNA-Reparatur zu spielen (Soetens *et al.*, 2001; Spence *et al.*, 1995). Die Polyubiquitinierung anhand der K63-Verknüpfung der DNA-Polymerase-Ringklemme PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) hat eine wichtige Funktion in der DNA-Reparatur. Diese Reaktion wird durch das Zusammenspiel des MMS2/UBC13-Komplexes mit den RING-Finger-Proteinen RAD5 und RAD18 sowie dem E2-Enzym RAD6 katalysiert (Ulrich & Jentsch, 2000; Hoege *et al.*, 2002). Des Weiteren ist RAD6 in der Lage E3-unabhängig die Monoubiquitinierung der Histone H2A und H2B in höheren Eukaryoten zu katalysieren (Jentsch *et al.*, 1987). Es wird vermutet, dass diese Monoubiquitinierung einen Einfluss auf die Chromatin-Struktur hat und damit die Zugänglichkeit der Promotor-DNA für die Transkriptionsmaschinerie reguliert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung von Lysin-123 des Histons H2B ein Signal zur Methylierung von H3 darstellt, was wiederum weitere Modifikationen der Histone in die Wege leitet (Sun *et al.*, 2002; Dover *et al.*, 2002). Monoubiquitinierung spielt auch bei der Endozytose eine wichtige Rolle. Proteine, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, werden an zytoplasmatischen Domänen ubiquitiniert und durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen (Hicke, 2001; Rotin *et al.*, 2000). Das Ubiquitinsignal scheint die Internalisierung in primäre Endosomen zu unterstützen und die Proteine für den lysosomalen Abbau zu markieren (Lucero *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang wird die Aktivität des EPS15 Proteins, welches für die Knospung von Clathrin-Vesikeln zuständig ist, ebenfalls durch ein einzelnes Ubiquitin-Molekül reguliert (Hicke, 2001).

I.1.1 Enzyme der Ubiquitinierungs-Reaktion

Wie bereits erwähnt, ist in der Ubiquitinierungs-Kaskade das Wirken von drei Enzymklassen notwendig, die als E1, E2 und E3 bezeichnet werden. Bislang ist nur ein Vertreter der E1-Enzymklasse bekannt: UBA1 wurde erstmals aus Weizen kloniert (Hatfield *et al.*, 1990) und kurz darauf auch in der Hefe identifiziert (McGrath *et al.*, 1991). Homologe des UBA1 sind in

allen untersuchten eukaryotischen Spezies vorhanden und lebenswichtig. Es ist das einzige beschriebene E1-Protein mit der Fähigkeit Ubiquitin zu aktivieren.

Die E2-Enzymklasse besteht aus der Familie der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (UBC) mit mindestens elf verschiedenen Mitgliedern, die alle durch eine hochkonservierte UBC-Domäne gekennzeichnet sind. Sie enthält das aktive Zentrum mit dem Cystein, das die Thioesterbindung mit Ubiquitin eingeht. Je nach Vorhandensein weiterer Domänen werden die E2-Enzyme in verschiedene Kategorien unterteilt.

Während nur ein E1-Enzym bekannt ist und eine überschaubare Anzahl von UBC-Proteinen die E2-Enzymklasse bildet, gibt es eine sehr große Anzahl von E3-Enzymen. Anhand des Mechanismus der Ubiquitin-Übertragung vom E2 (UBC) auf das Substrat-Protein unterscheidet man verschiedene Klassen von E3-Ubiquitin-Ligasen. Die HECT-Ubiquitin-Ligasen sind durch ihre C-terminale HECT-Domäne (*homologous to E6-AP C-Terminus*) gekennzeichnet. Diese umfasst ca. 350 Aminosäuren mit einem konservierten Cystein-Rest, der durch das E2-Enzym mit Ubiquitin beladen wird (Scheffner *et al.*, 1995; Huibregtse *et al.*, 1995) und die katalytische Domäne zur spezifischen Ubiquitinierung des Substrat-Proteins darstellt (Abb.I.2.A). Das Ubiquitin-Molekül wird dabei über seinen C-terminalen Glycin-Rest durch eine Isopeptidbindung mit der ϵ -Aminogruppe eines spezifischen Lysins des Substrat-Proteins verknüpft (Jentsch, 1992). RING-Finger Ubiquitin-Ligasen (RING = *really interesting new gene*) sind durch ihr 40 bis 60 Aminosäuren umfassendes RING-Finger-Motiv charakterisiert. Es enthält 8 Zink-bindende Aminosäure-Reste, die insgesamt 2 Zn^{2+} -Ionen koordinieren. Befindet sich an der fünften Zn^{2+} -Koordinations-Stelle ein Histidin-Rest anstelle von Cystein, so wird von einem RING-H2-Finger gesprochen (Freemont, 2000). RING-Finger E3-Enzyme vermitteln die Ubiquitinierung des Substrat-Proteins ohne selbst eine Thioesterbindung mit Ubiquitin einzugehen. Durch die spezifische Erkennung und Bindung des Substrat-Proteins sowie des E2-Ubiquitin-Komplexes ermöglichen sie die direkte Übertragung des Ubiquitins vom E2 auf das Ziel-Protein (Abb.I.2.B). Des weiteren besitzen RING-Finger E3s auch die Fähigkeit zur Auto-Ubiquitinierung, wodurch sie sich selbst zum proteasomalen Abbau markieren können. Eine weitere Klasse von Ubiquitin-Ligasen bilden die multimeren RING-Finger Ubiquitin-Ligasen wie z.B. SCF (Skp1-CUL1-FBP) (Abb.I.2.C). SCF ist ein Multiproteinkomplex, der durch spezialisierte Untereinheiten zur Bindung des E2-Ubiquitin-Konjugats und des Substrat-Proteins gekennzeichnet ist. Die Rekrutierung des Ubiquitin-beladenen E2-Enzyms wird durch das RING-Finger Protein ROC (*regulator of cullins*) ermöglicht, welches mit Cullin-Proteinen (CUL) assoziiert ist (Ohta *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2001; Vodermaier, 2004). Die Substrat-Bindung des SCF wird durch

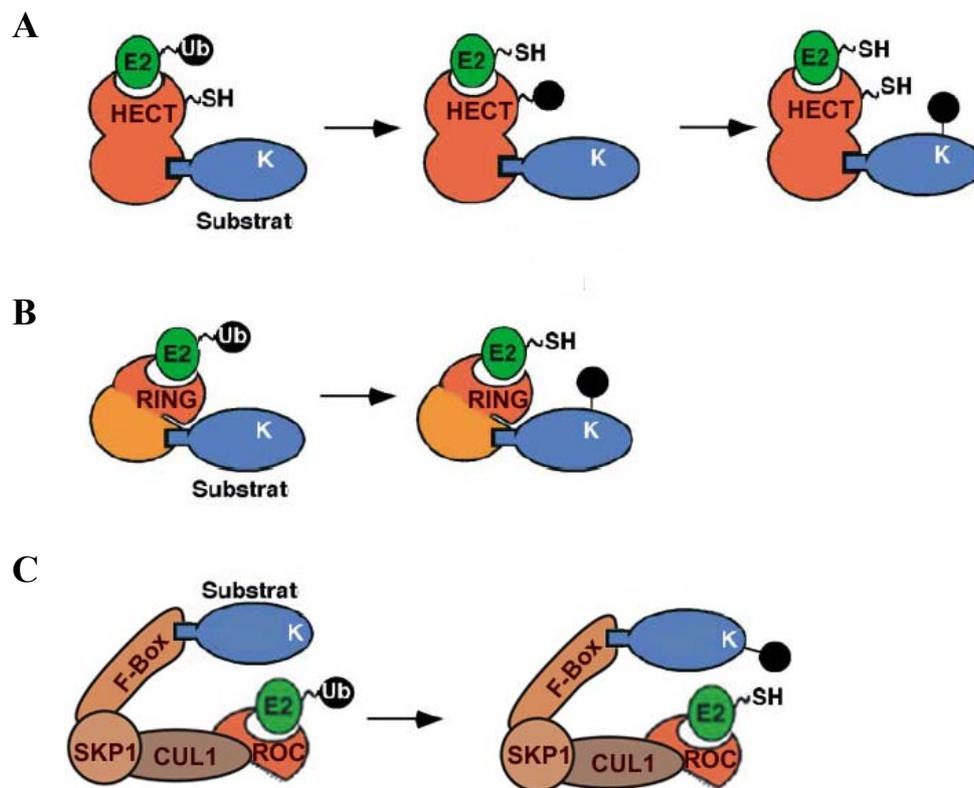


Abb.I.2 HECT- und RING-Finger Ubiquitin-Ligasen. (A) HECT Ubiquitin-Ligasen sind monomere Proteine, die spezifisch mit dem Substrat-Protein und dem Ubiquitin-beladenem E2-Enzym interagieren können. Die HECT-Domäne verfügt über einen konservierten Cytein-Rest, der durch das E2 mit Ubiquitin beladen wird und dieses auf das gebundene Substrat überträgt. (B) Monomere RING-Finger Ubiquitin-Ligasen binden ebenfalls spezifisch das Substrat-Protein und den E2-Ubiquitin-Komplex. Im Gegensatz zu HECT-E3s gehen RING-E3s keine Thioesterbindung mit Ubiquitin ein, sondern vermitteln direkt die Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat. (C) Multimere RING-Finger Ubiquitin-Ligasen wie das SCF (Skp1-CUL1-FBP) binden das Substrat-Protein über ein F-Box-Protein, welches über die Proteine SKP1 (*S-phase-kinase-associated protein-1*) und CUL1 mit ROC (*regulator of cullins*) assoziiert ist. Letzteres besitzt das RING-Finger-Motiv zur Bindung des Ubiquitin-beladenen E2-Enzyms. Aus Pickart, 2004, modifiziert.

F-Box-Proteine (Namensgebung durch das erste F-Box-Protein Cyclin F) ermöglicht, die ihrerseits über das SKP1-Protein (*S-phase-kinase-associated protein-1*) mit der CUL1-Untereinheit assoziiert sind (Zheng *et al.*, 2002). SCF-Ubiquitin-Ligasen können F-Box-Proteine mit unterschiedlichen Substrat-Spezifitäten enthalten, so dass eine Vielzahl von verschiedenen Ziel-Proteinen ubiquitiniert werden kann.

I.1.2 Das 26S Proteasom

Polyubiquitinierte Proteine werden vom Proteasom spezifisch erkannt und abgebaut. Das 26S Proteasom ist ein 2,5 MDa großer Komplex, der unter allen Eukaryoten hoch konserviert ist (Hochstrasser, 1996). Das 26S Proteasom kann in die zwei Subkomplexe 19S und 20S gegliedert werden (Abb.I.3). Der katalytische 20S Komplex setzt sich aus vier aufeinander gestapelten Ringen zusammen, die ihrerseits aus je sieben homologen Proteinen bestehen. Die beiden inneren β -Ringe besitzen die proteolytisch aktiven Zentren, welche in das Innere des zylindrischen 20S Komplexes weisen (Groll *et al.*, 1997; Baumeister *et al.*, 1998). Die zwei

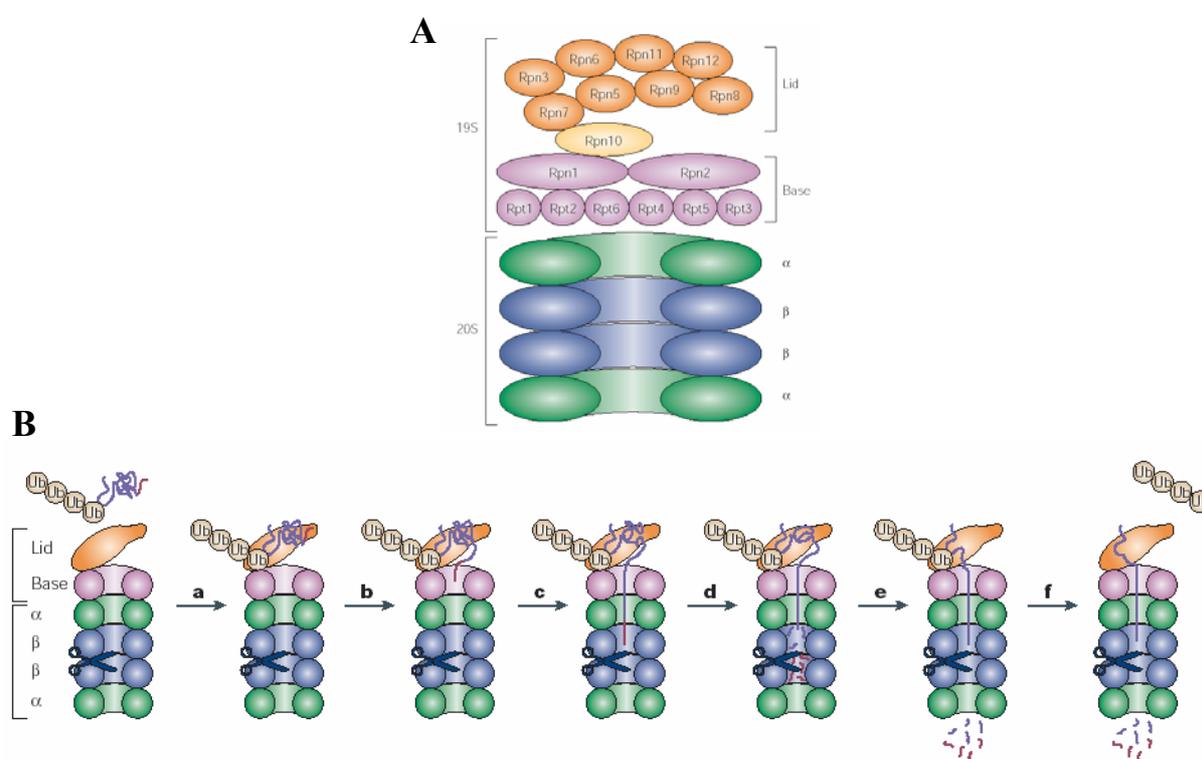


Abb.I.3 Das 26S Proteasom (A) Die beiden 20S und 19S Subkomplexe bilden das 26S Proteasom-Holoenzym. Der 20S Komplex enthält die proteolytisch aktiven Zentren und wird daher auch katalytischer Komplex genannt. Er besteht aus vier heptameren Ringen, wobei die beiden inneren β -Ringe die proteolytische Aktivität beherbergen. Die beiden äußeren α -Ringe kontrollieren den Zugang in das Proteasom. Der regulatorische 19S Komplex setzt sich aus den *lid* und *base* Unterstrukturen zusammen. Die Funktionen der Untereinheiten des *lid* (Rpn = *Regulatory particle non-ATPase*) sind noch größtenteils unbekannt. Der *base* Komplex scheint unter anderem eine wichtige Rolle bei der Rezeption von polyubiquitinierten Substrat-Proteinen zu spielen. Er enthält 6 homologe ATPasen (Rpt = *Regulatory particle ATPase*), die an der Entfaltung und der Translokation in den 20S Komplex des Substrat-Proteins beteiligt sind. (B) Schematische Darstellung des Abbaus polyubiquitinierten Proteine durch das 26S Proteasom. Die Modelle sind anhand des Proteasoms von *S. cerevisiae* erstellt. Aus Pickart, 2004.

äußeren α -Ringe kontrollieren den Zugang zum proteolytisch aktiven Zentrum des Proteasoms und stellen die Verbindung mit dem 19S Komplex her. Der regulatorische 19S Komplex ist ebenfalls in zwei Strukturen unterteilbar, die als *lid* und *base* bezeichnet werden. Beim Abbau polyubiquitinerter Substrat-Proteine ist der *lid* Komplex, der eine Funktion bei der Deubiquitinierung des Substrat-Proteins zu haben scheint, unerlässlich. Die genauen Funktionen der einzelnen Untereinheiten des *lid* Komplexes sind aber noch größtenteils unbekannt (Pickart, 2004). Die wichtigsten Komponenten des *base* Komplexes sind 6 homologe ATPasen, die an der Entfaltung des Substrates und dessen Translokation in den 20S Partikel beteiligt sind. Auch die Rezeption polyubiquitinerter Substrat-Proteine scheint hauptsächlich durch Komponenten des *base* Komplexes zu erfolgen (Pickart, 2004).

I.1.3 Das UP-System greift zentral in multiple Funktionen der Zelle ein

Das UP-System greift durch Proteolyse von Regulatoren oder anderen Zielproteinen kontrollierend in unterschiedliche zelluläre Funktionen ein (Abb.I.4). Der Zellteilungszyklus

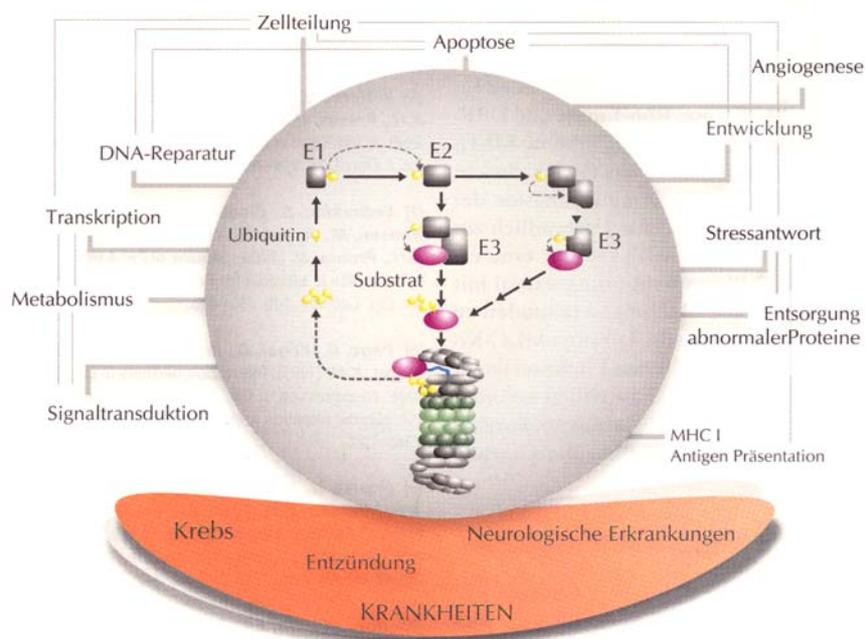


Abb.I.4 Das Ubiquitin-Proteasom (UP) System ist für multiple Funktionen der Zelle wichtig. Das UP-System greift durch Proteolyse von verschiedenen Zielproteinen kontrollierend in viele unterschiedliche zelluläre Funktionen ein. Während des Zellzyklus ist der Abbau des Anaphase-Inhibitors Pds1, der durch den Ubiquitin-Ligase-Komplex Cdc20-APC (*anaphase promoting complex*) vermittelt wird, essentiell für die Einleitung der Mitose. Der proteasomale Abbau des Tumorsuppressors p53 durch die onkogenen Ubiquitin-Ligasen Mdm2 oder E6-Protein des Human Papillomavirus spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung bestimmter Krebs-Zellarten. Aus Hilt, 2005.

wird durch Cyclin-abhängige Kinase-Komplexe (CDKs) strikt reguliert. Diese werden durch oszillierende Wellen von Cyclinen phasenspezifisch moduliert. Das UP-System sorgt durch den Abbau der entsprechenden Cycline für die termingerechte Abschaltung der CDKs. Bei der Einleitung der Mitose ist der Abbau des Anaphase-Inhibitors Pds1, vermittelt durch den Ubiquitin-Ligase-Komplex Cdc20-APC (*anaphase promoting complex*), ein zentraler Steuerungsschritt (Cohen-Fix *et al.*, 1996). Pds1 unterbindet die Einleitung der Mitose durch die spezifische Inhibition der Separase Esp1, eine hochselektive Protease, deren Aktivität für die Trennung der Schwesterchromatiden duplizierter Chromosomen notwendig ist. Das UP-System hat des weiteren eine sehr wichtige Funktion bei der Proteinqualitätskontrolle. Im Zytoplasma markiert die E3-Ubiquitin-Ligase CHIP, die mit Chaperonen der Hsp70/Hsp90 Familie interagiert, anormale Proteine für den Abbau durch das Proteasom. Im Endoplasmatischen Retikulum werden durch so genannte ERAD-Prozesse (*ER associated degradation*) falsch gefaltete Proteine den Proteasomen im Zytoplasma zugeführt (Sommer & Wolf, 1997). In diesem System sind die zentralen Funktionseinheiten der Ubiquitinierungsmaschinerie wie das E2-Enzym Ubc6 oder die E3-Ligasen Hrd1/Der3 und Doa10 in der ER-Membran verankert. Die Ubiquitinierung findet hier während der Translokation des Substrates durch die ER-Membran statt (Bays *et al.*, 2001).

Neben dem vollständigen Abbau ist das Proteasom auch an der Prozessierung von Proteinen beteiligt. Dieser Vorgang wurde für den heterodimeren Transkriptionsfaktor NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) beschrieben, dessen eine Untereinheit als inaktives Vorläuferprotein (p105) synthetisiert wird (Fan & Maniatis, 1991; Palombella *et al.*, 1994). Das NF- κ B p105 Protein wird in einer Ubiquitin-abhängigen Reaktion durch das Proteasom zu einer 50 kDa-Form prozessiert und dadurch aktiviert (Lin *et al.*, 1996). Ein vollständiger Abbau des p105 Vorläuferproteins durch das Proteasom wird dabei durch eine N-terminale, hochstabile *Rel homology domain* verhindert (Lin & Kobayashi, 2003).

Ein Transkriptionsfaktor der durch das Ubiquitin-Proteasom System vollständig abgebaut wird, ist der Tumorsuppressor p53. Er wird durch das onkogene RING-Finger Protein Mdm2 (*murine double-minute protein 2*) polyubiquitiniert. Durch den Abbau von p53 wird die Arretierung des Zellzyklus in G1 und die Apoptose der Zellen durch p53-Aktivität verhindert, was im Falle von DNA-Schädigung verheerende Folgen hat (Hilt, 2004). Auch das E6-Protein des Human Papillomavirus (HPV) vermittelt im Zusammenspiel mit zellulären Proteinen der Wirtszelle den proteasomalen Abbau von p53 (Scheffner *et al.*, 1990).

Transkriptionelle Regulation durch das UP-System kann auch auf Grundlage des Abbaus von Kofaktoren erfolgen. Die beiden homologen CLIM1/Ldb2- und CLIM2/NLI/Ldb1-Proteine

sind Bestandteile von Multiproteinkomplexen, die verschiedene Transkriptionsfaktoren wie LIM-Homöodomänen-, bHLH-, GATA-, und Otx-Transkriptionsfaktoren enthalten können. Sie bilden Homodimere, was für ihre Funktion als positive Koregulatoren vor allem für LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren (LIM-HD) äußerst wichtig ist (Agulnick *et al.*, 1996; Jurata *et al.*, 1996, 1997; Bach *et al.*, 1997; Mukhopadhyay *et al.*, 2003). In diesem System konnte für das RING-Finger Protein RLIM eine Funktion als negativer Regulator der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren gezeigt werden (Bach *et al.*, 1999). Der Mechanismus des negativen Einflusses von RLIM wurde verstanden, nachdem für RLIM eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität gezeigt werden konnte. So war es möglich die CLIM-Kofaktoren als Substrat-Proteine zu identifizieren, die von RLIM für den proteasomalen Abbau markiert werden, wodurch die von CLIM1/2 vermittelte Aktivität der LIM-HDs verringert wird (Ostendorff *et al.*, 2002).

1.2 LIM-Proteine

LIM-Proteine bilden eine große Familie von sehr diversen Proteinen, deren gemeinsames Merkmal eine oder mehrere LIM-Domänen ist. Die Bezeichnung „LIM“ rührt von den Initialen der drei zuerst entdeckten Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren LIN-11, Isl1 und MEC-3 aus *C. elegans* bzw. Ratte her. Die LIM-Domäne besteht aus ca. 55 Aminosäuren mit 8 hochkonservierten Cystein- oder Histidin-Resten. Anhand der Koordination von zwei Zink-Ionen durch jeweils vier der konservierten Aminosäurereste (Abb.I.5) entsteht ein Tandem von zwei Zink-Finger-Strukturen, die stets durch zwei Aminosäuren getrennt sind (Dawid *et al.*, 1998; Jurata & Gill, 1998). In seiner Struktur ähnelt das LIM-Motiv (Abb.I.5) den Zink-Fingern vom GATA-Typ (Perez-Alvarado *et al.*, 1994), kann aber nicht wie diese an DNA binden. Es dient vielmehr als eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne (Bach, 2000; Kadrmas & Beckerle, 2004). Sowohl ein allgemeines LIM-bindendes Motiv von Interaktionspartnern als auch eine Bindungs-Präferenz der LIM-Domänen selbst für bestimmte Proteinstrukturen konnte bislang nicht festgestellt werden (Khurana *et al.*, 2002; Kadrmas & Beckerle, 2004). LIM-Proteine konnten in allen Eukaryoten, deren Genom näher untersucht wurde, gefunden werden. In Prokaryoten fehlen sie jedoch. Der Mensch besitzt 135 derzeit identifizierte LIM-kodierende Sequenzen, die auf insgesamt 58 Gene verteilt sind (Kadrmas & Beckerle, 2004). Anhand ihrer Aminosäure-Sequenz lassen sich die LIM-Domänen in verschiedene Kategorien, die zum Teil sehr unterschiedliche Proteine enthalten, unterteilen.

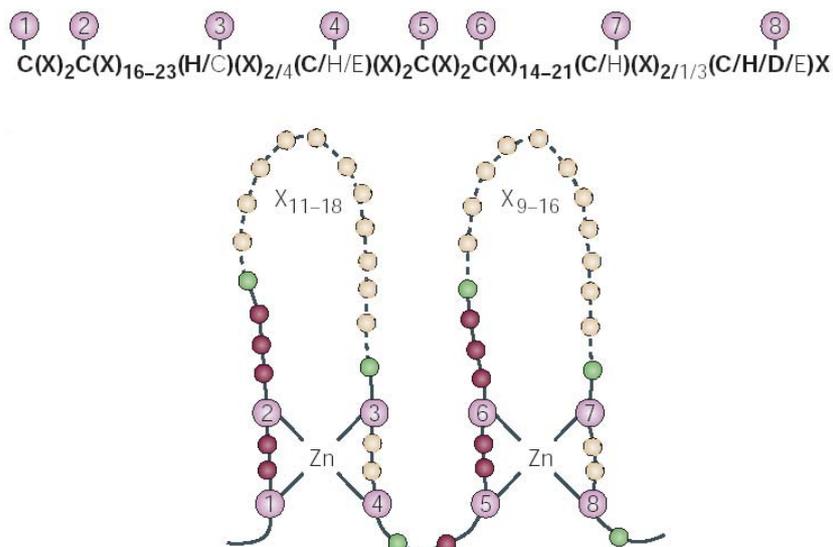


Abb.I.5 Die LIM-Domäne Die Konsensus-Sequenz basiert auf 135 identifizierten menschlichen LIM-Sequenzen. Die 8 konservierten Zink-Ionen-bindenden Aminosäuren sind hervorgehoben. X steht für beliebige Aminosäuren. Die Topologie einer LIM-Domäne durch die Koordination zweier Zink-Ionen ist ein Tandem von zwei Zink-Fingern. Grüne Markierung deutet auf aliphatische Aminosäuren hin, die semi-konserviert sind, während dunkelrot markierte invariante Positionen haben, aber nicht konserviert sind. Gelb markiert sind nicht konservierte Positionen, die in ihrer Zahl variabel sind. Aus Kadrmas & Beckerle, 2004.

LIM-Proteine, die ausschließlich im Zellkern zu finden sind, wie LMOs (*LIM only*) oder LIM-Homöodomänen (LIM-HD) Proteine, haben im Vergleich zu zytoplasmatischen LIM-Proteinen eine distinkte LIM-Sequenz. Lediglich LIM-Kinasen (LIMK) und das Aktin-bindende LIM-Protein ABLIM, die wichtige Funktionen bezüglich des Zytoskeletts ausüben, stellen eine Ausnahme dar. Sie besitzen zwei LIM-Domänen, die denen von LMO- und LIM-HD-Proteinen sehr stark ähneln (Kadrmas & Beckerle, 2004). Multi-LIM-Proteine des Zytoplasma wie *Enigma*, *Paxillin* oder PINCH (*particularly interesting new cysteine and histidine-rich protein*) enthalten 3, 4 bzw. 5 LIM-Domänen, die sich von denen der LMOs und LIM-HDs bzw. auch LIM-Kinasen deutlich unterscheiden (Kadrmas & Beckerle, 2004).

I.2.1 LIM-Proteine des Zellkerns

Zu den LIM-Proteinen des Zellkerns zählen die LIM-Homöodomänen (LIM-HD) Proteine, die zwei N-terminale LIM-Domänen aufweisen sowie *LIM only* (LMO) Proteine. LIM-HD-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die anhand ihrer Homöodomäne spezifische DNA-

Sequenzen binden können. Sie besitzen zudem eine C-terminale Transaktivierungsdomäne zur gewebsspezifischen Aktivierung der Genexpression. In höheren Organismen sind sie für die Entwicklung des Nervensystems von fundamentaler Bedeutung (Hobert & Westphal, 2000; Bach, 2000). Während der frühen Entwicklung von Wirbeltieren weisen verschiedene LIM-HD-Transkriptionsfaktoren zeitlich und räumlich sehr distinkte aber teilweise auch überlappende Expressionen auf. Lhx3 wird in so genannten V2 Interneuronen des Neuralrohres sowie den Vorläuferzellen von Motoneuronen und nur noch bedingt in postmitotischen Motoneuronen exprimiert (Abb.I.6.A). Das LIM-HD-Protein Isl1 wird in fast allen postmitotischen Motoneuronen des Neuralrohres exprimiert. Abhängig davon, ob diese Motoneurone neben Isl1 kombinatorisch auch LIM-HDs wie Isl2, Lhx3, Lhx4 oder Lim1 exprimieren, entwickeln sich ihre axonalen Projektionen aus dem Neuralrohr in verschiedene, dorsale oder ventrale Richtungen (Abb.I.6.B). Dadurch wird letztendlich der Motoneuronen-

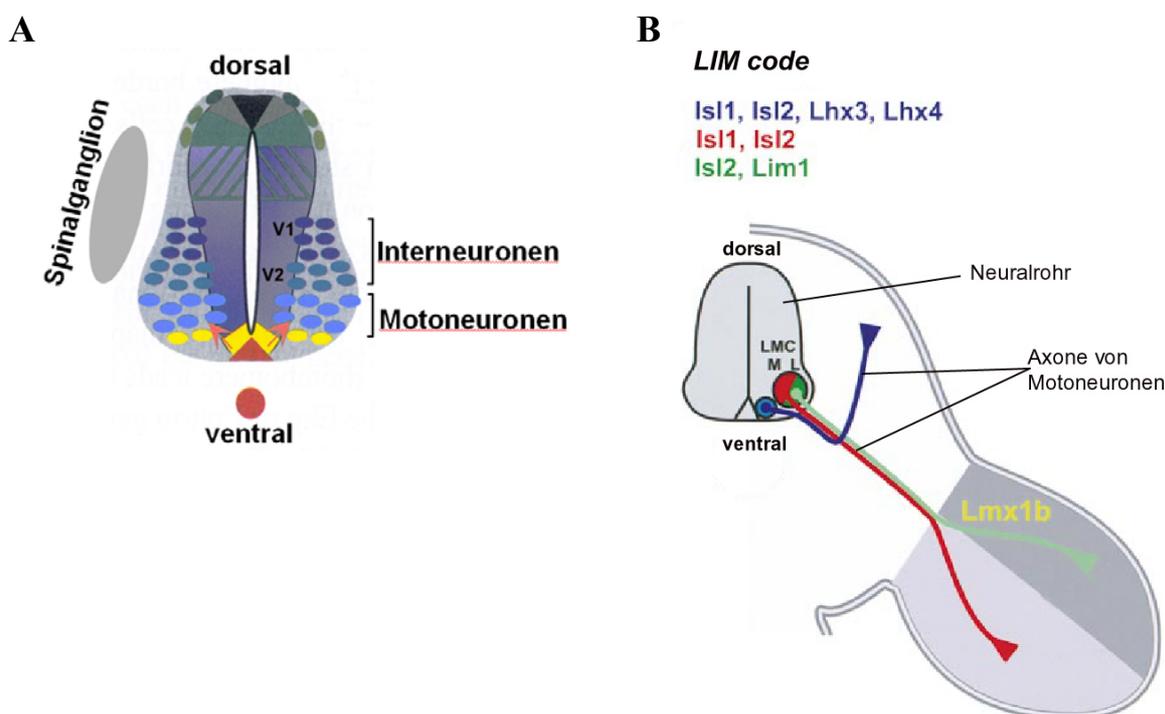


Abb.I.6 LIM-HD-Transkriptionsfaktoren sind für die Entwicklung neuronaler Zellen im Neuralrohr von Wirbeltieren wichtig. (A) und (B) sind Modelle des transversalen Körperdurchschnitts eines ca. 12 Tage alten Mausembryos. (A) Das Modell zeigt die Lage von Motoneuronen und Interneuronen im Neuralrohr. Das LIM-HD-Protein Lhx3 wird in V2-Interneuronen und teilweise in Motoneuronen exprimiert. (B) Der *LIM code* spielt eine wichtige Rolle bei der Pfadfindung von Motoneuron-Axonen. Je nach Kombination der Expression von den LIM-HD-Transkriptionsfaktoren Isl1, Isl2, Lhx3, Lhx4 oder Lim1 entstehen Motoneuronen, die ihre Axone außerhalb des Neuralrohres in dorsale oder ventrale Richtungen projizieren. Die Expression von Lmx1b spezifiziert den Pfad der ventral projizierten Axone zusätzlich. Aus Kania *et al.*, 2000, modifiziert.

Subtyp charakterisiert (Kania *et al.*, 2000; Shirasaki & Pfaff, 2002). In einer *Lhx3 knock-in* Maus, die in allen Motoneuronen stabil *Lhx3* exprimiert, werden die Axone aller Motoneuronen des Neuralrohres zur dorsalen Körperseite projiziert (Sharma *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang wird von einem *LIM code* gesprochen, anhand dessen der Typus von Neuronen und ihren axonalen Projektionen determiniert wird. Auch in anderen Spezies wie z.B. *Drosophila melanogaster* oder Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass der *LIM code* bei der Pfadfindung der Axone während der Entwicklung eine wichtige Rolle spielt (Dawid & Chitnis, 2001; Shirasaki & Pfaff, 2002). Des Weiteren sind LIM-HD-Transkriptionsfaktoren auch an der Entwicklung der Hypophyse, des pankreatischen Mesenchyms sowie der *Islet*-Zellen (*Isl1* und *Isl2*) und an der Erythropoese beteiligt (Pfaff *et al.*, 1996; Ahlgren, 1997; Porter *et al.*, 1997).

Für die Aktivität der LIM-HD-Proteine ist eine Interaktion anhand ihrer LIM-Domäne mit den nukleären Adaptor-Proteinen der CLIM/Ldb-Familie, die aus den Homologen CLIM1/Ldb2 und CLIM2/Ldb1/NLI (im weiteren Textverlauf nur noch als CLIM bezeichnet) besteht, von entscheidender Bedeutung. CLIM-Proteine bilden Homodimere anhand ihrer N-terminalen Dimerisierungsdomäne und binden durch einen spezifischen Bereich am C-Terminus, der als LIM-Interaktions-Domäne (LID) bezeichnet wird, an das LIM-Motiv der LIM-HDs (Agulnick *et al.*, 1996; Jurata *et al.*, 1996; Bach *et al.*, 1997). Die Homodimerisierung der CLIM-Proteine führt zur Bildung des Tetramers 2xCLIM+2xLIM-HD und somit eines Homöodomänen-Tandems. Es wird vermutet, dass dadurch gleichzeitig die DNA-Sequenzen der *Promoter*- und *Enhancer*-Elemente gebunden werden, um die Aktivierung der Transkription zu ermöglichen (Jurata *et al.*, 1998; Thaler *et al.*, 2002). In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass das LIM-HD-Protein *Apterous* durch die Deletion der LIM-Domäne seine Funktionalität verliert, was zu einer gestörten dorso-ventralen Entwicklung der Flügel führt. Wurde aber die LIM-Domäne von *Apterous* durch die Dimerisierungsdomäne von CHIP (CLIM-Homolog in *Drosophila*) ersetzt, so entwickelten sich die Flügel normal (Fernandez-Funez *et al.*, 1998; Milan & Cohen 1999; van Meyel *et al.*, 1999). Diese Beobachtung zeigt, dass die Funktion von CLIM als Kofaktor der LIM-HD-Proteine auf der Fähigkeit zur Dimerisierung beruht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dominant-negativer CLIM-Proteine, denen die Dimerisierungsdomäne fehlt, in Zebrafischen zu ähnlich gravierenden Phänotypen führt, wie sie in *Lhx2*^{-/-}-Mäusen beobachtet werden konnten. Diese beinhalteten Augendefekte bis hin zum fast vollständigem Verlust der Augen und Defekte in der Entwicklung der Grenzstruktur zwischen Stamm- und Hinterhirn sowie in der Entwicklung bestimmter Neurone (Porter *et al.*, 1997; Becker *et al.*,

2002). Allerdings zeigen Mäuse, in denen CLIM2 deletiert wurde, ein weitaus größeres Spektrum an Phänotypen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass CLIM-Proteine auch mit anderen Transkriptionsfaktoren und Regulatoren interagieren können (Mukhopadhyay *et al.*, 2003; Matthews & Visvader, 2003).

Nukleäre LIM-*only*-Proteine (LMOs) gehören zu den kleinsten LIM-Domän-Proteinen. Abgesehen von den zwei LIM-Domänen besitzen sie keine weiteren funktionellen Domänen. Das Tandem der beiden LIM-Domänen ermöglicht es, verschiedene Proteine zu binden und dadurch einen regulatorischen Komplex zu schaffen. So konnte für LMO2 gezeigt werden, dass es gleichzeitig die Transkriptionsfaktoren TAL1-E47 und GATA1 bindet, wodurch die spezifische Genexpression für Hämatopoese aktiviert wird (Kadrmas & Beckerle, 2004). LMO-Proteine können aber auch um die Bindung der CLIM-Proteine, die Kofaktoren der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren, konkurrieren und somit als negative Regulatoren der LIM-HD-Aktivität fungieren. *Apterous* aktiviert in *Drosophila* als LIM-HD auch die Expression des LMOs *Beadex* (Bx). Dieser wiederum entzieht *Apterous*-Proteinen durch kompetitive Bindung CHIP (CLIM-Homolog in *Drosophila*), was im proteasomalen Abbau von *Apterous* resultiert. Diese negativ wirkende Rückkopplung ist wichtig, da die Störung des Gleichgewichts zwischen *Beadex*, *Apterous* und CHIP zu Defekten während der Flügelentwicklung führt (Milan *et al.*, 1998; Milan & Cohen, 1999; Weihe *et al.*, 2001; Bach, 2002; Kadrmas & Beckerle, 2004).

1.2.2 LIM-Proteine des Zytoplasmas

Zytoplasmatische LIM-Proteine bilden eine sehr diverse Gruppe von Proteinen. Der größte Teil dieser Gruppe wurde im Zusammenhang mit dem Zytoskelett entdeckt. Sie können eine unterschiedliche Anzahl an LIM-Domänen und anderen funktionellen Domänen haben. Proteine der CRP-Familie (*cytoplasmic cysteine-rich protein*) besitzen nur 2 LIM-Domänen als Charakteristikum, während FHL-Proteine (*four-and-a-half*) aus 4½ LIM-Domänen bestehen. Interessanterweise konnte für beide Proteine eine partielle Lokalisation im Zellkern beobachtet werden. CRPs sind im Zytoplasma mit Alpha-Aktinin, einem Aktin-vernetzenden Protein, assoziiert. Für CRP1 und CRP2 konnte gezeigt werden, dass sie in Muskelzellen unter bestimmten Umständen, die bislang noch nicht verstanden werden konnten, im Zellkern zu finden sind. Dort bilden sie durch die Bindung von SRF (*serum-response factor*) an der N-terminalen LIM-Domäne und GATA4 oder GATA6 an der C-terminalen LIM-Domäne einen

ternären Komplex, der die Expression muskelspezifischer Gene stimuliert (Kadmas & Beckerle, 2004). Eine Ähnliche Beobachtung konnte für das Zytoskelett-assoziierte FHL2 gemacht werden, das durch die GTPase Rho aktiviert wird und anschließend im Zellkern nachgewiesen werden kann. Es wird vermutet, dass auch FHL2 im Nukleus als eine Plattform für die Generierung Transkriptions-aktivierender Komplexe dient (Müller *et al.*, 2002). *Focal adhesions* sind spezielle Bereiche der Zelloberfläche, an denen Aktinfilamente des Zytoskeletts verankert werden. An dieser Verankerung sind so genannte Integrine beteiligt, die an den *focal adhesions* angehäuft sind und mit Proteinen der extrazellulären Matrix interagieren (Labouesse & Georges-Labouesse, 2003). PINCH (*particularly interesting new cysteine and histidine-rich protein*), das außer 5 LIM-Domänen keine weiteren Charakteristika aufweist, interagiert mit dem Integrin-assoziierten Protein ILK (*integrin linked kinase*), welches eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion spielt. Die Deletion von PINCH führt zu Defekten bei der Verankerung von Aktin-Filamenten in der Zellmembran sowie Integrin-vermittelter Zelladhäsion, was eine embryonale Lethalität zur Folge hat (Hobert *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2003).

LIM-Proteine der *Enigma*-Familie wie z.B. Cypher und Mitglieder der ALP-Proteine (*alpha-actinin associated LIM protein*) haben neben den LIM-Domänen eine PDZ-Domäne, die u.a. zur Interaktion mit Proteinen des Zytoskeletts befähigt. ALP wurde erstmals als ein Alpha-Aktinin-assoziiertes Protein identifiziert und besitzt nur eine C-terminale LIM-Domäne. In Herzmuskel-Zellen kolokalisiert es mit Alpha-Aktinin in verschiedenen Bereichen der Aktin-Verankerung. Maus-Deletionsmutanten von ALP entwickeln Kardiomyopathien, da die durch ALP geförderte Vernetzung von Aktin-Filamenten mittels Alpha-Aktinin gestört ist (Pashmforoush *et al.*, 2001; Kadmas & Beckerle, 2004). *Cypher*, das wie alle LIM-Proteine der *Enigma*-Familie 3 LIM-Domänen am C-Terminus enthält, ist ebenfalls mit Alpha-Aktinin assoziiert und lokalisiert in Muskelzellen in den Z-Scheiben. Zusätzlich interagiert es auch mit Protein-Kinase C (PKC) und Calsarcin-3, einem Binde-Partner des Transkriptionsfaktors Calcineurin (Zhou *et al.*, 1999; Frey & Olson, 2002). Daher scheint *Cypher* an den Z-Scheiben sowohl in struktureller Hinsicht als auch bei der Signaltransduktion wichtig zu sein. Auch die Deletion von *Cypher* führt zur Kardiomyopathie und zu Defekten in der Architektur quergestreifter Muskeln (Vatta *et al.*, 2003).

ABLIM ist ein LIM-Protein mit 4 N-terminalen LIM-Domänen und einer C-terminalen Aktin-Bindedomäne. Eine Funktion von ABLIM wurde anhand des Homologen UNC-115 in *C. elegans* gezeigt. In Deletionsmutanten (*unc-115*) konnte beobachtet werden, dass die Axone bestimmter Neurone Fehler in der Pfadfindung aufweisen, obwohl ihre Motilität

unbeeinträchtigt war (Lundquist *et al.*, 1998). UNC-115 wird durch den Rho-/Rac-Signalweg reguliert. Daher wird vermutet, dass UNC-115 die Aktin-Dynamik und somit das Axonwachstum in Abhängigkeit von äußeren, richtungweisenden Signalen, reguliert (Struckhoff & Lundquist, 2003).

I.2.3 LIM-Kinasen sind katalytische LIM-Proteine des Zytoplasmas

LIM-Kinase 1 (LIMK1) und LIMK-Kinase 2 (LIMK2) bilden die Familie der LIM-Kinasen. Es handelt sich bei ihnen um Serin-/Threonin-Kinasen mit einer C-terminalen Kinase-Domäne. Neben den zwei N-terminalen LIM-Domänen besitzen sie eine PDZ-Domäne, die auch LIM-Kinasen funktionell in einen Zusammenhang mit dem Zytoskelett bringt. LIM-Kinasen sind Effektoren von kleinen GTPasen der Rho-/Rac-/Cdc42-Familie (auch als p21-Familie bezeichnet), die bei der Reorganisation des Zytoskeletts eine überaus wichtige Rolle spielen. Sie induzieren die Phosphorylierung der Rho-Kinase (ROCK) und p21-aktivierter Kinase (PAK1) (Abb.I.7.A). Daraufhin aktivieren diese LIMK1 und LIMK2 durch Phospho-

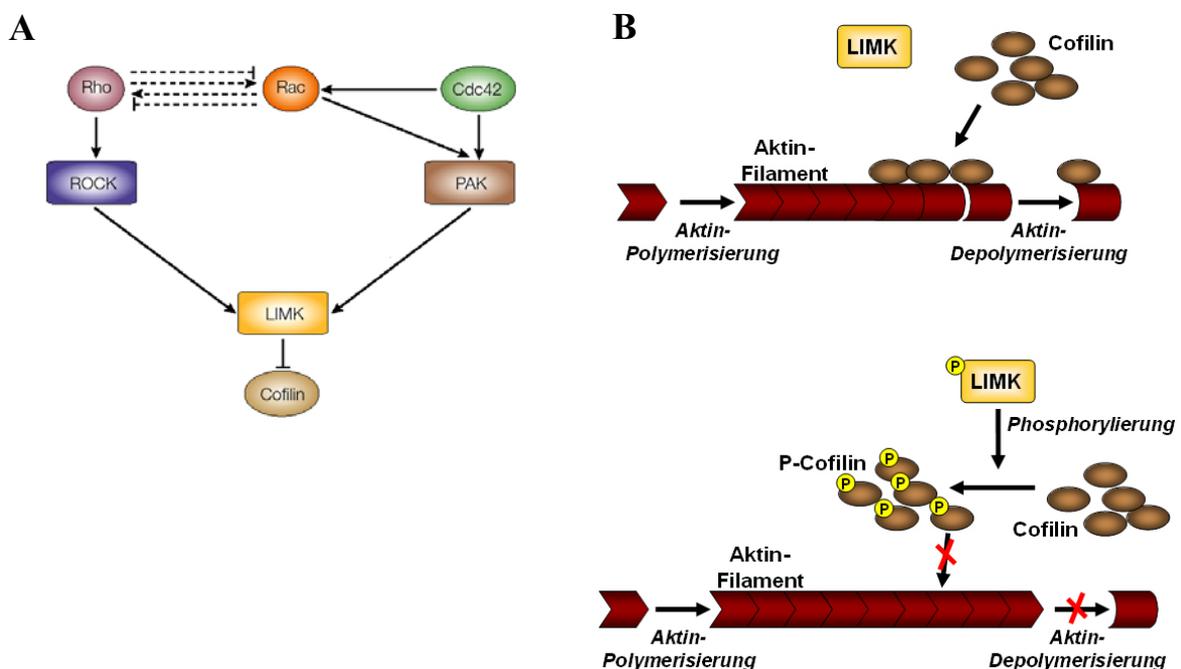


Abb.I.7 Aktivierung von LIM-Kinase und Deaktivierung Aktin-depolymerisierender Proteine.

(A) Rho/RAC/Cdc42 sind kleine GTPase, die Kinasen wie ROCK und PAK (siehe Text) aktivieren. Daraufhin phosphorylieren diese LIM-Kinase, die dadurch ebenfalls aktiviert wird. (B) Das Aktin-depolymerisierende Protein Cofilin wird durch aktivierte LIM-Kinase phosphoryliert. Phosphoryliertes Cofilin (P-Cofilin) kann dadurch keine Aktin-Filamente (F-Aktin) mehr depolymerisieren, so dass sich F-Aktin anhäuft. Modifiziert nach Riento & Ridley, 2003.

rylierung am Threonin 508 bzw. 505 (1999; Maekawa *et al.*, 1999; Ohashi *et al.*, 2000; Sumi *et al.*, 2001). Aktivierte LIMK-Kinase wiederum phosphoryliert Aktin-depolymerisierende Proteine der ADF- (*actin-depolymerizing factor*) / Cofilin-Familie (zusammengefasst als ADF/Cofilin). ADF/Cofilin fördert die Depolymerisierung von Aktin-Filamenten (F-Aktin). Durch die LIM-Kinase-vermittelte Phosphorylierung können diese inaktiviert werden (Abb.I.7.B), was zu einer Anhäufung von F-Aktin führt (Arber *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Reaktiviert werden die ADF/Cofilin-Proteine durch die Phosphatase Ssh (*Slingshot*) (Morgan *et al.*, 1993; Niwa *et al.*, 2002). Ein ständiger Kreislauf von Depolymerisierung und Polymerisierung der Aktin-Filamente ist eine Voraussetzung für die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts, die unter anderem bei der Migration von Zellen oder dem Auswuchs der Axone von Neuronen unerlässlich ist. Das Aktin-Zytoskelett im Wachstumskegel der Axone, muss eine hohe Dynamik aufweisen, um die Migration des Wachstumskegels und somit den Auswuchs des Axons zu ermöglichen (Mitchison & Kirschner, 1988; Song & Poo, 2001). Insbesondere in den Lamellopodien und Filopodien, die äußerst agile Strukturen der Wachstumskegel darstellen, besteht das Zytoskelett aus F-Aktin (Gungabissoon & Bamberg, 2003). Während LIMK2 ubiquitär exprimiert wird, konnte LIMK1 hauptsächlich in neuronalen Zellen nachgewiesen werden, wo LIMK1 eine regulatorische Funktion während des Auswuchs der Axone hat (Stanyon & Bernard, 1999).

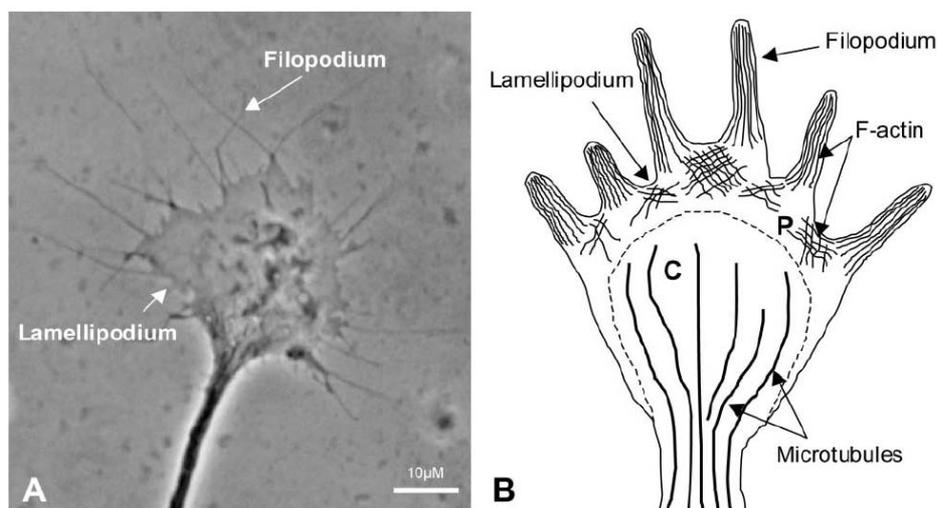


Abb.I.8 Wachstumskegel von Neuronen. (A) Phasenkontrast-Aufnahme eines axonalen Wachstumskegels. (B) Modell eines Wachstumskegels mit den wichtigsten Bestandteilen des Zytoskeletts. Aus der Peripher-Domäne (P) laufen dichte Bündel von F-Aktin in die Filopodien. Die Aktin-Dynamik in den Filopodien und Lamellopodien ist für die Motilität des Wachstumskegels zwingend. Der Zentrale Bereich (C) enthält Mikrotubuli, die in der Regel nur bis in die Peripher-Domäne reichen. Aus Gungabissoon & Bamberg, 2003.

Die Verlängerung der Neuriten von PC12 Zellen in Kultur wird gehemmt, wenn eine LIMK1-Deletionsmutante, der die Kinase-Domäne fehlt, überexprimiert wird (Birkenfeld *et al.*, 2001). In Neuronen der Spinalganglien aus Huhn-Embryonen zeigte sich, dass die Überexpressionen von LIMK1 oder mutierten LIMK1-Varianten, die entweder konstitutiv aktiv oder nicht aktivierbar sind, zu beeinträchtigten Motilitäten des Wachstumskegels führen. Diese Beobachtungen waren zurückzuführen auf veränderte Aktivitäten von Cofilin durch die LIMK1-Proteine (Endo *et al.*, 2003). Auch in kultivierten Neuronen des Ratten-Hippokampus zeigte sich ein Einfluss auf das Axon-Wachstum. So fördern erhöhte LIMK1-Proteinmengen den Auswuchs der Axone, was zunächst in einer Verlängerung dieser Projektionen resultiert. Halten jedoch die erhöhten Mengen an LIMK1-Proteinen über einen längeren Zeitraum hinweg an, so kommt es zur Inhibition des Axon-Wachstums und zur Akkumulation von F-Aktin im Wachstumskegel der Axone (Rosso *et al.*, 2004). Neurone der *knock-out* Mausmutanten von LIMK1 zeigten neben morphologischen Abnormalitäten der Axon-Wachstumskegel auch Defekte in der Struktur von Dendritenfortsätzen. In beiden Strukturen konnte eine Reduzierung der Phosphorylierung von ADF/Cofilin beobachtet werden (Meng *et al.*, 2002). Beim Menschen wurde entdeckt, dass Patienten, die am Williams-Syndrom leiden, hemizygot für LIMK1 sind. Bei ihnen ist unter anderem eine leichte mentale Retardierung feststellbar, die vermutlich auf den niedrigen LIMK1-Proteinmengen beruht (Stanyon & Bernard, 1999). Des weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter LIMK1-Aktivität und steigender Motilität von T-Zellen gezeigt werden (Nishata *et al.*, 2002).

Wie bereits beschrieben, erfolgt die Regulation der LIM-Kinasen über den Rho/Rac/Cdc42-Signalweg, in dem LIM-Kinase durch Phosphorylierung aktiviert wird. Inaktive LIM-Kinase scheint einer Autoinhibition zu unterliegen, woran die N-terminale LIM-Domäne beteiligt ist. Deletion der LIM-Domäne führt zu einer Erhöhung der LIMK-Aktivität. Dieser inhibitorische Effekt wird auch durch *trans* zugeführte LIM-Domänen erzielt und beruht auf der Interaktion der LIM-Domäne mit der Kinase-Domäne. Ob die Phosphorylierung von LIM-Kinase einen Einfluss auf die Interaktion der beiden Domänen hat, konnte bislang nicht geklärt werden (Nagata *et al.*, 1999; Kadrmas & Beckerle, 2004).

I.3 Hippocampale Neuronen als Modellsystem

Die meisten der bislang beschriebenen neurobiologisch relevanten Funktionen von Proteinen, wie z.B. die von LIM-Kinase 1, wurden in so genannten Primärkulturen von Neuronen unter-

sucht. Zellbiologische Experimente in der Neurobiologie wurden erstmals durch die Entwicklung der Methode, dissoziierte Zellen aus den Gehirnen von Ratten oder Mäusen zu präparieren und zu kultivieren ermöglicht. Mit Hilfe dieser Primärkulturen konnte z.B. die Ausbildung und das Auswachsen neuronaler Zellausläufer beobachtet sowie das Verhalten neuronaler Wachstumskegel in einzelnen Nervenzellen analysieren werden. Ein häufig verwendeter Bereich des Gehirns als Quelle für primäre Neuronenkulturen ist der Hippocampus, der als Teil des Archicortex zu den bestuntersuchten Regionen des Gehirns gehört. Durch seine begrenzte Anzahl von Neuronentypen eignet er sich besonders als Modellsystem für die Zellkultivierung. Neben Gliazellen kommen hauptsächlich die zwei neuronalen Zelltypen Pyramidenneurone und die kleineren Körner-Zellen vor. Die Pyramidenneurone entwickeln sich in einer stereotypen Sequenz von Ereignissen (Abb.I.9). Bei kultivierten Neuronen kommt es nach dem Ausplattieren in einem ersten Schritt zur Ausbildung einer dynamischen Membranstruktur, den Lamellopodien. Nach ca. 12 Std. in Kultur wachsen kleine Zellausläufer aus, so genannte Neuriten, die sich untereinander morphologisch und funktional nicht unterscheiden. Einer dieser Zellausläufer fängt nach ca. 36 Std. Kultivierungszeit an schneller als die anderen zu wachsen und entwickelt eine typisch axonale Morphologie. Es wird vermutet, dass das Wachstum der übrigen Neuriten durch die

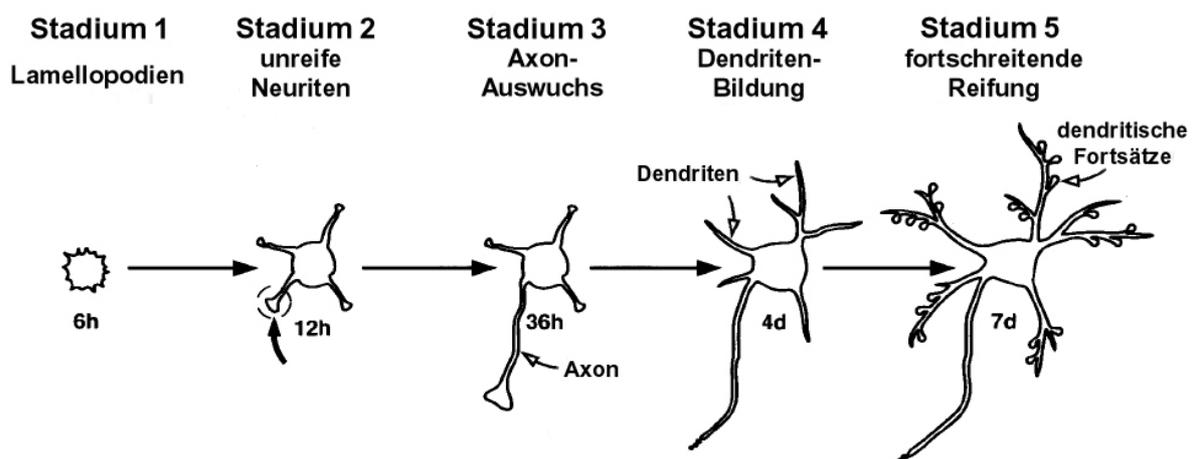


Abb.I.9 Entwicklung hippocampaler Neurone in Kultur. In den ersten 6 Std. können zunächst nur Lamellopodien beobachtet werden (Stadium 1), aus denen sich weitere 6 Std. später Neuriten entwickeln (Stadium 2). Nach insgesamt 36 Std. entwickelt sich eines der Neuriten durch schnelleres Wachstum zu einem Axon (Stadium 3). In den darauf folgenden Tagen wächst das Axon weiter, während die übrigen Neuriten zu Dendriten werden (Stadium 4). Diese bilden später so genannte dendritische Fortsätze aus, an denen sich Synapsen formieren können (Stadium 5). Aus Govek *et al.*, 2005 modifiziert.

Ausschüttung inhibitorischer Signalstoffe aus dem auswachsenden Axon unterdrückt wird. Im weiteren Verlauf entwickeln sich diese Neuriten zu Dendriten mit ihren typisch baumartigen Verzweigungen (Dotti *et al.*, 1988; Bradtke & Dotti, 1999; Andersen & Bi, 2000; Bradtke & Dotti, 2000; da Silva & Dotti, 2002; Dickson 2003; Govek *et al.*, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Primärkulturen hippocampaler Neurone verwendet, um mit Hilfe zellbiologischer Methoden, wie zum Beispiel ektopische Überexpression, RNAi oder Immunzytochemie, die Rolle der untersuchten Proteine bei der Entwicklung von Neuronen zu studieren.

I.4 Die RING-Finger Proteine RLIM und RNF6

In Maus und Mensch kodiert das Rnf12-Gen für RLIM (*RING-finger LIM-domain-binding protein*), ein RING-Finger Protein, das aufgrund seiner Fähigkeit, mit der LIM-Domäne des LIM-HD-Transkriptionsfaktors Lhx3 zu interagieren, entdeckt wurde. Das murine RLIM besteht aus 600 Aminosäuren und zeichnet sich durch eine C-terminale RING-Finger-Domäne aus, in der zwei Zinkatome von je vier Aminosäureresten koordiniert werden. Für das RING-Finger-Motiv wurde folgende Konsensus-Sequenz mit 8 Zn²⁺-bindenden Resten ermittelt: CX₂CX₉₋₃₉CX₁₋₃HX₂₋₃C/HX₂CX₄₋₄₈CX₂C (Freemont, 2000; Joazeiro & Weissman, 2000). Befindet sich an der fünften Zink-bindenden Position ein Histidin-Rest anstelle eines Cystein-Restes, so handelt es sich um ein so genanntes RING-H₂-Motiv, was bei RLIM der Fall ist. Es konnte gezeigt werden, dass RLIM generell mit den LIM-Domänen der LIM-HD-Proteine und nukleären LMOs interagieren kann, während es zu denen zytoplasmatischer LIM-Proteine, mit Ausnahme von LIM-Kinase, nur eine schwache Affinität zeigt (Bach *et al.*, 1999). Darüber hinaus interagiert RLIM mit CLIM-Proteinen, die unter anderem als Kofaktoren für LIM-HD-Transkriptionsfaktoren essentiell sind. In Hühnern konnte beobachtet werden, dass eine Virus-vermittelte Überexpression von RLIM Defekte in der Entwicklung der Flügel bewirkt. Diese Phänotypen glichen denen, die durch die Überexpression von dominant-negativen CLIM-Proteinen oder durch die Inhibition des LIM-HD-Proteins Lhx2 verursacht werden. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Funktion von RLIM als negativer Regulator von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren hin. Die Rekrutierung der Histonacetylase Sin3A zum Transkriptionsfaktor-Komplex durch RLIM schien eine mögliche Ursache der Inhibition durch RLIM zu sein (Bach *et al.*, 1999). Die Entdeckung der Ubiquitin-Ligase-Aktivität von RLIM in unserem Labor ermöglichte die Erkenntnis über einen

weiteren inhibitorischen Mechanismus. Neben der Fähigkeit zur Autoubiquitinierung ist RLIM auch in der Lage die Polyubiquitinierung von CLIM-Proteinen zu vermitteln und diese somit für den proteasomalen Abbau zu markieren. CLIM1 und CLIM2 sind für die Aktivität der LIM-HD-Proteine besonders wichtig. Durch den Abbau dieser CLIM-Kofaktoren entfaltet RLIM seine Funktion als negativer Regulator der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren (Ostendorff *et al.*, 2002).

Die *in situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten von Maus-Embryonen zeigte eine ubiquitäre Expression von RLIM, die der von CLIM-Proteinen, insbesondere CLIM2, sehr ähnelt. Unter anderem konnte eine starke Expression von RLIM- und CLIM-kodierender mRNA in Geweben wie dem Gehirn oder dem Neuralrohr gezeigt werden (Bach *et al.*, 1999). In diesen Geweben sind LIM-HD-Proteine an der Entwicklung bestimmter Strukturen, wie z.B. den Motoneuronen des Neuralrohres, beteiligt. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass RLIM als negativer Koregulator der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren an der Entwicklung dieser Strukturen beteiligt ist.

Viele der in den verschiedenen Datenbanken enthaltenen RING-Finger-Proteine weisen häufig Homologien zueinander auf. RNF6, das ebenfalls einen RING-H₂-Finger besitzt, ist dasjenige Protein, das die größte Homologie zu RLIM aufweist. Mit einer Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenz von über 80% ist die Ähnlichkeit beider Proteine zueinander besonders groß. Im Gegensatz zu RLIM sind jedoch mögliche Funktionen des RING-Finger-Proteins RNF6 größtenteils unbekannt. Erstmals kloniert wurde RNF6 von MacDonald *et al.* (1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression von RNF6 während der Meiose zunimmt und RNF6-Proteine eine Kolokalisation mit PML und Daxx aufweisen. PML und Daxx sind *PML-bodies* assoziierte Proteine, die eine Rolle bei der Apoptose spielen (Torii *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2002). Die Bedeutung dieser Kolokalisation ist jedoch ungeklärt. Darüber hinaus schlugen Lopez *et al.* (2002) eine Funktion von RNF6 bei der Aktivierung des Inha-Gens (*inhibin subunit alpha*) vor, das für die α -Untereinheit von Inhibin, einem Protein, das lokal in Sertoli-Zellen von Mäusen als Tumorsuppressor wirkt, kodiert (Lopez *et al.*, 2002). Lo *et al.* (2002) vermuteten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen RNF6 und der Tumor-Entstehung, da ihre Untersuchungen von Speiseröhren-Karzinomen (*esophageal squamous cell carcinoma*) zeigen, dass RNF6 in den betroffenen Zellen häufig mutiert ist (Lo *et al.*, 2002). Untersuchungen in unserem Labor identifizierten RNF6, wie auch schon RLIM, als eine Ubiquitin-Ligase. In kultivierten Säugetier-Zellen wies RNF6 eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation auf. Des Weiteren war es *in vitro* möglich die Interaktion von RNF6 mit LIM-Proteinen des Zytoplasmas wie z.B. mit LIM-

Kinase 1 (LIMK1) nachzuweisen und darüber hinaus eine *in vitro* Ubiquitinierung durch RNF6 zu zeigen. Eine physiologisch relevante Funktion dieser Interaktionen bzw. Ubiquitinierungen blieb jedoch bislang ungeklärt (Schlüter, 2004; Peters 2004).

I.5 Zielsetzung der Arbeit

Für RLIM konnte eine Funktion als negativer Koregulator der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Diese Funktion beruht auf der Ubiquitin-Ligase-Aktivität von RLIM, wodurch die CLIM-Kofaktoren der LIM-HD-Proteine für den proteasomalen Abbau markiert werden. LIM-HD-Transkriptionsfaktoren wie Lhx3 sind für die korrekte Entwicklung neuronaler Zellpopulationen im Neuralrohr von Mausembryonen essentiell.

Ziel dieser Arbeit war es Hinweise auf einen Zusammenhang von RLIM mit LIM-HD-Proteinen während der frühen Entwicklung der Maus zu liefern. Dafür sollten die Expressionsprofile von RLIM und den CLIM-Kofaktoren im Neuralrohr der Mausembryonen untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten Aufschlüsse darüber geben, ob RLIM bei der Entwicklung des Neuralrohres eine Rolle spielen kann.

Für das mit RLIM verwandte Protein RNF6 konnte noch keine biologisch relevante Funktion beschrieben werden. Daher sollte zuerst ein Vergleich des Expressionsprofils der beiden RING-Finger-Proteine RNF6 und RLIM im Neuralrohr von Mausembryonen erste Hinweise auf eventuelle Funktionen von RNF6 liefern. Mit Hilfe von siRNA-vermittelten „*knock-down*“ Experimenten und Überexpressionsstudien sollten dann zelluläre Funktionen von RNF6 identifiziert werden.

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen

Laborchemikalien und molekularbiologischen Reagenzien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem, Darmstadt; Amersham Pharmacia, Boston Biochemicals, (USA); Freiburg; Calbiochem, Schwalbach; Clontech, Palo Alto (USA); Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein; Greiner, Nürtingen; Invitrogen, Karlsruhe; MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Merck, Darmstadt; Polysciences, Warrington (USA); Qiagen, Hilden; Roth, Karlsruhe; Schleicher & Schüll, Dassel; Sakura, Torrance (USA); Sigma, München; Stratagene, La Jolla (USA); Vector-Alexis, Grünberg und Whatman, Maidstone (USA) bezogen.

Spezielle Chemikalien und Hilfsmittel von anderen Produzenten sind im Folgenden aufgeführt:

| | |
|---|--|
| Biomax MR und X-Omat Blue XB-1 | Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA |
| Hyperfilm TM ECL | Amersham-Pharmacia, GB |
| L- ³⁵ S-Methionin | Amersham-Pharmacia, GB |
| Milchpulver (fettfrei) | Albertsons, USA |
| Säulen zur Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen | Millipore GmbH, Schwalbach |
| Zellkulturschalen und Pipetten | Nunc GmbH, Wiesbaden Renner GmbH, Dannstadt |

II.1.2 Vektoren

| | |
|------------------|---|
| pCR 2.1 TOPO-TA: | Klonierungsvektor (Invitrogen) |
| pCS2: | eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promoter (Roth et al., 1991) |
| pCS2+MT: | eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promoter, N-terminale 6xMyc- Epitop-Fusion (Roth et al., 1991) |
| pET22b: | bakterieller Expressionsvektor, C- terminale Hexa-Histidin-Fusion (Merck) |

| | |
|---------------------|--|
| pGEX-KGK, pGEX-AHK: | bakterieller Expressionsvektor, N-terminale GST-Fusion (M.G. Rosenfeld) |
| pcDNA3: | eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promoter (Invitrogen) |
| pEGFP-C3: | eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promoter, N-terminale GFP-Fusion (Clontech) |

II.1.3 Lösungen und Medien

Alle Lösungen und Medien wurden mit Wasser, das durch ein Milli-Q-System (Millipore, Schwalbach) aufgereinigt wurde, hergestellt. Wo angegeben wurde der pH-Wert mittels Zugabe von NaOH, KOH oder HCL eingestellt. Zur Sterilisation wurden die Lösungen 20 min bei 121°C autoklaviert.

| | |
|------------------------------|---|
| DNA-Probenpuffer (6x) | 40 % Sucrose; 0,25 % O-Bromphenolblau; 0,25 % Xylen-Cyanolblau |
| Laemmli Probenpuffer (3x) | 360 mM Tris-HCl (pH 6,8); 6 % SDS; 30 % Glycerol; 5 % β -Mercaptoethanol; 0,05 % O-Bromphenolblau |
| Laemmli Stop Puffer (2x) | 62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8; 2 % SDS; 10 % Glycerol; 100 mM DTT; 0,001% Bromphenolblau |
| LB(Luria-Broth)-Medium | 10 g/L Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/L NaCl |
| NETN-Puffer | 0,5% NP 40; 20 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10% Glycerol ; frisch dazugeben 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1x Protease-Inhibitor-Mix (Roche) |
| PBS-Puffer | 0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 3,2 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 mM KH_2PO_4 |
| PBT | PBS und 0,1 % Triton X-100 |
| PBST | PBS und 0,1 % Tween 20 |
| SDS-PAGE Lauf-Puffer | 25 mM Tris-HCl; 190 mM Glycerol; 0,1 % SDS (pH 8,3) |
| TBE-Puffer | 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; pH 8,3 |
| TE-Puffer | 10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA (pH 8,0) |
| Western-Blot-Transfer-Puffer | 50 mM Tris (pH 8,0); 380 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol |

II.1.4 Zelllinien

COS7-Zellen; fibroblastenähnliche Affennierenzellen (*African green monkey*, Gluzman, 1981)

II.1.5 Bakterienstämme

Escherichia coli für Klonierungsexperimente:

DH5 α : F-*gyrA96*(Nal^r) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* (r_k⁻ m_k⁺) *glnV44 deoR* Δ (*lacZYA-argF*)U169 [Φ 80d Δ (*lacZ*)M15] (Fermentas Life Sciences; Woodcock *et al.*, 1989)

DH5 α IQ: *endA1 hsdR17* (rk⁻, mk⁺), *supE44, thi-1, -, recA1, gyrA96, relA1, 80 Δ lacZM15, Δ (lacZYA-argF)U169/F', proAB, lacIq, lacZ M15, Tn5(KmR)* (Gibco BRL, Karlsruhe)

Escherichia coli für die Expression rekombinanter Proteine:

BL21 (DE3): *hsdS_B* (r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* (λ *cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1*) (New England Biolabs; Studier und Mofatt, 1986)

BL21 Codon Plus (De3)-RIL strain^a: BF⁻ *ompT hsdS* (r_B⁻ m_B⁻) *dcm* + Tet^r *gal λ* (DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW Cam^r*] (Stratagene,)

II.1.6 Zellkulturmedien

COS7:

| | |
|--------|---|
| 500 mL | HAM's F12 (Gibco-BRL) |
| 55 mL | Fötale Kälberserum (FCS, inaktiviert bei 65°C für 30 min; Gibco-BRL) |
| 5,5 mL | Penicillin-/Streptomycin-Lösung (10000 U/mL Penicillin; 10000 μ g/mL Streptomycin, Gibco-BRL) |

Primäre hippocampale Neuronen:

Plating-Medium:

450 mL MEM (Gibco-BRL)
 3 g Glucose (Roth)
 50 mL Pferdeserum (Biother)

Neuronenmedium:

480 mL MEM (Gibco-BRL)
 3 g Glucose (Roth)
 Zusätze:
 500 µL Transferrin 100 mg/mL (Sigma)
 500 µL Insulin 5 mg/mL (Sigma)
 500 µL Progesteron 20 µM (Sigma)
 500 µL Putrescin 100 mM (Sigma)
 500 µL Selendioxid 30 µM (Sigma)
 5 mL Na-Pyruvat 100 mM (Sigma)
 12,5 mL Ovalbumin 4%

Für Neuronenmedium mit Cytostatikum:

500 µL AraC-C 5 mM (Sigma)
 (Cytosin-β-D-Arabinofuranosid-HCl)

Alle Medien wurden nach Zugabe der Zusätze steril filtriert und bei 4°C gelagert.

II.1.7 DNA-Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (*Primer*) wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in sterilem ddH₂O resuspendiert und auf eine Arbeitskonzentration von 100 pmol/µL eingestellt.

Für die Amplifikation der LIM-Kinase1-cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (siehe unten) wurden folgende *Primer* verwendet:

LIMK1pACT2-5': 5'- TAG ATC TGC ATG AGG TTG ACG CTA CTT -3'
 (enthält eine *Bgl*III-Schnittstelle am 5'-Ende)

LIMK1pACT2-3': 5'- TGT CGA GTC AGT CAG GGA CCT CGG -3' (*Sall*)
 (enthält eine *Sall*-Schnittstelle am 5'-Ende)

II.1.8 Doppelsträngige RNA-Oligonukleotide

Für RNAi-Experimente wurden doppelsträngige RNA-Oligonukleotide mit der Bezeichnung *stealth*-siRNA® von der Firma Invitrogen bezogen.

stealth siRNA RNF6-167

Sense Sequenz: GCGUCUCCCUUUCACACCAGUACUA

Antisense Sequenz: UAGUACUGGUGUGAAAGGGAGACGC

stealth siRNA RNF6-167-Kontrolle

Sense Sequenz: GCGCCUUUCACUCACGACAUUCCUA

Antisense Sequenz: UAGGAAUGUCGUGAGUGAAAGGCGC

stealth siRNA LIMK1-259

Sense Sequenz: GCGGCAAGUGAUGGAGACUCAGAAA

Antisense Sequenz: UUUCUGAGUCUCCAUCACUUGCCGC

stealth siRNA LIMK1-259-Kontrolle

Sense Sequenz: GCGUGAAGUAGAGAGACUCGCGAAA

Antisense Sequenz: UUUCGCGAGUCUCUCUACUUCACGC

II.1.9 Antikörper

II.1.9.1 Primäre Antikörper

| Antikörper gegen | Herkunftspezies | Eingesetzte Verdünnung | Bezugsquelle |
|------------------|--------------------------|------------------------|---------------------|
| β-Tubulin | polyklonal, Kaninchen | 1:1000 | Covance |
| HA.11 | monoklonal, Maus | 1:1000 | BAbCO |
| CLIM | polyklonal, Kaninchen | 1:3000 | Ostendorff, 2002 |
| c-Myc | polyklonal, Kaninchen | 1:1000 | Santa Cruz (sc-789) |
| Lhx3 | polyklonal, Kaninchen | 1:1000 | Ostendorff, 2002 |

| | | | |
|-------------------|--------------------------------|---------|------------------------------|
| LIMK1 | polyklonal, Kaninchen | 1:800 | Sigma |
| LIMK1 | polyklonal, Ratte | 1:000 | Foletta <i>et al.</i> , 2004 |
| LIMK1 | monoklonal, Maus | 1:500 | BD Biosciences |
| Neurofilament 200 | monoklonal, Maus | 1:000 | Sigma |
| RLIM | polyklonal, Meerschweinchen | 1:5000 | Ostendorff, 2002 |
| RLIM | polyklonal, Kaninchen | 1:3000 | Ostendorff, 2002 |
| Rnf6 | polyklonal, Meerschweinchen | 1:200 | Schlüter, 2003 |
| Tau | polyklonal, Kaninchen | 1:5000 | DakoCytomation |
| Tubulin | monoklonal, Maus | 1:25000 | Sigma |
| Ubch5 | polyklonal, Kaninchen | 1:1000 | Chemicon |

Für die immuncytochemische Fluoreszenz-Färbungen von Aktin wurde das Toxin Phalloidin aus dem grünen Knollenblätterpilz verwendet, welches an den Fluorophor Cy3 gekoppelt ist. Phalloidin-Cy3 wurde mit einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

II.1.9.2 Sekundäre Antikörper und HRP-Protein A

| Antikörper gegen | Herkunftspezies | Eingesetzte Verdünnung | Bezugsquelle |
|-------------------------------|-----------------|------------------------|---------------|
| Alexa488-anti-Kaninchen | Ziege | 1:1000 | MoBiTec |
| Alexa488-anti-Meerschweinchen | Ziege | 1:1000 | Vector-Alexis |
| Alexa546-anti-Meerschweinchen | Ziege | 1:1000 | Invitrogen |
| Alexa633-anti-Kaninchen | Ziege | 1:1000 | Invitrogen |

| | | | |
|-----------------------------|-------|--------|-------------------------|
| Cy3-anti-Kaninchen | Ziege | 1:1000 | Jackson Laboratories |
| Cy3-anti-Maus | Ziege | 1:1000 | Dianova |
| HRP-Protein A | Ziege | 1:5000 | Bio-Rad |
| HRP-anti-Kaninchen | Ziege | 1:2000 | Covance |
| HRP-anti-Meerschweinchen | Ziege | 1:2000 | Covance |
| Biotin-anti-Kaninchen | Ziege | 1:1000 | Vector-Alexis |
| Biotin-anti-Meerschweinchen | Ziege | 1:1000 | Vector-Alexis |

II.2 Methoden

II.2.1 Arbeiten mit DNA und RNA

II.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

II.2.1.1.1 Mini-Präparation

2 mL antibiotikahaltiges LB-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen 1 min bei 14.000 Upm (Eppendorf Tischzentrifuge, 5417) sedimentiert. Die Zellen wurden danach in 200 µL Lösung 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNaseA) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 200 µL Lösung 2 (200 mM NaOH; 1% SDS) dazugegeben, vermischt und bis zu 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µL Lösung 3 (2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1) wurde abermals gemischt. Zwecks Proteinfällung wurde 10 min bei 4°C inkubiert und 30 min 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Nach 30 minütiger Zentrifugation, anschließendem Waschen des Niederschlages mit 70 % EtOH und 5 minütiger Trocknung wurde das Pellet in 50 µl ddH₂O gelöst. Von diesem Ansatz wurden 5 µl für Restriktionsanalysen und 2,5 µl für Sequenzanalysen eingesetzt.

II.2.1.1.2 Maxi-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde mit Plasmid „Maxi-Präparations-Systemen der Firmen Gibco-BRL oder Machery-Nagel durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen einer 200 mL- bzw. 150 mL-Übernachtskultur benötigt. Die Zellen wurden zuerst bei 6000 Upm für 15 min bei 4°C (Beckman J2-21 M/E Zentrifuge, JA 10-Rotor) abzentrifugiert. Die Plasmide wurden anschließend nach den Angaben der Hersteller isoliert.

II.2.1.3 Phenol-/Chloroform-Extraktion

Die Phenolisierung ist die Standard-Extraktionsmethode, um Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen (Sambrook et al., 1989). Phenol dissoziiert Protein-Nukleinsäure-Komplexe in die freien Komponenten, während Chloroform Proteine denaturiert und die Phasentrennung erleichtert. Hierfür wurden DNA-haltige Lösungen mit dem gleichen Volumen eines wassergesättigten Phenol-/Chloroform-Gemisches (1:1; w/v) versetzt, gut gemischt und zur Phasentrennung bei 14000 x g für 10 min zentrifugiert. Aus der oberen wässrigen Phase wurde durch Ausschütteln mit je einem Volumen Chloroform die restliche Phenollösung entfernt und bei 14000 x g für 5 min zentrifugiert. Die obere DNA-enhaltende Phase wurde abgenommen und die DNA anschließend durch eine Ethanol-fällung ausgefällt.

II.2.1.4 Ethanol-fällung

Nukleinsäuren können durch Zugabe von 2,5 Volumen 96 %igem Ethanol gefällt werden, da auf diese Weise den Nukleinsäuren die Hydrathülle entzogen wird (Sambrook et al., 1989). Die Zugabe von monovalenten Kationen, Na^+ auf 0.3 M Endkonzentration als Acetat, ändert selektiv die Löslichkeit der DNA und erhöht dadurch die Effizienz der Ethanol-fällung. Durch Zugabe von 0.1 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,4) und 2,5 Volumen Ethanol wurde die DNA 30 min bei -80°C gefällt. Danach wurde das Präzipitat für 10 min bei 14000x g abzentrifugiert und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem gewählten kleinen Volumen 1x TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen.

II.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen (Mullis et al. 1986). Hierzu wird eine doppelsträngige DNA (Template-DNA) denaturiert und an den entstehenden komplementären DNA-Einzelsträngen

zwei Oligonukleotid-Primer, welche die zu amplifizierende Region (Ziel-DNA) flankieren, hybridisiert. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase werden, ausgehend von den entsprechenden Oligonukleotid-Primern, die jeweiligen komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Durch das Wiederholen eines ca. dreißigfachen Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung von Primern und davon ausgehender Komplementärstrangsynthese erreicht man eine Vermehrung des DNA-Fragments zwischen den Primern. Standardmäßig wurde in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß ein 50 µl Reaktionsansatz zusammenpipettiert. Im Allgemeinen enthielt ein 50 µl Ansatz 1 - 20 ng Plasmid-DNA oder 0,2 - 2 µg genomische DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl; 0,8 % NP-40), 2 µl 50 mM MgCl₂, 50 pmol jedes Primers, 5 µl 2 mM dNTP-Mix sowie 2,5 U *Taq*-Polymerase (Gibco-BRL) und wurde mit ddH₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Zur Durchführung der Reaktion wurde ein PTC-2000 Pelztier Thermal Cycler (MJ Research) benutzt. Der Ansatz wurde für 1 min bei 94°C inkubiert und durchlief dann 25-40-mal einen Zyklus aus Denaturierung (94°C, 1 min), Hybridisierung (bei geeigneter Temperatur und Dauer) und Polymerasereaktion (72°C und geeignete Dauer). Die Hybridisierungstemperatur der Primer war abhängig vom GC-Gehalt der Oligonucleotide. Die Dauer der Polymerasereaktion richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Als Abschluss der PCR wurde der Ansatz für 5 min bei 72°C inkubiert und auf RT gekühlt.

II.2.1.6 Klonierung von PCR-Fragmenten

Amplifizierte PCR-Fragmente wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend, wie weiter unten beschrieben, isoliert. Die PCR-Primer wurden so entwickelt, dass sie endständige Schnittstellen für Restriktionsenzyme hatten. Die PCR-Produkte konnten so, nach Verdau mit den entsprechenden Enzymen, über Gelelektrophorese getrennt und isoliert werden und anschließend in eine Ligation mit einem Vektor, der mit denselben Enzymen behandelt worden war, eingesetzt werden. Da Enzyme lineare DNA-Fragmente mit endständigen Restriktionsstellen häufig nicht effizient schneiden, wurde alternativ das TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen verwendet (nach Angaben des Herstellers). Hier kloniert man das PCR-Fragment in den pCR2.1-TOPO-Vektor, um im Folgenden eine leichtere Restriktion zu erreichen. Die *Taq*-Polymerase hängt einzelne Desoxyadenosinreste an die 3'-Enden von PCR-Produkten. Der linearisierte vorliegende TOPO-Vektor besitzt überhängende 3'-Thymidinreste, welches zum einen eine effiziente Ligation von PCR-Produkten erlaubt und zum anderen die Selbstligation von Vektor-DNA reduziert. Nach der Transformation und Vermehrung des Vektors in optimierten *E.coli*-Bakterien, konnten aus diesem Vektor die DNA-Fragmente herausgeschnitten und in andere Vektoren inkloniert werden.

II.2.1.7 Elektrophorese in Agarosegelen

DNA Moleküle wurden in Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TBE gelöst (aufkochen) und Ethidiumbromid hinzugefügt (0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Die Konzentration der Agarose wurde entsprechend der Größe der DNA-Moleküle eingestellt (0,8-2 %). Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und bei etwa 10 V/cm Gellänge elektrophoretisch aufgetrennt.

Die DNA ist aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandert daher im elektrischen Feld zur Anode. Dabei wird die Geschwindigkeit durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Spannung beeinflusst. Je höher die gewählte Agarosekonzentration, desto geringer ist die Porengröße und damit die Wanderungsgeschwindigkeit. Kleinere DNA-Fragmente wurden daher bei höheren Agarosekonzentrationen aufgetrennt.

Unter UV-Licht wurden die durch interkaliertes Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden photographisch dokumentiert (UV-Gel Dokumentationssystem von Herolab, Wiesloch).

II.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde das erwünschte DNA-Fragment unter UV-Licht herausgeschnitten und mittels Zentrifugation durch Gel-Extraktions-Säulen (Milli-Pore) nach Angabe des Herstellers aus der Agarose eluiert.

II.2.1.9 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

DNA und RNA-Konzentrationen wurden photometrisch durch Messen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (Ultrospec 3000, Pharmacia). Bei dieser Wellenlänge liegt sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige DNA das Absorptionsmaximum. Eine OD_{260} von 1 entspricht etwa 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für doppelsträngige DNA, sowie 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für einzelsträngige DNA und 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für RNA.

II.2.1.10 Restriktionsverdau

Restriktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 20 mL durchgeführt. Jedem Ansatz wurde der vom Hersteller für das jeweilige Enzym empfohlene Puffer zugefügt. Die Reaktionen wurde in der Regel mit 1-2 U Enzym/ μg DNA verdaut und inkubierten 1 h - über

Nacht bei 37°C. Durch Zugabe von Probenpuffer (bei anschließender Gelelektrophorese) oder durch enzymespezifische Hitzeinaktivierung (im Fall nachfolgender Manipulation der DNA mit weiteren Enzymen) wurden die Reaktionen gestoppt.

II.2.1.11 Präparation von Vektoren

Zur Herstellung linearer Vektor-DNA wurde der jeweilige Vektor mit einem oder einer Kombination von Restriktionsenzymen geschnitten. Zur Überprüfung der Vollständigkeit einer Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes auf ein Agarosegel geladen. Anschließend wurde die DNA unter Verwendung des DNA-Gel-Extraktions-Kits (Genomics) isoliert. Zur Verhinderung einer Religation der Vektor-DNA, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert worden war, wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert.

II.2.1.12 Dephosphorylierungen von 5'-Enden

Eine Religation von Vektoren kann durch die Entfernung der Phosphatgruppen am 5'-Ende mit Hilfe von alkalischen Phosphatasen verhindert werden. Nach Zugabe von 1 µL alkalischer Phosphatase (1 U/mL; Roche) und 10x AP-Puffer wurde bei 37°C die betreffende DNA für 1 h inkubiert. Es folgte eine Inaktivierung der Phosphatase bei 85°C für 15 min. Zur DNA-Reinigung wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion mit Ethanol-fällung verwendet. Das gewaschene und getrocknete Pellet wurde in ddH₂O aufgenommen.

II.2.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (Roche) benutzt. Standardmäßig wurde ein molares Vektor / Insert Verhältnis von 1 zu 3 benutzt. Die Ligation erfolgte üblicherweise mit 1 µL T4-DNA-Ligase (1.5 U/µL) bei 16°C über Nacht, teilweise wurde die Reaktion auch in 3 - 5 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ligation wurden in einem möglichst kleinen Volumen (höchstens 15 µL) vorgenommen. Teile des Ligationsansatzes (4 - 15 mL) wurden in kompetente Bakterien-Zellen des *E.coli*-Stammes DH5α transformiert.

II.2.1.14 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden mit einem ABI Prism 377 DNA-Sequencer (Perkin Elmer)

unter Verwendung des ABI-Prism-Dye-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kits (Perkin Elmer) und Standard-Primern nach Angaben des Herstellers von der Sequenz Service-Einheit des ZMNH durchgeführt. Jeweils Ansätze, die ca. 0,6 - 0,75µg DNA und 10 pmol *Primer* enthielten und mit ddH₂O auf ein Volumen von 8 µL gebracht worden waren, wurden benötigt.

II.2.1.15 Herstellung kompetenter Bakterien

Von einer Glycerinkultur des *E.coli*-Stammes DH5α wurden circa 10 µL auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach Wachstum über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurde eine einzelne Kolonie zum Animpfen einer 5 mL Vorkultur benutzt, die wiederum über Nacht bei 37°C geschüttelt wurde. Als Hauptkultur wurden 150 mL LB-Medium, das 10 mM CaCl₂ enthielt, mit 1 mL der Vorkultur angeimpft und solange geschüttelt, bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dies ist der Fall, wenn die Bakteriensuspension eine OD₆₀₀ von 0,45-0,5 erreicht hat. Die Suspension wurde dann bei 4°C und 5000 Upm 5 min zentrifugiert (Zentrifuge J2-21 M/E Rotor JA10 oder JA 14, Beckmann). Nach Dekantieren des Überstands wurde das Sediment in 50 mL eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und 30 min unter gelegentlichem Rühren auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 5 - 10 min bei 2000 Upm zentrifugiert (Minifuge RF, Haereus). Das Sediment wurde in 10 mL eiskaltem 100 mM CaCl₂ mit 15 % Glycerin resuspendiert und über Nacht im 4°C-Raum auf Eis inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension auf Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

II.2.1.16 Transformation von Bakterienzellen

Die kompetenten Bakterienzellen wurden zuerst langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA (1-25 ng) wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte für 45-60 sec ein Hitzeschock bei 42°C. Der Ansatz wurde sofort wieder auf Eis abgekühlt und dort für 2 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 mL LB-Medium ohne Antibiotika wurden die Zellen 45 min bei 37°C geschüttelt, um ihnen die Gelegenheit zur Expression der Antibiotikaresistenzgene zu geben. Die Bakterien wurden dann auf antibiotikahaltige LB-Platten (0.1 mg/mL Ampicillin oder 0.1 mg/mL Kanamycin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

II.2.1.17 Verwendung doppelsträngiger RNA-Oligonukleotide

Doppelsträngige RNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen in lyophilisierter

Form bezogen. Sie wurden in RNase-freiem Wasser resuspendiert und auf die Arbeitskonzentration 20 pmol/ μ L eingestellt. Die Durchführung der Transfektionen von Säugetierzellen mit den RNA-Oligonukleotiden wird in Abschnitt II.2.3.3 beschrieben.

II.2.2 Proteinbiochemische Arbeiten

II.2.2.1 Expression von Proteinen in Bakterien

Proteine wurden in dem *Escherichia coli*-Stamm BL21 exprimiert. Für GST-Fusionsproteine (Glutathion-S-Transferase) wurden die Vektoren pGEX-KGK, pGEX-KG und pGEX-AHK verwendet. Die Zellen wurden mit den gewünschten Expressionskonstrukten transformiert, auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine 20 mL Vorkultur aus einem kultivierten Klon in antibiotikahaltigem LB-Medium inkubiert. 3-5 mL der Vorkultur wurden in 200 mL frisches antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben und die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 (mittlere logarithmische Wachstumsphase) schüttelnd bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten Wachstumsphase wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Suspension wurde weitere 3-5 h bei kurzen Proteinen bei 37°C und alternativ über Nacht bei der Expression längerer Proteine (RLIM und Rnf6) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei RT und 6000 Upm zentrifugiert (Zentrifuge J2-21M/E, JA-10 Rotor, Beckmann).

II.2.2.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden mit Hilfe von Glutathion-Agarose (Sigma) aus dem Bakterienlysat gereinigt. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Bakteriensedimente der exprimierten GST-Proteine wurden in Lysispuffer (50 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,6; 10 % Glycerol; 1 μ g/mL Aprotinin; 1 μ g/mL Leupeptin; 1 mM DTT) resuspendiert und in ein 12 mL Greiner-Röhrchen überführt. Die Proben wurden 3x 30 sec in 45 Sekundenintervallen mit 60 Watt beschallt und anschließend 30 min bei 9500 Upm in einer Beckmann Zentrifuge (Rotor JA-20) zentrifugiert. Zu dem Überstand wurden 500 mL Glutathion-Agarose (nach Angaben des Herstellers equilibriert) pipettiert. Überstand und Glutathion-Agarose wurden 3 - 4 h bei ständiger Rotation inkubiert. Das durch die anschließende Zentrifugation (3500 Upm, 5 min, Haereus-Zentrifuge) erhaltene Sediment wurde 3 mal 5 - 10 min mit ca. 5 mL Lysispuffer gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde wie beschrieben zentrifugiert, der Lysispuffer dekantiert und neuer

Lysispuffer zugegeben. Anschließend wurden die GST-Proteine mit dem Elutionspuffer (Lysispuffer mit 10-25 mM Glutathion) unter ständiger Rotation 1 h bis über Nacht von der Glutathion-Agarose eluiert. Unter Benutzung einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung des Gels wurden die Proben analysiert.

II.2.2.3 Aufreinigung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen

Zellextrakte zur Gewinnung der Proteine wurden aus COS7-Zellen oder Primärkulturen hippocampaler Neuronen Zellextrakte hergestellt. Es wurden, wenn nicht anders angegeben, Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 3 cm für Primärkulturen oder 10 cm für COS7-Kulturen verwendet. Alle Schritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen. Die Zellen wurden 2 mal mit 2 – 5 mL PBS gewaschen. Nachdem das PBS vollständig abgesaugt worden war, wurden je nach Zellkultur und Zelldichte 200 µL bis 500 µL NETN-Puffer dazugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte abgelöst. In Suspension wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellextrakte 15 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C gelagert.

II.2.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (1976) durchgeführt. Es wurde Bradford-Reagenz (Roti-Quant) der Firma Roth verwendet. Je 500 µL Reagenz wurden mit 2 mL Zellextrakt versetzt und gemischt. Zusätzlich wurde eine Eichreihe aus 200 µL Bradford-Reagenz mit 1 - 10 µg BSA pipettiert. Je 200 µL der Lösungen (Doppelbestimmung) wurden in eine Mikrotiter-Platte mit 96 Mulden pipettiert. Die Proteinkonzentration konnte nach einer Extinktionsmessung bei 595 nm mit Hilfe der erstellten Eichgerade berechnet werden.

II.2.2.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. 8-15 %ige SDS-Polyacrylamidgele (Sambrook et al., 1989) wurden verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel in 3x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 100°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 15 - 44 mA. Vorgefärbte Protein-Molekulargewichtsstandards (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas) wurden zur Bestimmung der Proteingrößen verwendet. Zur Visualisierung wurden die Proteine im Gel mit Coomassie angefärbt, auf Nitrozellulose transferiert und im Western-Blot-Verfahren analysiert. Im Fall radioaktiver Proteine wurde das Gel getrocknet, danach wurde ein Röntgenfilm exponiert.

II.2.2.6 Färbung von SDS-PAGE-Gelen mit Coomassie Brilliant Blau

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele 60 min in Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (0,2 % Coomassie Brilliant Blue R-250; 50 % Methanol; 7,5 % Essigsäure) gefärbt, anschließend mit Entfärberlösung (50 % Methanol; 10 % Essigsäure) inkubiert und getrocknet (Model 583, Biorad).

II.2.2.7 Western-Blot

II.2.2.7.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Der Transfer von Proteinen nach Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Western-Blot) erfolgte nach Herstellerangaben entweder nach einer *Semi-Dry-Transfer-Methode* in einer Graphitblot-Apparatur (Phase, Lübeck) mit Transferpuffer (50 mM Tris-HCl, 380 mM Glycerin, 0.1 % SDS, 20 % Methanol) bei 1 mA/cm² für 60 - 120 min oder nach einer Tank-Blot Methode mittels einer Blot-Apparatur (Amersham Pharmacia) im Transferpuffer (SDS-PAGE-Laufpuffer + 20% Ethanol) bei 90 mA über Nacht.

II.2.2.7.2 Ponceaurot-Färbung der Nitrozellulosemembran

Die Nitrozellulosemembran mit den immobilisierten Proteinen wurde nach Herstellerangaben kurz in Ponceaurot (Ponceau S, Applichem) geschwenkt, um zu überprüfen, ob der Transfer gleichmäßig erfolgt war. Die Ponceaurot-Färbung wurde durch mehrmaliges Schwenken in ddH₂O und PBST entfernt. Danach folgte der immunologische Nachweis mit spezifischen Antikörpern.

II.2.2.7.3 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der Western-Blot wurde nach dem Proteintransfer in einer Blockierungslösung (PBS; 3 % fettfreies Milchpulver) 1 h inkubiert und die freie Proteinbindungskapazität der Membran dadurch abgesättigt. Nach dem Blockieren wurde der gegen das gesuchte Protein gerichtete Antikörper (primärer Antikörper) in Blockierungslösung mit entsprechender Verdünnung inkubiert, dies für mindestens 1 h bei RT bis über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran zweimal mit PBST für 1 und 10 min bei RT und zweimal mit PBS für 1 und 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Daraufhin wurde der Western-Blot mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Protein A bzw. Meerrettichperoxidase-gekoppelte anti-Kaninchen- oder anti-Meerschweinchen-IgGs für mindestens 20 min inkubiert. Die Detektion

der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte nach erneutem Waschen (wie oben) mit dem ECL- (*Enhanced Chemiluminescence*) Reagenz nach den Angaben der Firma Amersham auf ECL-Filmen (Hyperfilm-ECL, Amersham).

II.2.2.8 Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen *in vitro*

Es wurde das TNT-*in vitro*-Translations-Kit von Promega verwendet, um radioaktiv markierte Proteine *in vitro* herzustellen. In diesem Versuch werden Transkription und Translation gekoppelt. Die Translation wurde entweder in RRL (*rabbit reticulocyte lysate*) oder in WG (*wheat germ extract*) durchgeführt. Es wurden jeweils 25 μL RRL bzw. WG, 1 μg Plasmid-DNA, 1 mL Aminosäure-Mix ohne Methionin, 2 μL L- ^{35}S Methionin, 2 μL Puffer, 1 μL Polymerase sowie 18 μL ddH₂O gemischt und der Ansatz wurde 90 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Ein Aliquot von 2 μL der fertigen Proben wurde über eine SDS-PAGE aufgetrennt, getrocknet und ein Film (Biomax-MR oder X-Omat Blue XB-1) wurde exponiert. Vorgefärbte Protein-Molekulargewichtsstandards (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas) wurden zur Bestimmung und Überprüfung der Proteingrößen verwendet.

II.2.2.9 *In Vitro*-Ubiquitinierungen

Für RNF6-abhängige *in vitro*-Ubiquitinierungen wurden als Substrat 2 - 5 μL ^{35}S -markiertes TNT-Protein (LIMK1) in Gegenwart von 50 ng E1 (Biotrend), 50 ng bakteriell exprimiertem E2 (His-UbcH5b), 4 μg Ubiquitin (Sigma) bzw. mutierte Ubiquitin-Varianten (Boston Biochemicals), 2 mM DTT, 4 mM ATP, 6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl und 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit GST-RNF6 2 h bei 30 °C in einem 50 μL Ansatz inkubiert (Ostendorff et al., 2002). Die Reaktionen wurden mit 50 mL 2x Laemmli gestoppt, 5 min gekocht und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden 30 min in 40% Methanol mit 10 % Essigsäure fixiert und anschließend 15 min in *Amplify* Lösung (Amersham Pharmacia) inkubiert. Nach Trocknen des Gels wurde über Nacht ein Kodak Biomax Film exponiert.

II.2.2.10 Koimmunpräzipitation

Für den Nachweis von Proteininteraktionen in Zellen wurden Koimmunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dafür wurden Zellextrakte zunächst 1 h mit Protein A-gekoppelten Sepharose-Kügelchen, die zuvor in NETN-Lösung äquilibriert wurden, bei 4°C über Kopf drehend inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Kügelchen durch 1 – 2 min Zentrifugation bei 2000 Upm sedimentiert. Die Überstände wurden abgenommen und 1 h

mit 5 – 10 μL spezifischen Antikörpern bzw. Präimmenserum oder unspezifischen IgGs als Negativ-Kontrolle bei 4°C über Kopf drehend inkubiert. Nach Zugabe von frischen Sepharose-Kügelchen wurde 4 h weiter bei 4°C über Kopf drehend inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Kügelchen durch 1 – 2 min Zentrifugation bei 2000 Upm sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Sepharose-Kügelchen wurden dann dreimal mit NETN-Puffer gewaschen und schließlich in 3 x Laemmli-Puffer aufgenommen um 5 min bei 99°C aufgeköcht zu werden. Danach wurden die Sepharose-Kügelchen durch 1 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit sedimentiert und verworfen. Der Nachweis von Interaktionspartnern erfolgte durch Analyse des Überstandes mittels SDS-PAGE und darauf folgender Western-Blot-Detektion.

II.2.3 Methoden der Zellkultur

II.2.3.1 Primärkultur von hippocampalen Neuronen

Zur Kultivierung von hippocampalen Neuronen wurden neugeborene (P0) Mäuse durch Dekapitation getötet. Die Hippocampi wurden in EBSS (Gibco-BRL) präpariert. Zur Vereinzelung der Zellen wurden die Gewebe in 2 mL Papain (24,9 U in EBSS; Worshington) + 100 μL EDTA (5 mM in EBSS; AppliChem) + 100 μL L-Cystein (10 mM in EBSS; Sigma) für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Vereinzelung durch Zugabe von 1 mL Trypsininhibitor (0,25 g in 95 mL EBBS + 5 mL Pferdeserum; Sigma) gestoppt. Der Ansatz wurde 5 min bei 37°C stehen gelassen, damit sich die Zellen absetzten. Der Überstand wurde dann fast vollständig abgenommen und durch Plating-Medium ersetzt. Zur weiteren mechanischen Vereinzelung wurden mit Hilfe von sterilen Pasteurpipetten die Zellen trituriert bis keine Zellklumpen mehr sichtbar waren. Die Zelldichte wurde mit Hilfe von Neubauer-Zählkammern bestimmt. Auf Poly-L-Lysin (Sigma) und Laminin (Sigma) beschichteten 12 mm \varnothing Glasplättchen in 24 Loch-Schalen (Renner) wurden ca. 150000 Zellen und auf Poly-L-Lysin (Sigma) und Laminin (Sigma) beschichtete 3 cm Kulturschalen je ca. 600000 Zellen gegeben. Nach 24 h bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% in wasserdampfgesättigter Atmosphäre wurde das Plating-Medium durch Neuronenmedium ersetzt. Für Langzeit-Inkubationen wurde das Neuronenmedium durch AraC-C-haltiges Neuronenmedium ersetzt, damit eine unkontrollierte Vermehrung der Glia-Zellen verhindert wird.

II.2.3.2 Kultur von Säugerzellen

Die verwendeten COS7-Zellen wurden in HAM's F12 Medium in Gegenwart von 10 % FCS, 100 U/mL Penicillin und 10 mg/mL Streptomycin bei 37°C und einer CO₂-

Konzentration von 5% in wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wuchsen fast bis zur Konfluenz bevor sie subkultiviert wurden. Zum Ablösen der Zellen von der Schale wurde 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco-BRL) verwendet.

II.2.3.3 Lagerung von Säugerzellen

Die Zellen wurden von den Kulturschalen durch Zugabe von 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco-BRL) abgelöst, in FCS/DMSO (9:1) aufgenommen und in Aliquots von 1 mL auf Kryo-Einfrierröhrchen (Renner) verteilt. Diese wurden langsam auf -80°C abgekühlt und danach in flüssigen Stickstoff überführt.

II.2.3.4 Transfektion primärer hippocampaler Neuronen mit Lipofectamine® 2000

Neuronale Primärkulturen wurden entsprechend der Angaben des Herstellers von Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) transfiziert. Die Medien der Zellen wurden vor der Transfektion abgenommen aber nicht verworfen und durch das Serum-freie Medium Opti-MEM®I (Invitrogen) ersetzt. Plasmid-DNA und siRNA wurden wie auch das Lipofectamine® 2000 ebenfalls in Opti-MEM®I vorbereitet. Für Zellen in 24-Loch-Schalen wurden pro 12 mm Ø Glasplättchen 0,8 µg DNA bzw. 40 pmol siRNA mit jeweils 2 µL Lipofectamine® 2000 in insgesamt 100 µL Opti-MEM®I eingesetzt. Für Kulturen in 3 cm Schalen wurden jeweils 4 µg DNA bzw. 200 pmol siRNA mit 8 µL Lipofectamine® 2000 in insgesamt 500 µL Opti-MEM®I verwendet. Nach der Zugabe des Transfektionsmix wurden die Kulturen für 1 h bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% in wasserdampf-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch das aufbewahrte Neuronenmedium, zu dem 1/10 frisches Neuronenmedium zugefügt wurde, ersetzt. Die Kulturen wurden dann weiter bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% in wasserdampf-gesättigter Atmosphäre gehalten.

II.2.3.5 Transfektion der Säugerzellen mit Polyethanolimin (PEI)

COS7-Zellen wurden auf 10 cm Schalen ausgesät und wachsen gelassen, bis eine Konfluenz von 60 – 70 % erreicht war. 1 h vor der Transfektion wurde das gesamte Medium (10 mL) abgesaugt und durch nur 5 mL neues Medium ersetzt. Der Transfektionsansatz pro Schale enthielt 15 µg DNA und 240 µL PBS. In einem anderen Gefäß wurden 42 mL des organischen Makromoleküls PEI mit 240 mL PBS vermischt, dieses Gemisch zu dem Transfektionsansatz gegeben und 10 sec gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurden die verschiedenen Ansätze langsam und vorsichtig auf die einzelnen Platten pipettiert. Nach einer 3,5 - 5-stündigen Inkubation der Platten bei 37°C wurde das

Medium abgesaugt und 10 mL neues Medium dazugegeben. Nach 24 - 48 h wurden die Zellen geerntet.

II.2.3.6 Immunozytochemische Detektion in primären Neuronen

Um endogene oder ektopisch exprimierte Proteine in den primären hippocampalen Neuronen nachzuweisen, wurden immunozytochemische Experimente mit Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern durchgeführt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben auf 12 mm Ø Glasplättchen kultiviert. Die Zellen wurden 15 min bei Raumtemperatur in 4% PFA fixiert und anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung und Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindestellen wurden die Zellen 30 min bei 4°C in PBT + 10% Pferdeserum inkubiert. Die primären Antikörper bzw. Phalloidin wurden in PBT + 1% Pferdeserum verdünnt. Sie wurden direkt nach dem Absaugen des Blockierungs-Puffers auf die Zellen gegeben und 2 h bis über Nacht bei 4°C behutsam geschwenkt. Nach der Inkubation mit primären Antikörpern wurde 3 mal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper in PBT + 1% Pferdeserum verdünnt (in der Regel 1:1000) und für 2 h bei 4°C auf die Zellen gegeben. Nach dem dreimaligen Waschen mit PBS wurde abschließend mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit den Zellen auf Objektträger gebracht. Hierzu wurde Aqua-Poly/Mount (Polysciences) verwendet. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Fluoreszenz-Signale wurden mit dem an das konfokale Lasermikroskop (Leica DM IRBE, Heidelberg) angeschlossenen Scanner (Leica TCS SPII, Heidelberg) dokumentiert.

II.2.3.7 Längenmessung der Axone von transfizierten hippocampalen Neuronen

Um die Längen der Axone von primären hippocampalen Neuronen, die mit DNA oder siRNA transfiziert wurde, zu messen war es bei der immunozytochemischen Detektion (siehe oben) notwendig Axon-spezifische Antigene wie Neurofilament²⁰⁰ oder das Tau-Protein anzufärben. Die digitalen Aufnahmen mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops (Leica) wurden mit der AxioVision-Software (Carl Zeiss, Jena) analysiert. Dabei wurde die Funktion zur Messung von unregelmäßigen Kurven verwendet, die die Länge der Axone in Pixel wiedergibt. Zusammen mit der Länge des Längenmaßstabs in Pixel konnte die Länge des Axons berechnet werden. Für die Längenbestimmungen wurden Projektionen, die positiv für die Axon-spezifischen Antigene Neurofilament²⁰⁰ oder Tau positiv waren gemessen. Für die Messungen wurden ausschließlich transfizierte Neurone, die positiv für das GFP-Signal waren, verwendet.

II.2.3.8 Applikation des Proteasom-Inhibitors MG132

Um die Proteasom-Aktivität in den Zellen zu inaktivieren, wurden Primärkulturen hippocampaler Neurone mit dem Inhibitor MG132 (Calbiochem), welches ungehindert in Zellen diffundieren kann, behandelt. Dafür wurde MG132 (50 mg/mL in DMSO) zum Neuronenmedium mit einer Endkonzentration von 25 µg/mL zugefügt. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit von 1 – 6 h geerntet bzw. für immunzytochemische Untersuchungen fixiert.

II.2.4 Arbeiten mit Gewebeschnitten

II.2.4.1 Kryoschnitte von Maus-Gewebe

Isolierte Mausembryonen wurden in 4% PFA in PBS (pH 7,4) mindestens 1,5 Std. bei 4°C leicht schwenkend fixiert. Anschließend wurden die Embryonen in PBS gewaschen und über Nacht in 30% (w/v) Sucrose enthaltendem PBS bis zum Absinken inkubiert. Abgesunkene Embryonen wurden in Tissue-Tec[®] (Sakura) O.C.T. (*optimal cutting temperature compound*) eingebettet und bei -80°C eingefroren. Die gefrorenen Embryonen wurden nach Bedarf mit dem Kryostat in 10 µM dicke Gewebestücke geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden bei -80°C eingelagert oder für immunhistochemischen Untersuchungen weiterverwendet.

II.2.4.2 Vibratomschnitte von Maus-Gewebe

Mausembryonen wurden in 4% PFA in PBS (pH 7,4) über Nacht leicht schwenkend fixiert. Anschließend wurden sie durch folgende Alkoholreihe geführt: 10% Ethanol, 20% Ethanol, 40% Ethanol, 60% Ethanol, 80% Ethanol, 100% Ethanol. Fixierte Embryonen können in 100% Ethanol bei -20°C gelagert werden. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden sie dann in umgekehrter Reihenfolge wieder durch die Alkoholreihe geführt. Die Inkubationszeit betrug 15 – 20 min pro Ethanolkonzentration. Als nächstes wurden die Embryonen nach dem Waschen mit PBS in 6% Agarose eingebettet. Nach Erhärten der Agarose wurden die Embryonen mit einem Vibratom (Leica) in einem PBS-Bad geschnitten. Die Schnittdicken betragen 40 – 60 µM und repräsentierten dadurch mehrere Zellschichten des Gewebes. Die Gewebeschnitte wurden sofort für die darauf folgenden Untersuchungen weiterverwendet.

II.2.4.3 Immunhistochemie mit Kryoschnitten

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die eingefrorenen Kryoschnitte aufgetaut und mit einem wasserabweisenden Stift umzirkelt. Das Gewebe wurde mit PBT + 10% Pferdeserum 15 min lang bei Raumtemperatur permeabilisiert und gleichzeitig blockiert. Die primären Antikörper wurden in PBT + 1% Pferdeserum verdünnt und direkt nach dem Entfernung des Blockierungs-Puffers auf das Gewebe gegeben. Die Inkubation erfolgte bis über Nacht bei 4°C. Die primären Antikörpern wurden abgenommen und das Gewebe 3 mal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper, welche ebenfalls in PBT + 1% Pferdeserum verdünnt waren (in der Regel 1:1000), für 2 h bei 4°C auf die Gewebe gegeben. Nach dem dreimaligen Waschen mit PBS wurde abschließend mit ddH₂O gewaschen und die Schnitte auf Objektträgern mit Vectashield Mounting Medium (Vector-Alexis) eingedeckelt. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Fluoreszenz-Signale wurden mit dem an das konfokale Lasermikroskop (Leica DM IRBE, Heidelberg) angeschlossenen Scanner (Leica TCS SPII, Heidelberg) dokumentiert.

II.2.4.4 Immunhistochemie mit Vibratomschnitten

Die hin und zurück durch eine Alkoholreihe (10% Ethanol, 20% Ethanol, 40% Ethanol, 60% Ethanol, 80% Ethanol, 100% Ethanol) geführten Vibratomschnitte wurden immunhistochemische Untersuchungen verwendet. Die Schnitte wurden stets schwimmend in den jeweiligen Lösungen inkubiert. Zunächst wurden endogene Peroxidase-Aktivitäten durch die Inkubation in 0,03% H₂O₂ in PBS für 30 min bei Raumtemperatur getilgt. Nach 3 Waschdurchgängen mit PBS wurden die Zellen 30 min bei Raumtemperatur in PBT + 10% (v/v) Pferdeserum + 1% BSA (w/v) (Sigma) für 1 h zum Blockieren inkubiert. Die primären Antikörper wurden in der Blockier-Lösung verdünnt und zu den Schnitten pipettiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken. Nach dem dreimaligen Waschen mit PBT wurde die Schnitte in Blockier-Lösung mit sekundären Biotin-gekoppelten Antikörpern für 4 h bis über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe 3 mal mit PBS gewaschen. Um eine Verstärkung der Signale zu erhalten wurden das ABC-Kit (*Avidin Biotin Complex*) (Vector-Alexis) verwendet. In diesem Kit ist die Meerrettichperoxidase H an Avidin gekoppelt. Avidin besitzt vier Bindestellen mit einer sehr hohen Affinität für Biotin, wodurch pro primären Antikörper mehr Meerrettichperoxidase H-Aktivität gebunden wird. Die Inkubation der Vibratomschnitte in der ABC-Lösung erfolgte für 4 h bei 4°C unter leichtem Schwenken. Nach der Inkubation wurden die Gewebe zunächst 2 mal mit PBS und anschließend 3 mal mit Tris-HCl (pH 7,6) für jeweils 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Für die Detektion wurden dann die Gewebe 10 min bei Raumtemperatur in der DAB-Lösung (50 mM Tris-HCl, pH 7,6 + 0,5 mg/mL DAB (Sigma) + 10 mM Imidazol + 0,3% Ammoniumnickelsulfat) präinkubiert. Die Entwicklung des Signale

wurde in Gang gesetzt durch Zugabe von H₂O₂-haltiger DAB-Lösung (5 mL DAB-Lösung + 10 µL 3% H₂O₂). Die zunehmend stärker werdende Färbung wurde durch das Binokular beobachtet und rechtzeitig durch Ersetzen der DAB-Lösung mit 50 mM Tris (pH 7,6) gestoppt. Nach zwei weiteren Waschschrinen mit 50 mM Tris (pH 7,6) wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und mit Hilfe einer Kamera am Lichtmikroskop fotografisch dokumentiert.

III. Ergebnisse

III.1 Expression von RLIM im Neuralrohr von Mausembryonen

RLIM spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Protein-Netzwerkes von LIM-Homeodomän-Transkriptionsfaktoren (LIM-HD). Es vermittelt die Polyubiquitinierung und somit den proteasomalen Abbau von CLIM-Proteinen, welche für die Aktivität von LIM-HD wichtig sind (Ostendorff *et al.*, 2002). Die durch CLIM-Kofaktoren vermittelte biologische Aktivität verschiedener LIM-HD-Proteine ist für die korrekte Bildung neuronaler Strukturen, z.B. im Wirbeltier-Neuralrohr, essentiell (Shirasaki und Pfaff, 2002). Da die entwicklungsbiologische Relevanz der LIM-HD-Proteine bereits bekannt war (Shirasaki and Pfaff, 2002), sollte in diesem Teil der Arbeit das Expressions-Profil von RLIM im Vergleich mit den LIM-HD-Kofaktoren CLIM1 und CLIM2 während der Entwicklung untersucht werden. Hierfür wurden spezifische Antiseren aus Kaninchen verwendet, wobei das Antiserum gegen CLIM-Kofaktoren beide Homologe CLIM1 und CLIM2 erkennt. Für den Vergleich der Expressionsmuster wurde das Neuralrohr von Mausembryonen untersucht, da hier der Grossteil aller bekannten LIM-HD während der frühen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt.

III.1.1 Expressionsprofil von RLIM und CLIM in der frühen Mausentwicklung

Für die Untersuchung der Expressionsprofile von RLIM und CLIM während der Entwicklung von Mausembryonen wurden transversale Vibratomschnitte der Thoraxebene mit einer Stärke von 50 – 80 μm verwendet. Diese Schnitte enthalten mehrere Zellschichten, so dass exprimierte Proteine deutlicher durch Immunhistochemie nachgewiesen werden können. Es wurden Mausembryonen der Altersstufen 11-11,5; 12-12,5; 13-13,5; 14-14,5 sowie 15-15,5 (E11-11,5 bis E15-15,5) mit Antiseren gegen RLIM und CLIM behandelt. Die Abbildung III.1.1 zeigt den immunhistochemischen Nachweis beider Proteine im Neuralrohr der Embryonen. Die Expressionen von RLIM und CLIM weisen in nahezu allen Stufen der Entwicklung ein identisches Muster auf. Zu den Zeitpunkten E11-11,5 und E12-12,5 können beide Proteine im dorsalen und ventralen Bereich des Neuralrohres nachgewiesen werden (Abb.III.1.1), wobei eine Kondensierung der Expressionsdomänen im Neuralrohr der E12-12,5 Embryonen

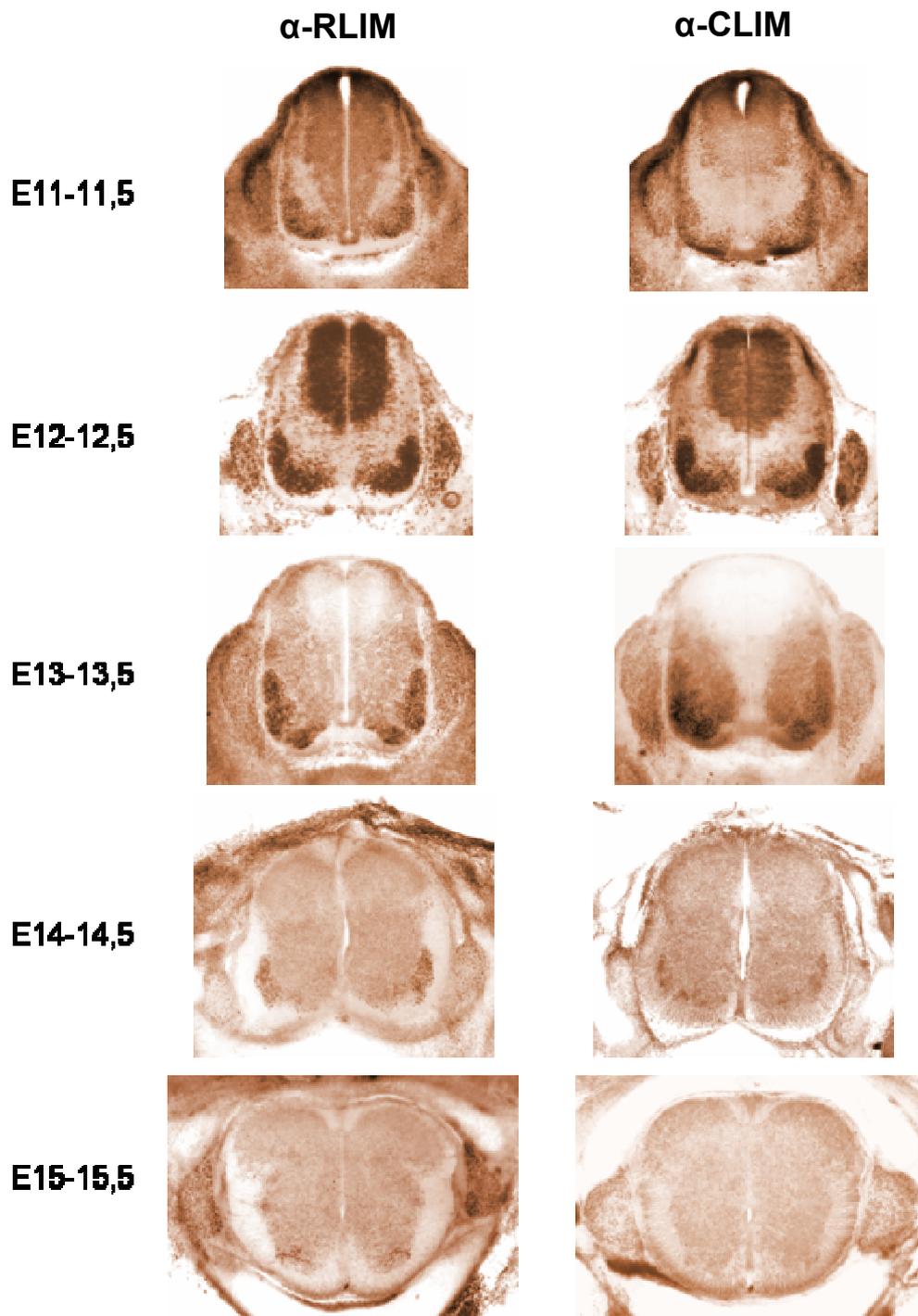


Abb.III.1.1 RLIM und CLIM Expression im Neuralrohr der Maus während der frühen Entwicklung.

Vibratonschnitte der Thoraxregion von 11-11,5 bis 15-15,5 Tage alten Mausembryonen wurden immunhistochemisch mit RLIM- und CLIM-Antiseren behandelt. RLIM und CLIM werden zu frühen Zeitpunkten im dorsalen sowie ventralen Bereich des Neuralrohres exprimiert. Nach 13 Tagen konnten RLIM und CLIM nur noch ventral nachgewiesen werden. An den folgenden Tagen wird die Expression beider Proteine immer schwächer und ist am Tag 15-15,5 kaum noch nachweisbar.

erkennbar wird. Bereits einen Tag später zum Zeitpunkt E13-13,5 ist die Expression von RLIM und CLIM im dorsalen Teil des Neuralrohres nicht mehr nachweisbar. Gleichzeitig damit werden die Expressionsdomänen beider Proteine im ventralen Bereich kleiner und sind einen weiteren Tag später (E14-14,5) deutlich reduziert. Im Neuralrohr von 15-15,5 Tage alten Mausembryonen (E15-15,5) kann RLIM nur noch in einer sehr geringen Zahl von ventral lokalisierten Zellen nachgewiesen werden, während die CLIM-Expression gänzlich verschwunden ist (Abb.III.1.1). Ein Vergleich zur Expression des LIM-HD-Transkriptionsfaktors Lhx3 zeigte, dass auch die Lhx3-Expression mit zunehmendem Alter der Embryonen schwächer wird und bereits nach 14-14,5 Tagen kaum noch detektiert werden kann. Lhx3 wird in V2-Interneuronen sowie Motoneuronen des Säugetier-Neuralrohres während der Entwicklung exprimiert und ist daher nur in einer sehr distinkten Zellpopulation nachweisbar (Abb.III.1.2). Die Expression von RLIM und CLIM scheinen ähnlich wie die von Lhx3 im Laufe der frühen Entwicklung des Neuralrohres herunterreguliert zu werden.

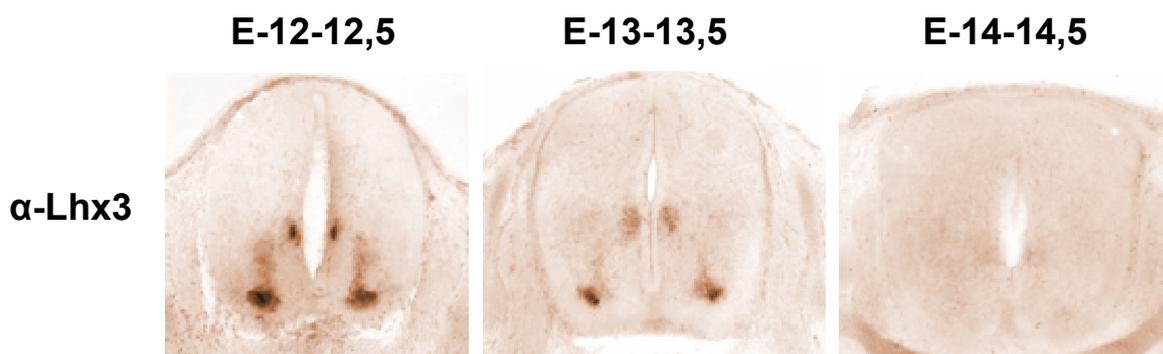


Abb.III.1.2 Expression des LIM-HD-Transkriptionsfaktors Lhx3 im Neuralrohr der Maus.

Vibratonschnitte der Thoraxregion von 12-12,5 bis 14-14,5 Tage alten Mausembryonen wurden immunhistochemisch mit Lhx3-Antiseren behandelt. Lhx3 wird in V2-Interneuronen sowie Motoneuronen des Neuralrohres exprimiert. Die Lhx3-Expression im Neuralrohr wird mit zunehmendem Alter der Embryonen schwächer und ist nach 14-14,5 Tagen kaum noch vorhanden.

III.1.2 Expression von RLIM und CLIM in E12-12,5 Mausembryonen

LIM-HD-Transkriptionsfaktoren zeigen in Mausembryonen entlang der Körperachse von anterior nach posterior ein variierendes Expressionsprofil (Tsuchida *et al.*, 1994). Um die Verteilung von RLIM und CLIM entlang der Körperachse von Mausembryonen zu untersuchen, wurden transversale Vibratonschnitte von drei Ebenen (cervical, thoracal und lumbar) der

E12-12,5 Embryonen immunhistochemisch analysiert (Abb.III.1.3). Auf allen drei Ebenen konnten identische Expressions-Domänen von RLIM und CLIM nachgewiesen werden. Beide Proteine werden sowohl im ventralen als auch im dorsalen Teil des Neuralrohres exprimiert und können ebenfalls deutlich in den dorsalen Wurzelganglien nachgewiesen werden. Eine Veränderung des Expressionsprofils im Neuralrohr entlang der Körperachse, wie sie für LIM-HDs (z.B. Lhx3 und Isl1) gezeigt wurde, ist somit bei RLIM und CLIM nicht erkennbar.

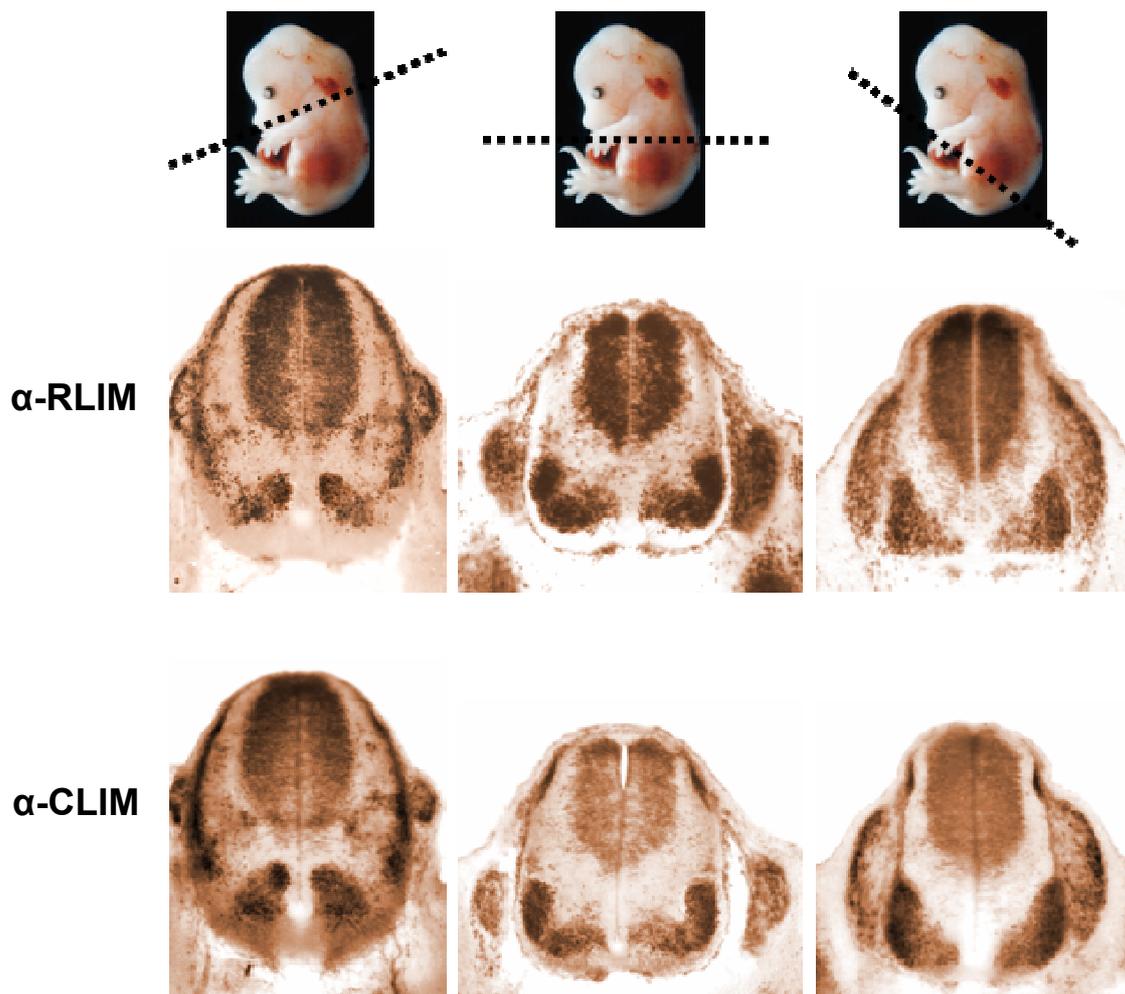


Abb.III.1.3 Expression von RLIM und CLIM im Neuralrohr entlang der Körperachse von E12-12,5 Mausembryonen. Die Ebenen der Vibratomschnitte (cervical, thoracal, lumbar) von 12-12,5 Tage alten Mausembryonen sind anhand der Embryonen-Bilder ganz oben dargestellt. Die Vibratomschnitte wurden immunhistochemisch mit RLIM- und CLIM-Antisera behandelt. Beide Proteine zeigen auf allen drei Körperebenen eine identische Verteilung der Proteinexpressionen im Neuralrohr und sind in ventralen und dorsalen Bereichen nachweisbar. RLIM- und CLIM-Expressionen sind außerdem in den dorsalen Wurzelganglien auf allen drei Schnittebenen nachweisbar.

III.1.3 Kolokalisation von RLIM mit CLIM und Lhx3 in Zellen des Neuralrohres

Um zu prüfen, ob RLIM mit CLIM und Lhx3 in Zellen des Neuralrohres kolokalisiert, wurden transversale Cryotomschnitte von E13-13,5 Mausembryonen mit einer Stärke von 10 μm verwendet. Schnitte dieser Dicke repräsentieren eine geringe Anzahl von Zellschichten, so dass der Nachweis einer distinkten Koexpression auf zellulärer Ebene möglich ist. Die Cryotomschnitte wurden immunhistochemisch mit Hilfe von Antiseren gegen RLIM, CLIM oder Lhx3 aus unterschiedlichen Spezies sowie Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern gefärbt. Die Abbildung III.1.4 zeigt die Fluoreszenzsignale aus der ventralen linken Hälfte des Neuralrohres. RLIM und CLIM sind in fast jeder Zelle kolokalisiert, was aufgrund der Tatsache, dass CLIM-Proteine durch RLIM für den proteasomalen Abbau markiert werden, überraschend ist. Diese Beobachtung lässt daher auf eine Regulation des RLIM-vermittelten Abbaus von CLIM-Proteinen schließen. Kolokalisation von RLIM mit Lhx3 ist im Grossteil der RLIM- und Lhx3-exprimierenden Zellen nachweisbar und bestätigt die Rolle von RLIM im LIM-HD-System.

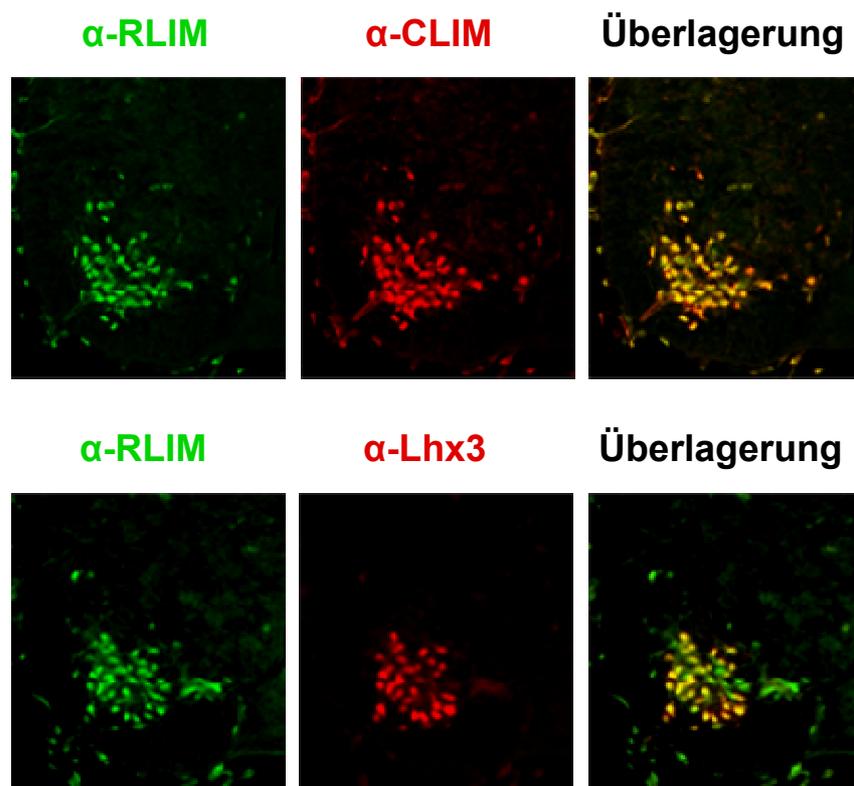


Abb.III.1.4 Kolokalisation von RLIM mit CLIM und Lhx3 im Neuralrohr von E13-13,5 Mausembryonen. Transversale Cryotomschnitte durch Mausembryonen der Stärke 10 μm wurden mit Antiseren gegen RLIM und CLIM oder Lhx3 aus unterschiedlichen Spezies behandelt. Die Fluoreszenzsignale der fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper erscheinen im Falle einer Kolokalisation zweier Proteine in der Überlagerung gelb. RLIM kolokalisiert sowohl mit CLIM als auch mit Lhx3 in Zellen des ventralen Teils des Neuralrohres. Die Färbungen sind mit freundlicher Unterstützung von Kerstin Cornils entstanden.

III.2 Expression und Funktion von RNF6 in Neuronen der Maus

RLIM spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der biologischen Aktivität des Protein-Netzwerkes von LIM-Homeodomän-Transkriptionsfaktoren (LIM-HD). Unter allen RING-Finger Proteinen, die in der Datenbank erfasst sind, weist RNF6 die engste Verwandtschaft zu RLIM auf, die durch die Konservierung der Aminosäuresequenz von ca. 80% sehr auffällig ist. Auch für RNF6 konnte in unserem Labor eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität mit einer für RING-Finger E3-Enzymen typischen Autoubiquitinierungs-Aktivität gezeigt werden (Schlüter, 2004). Über die konkrete Funktion der Ubiquitin-Ligase RNF6 war jedoch wenig bekannt. Daher sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die Funktion von RNF6 im Vergleich mit RLIM näher untersucht werden.

III.2.1 Vergleich der Expression von RNF6 und RLIM in E13 Mausembryonen

Da RNF6 und RLIM zueinander eine starke Konservierung der Aminosäuresequenz aufweisen, sollten die Expressionsmuster beider Proteine verglichen werden, um eventuell so Hinweise auf mögliche Funktionen von RNF6 zu erhalten. Aufgrund der Ähnlichkeit beider Ubiquitin-Ligasen wurde zunächst vermutet, dass auch RNF6 im LIM-HD-Proteinnetzwerk eine Rolle spielt. Um dies zu prüfen, wurden die Expressionsmuster im Neuralrohr von Mausembryonen untersucht.

III.2.1.1 Expression von RNF6 und RLIM im Neuralrohr von E13 Mausembryonen

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen RNF6 und RLIM wurden beide Proteine immunhistochemisch auf Vibratonschnitten von 13-13,5 Tage (E13-13,5) alten Mausembryonen nachgewiesen. Beide werden im ventralen Bereich des sich entwickelnden Neuralrohres exprimiert, wie es schon für RLIM im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abb.III.2.1.A und B sowie Abb.III.1.1). Das sehr ähnlich zu RLIM erscheinende Expressionsmuster von RNF6 deutete zunächst auf einen Zusammenhang mit dem LIM-HD-Proteinnetzwerk hin. Vergleicht man die Färbungen der Vibratonschnitte mit RNF6- und RLIM-Antiseren in der stärkeren Vergrößerung, so erscheint die Verteilung des RNF6-Proteins diffus, während RLIM-Proteine eine Kernlokalisation zeigen (Abb.III.2.1.C und D).

Diese diffuse Erscheinung von RNF6 ist auf eine zytoplasmatische Lokalisation in den Zellen des Neuralrohres zurückzuführen, was mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen bezüglich der zellulären Lokalisation von RNF6-Proteinen übereinstimmt. Mein Kollege Marvin Peters, der immunzytochemisch die Lokalisation von RNF6 und RLIM in kultivierten Säugerzellen untersucht hatte, konnte zeigen, dass RNF6 vornehmlich im Zytoplasma nachweisbar ist. Dahingegen sind RLIM-Proteine, wie auch CLIM- und LIM-HD-Proteine, hauptsächlich im Nukleus lokalisiert (Peters, 2004). Daher erschien ein Zusammenhang von RNF6 mit dem LIM-HD-Proteinnetzwerk nicht mehr als sehr wahrscheinlich.

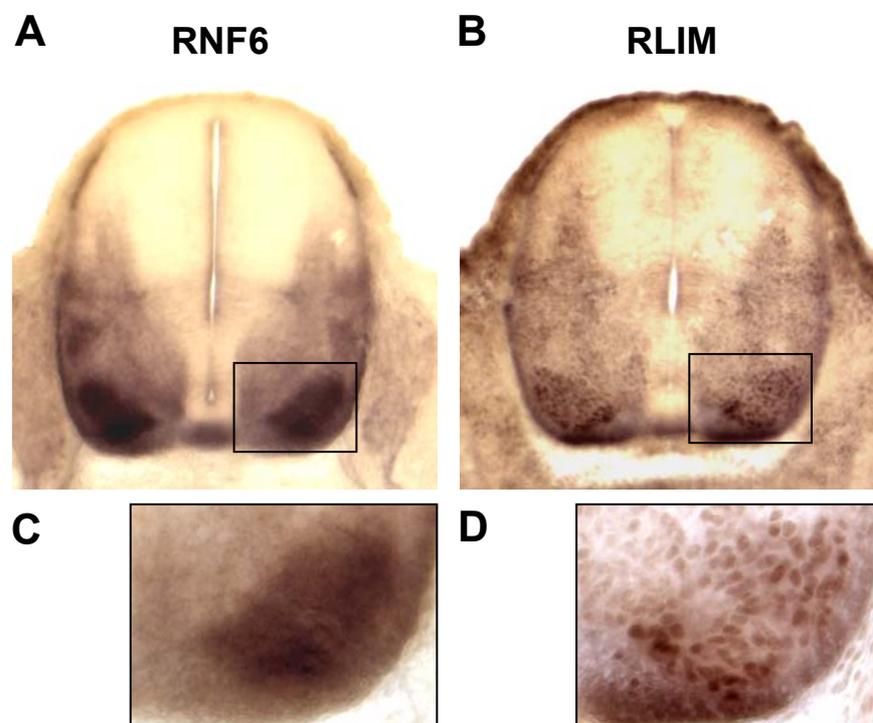


Abb.III.2.1 RNF6 und RLIM sind im ventralen Teil des E13-13,5 Maus-Neuralrohres stark exprimiert.

(A-F) Vibratomschnitte der Thoraxregion von E13-13,5 Mausembryonen wurden in immunhistochemischen Experimenten mit RNF6- oder RLIM-Antisera behandelt. Rnf6 und RLIM werden im ventralen Teil des Neuralrohres exprimiert. (C,D) Die Vergrößerung zeigt eine diffuse RNF6- und distinkte RLIM-Färbung, was auf eine zytoplasmatische Lokalisation von RNF6 und eine nukleäre Lokalisation von RLIM in den Zellen des Neuralrohres hinweist.

III.2.1.2 RNF6 ist in axonalen Projektionen des ventralen Neuralrohres lokalisiert

RNF6 ist deutlich in Ausläufern nachweisbar, welche die axonalen Projektionen von Neuronen der Spinalganglien (DRGs) und von Neuronen im ventralen Teil des Neuralrohres, den so genannten Neuronen der lateralen Ventralwurzel, darstellen (Abb.III.2.2.A). Solch eine distinkte Expression in den Ausläufern ist bei RLIM nicht erkennbar. Dagegen wird RLIM eher ubiquitär exprimiert, was anhand der Färbung des Ektoderms sowie innerer Organe mit dem RLIM-Antiserum erkennbar ist (Abb.III.2.2.B).

Um auszuschließen, dass die Ausläufer aufgrund der Expression von RNF6 in Glia-Zellen mit dem RNF6-Antiserum angefärbt werden können, wurden $erb^{-/-}$ -Mäuse untersucht. Diese

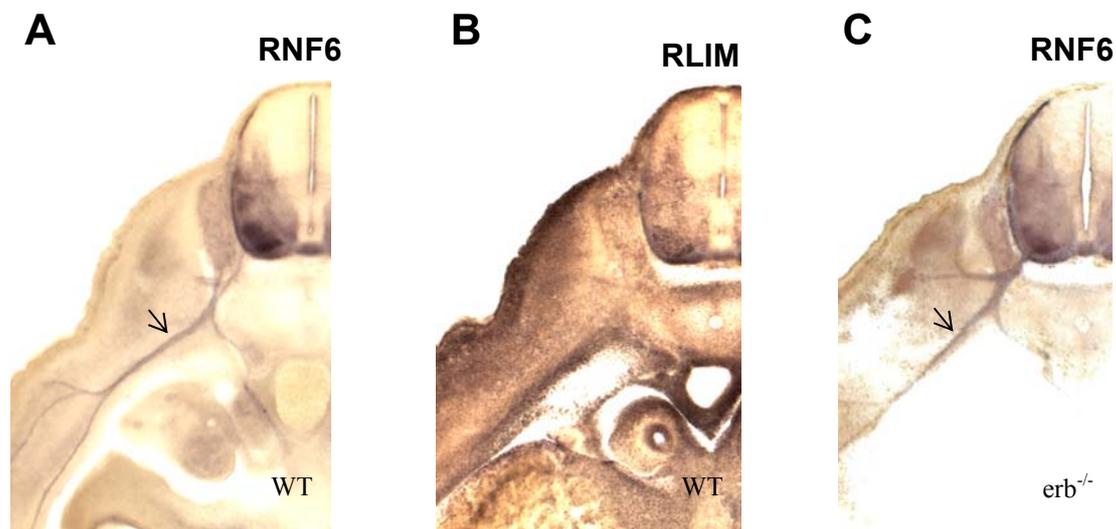


Abb.III.2.2. RNF6 lokalisiert in axonale Projektionen von Neuronen des ventralen Neuralrohres.

(A,B) Vibratomschnitte der Thoraxregion von Abb.III.2.1. A und B in der Vollansicht der linken Seite. RNF6 scheint in axonalen Projektionen (Pfeil) aus dem ventralen Neuralrohr lokalisiert zu sein, während RLIM schwach bzw. kaum in diesen Strukturen nachweisbar ist. (C) Vibratomschnitte der Thoraxregion eines $erb^{-/-}$ E13 Mausembryos. Den $erb^{-/-}$ -Mäusen fehlen Glia-Zellen, so dass es sich bei den mit RNF6-Antiserum gefärbten Strukturen um Axone von Neuronen (Pfeile) handeln muss.

Mausmutanten können in der frühen Phase der Entwicklung keine Gliazellen um die Axone ausbilden (Riethmacher *et al.*, 1997), so dass die Projektionen aus dem ventralen Teil des Neuralrohres lediglich aus Axonen bestehen. Diese Mausmutanten wurden mir freundlicherweise von Dr. D.Riethmacher zur Verfügung gestellt. Die Behandlung der thoracalen Vibratomschnitte von E13-13,5 $erb^{-/-}$ -Mäusen mit RNF6-Antiserum zeigt ebenfalls die Färbung von

neuronalen Ausläufern, die nur durch eine Lokalisation von RNF6 in den Axonen von Neuronen zu erklären ist (Abb.III.2.2.C).

III.2.2. Expression von RNF6 in kultivierten Hippocampus-Neuronen

Um die Expression von RNF6 in Neuronen näher untersuchen zu können, wurden Primärkulturen von hippocampalen Neuronen aus neugeborenen Mäusen präpariert. Primärkulturen hippocampaler Neuronen sind ein etabliertes System, um die generelle Entwicklung von Neuronen und die dabei ablaufenden biochemischen Prozesse zu untersuchen (Craig & Banker, 1994).

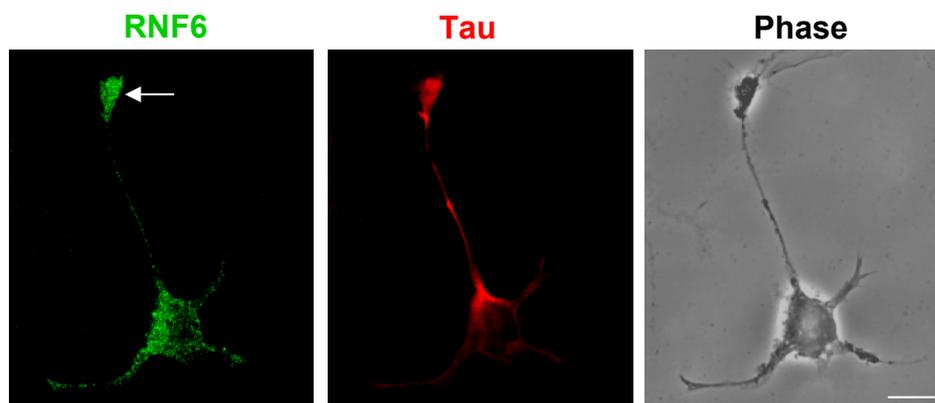


Abb.III.2.3. RNF6 ist besonders auffällig in den Wachstumskegeln von hippocampalen Primärkultur-Neuronen aus neugeborenen Mäusen exprimiert. Primärkulturen von hippocampalen Neuronen wurden 48 h nach Präparation fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit RNF6-Antiserum sowie Tau-Antikörpern und daraufhin mit Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern behandelt. Der grüne Kanal zeigt die Signale von RNF6-Proteinen und der rote Kanal die Signale des axonalen Markers Tau. Die Phasenkontrast-Aufnahme (Phase) zeigt das Neuron im Phasenkontrast. RNF6 lokalisiert stark in den Wachstumskegel des Neurons (Pfeil). Der Längenmaßstab beträgt 10 μ M.

Hippocampale Neuronen wurden nach der Präparation 48 h lang kultiviert und danach fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen immunzytochemisch mit spezifischen Antisera gegen RNF6 und gegen das Tau-Protein sowie Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern untersucht (Abb.III.2.3). Das Tau-Protein ist spezifisch in axonalen Projektionen lokalisiert und dient als Marker für Axone (Binder *et al.*, 1985). Die Aufnahmen mit dem Konfo-

kal-Mikroskop zeigen, dass RNF6 in hippocampalen Neuronen vornehmlich zytoplasmatisch exprimiert wird. Besonders auffällig ist die starke Lokalisation von RNF6 im Wachstumskegel der Axone. Die Tau-Färbung der längsten Projektion des Neurons bestätigt, dass es sich um einen axonalen Wachstumskegel handelt (Abb.III.2.3).

III.2.3. RNF6 reguliert das Axonwachstum hippocampaler Neuronen

Um mögliche Funktionen von RNF6 in Neuronen zu untersuchen, sollten zunächst mittels RNA-Interferenz (RNAi) endogene RNF6-Proteinkonzentrationen in hippocampalen Neuronen verringert werden. In einem komplementären Ansatz wurden durch transiente Transfektionen von GFP-Fusionsproteinen (GFP = *green fluorescent protein*) die RNF6-Proteinmengen erhöht. Die Neuronen wurden dann mikroskopisch auf Veränderungen untersucht, die auf die modifizierten Proteinmengen von RNF6 zurückzuführen sind.

III.2.3.1 Applikation von doppelsträngigen RNA-Oligonukleotiden

Die Funktionalität der verwendeten doppelsträngigen RNA-Oligonukleotide mit der Zielsequenz von RNF6 (RNF6-siRNA; si = *short interfering*) wurde durch Western-Blot-Detektion kontrolliert. Die Analyse der Proteinextrakte von transfizierten Primärkulturen hippocampaler Neurone zeigt, dass die Transfektion mit siRNA gegen RNF6 zur signifikanten Abnahme von RNF6-Proteinmengen führt, während RLIM-Proteinmengen unbeeinflusst bleiben (Abb.III.2.4). Als Kontrolle dienen RNA-Oligonukleotide (Kontroll-siRNA), die den gleichen GC-Gehalt wie RNF6-siRNA haben, deren Nukleotid-Sequenz aber um ca. 30% abweicht.

Mit siRNAi transfizierte Neuronenkulturen wurden immunzytochemisch untersucht, um eventuelle phänotypische Änderungen durch die verminderte RNF6-Proteinkonzentration in den Neuronen zu identifizieren. 24 h nach Präparation wurden dafür Primärkulturen hippocampaler Neuronen mit siRNAs transfiziert. Um transfizierte Neuronen von untransfizierten zu unterscheiden, wurde das GFP-C3-Plasmid, das lediglich lösliches GFP kodiert, kotransfiziert. Erfolgreich transfizierte Neurone konnten am konfokalen Mikroskop anhand der Auto-Fluoreszenz des GFP identifiziert werden. Weitere 24 h später wurden die Kulturen fixiert und mit Antikörpern gegen Neurofilament²⁰⁰, einem Marker für Neuriten, sowie Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern behandelt.

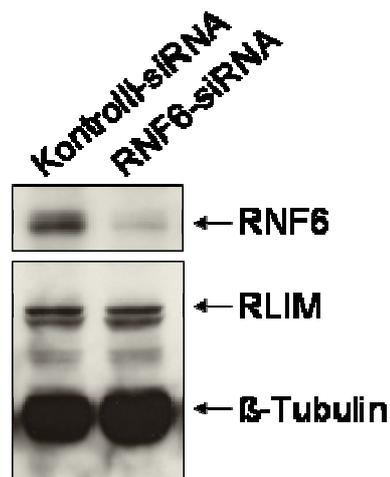


Abb.III.2.4. Die RNF6-Proteinmenge kann in Primärkulturen von hippocampalen Neuronen durch RNAi verringert werden. Primärkulturen von hippocampalen Neuronen wurden 24 h nach Präparation mit siRNA gegen RNF6 sowie Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden die transfizierten Primärkulturen geerntet und lysiert. Die Lysate wurden mittels Western-Blot-Detektion mit spezifischen Antikörpern gegen RNF6, RLIM und β -Tubulin untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle werden RNF6-Proteinmengen in den Zellen der neuronalen Primärkultur durch RNAi signifikant reduziert, während die Proteinkonzentration des verwandten RLIM konstant bleibt. Der Nachweis der β -Tubulin-Proteinmengen dient als Ladekontrolle.

Mit RNF6-siRNA transfizierte Neurone zeigen im Vergleich zu Neuronen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, eine auffällige Verlängerung der Neuriten (Abb.III.2.5). Um eine statistisch gesicherte Aussage über die Signifikanz der Längenveränderung durch RNAi gegen RNF6 machen zu können, wurden in drei unabhängigen Experimenten die Längen der Neuriten von je mindestens 50 transfizierten Neuronen untersucht. Es wurde jeweils die längste Projektion der transfizierten Neurone gemessen (Tab.III.2.1; einzelne Messwerte siehe Anhang V.1.1). In allen drei Experimenten führte eine verringerte RNF6-Proteinkonzentration zu einer deutlichen Verlängerung der Neuriten. Im Mittel betrug diese Verlängerung von $95,65\mu\text{m}^{\pm 30,48\mu\text{m}}$ bei den Kontroll-Experimenten auf $163,21\mu\text{m}^{\pm 59,03\mu\text{m}}$ bei RNAi-Experimenten mit RNF6-siRNA.

Die Messreihen der Neuriten-Längen aus den drei unabhängigen Experimenten wurden statistisch ausgewertet. Der *t*-Test eignet sich um festzustellen, ob die unterschiedlichen Mittelwerte zwischen zwei Messreihen auf Zufall beruhen oder signifikant sind. Ein Unterschied ist als signifikant zu bewerten, wenn der *p*-Wert des *t*-Tests kleiner als 0,05 ist. Für die Ermittlung des *p*-Werts wurden jeweils die Messreihen der Neuritenlängen aus der Kontroll-Transfektion

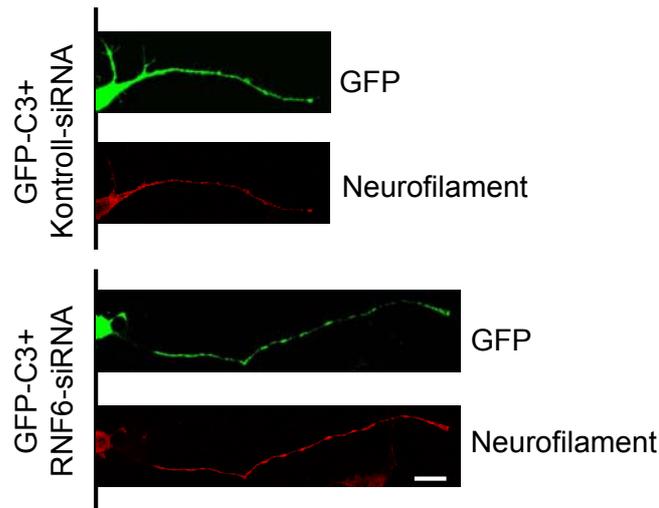
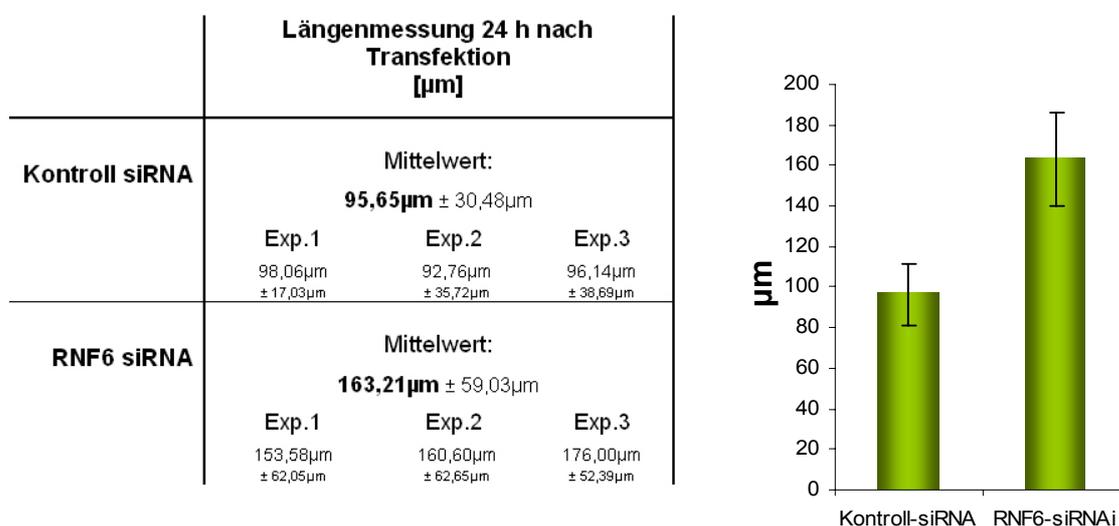


Abb.III.2.5. Mit RNF6-siRNA transfizierte Neurone zeigen eine auffällige Verlängerung der Neuriten. Primärkulturen von hippocampalen Neuronen wurden 24 h nach Präparation mit siRNA gegen RNF6 sowie Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen Neurofilament²⁰⁰, einem weiteren Marker für Neuriten, behandelt. Der grüne Kanal zeigt das GFP-Signal transfizierter Neurone; der rote Kanal die Signale durch die Färbung mit Neurofilament-Antikörper. Der Längenmaßstab beträgt 10µM.



Tab.III.2.1. Messergebnisse der Neuriten-Längen von siRNA behandelten Neuronen. In der Tabelle sind die gemessenen durchschnittlichen Längen aus den einzelnen Experimenten aufgelistet. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung einer jeden Messreihe und die Mittelwerte aus allen Experimenten zusammen sind aufgeführt. Rechts sind die gemessenen Längen graphisch dargestellt. Die Längenmessung weist auf eine signifikante Verlängerung der Neuriten durch die Verminderung von der RNF6-Protein-Konzentration durch RNAi hin. Der t-Test ergab für jede entsprechende Paarung der Einzelexperimente einen p-Wert < 0,0001.

und der entsprechenden RNF6-siRNA-Transfektion gegenüber gestellt. Dabei ergibt sich für jedes Messreihen-Paar ein p-Wert von $< 0,0001$. Die gemessenen Längenunterschiede zwischen den Neuriten von Neuronen, die mit RNF6-siRNA oder mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, sind somit signifikant.

III.2.3.2 Expression von GFP-Fusionsproteinen in hippocampalen Neuronen

In einem komplementären Ansatz zu den RNAi-Experimenten wurden mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen die Auswirkungen der Überexpression von RNF6 in voller Länge und von RING-Finger-deletierten RNF6-Proteinen (RNF6 Δ RING) auf hippocampale Neurone untersucht. Die Deletion des RING-Finger-Motivs verleiht RING-Finger Ubiquitin-Ligasen in der Regel eine dominant-negative Eigenschaft (Pickart, 2001). Eine Überexpression dominant-negativer Proteine verursacht die Unterdrückung der Aktivität des endogenen Wild-Typ-Proteins. Die Überexpressions-Experimente wurden analog zu den RNAi-Experimenten durchgeführt. Auch hier konnten auffällige Veränderungen der Neuriten-Längen von Neuronen, die GFP-RNF6 oder GFP-RNF6 Δ RING exprimieren, beobachtet werden (Abb.III.2.6).

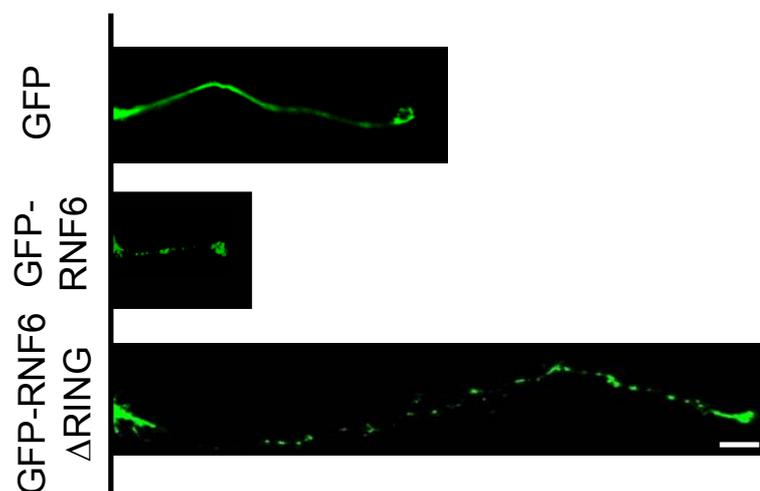
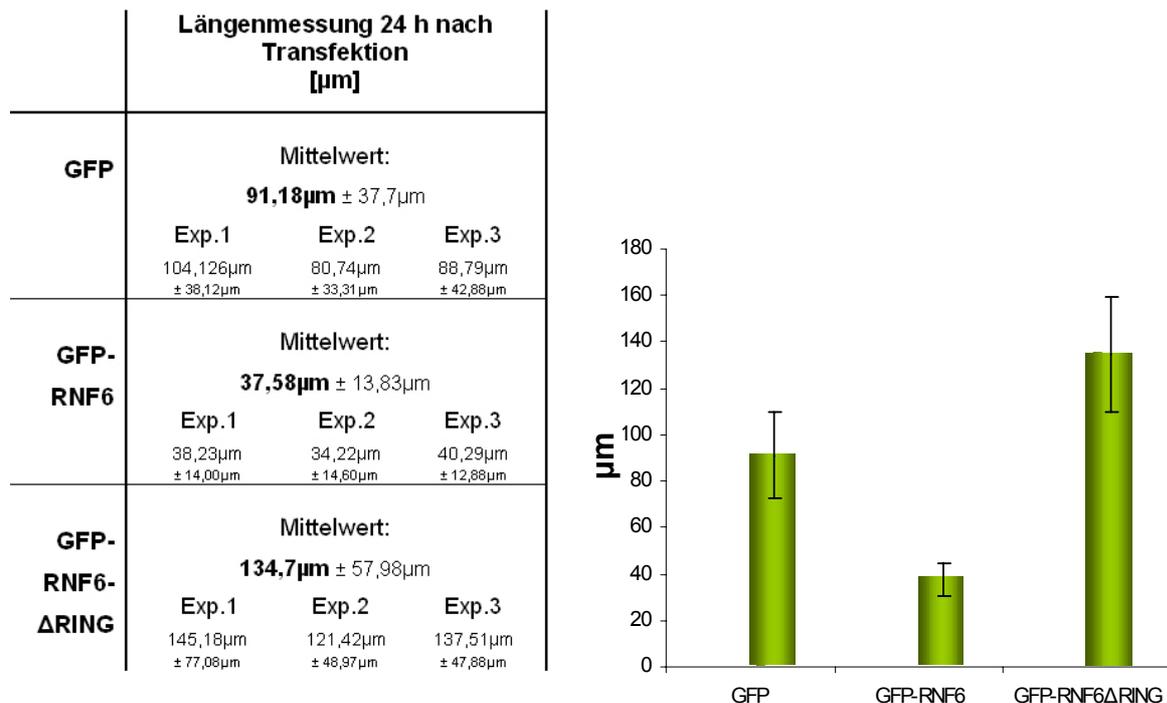


Abb.III.2.6. Hippocampale Neurone, in denen GFP-RNF6 oder GFP-RNF6 Δ RING überexprimiert werden, zeigen auffällige Längenänderungen der Neuriten. Primärkulturen von hippocampalen Neuronen wurden 24 h nach Präparation mit Plasmid-DNA, die für GFP-RNF6 in voller Länge, GFP-RNF6 Δ RING oder nur GFP kodiert, transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert. Der grüne Kanal zeigt das Autofluoreszenz-Signal der GFP-Fusionsproteine in transfizierten Neuronen. Der Längenmaßstab beträgt 10 μ M. GFP-RNF6 verursacht verkürzte Neuriten während GFP-RNF6 Δ RING zur Verlängerung führt.

Die Überexpression des Fusionsproteins GFP-RNF6 führte im Vergleich zur Kontrolltransfektion (GFP) zu verkürzten Neuriten. Dagegen zeigten Neurone mit einer Überexpression von GFP-RNF6 Δ RING deutlich verlängerte Neuriten (Abb.III.2.6). Die Effekte auf Neuritenlängen durch die Überexpression von RNF6-Proteinen wurden in drei unabhängigen Experimenten untersucht, in denen jeweils mindestens 50 transfizierte Neurone analysiert wurden (Tab.III.2.2; einzelne Messwerte siehe Anhang V.1.1). Die Transfektion mit GFP-RNF6-kodierender Plasmid-DNA verursachte stets verkürzte Neuriten der hippocampalen Neurone. Der Mittelwert aus drei Experimenten betrug $37,58\mu\text{m}^{\pm 13,83\mu\text{m}}$, während die Neuriten im Kontrollexperiment mit GFP-Plasmid im Mittel $91,18\mu\text{m}^{\pm 37,70\mu\text{m}}$ lange Neuriten zeigten. Bei Neuronen, die GFP-RNF6 Δ RING exprimierten, betrug der Mittelwert der Neuritenlängen $134,70\mu\text{m}^{\pm 57,98\mu\text{m}}$ (Tab.III.2.2).



Tab.III.2.2. Messergebnisse der Neuritenlängen von Neuronen, in denen GFP, GFP-RNF6 oder GFP-RNF6 Δ RING überexprimiert wurden. In der Tabelle sind die gemessenen durchschnittlichen Längen-Werte aus den einzelnen Experimenten aufgelistet. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung einer jeden Messreihe und die Mittelwerte aus allen Experimenten zusammen sind aufgeführt. Rechts sind die gemessenen Längen graphisch dargestellt. Die Längenmessung weist auf eine signifikante Verlängerung der Neuriten durch die Überexpression von GFP-RNF6 Δ RING hin, während GFP-RNF6 das Wachstum der Neuriten hemmt. Der *t*-Test ergab für jede Paarung der Einzelexperimente GFP \leftrightarrow GFP-RNF6 einen *p*-Wert $< 0,0001$. Die Paarungen GFP \leftrightarrow GFP-RNF6 Δ RING lieferten im *t*-Test für Experiment 1 einen *p*-Wert $< 0,001$; für Experiment 2 einen *p*-Wert $< 0,0001$ und für Experiment 3 einen *p*-Wert $< 0,002$.

Der *t*-Test liefert für alle Paarungen GFP ↔ GFP-RNF6 einen p-Wert < 0,0001 und für die Messreihenpaare GFP ↔ GFP-RNF6ΔRING beim Experiment 1 einen p-Wert < 0,001; beim Experiment 2 einen p-Wert < 0,0001 sowie einen p-Wert < 0,002 beim Experiment 3. Alle gemessenen Längenunterschiede sind somit statistisch signifikant und weisen auf eine funktionelle Rolle von RNF6 während der Entwicklung neuronaler Projektionen hin.

III.2.4 RNF6 interagiert mit LIMK1 *in vivo*

Aufgrund der Ubiquitin-Ligase-Aktivität von RNF6 war es wahrscheinlich, dass die Effekte auf hippocampale Neurone auf der Ubiquitin-Ligase-Eigenschaft von RNF6 beruhen. Von vorherigen Untersuchungen war bekannt, dass RLIM *in vitro* mit LIM-Kinase1 (LIMK1) interagieren kann (Bach *et al.*, 1999). LIMK1 wurde bereits als ein wichtiges regulierendes Element bezüglich des Axonwachstums beschrieben (Gungabisson & Bamberg, 2003; Rosso *et al.*, 2004). Eine *in vitro* Interaktion von LIMK1 und RNF6 war zuvor in GST-pulldown-Experimenten gezeigt worden (Schlüter, 2004). Diese Interaktion sollte zunächst durch Koimmunpräzipitation aus Lysaten transfizierter Zellen in Kultur bestätigt werden.

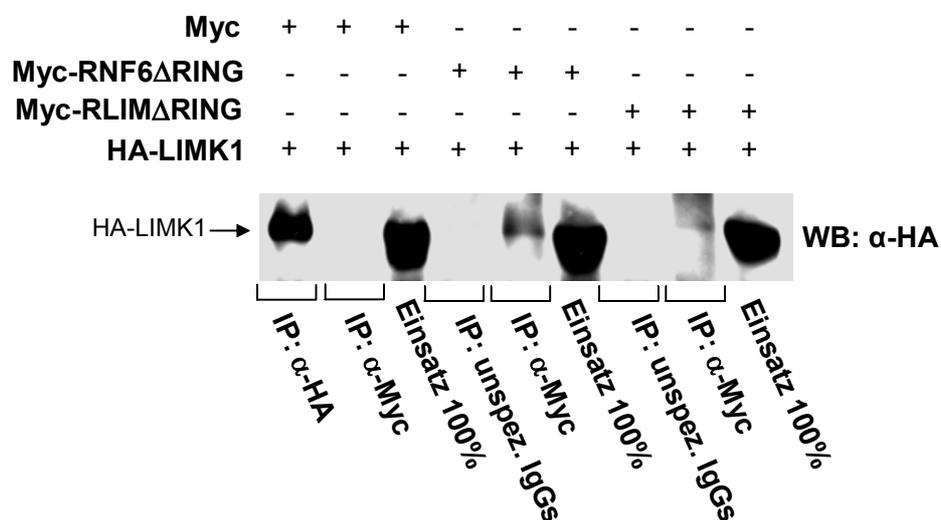


Abb.III.2.7. Koimmunpräzipitation von HA-LIMK1 mit Myc-RNF6ΔRING aus Zelllysaten transfizierter Cos7-Zellen. Cos7-Zellen wurden mit verschiedenen Plasmid-DNA-Kombinationen kodierend für HA-LIMK1 und Myc-Fusionsproteine bzw. Myc allein kotransfiziert. Mit den Zelllysaten der transfizierten Zellen wurden Immunopräzipitationen durchgeführt. Eine Präzipitation mit Myc-Antikörpern (α-Myc) führt nur in Anwesenheit von Myc-markiertem RNF6ΔRING oder RLIMΔRING zu einer Kopräzipitation von HA-LIMK1. Unspezifisches Antiserum (unspez. IgGs) führt nicht zu einer Kopräzipitation von HA-LIMK1.

Immunopräzipitationen aus den Zelllysaten transfizierter Cos7-Zellen zeigten, dass HA-markierte LIMK1 (HA-LIMK1) mit Myc-markiertem RNF6 Δ RING (Myc-RNF6 Δ RING) und schwächer auch mit Myc-RLIM Δ RING kopräzipitiert.

Die RING-Finger deletierten Varianten (Δ RING) von RNF6 und RLIM wurden verwendet, um gegebenenfalls den Abbau von HA-LIMK1 durch Ubiquitin-Ligase-Aktivität zu unterbinden. Da die Kopräzipitation in Anwesenheit des Myc-Epitops alleine ausblieb, und auch die Verwendung von unspezifischem Antiserum ein negatives Resultat lieferte (Abb.III.2.7) wurde die Spezifität der Koimmunpräzipitationen von HA-LIMK1 mit Myc-RNF6 Δ RING bestätigt.

Um zu überprüfen, ob RNF6 *in vivo* auch in Neuronen mit LIMK1 assoziiert vorliegen kann, was eine Voraussetzung für einen eventuell durch RNF6 vermittelten Abbau wäre, wurden Immunpräzipitationen mit Lysaten von Neuronenkulturen durchgeführt. Primärkulturen hippocampaler Neurone wurden zunächst für 3 h mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt, um so höhere Proteinkonzentrationen des potentiellen Substrates und Interaktionspartners zu gewährleisten (Abb.III.2.8).

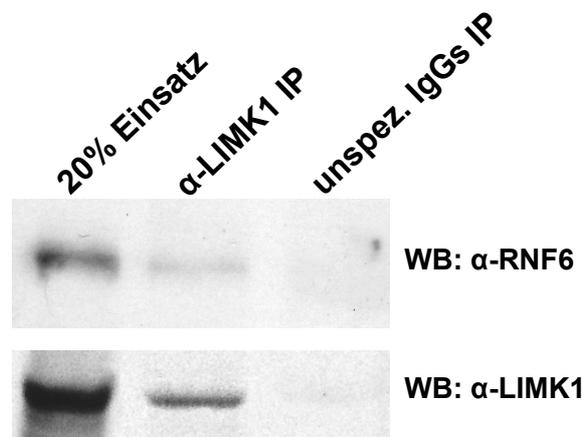


Abb.III.2.8. Koimmunpräzipitation von endogenem RNF6 mit endogener LIMK1 aus Lysaten von Primärkulturen hippocampaler Neurone. Primärkulturen hippocampaler Neurone wurden 3 h mit 25 μ g/mL MG132 Endkonzentration inkubiert und anschließend lysiert. Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen LIMK1 (α -LIMK1) führt zur Kopräzipitation von endogenem RNF6. Unspezifisches Antiserum (unspez. IgGs) präzipitiert LIMK1 nicht und führt somit auch nicht zur Kopräzipitation von RNF6.

Unmittelbar nach der Inkubation wurden die Kulturen lysiert, um anschließend Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen LIMK1 (α -LIMK1) und mit unspezifischem Antiserum (unspez. IgGs) als Negativ-Kontrolle durchzuführen. Die Abbildung III.2.8. zeigt,

dass die Präzipitation von LIMK1 durch α -LIMK1 auch RNF6 kopräzipitiert, was ein starker Hinweis auf die Interaktion beider Proteine in den Zellen der Primärkultur hippocampaler Neurone ist. Die Spezifität dieser Interaktion wurde durch die Negativ-Kontrolle bestätigt, bei der unspezifisches Antiserum keine Präzipitation von LIMK1 und RNF6 bewirkte.

III.2.5 Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 in Neuronen

Die Expression von RNF6 und LIMK1 wurde immunhistochemisch und immunzytochemisch verglichen, um zu untersuchen, ob beide Proteine kolokalisieren können.

LIMK1 ist ein neuronal exprimiertes Protein, das bei diversen Vorgängen in Nervenzellen, wie zum Beispiel bei der Axonbildung und dessen Wachstum, eine Rolle spielt (Gungabisson & Bamberg, 2003; Rosso *et al.*, 2004). Färbungen der Vibratomschnitte von E13-13,5 Mausembryonen mit RNF6-Antiserum sowie LIMK1-Antikörpern zeigen überaus ähnliche Expressionsmuster für LIMK1 und RNF6 (Abb.III.2.9).

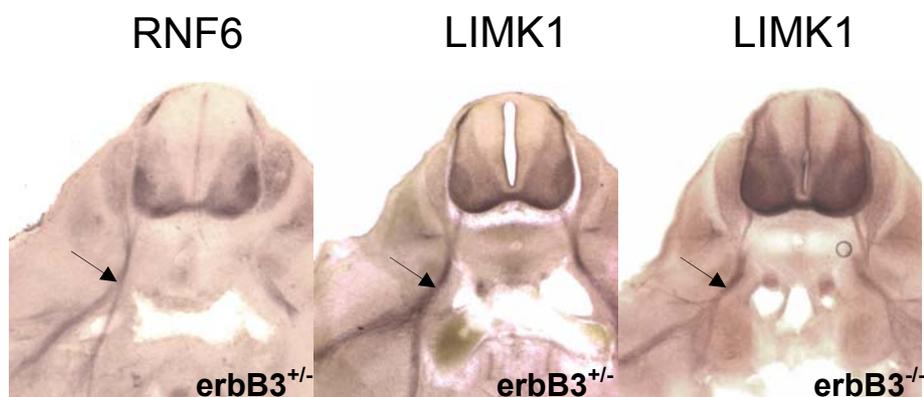


Abb.III.2.9 RNF6 und LIMK1 haben ähnliche Expressionsmuster in E13 Mausembryonen. Transversalschnitte von E13-13,5 Mausembryonen wurden mit RNF6-Antiserum und LIMK1-Antikörpern behandelt. Sowohl in $erb^{+/-}$ -Mäusen als auch in $erb^{-/-}$ -Mäusen ist das Muster der LIMK1-Expression identisch zum Muster der RNF6-Expression in $erb^{+/-}$ -Mäusen. Die Pfeile weisen auf Färbungen axonaler Strukturen hin.

Beide Proteine sind in den Projektionen aus Neuronen der Spinalganglien und der lateralen Ventralwurzeln detektierbar. RNF6 und LIMK1 zeigen auffällig ähnliche Expressionsmuster in den Axonen (Pfeile, Abb.III.2.9). Die Ähnlichkeit der Expressionsmuster zwischen beiden Proteinen ist ebenfalls deutlich im Neuralrohr der E13-13,5 Mausembryonen erkennbar. Auch hier wurden $erb^{-/-}$ -Mäuseembryonen untersucht, denen Glia-Zellen fehlen, um zu prüfen, ob

die beobachtete Expression von LIMK1 tatsächlich in den Axonen stattfindet. Heterozygote $erb^{+/-}$ -Mausembryonen, die phänotypisch den WT-Mausembryonen entsprechen, dienten als Vergleich (Riethmacher *et al.*, 1997). Wie auch schon für RNF6 gezeigt werden konnte, wird LIMK1 in $erb^{-/-}$ -Mausembryonen in den axonalen Projektionen exprimiert (Abb.III.2.2), wodurch eine Kolokalisation beider Proteine nahe lag.

Die vermutete Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 wurde immunzytochemisch in primären hippocampalen Neuronen näher untersucht. 48 h nach Präparation wurden die Zellen fixiert und mit den entsprechenden primären Antikörpern sowie Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern behandelt. Mit Hilfe des konfokalen Mikroskops wurden die Fluoreszenzsignale aufgenommen. RNF6 und LIMK1 zeigen beide eine überwiegend zytoplasmatische

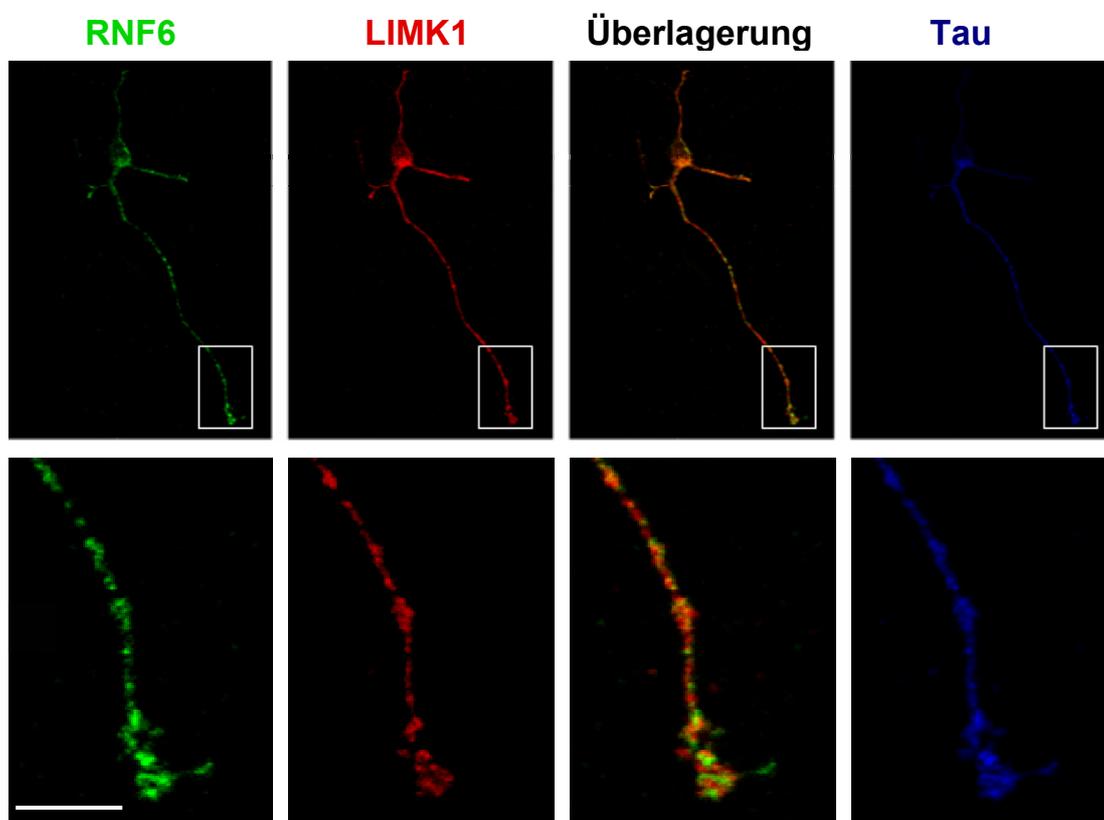


Abb.III.2.10. RNF6 und LIMK1 partielle Kolokalisation in hippocampalen Neuronen. Hippocampale Neuronen wurden 48 h nach Präparation fixiert und mit Meerschweinchen-Antiserum gegen RNF6 sowie mit Antikörpern aus der Maus gegen LIMK1 bzw. aus Kaninchen gegen Tau-Protein inkubiert. Die Fluoreszenzsignale der sekundären Antikörper wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops dokumentiert. Die weißen Rechtecke deuten den in der unteren Reihe vergrößerten Bereich an. Die Überlagerung des grünen (RNF6) und roten (LIMK1) Kanals weist auf eine partielle Kolokalisierung (gelbe Signale) von RNF6 und LIMK1 hin. Der blaue Kanal zeigt die Signale des Tau-Proteins (Tau), das als Marker für axonale Strukturen dient. Der Längenmaßstab beträgt $10\mu\text{M}$

Lokalisation. Die Überlagerung der Signale zeigt, dass RNF6 und LIMK1 partiell kolokalisieren, was anhand von gelben Bereichen erkennbar ist (Abb.III.2.10). Das Axon wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen das axonspezifische Tau-Proteins markiert. In der Vergrößerung der Axon-Endigung wird deutlich, dass die RNF6- und LIMK1-Signale insbesondere im Wachstumskegel eine reziproke Verteilung aufweisen. Es sind gelbe Bereiche an den Schnittstellen von Domänen mit stärkeren RNF6- oder LIMK1-Signalen in der vergrößerten Überlagerung erkennbar. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte ein durch RNF6 vermittelter Abbau von LIMK1 sein, der zu einer Verringerung der LIMK1-Proteinmengen in Bereichen mit stärkerer RNF6-Konzentration führen würde.

III.2.6 Proteasomale Regulation der LIMK1-Proteinmengen in Neuronen

Um zu prüfen, ob RNF6 *de facto* die Degradation von LIMK1 durch das Proteasom vermitteln kann, wurde geprüft, ob die Inhibition der proteasomalen Aktivität in Primärkulturen hippocampaler Neurone die LIMK1-Proteinkonzentration beeinflussen kann. Im Falle eines proteasomalen Abbaus würden die LIMK1-Proteine durch die Hemmung des Proteasoms stabilisiert werden können. Dafür wurden die Kulturen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 für 1 h, 3 h und 6 h inkubiert und mit einer unbehandelten Neuronenkultur sowohl immunzytochemisch als auch mit Hilfe der Western-Blot-Technik verglichen.

III.2.6.1 Untersuchung der LIMK1-Proteinkonzentration nach Proteasom-Inhibition

Ein Teil der MG132 behandelten Kulturen wurde fixiert und mit Antikörpern gegen LIMK1 sowie Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern untersucht. Der verbleibende Teil der MG132 behandelten bzw. unbehandelten Neuronenkulturen wurde lysiert und die Proteinextrakte mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens analysiert (Abb.III.2.11). Bereits 3 h nach MG132-Zugabe war ein deutlicher Anstieg der LIMK1-Proteinmengen in den Proteinextrakten der Zellkulturen detektierbar. 6 h nach Zugabe des Proteasom-Inhibitors nahm die Akkumulation der LIMK1-Proteine noch weiter zu, so dass ein starkes LIMK1-Signal im Western-Blot nachgewiesen wurde (Abb.III.2.11.A). Die Zunahme der Konzentration von LIMK1-Proteinen durch Inhibition des Proteasoms ist auch anhand steigender Intensitäten der LIMK1-Fluoreszenzsignale in den Neuronen erkennbar. Insbesondere in den Wachstumskegeln der Axone ist der Anstieg der LIMK1-Proteinmengen anhand der Fluoreszenz-

Intensitäten deutlich erkennbar (Abb.III.2.11.B). Diese Untersuchungen zeigen, dass die Inhibition der Abbau-Aktivität des Proteasoms zu steigenden LIMK1-Proteinmengen in Primärkulturen hippocampaler Neuronen führt. Dieses Resultat ist ein eindeutiger Hinweis auf die Regulation von LIMK1-Proteinkonzentrationen über den proteasomalen Abbauweg.

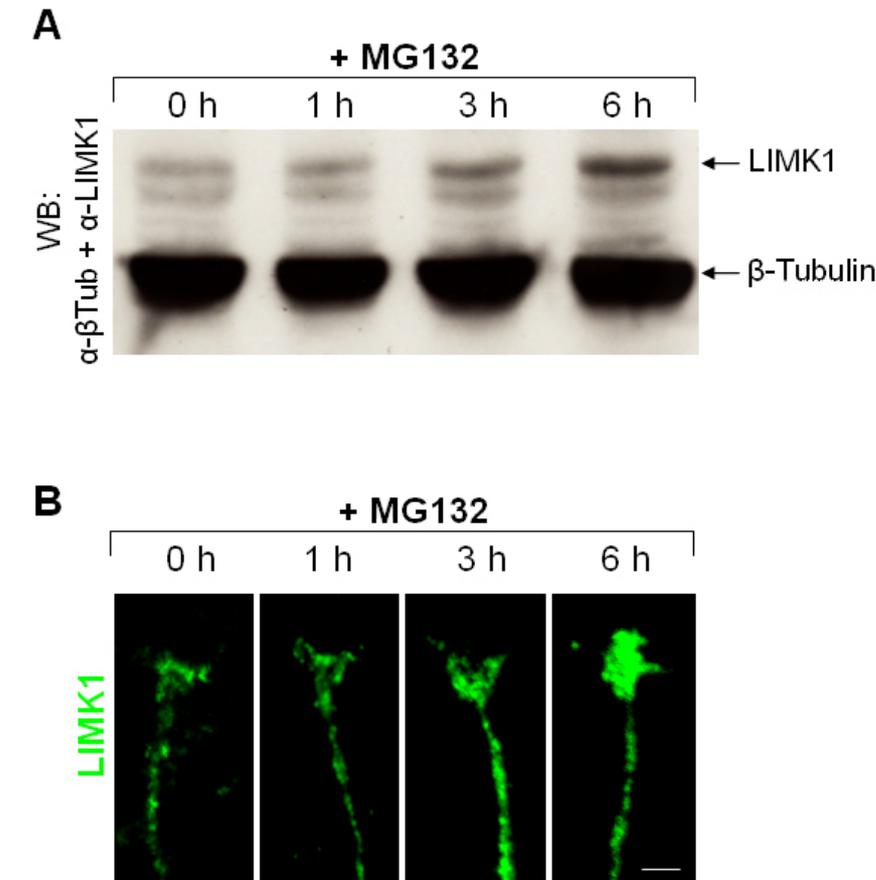


Abb.III.2.11. Inhibition des Proteasoms führt zum Anstieg von LIMK1-Proteinmengen in Primärkulturen hippocampaler Neuronen. Primärkulturen hippocampaler Neuronen wurden 48 h nach Präparation ohne oder mit MG132 (Endkonzentration 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) für 1 h, 3 h und 6 h inkubiert. **(A)** Ein Teil der MG132-behandelten Primärkulturen wurde lysiert. Die Proteine der Lysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot-Detektion auf LIMK1-Proteinmengen hin untersucht. **(B)** Der zweite Teil der Kulturen wurde fixiert und mit LIMK1-Antikörpern sowie Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern behandelt. Sowohl anhand der Zunahme der LIMK1-Signale in der Western-Blot-Analyse als auch der Fluoreszenz-Intensitäten in fixierten Neuronen sind steigende Proteinmengen von LIMK1 durch die Inhibition des Proteasoms nachweisbar. Die Detektion des Western-Blots mit Antikörpern gegen β -Tubulin dient als Ladekontrolle. Der Längenmaßstab beträgt 4 μM .

III.2.6.2 Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 nach Inhibition des Proteasoms

Die Tatsache, dass LIMK1-Proteine dem proteasomalen Abbau zugeführt werden, führte zu der Überlegung, ob durch die Inhibition der Proteasom-Aktivität die Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 in axonalen Wachstumskegeln zunehmen kann. Für diese Untersuchung wurden erneut hippocampale Kulturen mit oder ohne den Inhibitor MG132 für 3 h inkubiert. Nach Fixierung der Neurone wurden RNF6- und LIMK1-Proteine mit den entsprechenden Primär-Antikörpern sowie Fluorophor-gekoppelten Sekundär-Antikörpern detektiert. Die Aufnahmen axonaler Wachstumskegel mit Hilfe des konfokalen Mikroskops zeigen, dass die MG132-Behandlung in der Tat zu einer signifikanten Erhöhung der Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 führt (Abb.III.2.12).

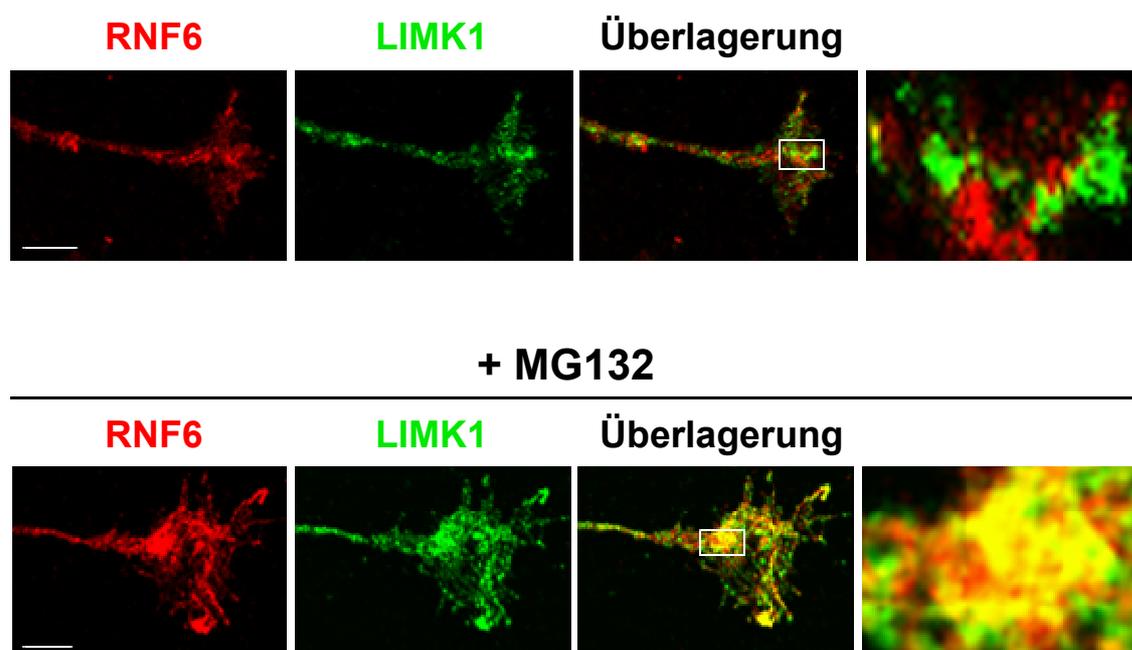


Abb.III.2.12. Inhibition der Proteasom-Aktivität führt zum Anstieg der Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 in axonalen Wachstumskegeln hippocampaler Neuronen. Primärkulturen hippocampaler Neuronen wurden 48 h nach Präparation ohne oder mit MG132 (Endkonzentration 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) für 3 h inkubiert. Die Kulturen wurden fixiert und mit Meerschweinchen-Anitserum gegen RNF6 und LIMK1-Antikörpern aus Kaninchen sowie den entsprechenden Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern behandelt. Nach MG132-Behandlung zeigen sich in der Überlagerung der roten RNF6-Signale und grünen LIMK1-Signale deutlich mehr gelbe Bereiche. Die Vergrößerungen (jeweils außen rechts) verdeutlichen die Zunahme gelber Bereiche, welche auf einer stärkeren Kolokalisation beider Proteine beruht. Der Längenmaßstab beträgt 2 μM .

Diese Beobachtung ist anhand der großen gelben Bereiche in der Vergrößerung der Überlagerungs-Aufnahme von roten RNF6- und grünen LIMK1-Signalen besonders deutlich (Abb.III.2.12 unten). Die reziproke Verteilung von RNF6 und LIMK1 in den axonalen Wachstumskegeln scheint daher auf der RNF6-Ubiquitin-Ligase-Aktivität zu beruhen, wodurch LIMK1 in Bereichen hoher RNF6-Proteinmengen verstärkt dem proteasomalen Abbau zugeführt wird.

III.2.7 Expression von UbcH5 in kultivierten hippocampalen Neuronen

Für die Ubiquitin-Ligase-Aktivität benötigt RNF6 das Zusammenspiel mit dem ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2-Enzym) UbcH5 (Schlüter, 2004). Für den RNF6-vermittelten Abbau von LIMK1 in den Neuronen ist die Expression von UbcH5 eine wichtige Voraussetzung. Daher wurde mit spezifischen Antikörpern immunzytochemisch untersucht, ob UbcH5 ebenfalls in Neuronen exprimiert wird.

Die Abb.III.2.13 zeigt die Färbung von fixierten hippocampalen Neuronen mit UbcH5-Antikörpern und RNF6-Antiserum. UbcH5 ist ubiquitär exprimiert und zeigt u.a. in den axonalen

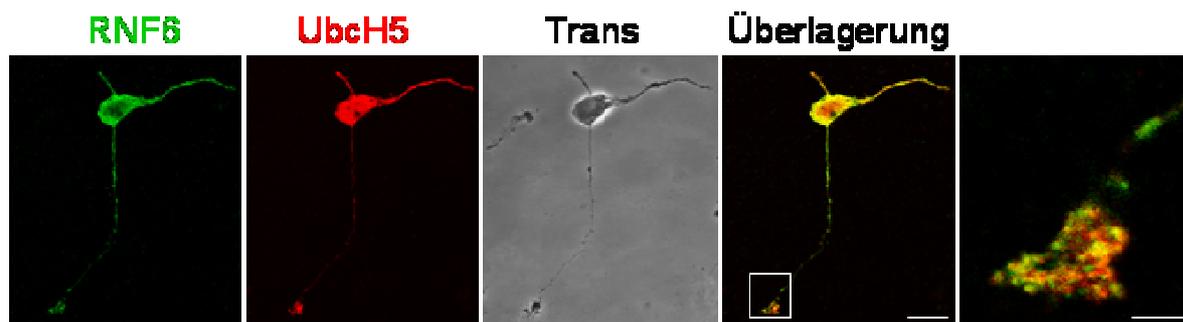


Abb.III.2.13. UbcH5 wird in Neuronen exprimiert und kolokalisiert mit RNF6. Primärkulturen hippocampaler Neuronen wurden 48 h nach Präparation fixiert und mit Meerschweinchen-Antiserum gegen RNF6 und Antikörpern gegen UbcH5 aus Kaninchen sowie den entsprechenden fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern behandelt. Der rote Kanal des konfokalen Mikroskops zeigt, dass UbcH5 in hippocampalen Neuronen ubiquitär exprimiert wird. Die Vergrößerung der Überlagerung des grünen und roten Kanals weist im Wachstumskegel mehrere gelbe Bereiche auf, in denen RNF6 und UbcH5 kolokalisieren. Die Transmissionsaufnahme (Trans) zeigt das Neuron im Durchlicht. Der Längenmaßstab beträgt 10µM bzw. 2 µM in der Vergrößerung.

Wachstumskegeln Kolokalisation mit RNF6. So ist durch die Anwesenheit von UbcH5 in den Wachstumskegeln die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von RNF6 gewährleistet.

III.2.8 RNF6 vermittelt die Polyubiquitinierung von LIMK1 *in vitro*

Für den proteasomalen Abbau ist die Ubiquitinierung des Substrat-Proteins eine wichtige Voraussetzung. Dafür muss das Ziel-Protein mit mindestens vier Ubiquitin-Molekülen, die über das Lysin 48 (K48) verkettet sind, markiert sein (Spence *et al.*, 1995). Es sollte untersucht werden, ob die Ubiquitin-Ligase RNF6 in der Lage ist, *in vitro* die Polyubiquitinierung von LIMK1 zu vermitteln. Hierfür wurde *in vitro* translatiertes LIMK1-Protein, welches radioaktiv mit $^{35}\text{[S]}$ markiert wurde, eingesetzt. In der SDS-PAGE mit Ubiquitinierungs-Reaktionen kann in der Regel eine geringere Mobilität der Proteinbanden von Ubiquitin-konjugierten Proteinen beobachtet werden. Solch eine Erhöhung der Molekülmasse kann aber auch durch gleichzeitige Monoubiquitinierungen mehrerer Lysinreste des Substrat-Proteins verursacht werden. Um diese Art der Modifikation von der langkettigen Polyubiquitinierung zu unterscheiden, wurden mutierte Ubiquitin-Moleküle verwendet, die keine Lysinreste mehr enthalten. Mit ihnen kann das Substrat-Protein lediglich monoubiquitiniert werden, da die Bildung von Ketten mit diesen mutierten Ubiquitinen nicht möglich ist. Zusätzlich dazu wurden in einem anderen Reaktionsansatz Ubiquitin-Mutanten eingesetzt, die lediglich das Lysin an Position 48 (K48) enthalten. Mit ihnen kommt es nur dann zur Bildung von Ubiquitin-Ketten an den Substrat-Proteinen, wenn diese für den proteasomalen Abbau markiert werden sollen.

Bakteriell exprimiertes RNF6-Protein kann in Anwesenheit aller notwendigen Komponenten der Ubiquitin-Reaktion die Polyubiquitinierung von radioaktiv-markierter LIMK1 vermitteln (Abb.III.2.14). In der Reaktion mit der Ubiquitin-Mutante ohne Lysinreste (Ubiquitin^{K0}) wird LIMK1 in einer Weise modifiziert, die sich deutlich von der Modifikation durch Wild-Typ-Ubiquitin (Ubiquitin^{WT}) unterscheidet. Hochmolekulare LIMK1-Proteine (durch Sternchen in Abb.III.2.14 angedeutet), wie sie in der Anwesenheit von Ubiquitin^{WT} entstehen, werden durch die Verwendung von Ubiquitin^{K0} nicht gebildet. Daher können Monoubiquitinierungen nicht die Ursache für die Bildung der hochmolekularen LIMK1-Proteine durch die Verwendung von Ubiquitin^{WT} sein. Zugleich konnte gezeigt werden, dass auch mit der Ubiquitin-Mutante, die lediglich das K48 (Ubiquitin^{K48}) enthält, eine Polyubiquitinierung von LIMK1

durch RNF6 möglich ist. RNF6 ist somit in der Lage *in vitro* LIMK1-Proteine derart mit Ubiquitin zu markieren, dass die Voraussetzung für einen Abbau durch das Proteasom erfüllt ist.

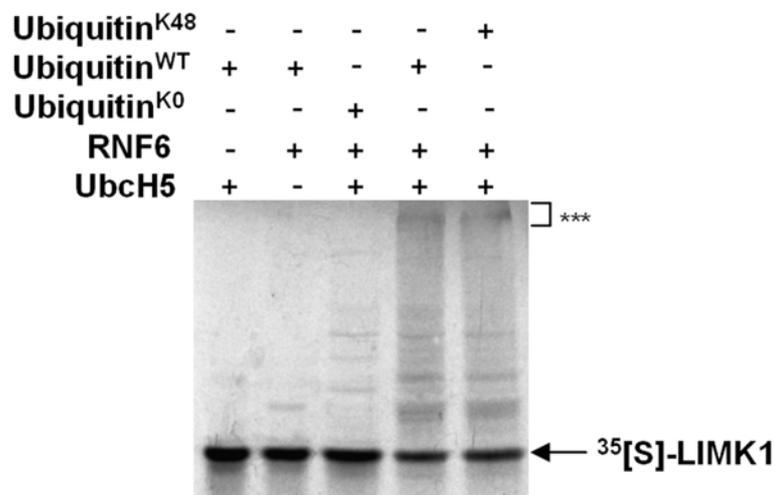


Abb.III.2.14. RNF6 vermittelt die Polyubiquitinierung von LIMK1 *in vitro*. LIMK1 wurde *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert. Das E2-Protein UbcH5 sowie RNF6 wurden bakteriell exprimiert und aufgereinigt. E1-Enzym und die verschiedenen Ubiquitin-Moleküle sind kommerzieller Herkunft. Die Reaktionsansätze wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Der Einsatz von Wild-Typ Ubiquitin^{WT} oder Ubiquitin^{K48}, das nur den Lysinrest an Position 48 enthält, führt zu polyubiquitinierten LIMK1-Proteinen (Sterne). Im Gegensatz dazu führt die Konjugation von Ubiquitin^{K0} nur zu monoubiquitinierten LIMK1-Proteinen, die bei der SDS-PAGE nicht im hochmolekularen Bereich migrieren. Monoubiquitinierungen reichen somit nicht aus, um ähnlich hochmolekulare LIMK1-Proteine wie durch Ubiquitin^{WT} oder Ubiquitin^{K48} zu ermöglichen.

In diesem Zusammenhang konnte meine Kollegin Anne Schlüter den Abbau von transfizierter LIMK1 durch Überexpression von RNF6 in Säugetierzellen zeigen, während die verwandte Ubiquitin-Ligase RLIM kaum dazu in der Lage ist (Schlüter, 2004). Ihre Ergebnisse bestätigen den Befund, dass RNF6 die Polyubiquitinierung von LIMK1 vermittelt und damit LIMK1-Proteine für den Abbau durch das Proteasom markiert. LIMK1 ist somit ein Substrat der RING-Finger Ubiquitin-Ligase RNF6.

III.2.9 RNF6 reguliert LIMK1-Proteinmengen in axonalen Wachstumskegeln

Überexpression von GFP-RNF6 oder GFP-RNF6 Δ RING sowie die Verringerung von RNF6-Proteinmengen durch RNAi in hippocampalen Neuronen führt zu Längenänderungen der Pro-

jektionen (siehe Abschnitt III.2.3). Auch LIMK1 wurde bereits in verschiedenen Studien als ein regulierendes Element bezüglich des axonalen Wachstums beschrieben (Gungabisson & Bamberg, 2003; Rosso *et al.*, 2004). Daher wurde in dieser Arbeit vermutet, dass die Beeinflussung der axonalen Längen durch Änderung der RNF6-Proteinmengen ihre Ursache im Ubiquitin-Ligase / Substrat Verhältnis zwischen RNF6 und LIMK1 haben könnte. Es sollte zunächst untersucht werden, ob die Verminderung der RNF6-Proteinkonzentration durch RNAi gegen RNF6 bzw. ihre Erhöhung durch die Überexpression von GFP-RNF6 oder GFP-RNF6 Δ RING einen Effekt auf die LIMK1-Proteinmengen in den Wachstumskegeln der Projektionen hat. Der Einfluss von LIMK1 auf das Wachstum der Axone beruht auf dessen Lokalisation und Aktivität in den axonalen Wachstumskegeln der Neuronen (Endo *et al.*, 2003; Rosso *et al.*, 2004).

III.2.9.1 Änderung der LIMK1-Proteinmengen in Neuronen durch RNAi gegen RNF6

Primärkulturen hippocampaler Neuronen wurden mit RNF6-siRNA bzw. mit Kontroll-siRNA transfiziert, um den Einfluss reduzierter RNF6-Proteinmengen auf die LIMK1-Proteinkonzentration zu analysieren. Ein Teil der Kulturen wurde geerntet und lysiert, um die Proteinextrakte mittels Western-Blot-Detektion auf LIMK1-Proteinmengen zu untersuchen (Abb.III.2.15). Der übrige Teil wurde nach Fixierung der Zellen mit Hilfe von Antikörpern gegen LIMK1 und fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern analysiert (Abb.III.2.16). Die Western-Blot-Analyse zeigt erhöhte LIMK1-Proteinmengen, wenn durch RNAi die endogene RNF6-Proteinkonzentration in der Primärkultur hippocampaler Neuronen abnimmt (Abb.III.2.15). Gleichzeitig bleiben die Proteinmengen der RNF6-verwandten Ubiquitin-Ligase RLIM durch die siRNA-Applikation unbeeinflusst und belegen dadurch die Spezifität der siRNA gegen RNF6. Immunzytochemische Fluoreszenz-Färbungen der siRNA-transfizierten Primärkultur hippocampaler Neuronen bestätigen den Befund durch die Western-Blot-Analyse. LIMK1-Proteine nehmen insbesondere in den Wachstumskegeln der Axone zu, wenn die endogenen Mengen an RNF6-Protein durch RNAi abnehmen (Abb.III.2.16). Die Verminderung der RNF6-Proteinkonzentrationen hat also in Zellen der Primärkultur Hippocampaler Neuronen einen unmittelbaren Effekt auf die LIMK1-Proteinmengen. Die Zunahme von LIMK1 in den Wachstumskegeln der Axone könnte der Grund für die Verlängerung der Axone in den RNAi-Experimenten gegen RNF6 sein.

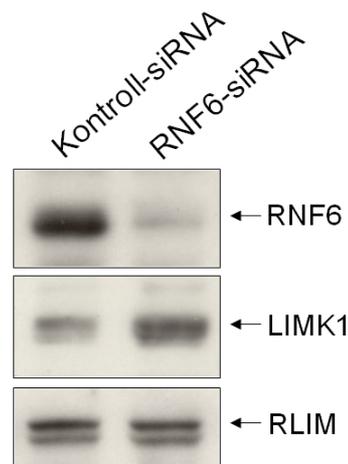


Abb.III.2.15. RNAi gegen RNF6 führt zu steigenden LIMK1-Proteinmengen in hippocampalen Neuronen.

Primärkulturen hippocampaler Neuronen wurden 24 h nach Präparation mit siRNA gegen RNF6 bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurde ein Teil der transfizierten Kulturen geerntet und lysiert. Die Lysate wurden nach SDS-PAGE mittels Western-Blot-Verfahren mit Antiserum gegen RNF6, LIMK1 sowie RLIM analysiert. Die Verringerung endogener RNF6-Proteinmengen führt zu einem signifikanten Anstieg von LIMK1 in den Proteinextrakten der Neurone. Der Nachweis der RLIM-Proteinmenge, welche unverändert bleibt, dient als Ladekontrolle.

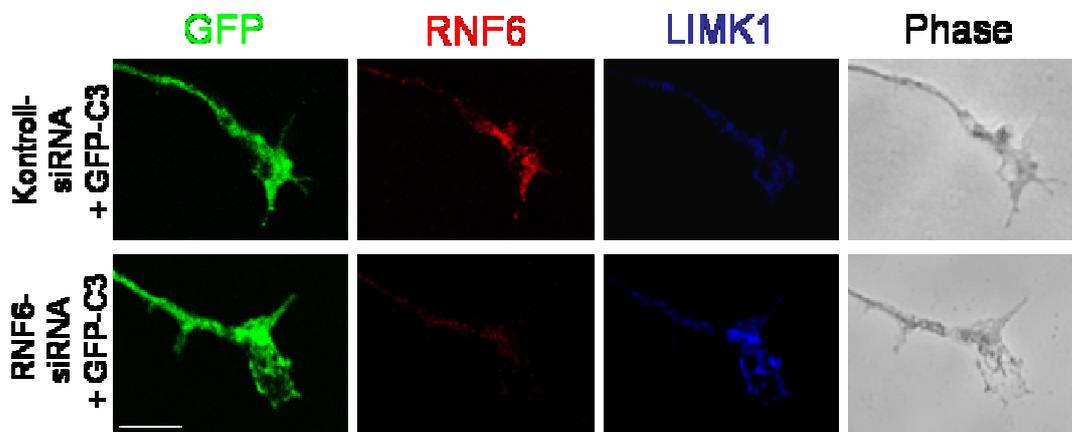


Abb.III.2.16 RNAi gegen RNF6 führt zu steigenden LIMK1-Proteinmengen in axonalen Wachstumskugeln hippocampaler Neuronen.

Primärkulturen hippocampaler Neuronen wurden 24 h nach Präparation mit siRNA gegen RNF6 bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Kofransfektion mit GFP-Plasmid-DNA dient der Visualisierung transfizierter Zellen. Nach 48 h wurden die transfizierten Kulturen geerntet und immunocytochemisch mit Meer-schweinchen-Antiserum gegen RNF6 (rot) und Kaninchen-Antikörpern gegen LIMK1 (blau) gefärbt. Konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass in axonalen Wachstumskugeln geringe RNF6-Proteinkonzentrationen höhere LIMK1-Proteinmengen begünstigen. Der Längenmaßstab beträgt 4 μ M.

III.2.9.2 Expression von endogener LIMK1 und GFP-RNF6-Fusionsproteinen in axonalen Wachstumskegeln

Der Einfluss von ektoptisch exprimierter GFP-RNF6 bzw. GFP-RNF6 Δ RING auf endogene LIMK1-Proteine in den axonalen Wachstumskegeln hippocampaler Neuronen wurde immunzytochemisch untersucht.

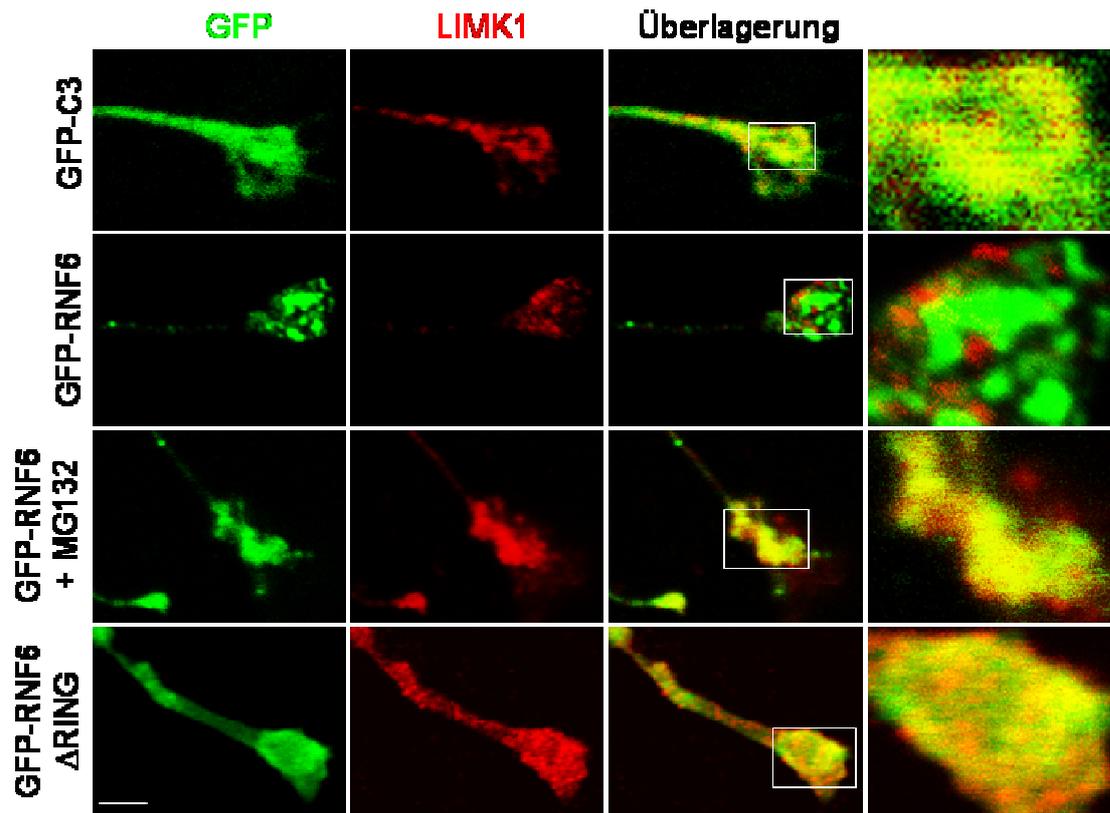


Abb.III.2.17. GFP-RNF6-Proteine beeinflussen LIMK1-Proteinkonzentrationen in axonalen Wachstumskegeln. Primärkulturen hippocampaler Neuronen wurden 24 h nach Präparation mit GFP, GFP-RNF6 oder GFP-RNF6 Δ RING transfiziert und nach weiteren 24 h fixiert. MG132-Behandlung erfolgte 3 h mit 25 μ g/mL unmittelbar vor der Fixierung. Der grüne Kanal zeigt die Autofluoreszenz der GFP-Fusionsproteine bzw. von GFP. Endogene LIMK1-Proteine wurden mit LIMK1-Antikörpern aus Kaninchen und Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern detektiert (rot). Die Aufnahmen des konfokalen Mikroskops zeigen axonale Wachstumskegel der transfizierten hippocampalen Neuronen. GFP-RNF6 zeigt nur nach MG132-Behandlung starke Überlagerung mit endogener LIMK1. GFP-RNF6 Δ RING führt zur Akkumulation endogener LIMK1-Proteine. Der Längenmaßstab beträgt 5 μ m.

GFP-RNF6 zeigt verglichen mit der endogenen LIMK1-Expression eine reziproke Verteilung in den Wachstumskegeln. Dies konnte zuvor bei endogenem RNF6 ebenfalls festgestellt wer-

den (siehe Abb.III.2.12). Inhibition des Proteasoms durch MG132-Behandlung führt ähnlich wie im Falle von endogenem RNF6 auch hier zu einer stärkeren Überlagerung der GFP-RNF6-Signale mit den Signalen endogener LIMK1-Proteine (Abb.III.2.17). Die Transfektion des GFP-RNF6 Δ RING, welches eine dominant-negative Eigenschaft bezüglich der Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt, führt zu einer Akkumulation endogener LIMK1-Proteine in den axonalen Wachstumskegeln und zeigt starke Kolo-kalisation mit LIMK1 (Abb.III.2.17). GFP-RNF6 Δ RING scheint den Abbau von LIMK1-Proteinen in den Wachstumskegeln der Axone zu unterdrücken, was ebenfalls ein Hinweis auf den durch die Ubiquitin-Ligase RNF6 vermittelten proteasomalen Abbau von LIMK1-Proteinen ist.

III.2.10 Regulation der LIMK1-Proteinmengen durch RNF6 während der Entwicklung axonaler Projektionen

Bislang konnte gezeigt werden, dass RNF6 den proteasomalen Abbau von LIMK1 vermitteln und dadurch die Konzentration von LIMK1-Proteinen in den Wachstumskegeln der Axone kontrollieren kann. Es sollte der funktionelle Zusammenhang zwischen der Fähigkeit von RNF6 LIMK1 für den Abbau zu markieren und dem Axonwachstum hippocampaler Neuronen untersucht werden. Sowohl die Überexpression von LIMK1 und RNF6 als auch die Verminderung der endogenen RNF6- und LIMK1-Proteinkonzentrationen durch RNAi sollten verwendet werden, um eventuell inhibierende, kompensatorische oder verstärkende Effekte auf das Wachstum der Axone zu prüfen.

III.2.10.1 Applikation von siRNA zur Reduzierung von LIMK1-Proteinmengen

Um den Einfluss der Minderung von LIMK1-Proteinmengen auf das Axonwachstum untersuchen zu können, musste zunächst die Funktionalität der RNA-Oligonukleotide gegen LIMK1 (LIMK1-siRNA) in der Primärkultur hippocampaler Neuronen getestet werden. Hippocampale Neuronenkulturen wurden mit spezifischer siRNA gegen LIMK1 zusammen mit RNF6-siRNA oder alleine transfiziert (Abb.III.2.18). Als entsprechende Kontrolle wurde ein Gemisch der beiden Kontroll-siRNA (gleicher GC-Gehalt wie LIMK1-siRNA oder RNF6-siRNA jedoch aber nur ca. 70% Sequenzübereinstimmung) verwendet. Die Zellen der Primär-

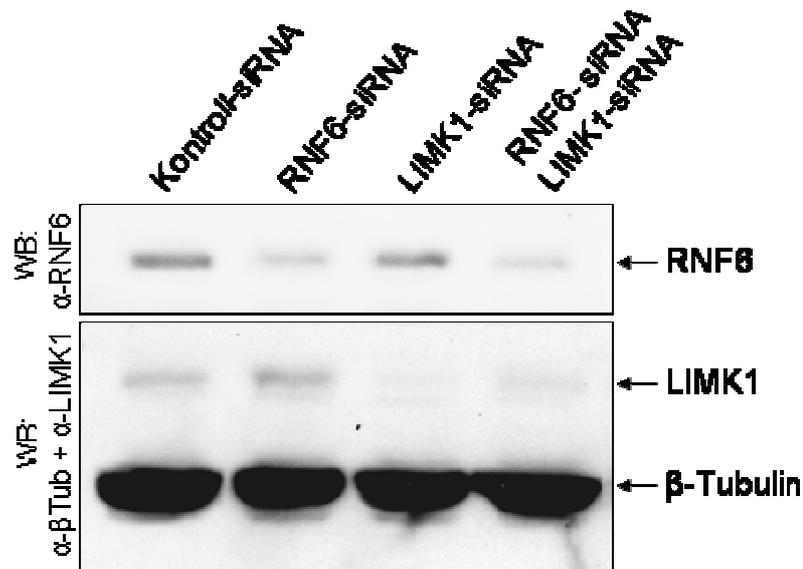


Abb.III.2.18. LIMK1-Proteinmenge in hippocampalen Neuronen kann durch spezifische siRNA deutlich reduziert werden. Primärkulturen hippocampaler Neuronen wurden 24 h nach Präparation mit LIMK1-siRNA, RNF6-siRNA sowie mit einer Mischung beider siRNAs oder Kontroll-siRNA transfiziert. Die Kontroll-siRNA weist zur entsprechenden Zielsequenz den gleichen GC-Gehalt mit jedoch lediglich 70% Sequenzübereinstimmung auf. Beide Kontroll-siRNAs bezüglich RNF6 und LIMK1 wurden gemeinsam als Gemisch transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Lysate wurden mittels Western-Blot-Analyse mit LIMK1- und β -Tubulin-Antikörpern detektiert. Dieselbe Membran wurde anschließend mit RNF6-Antiserum detektiert. Der Nachweis von β -Tubulin-Proteinmengen dient als Lade-Kontrolle.

kultur wurden 48 h nach Transfektion geerntet und lysiert. Mittels Western-Blot-Detektion mit LIMK1- und β -Tubulin-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass LIMK1 in den Lysaten der mit LIMK1-siRNA transfizierten Neuronen deutlich schwächer nachweisbar ist als in den Kontroll-siRNA behandelten Neuronen. Auch die Proteinextrakte der Primärkultur, die mit siRNAs gegen RNF6 und LIMK1 transfiziert wurde, enthalten im Vergleich zur Kontrolle weniger LIMK1-Proteine. Hier ist die etwas höhere LIMK1-Menge auf die gleichzeitige Reduktion der RNF6-Proteinmenge zurückführbar. Dahingegen ist, wie bereits in Abschnitt III.2.8 gezeigt werden konnte, LIMK1 in den Proteinextrakten aus Zellen, die mit RNF6-siRNA behandelt wurden, stärker nachweisbar. Die Detektion der gleichen Nitrocellulosemembran mit RNF6-Antiserum bestätigt die Verminderung der RNF6-Konzentration durch siRNA in den entsprechenden Proteinextrakten (Abb.III.2.18). Somit eignete sich auch die spezifische siRNA gegen LIMK1, um Effekte auf axonale Projektionen hippocampaler Neurone durch die Erniedrigung der LIMK1-Proteinkonzentration zu untersuchen.

III.2.10.2 Messung der Axonlängen nach Transfektion mit siRNA und Plasmid-DNA

Die Längen der Axone von hippocampalen Neuronen sollten in Abhängigkeit von der Verminderung der RNF6- und LIMK-Proteinmengen untersucht werden. Dafür wurden die Proteinkonzentrationen in den Neuronen beider Proteine sowohl in getrennten Ansätzen als auch gemeinsam in einem Ansatz durch RNAi verringert. So wurden Hippocampale Neuronen unter anderem mit einem Gemisch von siRNA-Oligonukleotiden gegen RNF6 und LIMK1 (20 pmol von RNF6-siRNA und 20 pmol LIMK-siRNA pro 2 cm² Kultur) transfiziert. Das entsprechende Kontroll-Experiment wurde daher ebenfalls mit einem Gemisch von je 20 pmol passender Kontroll-siRNA bezüglich RNF6 (Kontr^{RNF6}siRNA) und LIMK1 (Kontr^{LIMK1}siRNA) durchgeführt. Für RNAi nur gegen LIMK1 oder RNF6 alleine wurden jeweils 20 pmol spezifische siRNA mit 20 pmol Kontroll-siRNA verwendet. Komplementär zu den RNAi-Experimenten sollten auch die Einflüsse erhöhter Proteinmengen von LIMK1 und RNF6 auf die axonalen Projektionen hippocampaler Neurone untersucht werden. Hierfür wurden Expressions-Plasmide, die für die Fusionsproteine GFP-LIMK1 und Myc-RNF6 kodieren, transient in die Neurone transfiziert. Die beiden unterschiedlichen Epitop-Markierungen dienten dem spezifischen Nachweis beider Fusionsproteine, da auch die Kotransfektion mit beiden Plasmiden zusammen (GFP-LIMK1 und Myc-RNF6) durchgeführt wurde. So konnten auch eventuelle kompensatorische Effekte auf die Axonlängen durch die gleichzeitige Überexpression von RNF6 und LIMK1 untersucht werden. Als Kontroll-Experiment wurde die Kotransfektion der beiden Ausgangs-Plasmide GFP-C3 (GFP) und pCS2-Myc (Myc) verwendet.

Die verschiedenen Transfektionen der Hippocampus-Neuronen in Primärkultur erfolgten stets 24 h nach Präparation der Neurone. Weitere 24 h später wurden die transfizierten Kulturen fixiert und immunzytochemisch mit Antikörpern gegen das axonale Marker-Protein Tau gefärbt. Mit Myc- bzw. Myc-RNF6-Plasmid-DNA transfizierte Neurone wurden zusätzlich auch mit Antikörpern gegen das Myc-Epitop immunzytochemisch gefärbt. In Abbildung III.2.19 sind Aufnahmen repräsentativer Neuronen mit Hilfe des konfokalen Mikroskops dargestellt. Für jede Transfektions-Kombination wurden die Axonlängen aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt (Messwerte siehe Anhang V.1.2-1.5). In der Abbildung III.2.20 sind anhand von Säulendiagrammen die Mittelwerte der Axonlängen von drei unabhängigen Experimenten

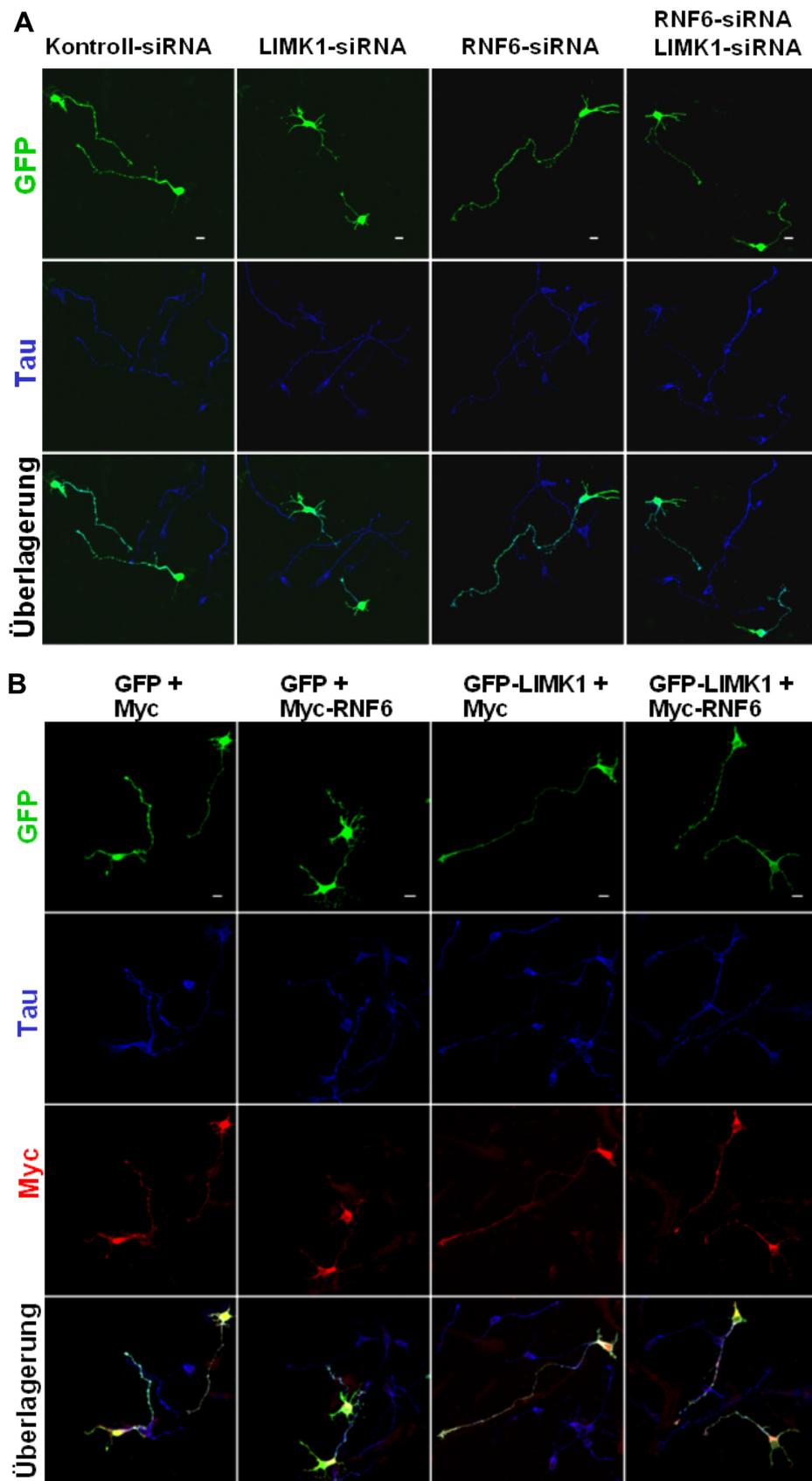


Abb.III.2.19 Repräsentative Neuronen 24 h nach Transfektion. Primärkulturen hippocampaler Neuronen wurden 24 h nach Präparation mit siRNA (A) oder Plasmid-DNA (B) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern untersucht. Der Längenmaßstab beträgt 10 μ M in (A) und (B)

dargestellt. Wie bereits in Abschnitt III.2.3.1 gezeigt wurde, bewirkt RNAi gegen RNF6 verglichen mit dem Kontroll-Experiment längere Axone transfizierter Neurone. Dagegen sind die Axone der Neurone, deren LIMK1-Proteinmengen durch RNAi reduziert wurden, auffallend kürzer.

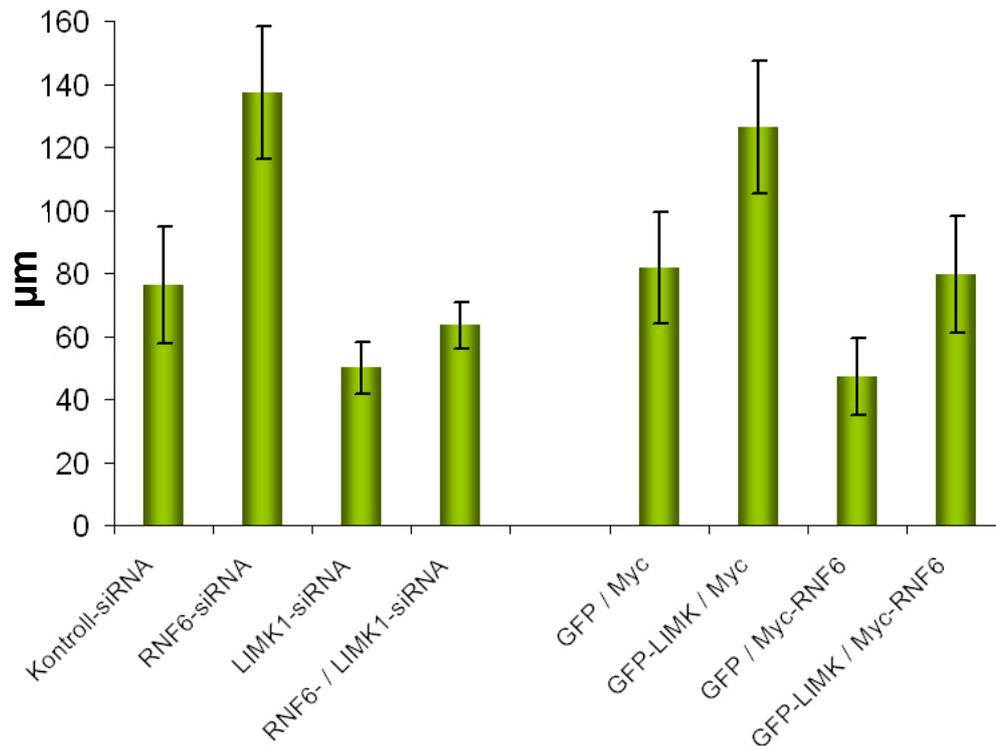


Abb.III.2.20 Axonlängen transfizierter Neurone 24 h nach Transfektion. Primäre hippocampale Neuronen wurden 24 h kultiviert und anschließend mit siRNA oder Plasmid-DNA transfiziert. Die Säulendiagramme stellen die Mittelwerte der Axonlängen (\pm Standardabweichung) aus drei unabhängigen Experimenten dar. Durch RNAi gegen RNF6 werden im Vergleich zur Kontrolle längere Axone verursacht, wohingegen RNAi gegen LIMK1 zu einer Verkürzung führt. Die Verlängerung der Axone durch RNAi gegen RNF6 ist nur in Anwesenheit von LIMK1 möglich, da gleichzeitiges Vermindern von RNF6- und LIMK1-Proteinmengen keinen Verlängerungseffekt hat. Die Expression von GFP-LIMK1 hat ebenfalls, ähnlich wie die Verminderung der RNF6-Proteinkonzentration, eine Verlängerung zur Folge. Myc-RNF6 dahingegen verursacht verkürzte Axone, was der Verkürzung durch RNAi gegen LIMK1 ähnelt. Werden GFP-LIMK1 und Myc-RNF6 gemeinsam in Neurone transfiziert, so scheinen sich verkürzende und verlängernde Effekte aufzuheben.

Ein Zusammenhang zwischen RNF6 und LIMK1 wird auch deutlich, wenn durch RNAi die Proteinmengen beider gesenkt werden. So kann die Verlängerung der Axone durch siRNA gegen RNF6 unterbunden werden, wenn gleichzeitig die LIMK1-Proteinkonzentration durch RNAi reduziert wird. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Effekte durch siRNA

gegen RNF6 auf den Proteinmengen der LIMK1 beruhen. Ähnlich zu den Neuronen, deren RNF6-Proteinmengen durch RNAi gesenkt wurden, zeigen Neurone mit erhöhter LIMK1-Proteinkonzentration durch die Expression von GFP-LIMK1 verlängerte Axone. Dahingegen verursacht die Expression von Myc-RNF6 eine Verkürzung der Axone, wie sie durch RNAi gegen LIMK1 ebenfalls beobachtet werden kann. Werden die beiden Plasmide GFP-LIMK1 und Myc-RNF6 kotransfiziert, so scheinen sich die Effekte beider Proteine gegenseitig aufzuheben. Diese Kompensation bezüglich der Axonlängen verdeutlicht den Zusammenhang von LIMK1 und RNF6 bei der Entwicklung neuronaler Axone (Abb.III.2.20). Die beschriebenen Längenverhältnisse sind in den immunzytochemischen Färbungen repräsentativer Neurone nachvollziehbar (Abb.III.2.19).

Die Rolle von LIMK1 während des Axonwachstums wurde bereits in verschiedenen Studien durch die Überexpression von LIMK1-Proteinen beschrieben (Gungabisson & Bamberg, 2003; Rosso *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den Effekten in der frühen Entwicklung der Axone konnte auch gezeigt werden, dass die Erhöhung von LIMK1-Proteinkonzentrationen über einen längeren Zeitraum zu einer Inhibition des weiteren axonalen Wachstums der Neurone führt. Aufgrund dieser Information sollten die Axonlängen transfizierter Neurone in einer Zeitreihe, die auch Inkubationszeiten länger als 24 h beinhaltet, gemessen werden. Hierfür wurden 24 h nach Präparation der hippocampalen Neurone die gleichen Transfektionen sowohl mit siRNA als auch mit Plasmid-DNA durchgeführt, wie sie bereits weiter oben beschrieben wurden. Die Neurone wurden dann 12 h, 48 h und 72 h nach Transfektion fixiert und immunzytochemisch aufgearbeitet. Die durchschnittlichen Längen der Axone pro Experiment sowie der Mittelwert aus den jeweiligen drei Experimenten sind in den Tabellen III.2.3.A / B zusammengefasst. In der Abbildung III.2.21 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt (Messwerte siehe Anhang V.1.2-1.5).

Bereits 12 h nach Transfektion können durch RNAi gegen RNF6 (Mittelwert: $92,8^{+36,1}$ μm) verlängerte Axone im Vergleich zur Kontroll-siRNA ($65,8^{+27,4}$ μm) beobachtet werden. Eine ähnlich starke Verlängerung der Neuriten um ca. 40% lässt sich auch bei der Expression von GFP-LIMK1 ($85,5^{+27,94}$ μm) beobachten. Kontroll-Neuronen, die mit GFP + Myc oder Kontroll-siRNA transfiziert wurden, zeigen Axonlängen, die einander entsprechen ($65,4^{+30,6}$ μm). Gemeinsam mit GFP-LIMK1 transfiziertes Myc-RNF6 verursacht auch zum Zeitpunkt 12 h nach Transfektion kaum Längenunterschiede der Axone ($68,7^{+18,6}$ μm). Dahingegen führen siRNA gegen LIMK1 ($44,0^{+20,1}$ μm) oder die Überexpression von Myc-RNF6 ($38,0^{+14,6}$ μm) zu ca. 30% kürzeren Neuriten als bei den Kontroll-Experimenten. So können bereits nach

12 h tendenziell die gleichen Effekte auf Axonlängen beobachtet werden, wie sie schon für den Zeitpunkt 24 h nach Transfektion beschrieben wurden.

Insgesamt 48 h nach der Transfektion kann eine interessante Änderung des axonalen Wachstums bei GFP-LIMK1 oder RNF6-siRNA transfizierten Neuronen beobachtet werden. Ihre

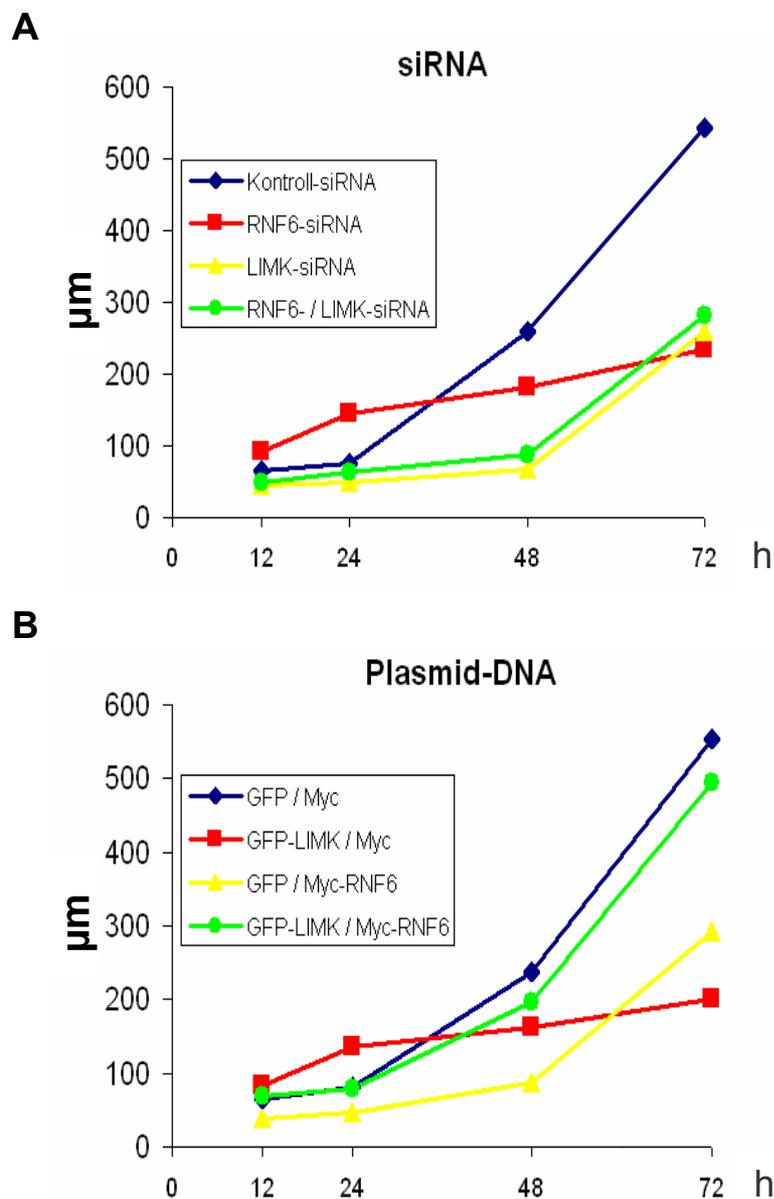


Abb.III.2.21 Graphische Darstellungen der Axonlängen transfizierter Neuronen. Die Graphiken A und B wurden anhand der Mittelwerte von Axonlängen aus den Tabellen III.2.A und III.2.B erstellt. Sie dienen zur Veranschaulichung der Entwicklung von Axonlängen über den Zeitraum von 12 – 72 h nach Transfektion der hippocampalen Neuronen mit siRNA (A) oder Plasmid-DNA (B). Überexpression von GFP-LIMK1 und RNAi gegen RNF6 führen nach einer Inkubationszeit, die länger als 24 h ist, zur Inhibition des axonalen Wachstums. Dahingegen scheinen inhibitorische Effekte der Expression von Myc-RNF6 und RNAi gegen LIMK1 schwächer zu werden.

| A | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h |
|---|--|--|---|--|
| Kontr^{LIMK1} siRNA Kontr^{RNF6} siRNA | 65,8µm ± 27,4µm n = 150 62,7 ± 24,5 66,9 ± 28,7 67,9 ± 28,9 | 77,1µm ± 36,9µm n = 194 80,3 ± 41,6 75,6 ± 35,9 75,4 ± 33,3 | 258,4µm ± 106,6µm n = 139 244,9 ± 94,0 268,5 ± 120,6 262,0 ± 105,1 | 542,8µm ± 146,0µm n = 97 507,6 ± 134,0 574,8 ± 158,2 545,9 ± 145,8 |
| LIMK1 siRNA Kontr^{RNF6} siRNA | 44,0µm ± 20,1µm n = 153 42,8 ± 19,0 44,1 ± 20,2 45,1 ± 21,0 | 49,5µm ± 16,5µm n = 150 48,8 ± 16,8 50,0 ± 16,6 49,7 ± 16,0 | 67,3µm ± 27,2µm n = 138 63,1 ± 23,5 70,4 ± 29,6 68,4 ± 28,5 | 259,7µm ± 93,1µm n = 94 236,6 ± 76,2 281,3 ± 111,3 261,1 ± 91,9 |
| Kontr^{LIMK1} siRNA RNF6 siRNA | 92,8µm ± 36,1µm n = 136 84,8 ± 34,7 96,1 ± 39,0 97,4 ± 34,6 | 138,2µm ± 50,5µm n = 180 139,6 ± 51,0 134,8 ± 51,3 140,0 ± 49,2 | 180,4µm ± 76,9µm n = 134 177,1 ± 77,7 194,8 ± 86,6 169,4 ± 66,2 | 238,0µm ± 62,3µm n = 100 212,4 ± 42,6 254,1 ± 77,6 247,6 ± 66,7 |
| LIMK1 siRNA RNF6 siRNA | 49,6µm ± 21,8µm n = 138 44,9 ± 17,8 52,8 ± 24,6 51,2 ± 23,0 | 63,4µm ± 16,3µm n = 158 63,2 ± 14,6 65,3 ± 14,5 61,8 ± 19,9 | 94,1µm ± 44,0µm n = 139 87,0 ± 41,1 106,0 ± 52,3 89,4 ± 40,5 | 282,5µm ± 83,1µm n = 101 255,1 ± 61,4 312,8 ± 108,7 279,5 ± 79,3 |
| B | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| GFP-C3 Myc | 65,4µm ± 30,6µm n = 107 66,2 ± 32,3 63,9 ± 29,1 66,9 ± 30,4 | 82,7µm ± 34,9µm n = 102 82,5 ± 34,9 87,7 ± 38,6 77,9 ± 31,2 | 235,5µm ± 80,1µm n = 126 246,6 ± 87,8 223,5 ± 73,5 236,3 ± 79,2 | 551,1µm ± 146,6µm n = 100 509,8 ± 120,6 590,3 ± 176,9 553,1 ± 142,2 |
| GFP-C3 Myc-RNF6 | 38,0µm ± 14,6µm n = 137 36,6 ± 14,1 38,1 ± 14,5 39,4 ± 15,3 | 47,2µm ± 24,3µm n = 137 46,3 ± 24,6 50,9 ± 28,0 44,4 ± 20,4 | 87,0µm ± 27,8µm n = 103 92,4 ± 31,4 81,1 ± 24,2 87,6 ± 27,8 | 292,9µm ± 82,6µm n = 93 285,7 ± 79,3 290,9 ± 81,0 302,0 ± 87,6 |
| GFP-LIMK1 Myc | 85,5µm ± 29,4µm n = 138 86,6 ± 30,6 80,7 ± 25,4 89,3 ± 32,1 | 125,6µm ± 60,4µm n = 93 121,5 ± 57,8 140,7 ± 72,0 114,7 ± 51,4 | 151,8µm ± 35,1µm n = 111 166,2 ± 33,2 140,0 ± 34,7 149,1 ± 37,4 | 201,0µm ± 56,2µm n = 92 197,6 ± 56,7 201,0 ± 56,3 204,3 ± 55,6 |
| GFP-LIMK1 Myc-RNF6 | 68,7µm ± 18,6µm n = 90 71,1 ± 22,9 66,7 ± 16,2 68,2 ± 16,7 | 81,1µm ± 37,4µm n = 95 76,5 ± 34,1 87,6 ± 46,0 79,1 ± 32,2 | 195,4µm ± 61,9µm n = 108 205,0 ± 71,0 182,1 ± 51,5 199,2 ± 63,3 | 485,0µm ± 149,7µm n = 90 460,5 ± 135,2 500,1 ± 163,7 494,5 ± 150,1 |

Tab.III.2.3.A / B. Messungen der Axonlängen hippocampaler Neuronen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Transfektion mit siRNA oder GFP- und Myc-Konstrukten. (A) Primärkulturen hippocampaler Neuronen wurden 24 h nach Präparation mit siRNA gegen LIMK1 und/oder gegen RNF6 sowie Kontroll-siRNA transfiziert. Es wurde stets das GFP-C3-Plasmid als Transfektionskontrolle kotransfiziert. Jeder Transfektionsansatz enthielt 40 pmol siRNA wobei je 20 pmol siRNA gegen LIMK1 und/oder RNF6 bzw. Kontroll-siRNA (Kontr^{LIMK1} oder Kontr^{RNF6}) je nach Kombination entfielen. **(B)** Hippocampale Neuronen wurden 24 h nach Präparation mit GFP-C3 (kodiert nur das GFP-Protein) bzw. GFP-LIMK1 zusammen mit Plasmid-DNA, die nur für das Myc-Epitop kodiert, oder mit Myc-RNF6 transfiziert. Die Neurone in **(A)** und **(B)** wurden nach 12, 24, 48 oder 72 h fixiert und immunzytochemisch mit Tau-Antikörpern und in **(B)** zusätzlich mit Antikörpern gegen das Myc-Epitop gefärbt. Die Werte der unteren Reihen geben die gemessenen durchschnittlichen Längen (± Standardabweichung) der Axone transfizierter Neurone in den drei Experimenten wieder. Der durch Fettdruck hervorgehobene Wert ist der Mittelwert (± Mittelwert der Standardabweichungen) aus den drei Messungen. Die Gesamtzahl aller gemessenen Neuronen ist mit „n“ angegeben.

Axonlängen bleiben im Mittel deutlich unter 200 μm während die Axone in den Kontroll-Experimenten eine Länge von durchschnittlich 250 μm erreichen (Tab.III.2.3. und Abb.III.2.21). Lediglich der kompensatorische Effekt bezüglich der Axonlängen durch die Koexpression von GFP-LIMK1 und Myc-RNF6 ist auch nach 48 h feststellbar.

Insgesamt 72 h nach Transfektion ist die Stagnation des Axonwachstums bei GFP-LIMK1 + Myc oder RNF6-siRNA transfizierten Neuronen besonders offensichtlich. Die Axone dieser Neurone sind nur noch mit einer Rate von 2,1 $\mu\text{m}/\text{h}$ bzw. 2,4 $\mu\text{m}/\text{h}$ gewachsen, so dass lediglich Längen zwischen 200 μm und 250 μm erreicht werden. Dagegen beträgt die Wachstumsrate der Axone in den Kontroll-Experimenten 13,2 $\mu\text{m}/\text{h}$ bzw. 12,0 $\mu\text{m}/\text{h}$, wodurch sie im Mittel Längen von über 500 μm erreichen (Tab.III.2.3. und Abb.III.2.20). Indessen scheinen die hemmenden Wirkungen bezüglich des Axon-Wachstums von Myc-RNF6 und siRNA gegen LIMK1 mit zunehmender Dauer schwächer zu werden. Verglichen mit den nach 48 h fixierten Zellen der gleichen Transfektionen beträgt die Wachstumsrate zum Zeitpunkt 72 h in beiden Fällen ca. 8 $\mu\text{m}/\text{h}$. Dadurch weisen sie nach 72 h mit $292,9^{\pm 82,6}$ μm bzw. $259,7^{\pm 93,1}$ μm längere Axone auf als die mit GFP-LIMK + Myc ($201,0^{\pm 82,6}$ μm) oder RNF6-siRNA ($238,0^{\pm 62,3}$ μm) transfizierten Neurone (Abb.III.2.20). Der kompensatorische Effekt der Koexpression von GFP-LIMK1 und My-RNF6 hält weitestgehend auch nach 72 h an und ermöglicht eine Axonwachstumsrate von 12,1 $\mu\text{m}/\text{h}$, das im Mittel zu einer Axonlänge von $485,0^{\pm 149,7}$ μm führt.

Um die Relevanz der gemessenen Unterschiede in den Durchschnittswerten der Axonlängen statistisch zu überprüfen, wurde für alle Messreihen der *t*-Test durchgeführt. Dafür wurden die Messergebnisse der einzelnen Experimente stets mit denen des Kontroll-Experiments (Kontr^{RNF6}siRNA + Kontr^{LIMK1}siRNA oder GFP-C3 + Myc) der entsprechenden Messreihe gepaart und der jeweilige p-Wert ermittelt. In den Tabellen III.2.4.A / B sind die p-Werte der *t*-Tests aufgelistet. Für fast alle Messreihen ergaben sich p-Werte, die stets unter 0,05 liegen. In diesen Fällen sind die gemessenen Längenunterschiede der Axone signifikant. Lediglich die Messreihen der Kotransfektion von GFP-LIMK1 mit Myc-RNF6 liefern stets p-Werte über 0,05 (Tab.III.2.4.B). In diesem Fall bestätigen die p-Werte des *t*-Tests, dass die verursachten Axonlängen durch die gemeinsame Überexpression von GFP-LIMK1 und Myc-RNF6 sich unwesentlich von den Längen der Axone in den Kontroll-Experimenten unterscheiden. Somit kann auch statistisch bestätigt werden, dass es bei der Kotransfektion von RNF6 und LIMK1 zu einer Kompensation kommt, die den funktionalen Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen bezüglich der Entwicklung der neuronalen Axone untermauert.

A

| | 12 h | | | 24 h | | | 48 h | | | 72 h | | |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Exp.1 | Exp.2 | Exp.3 |
| Kontrol ^{LIMK1} siRNA ↔ Kontrol ^{RNF6} siRNA | 0,0005 | 0,0006 | 0,0009 | 0,0004 | 0,0007 | 0,0002 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 |
| LIMK1 siRNA ↔ Kontrol ^{RNF6} siRNA | | | | | | | | | | | | |
| Kontrol ^{LIMK1} siRNA ↔ Kontrol ^{RNF6} siRNA | 0,0021 | 0,0011 | 0,0018 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | 0,0044 | 0,011 | 0,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 |
| Kontrol ^{LIMK1} siRNA ↔ RNF6 siRNA | | | | | | | | | | | | |
| Kontrol ^{LIMK1} siRNA ↔ LIMK1 siRNA ↔ RNF6 siRNA | 0,0019 | 0,044 | 0,02 | 0,045 | 0,15 | 0,041 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 |

B

| | 12 h | | | 24 h | | | 48 h | | | 72 h | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Exp.1 | Exp.2 | Exp.3 |
| GFP-C3 ↔ Myc | 0,028 | 0,037 | 0,011 | 0,011 | 0,0055 | 0,0068 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 |
| GFP-LIMK1 ↔ Myc | | | | | | | | | | | | |
| GFP-C3 ↔ Myc | <,0001 | 0,0002 | 0,0001 | 0,0002 | 0,0002 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 | <,0001 |
| GFP-C3 ↔ Myc-RNF6 | | | | | | | | | | | | |
| GFP-C3 ↔ Myc | 0,61 | 0,73 | 0,81 | 0,6 | 0,99 | 0,9 | 0,48 | 0,52 | 0,7 | 0,24 | 0,11 | 0,22 |
| GFP-LIMK1 ↔ Myc-RNF6 | | | | | | | | | | | | |

Tab.III.2.4 A / B. Die Messreihen der Axonlängen wurden dem *t*-Test unterzogen, um die Signifikanz von gemessenen Längenunterschieden zu beurteilen. Jede Messreihe einer Transfektion wurde stets mit der Messreihe der Kontroll-Transfektion gepaart und der p-Werts des *t*-Tests bestimmt. In der Tabelle (A) sind die Resultate der RNAi-Messreihen aufgelistet. Die Tabelle (B) enthält die p-Werte der Messreihen für die Plasmid-DNA-Transfektionen. Ein p-Wert kleiner als 0,05 gibt an, dass der gemessene axonale Längenunterschiede zwischen transfizierten Neuronen und Neuronen des Kontroll-Experiments signifikant ist und nicht auf Zufall beruht. Je kleiner der p-Wert ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die gemessenen Unterschiede in den Axonlängen signifikant sind.

Zusammengefasst zeigen die Messergebnisse der Axonlängen von transfizierten hippocampalen Neuronen, dass RNF6 eine wichtige Rolle in der Regulation der LIMK1-Proteinmengen hat. In der frühen Phase der Entwicklung der Axone führt die Senkung von RNF6-Proteinmengen durch RNAi, wie auch die Erhöhung der LIMK1-Proteinkonzentration durch Expression des Fusionsproteins GFP-LIMK1, zu verlängerten Axonen der Neurone. Der Effekt auf die Axone durch die Verwendung von siRNA gegen RNF6 ist auf eine Zunahme der LIMK1-Proteinmengen zurückführbar. Jedoch verursacht in den hippocampalen Neuronen sowohl die Expression von GFP-LIMK1 als auch die Verringerung der RNF6-

Proteinkonzentration durch RNAi über einen längeren Zeitraum einen Umkehreffekt. Die Wachstumsraten der Axone stagnieren, was letztendlich verglichen mit Kontroll-Neuronen in kürzeren axonalen Projektionen resultiert. Werden aber GFP-LIMK1 und Myc-RNF6 kotransfiziert, so kompensieren sich die Effekte beider Proteine, wodurch sich die Axone unabhängig vom Entwicklungsstadium mit einer ähnlichen Wachstumsrate wie bei Kontroll-Neuronen entwickeln. Somit steht die Fähigkeit von RNF6, die LIMK1-Proteinmengen in Neuronen durch Vermittlung des proteasomalen Abbaus zu regulieren, in einem engen Zusammenhang mit der Entwicklung der Axone.

III.2.10.3 Einfluss von RNF6 auf das Aktin-Zytoskelett in Wachstumskegeln

Es konnte gezeigt werden, dass LIMK1 das Axon-Wachstum durch die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts in den Wachstumskegeln der Axone beeinflusst (Gungabisson & Bamberg, 2003). LIM-Kinasen können generell die Aktin-depolymerisierenden Faktoren ADF/Cofilin phosphorylieren und dadurch deren Aktivität inhibieren. Die Inhibition von ADF/Cofilin durch LIMK-Proteine führt zu einer Akkumulation von Aktin-Filamenten (F-Aktin) (Arber *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Endo *et al.*, 2003). Zusätzlich ist bekannt, dass die Motilität der Wachstumskegel und somit das Wachstum der Axone vom Gleichgewicht zwischen Aktin-Polymerisierung und -Depolymerisierung abhängt (Bradke & Dotti 1999; Gungabisson & Bamberg, 2003). Daher sollte die Auswirkung der modifizierten RNF6-Proteinmengen auf das Aktin-Zytoskelett im Wachstumskegel untersucht werden.

In Abbildung III.2.22 A und B sind die Aufnahmen repräsentativer Neuronen dargestellt, die 48 h nach Transfektion fixiert und immunzytochemisch mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern behandelt wurden. Die Axone wurden durch die Färbung mit dem Tau-Antikörper markiert. Die Neurone wurden zusätzlich mit Fluorophor-gekoppeltem Phalloidin, das eine spezifische Affinität für F-Aktin besitzt, behandelt. 48 h nach Transfektion tritt bei ca. 30% der Neurone, welche mit GFP-LIMK1 und lediglich Myc transfiziert sind, eine deutliche Vergrößerung der Wachstumskegel ein. Diese Vergrößerungen gehen mit einer starken Akkumulation von Aktin-Filamenten (F-Aktin) einher (Abb.III.2.21 A und B). Ein ähnliches Phänomen kann auch bei hippocampalen Neuronen, deren RNF6-Proteinmengen durch RNAi verringert wurden, beobachtet werden (Abb.III.2.22 C und D). Auch hier treten vergrößerte Wachstumskegel, die eine Akkumulation von F-Aktin aufweisen, mit einer Häufigkeit von ca.

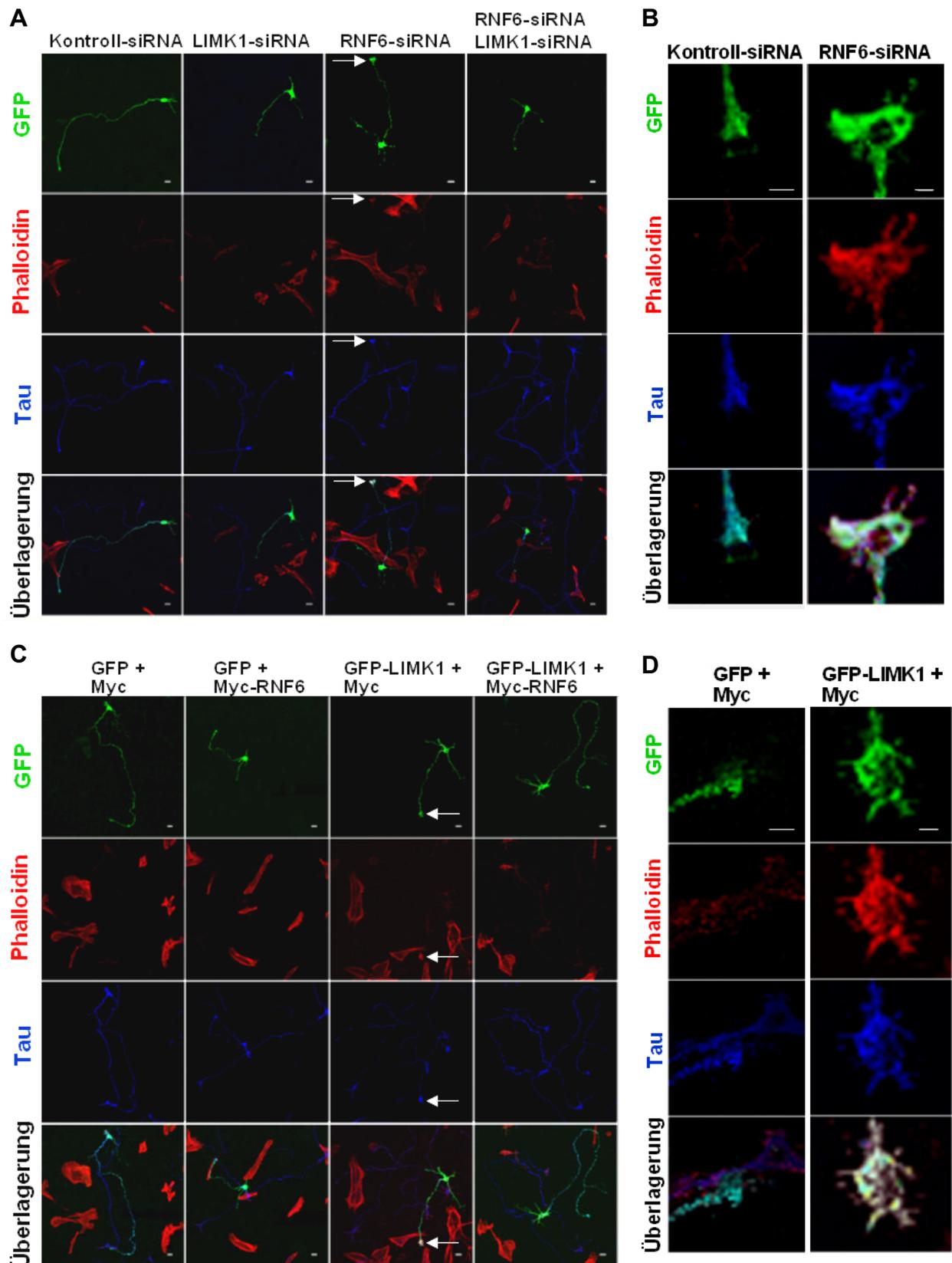


Abb.III.2.22 Repräsentative Neuronen 48 h nach Transfektion. Primärkulturen hippocampaler Neuronen wurden 24 h nach Präparation mit siRNA (A) oder Plasmid-DNA (C) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern bzw. Phalloidin untersucht. (B) und (D) zeigen die Vergrößerungen der Wachstumskegeln aus entsprechenden Transfektionen. Der Längenmaßstab beträgt 10 μm in (A) und (C) sowie 2 μm in (B) und (D).

30% auf. Ähnliche morphologischen Änderungen des Wachstumskegel konnten in allen anderen Transfektions-Varianten lediglich in weniger als 5% der transfizierten Neurone beobachtet werden. So könnte die verstärkte Anhäufung von F-Aktin in den Wachstumskegeln eine mögliche Ursache für die stagnierende Wachstumsrate der axonalen Projektionen sein, wenn in den Neuronen für längere Zeit die LIMK1-Proteinmengen erhöht sind.

IV. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die RING-Finger Ubiquitin-Ligase RLIM bei der frühen Entwicklung des Neuralrohres in Mausembryonen eine Rolle spielen könnte. Ferner wurde das RING-Finger-Protein RNF6, das eine enge Verwandtschaft zu RLIM aufweist, auf mögliche Funktionen in der Zelle untersucht.

IV.1 Regulation von CLIM durch RLIM im Neuralrohr der Mausembryonen

Die immunhistochemischen Untersuchungen der Vibratonschnitte von Mausembryonen ergaben ein sehr ähnliches Expressionsmuster für die Ubiquitin-Ligase RLIM und seine Substrat-Proteine CLIM. Die Kolo-kalisation beider Proteine in allen RLIM- bzw. CLIM-exprimierenden Zellen im ventralen Bereich des Neuralrohres von E13-13,5 Mäusen war überraschend, da RLIM als Ubiquitin-Ligase CLIM-Proteine für den proteasomalen Abbau markiert (Ostendorff *et al.*, 2002). Die Koexistenz der beiden Proteine könnte ein Hinweis darauf sein, dass der RLIM-vermittelte Abbau von CLIM einer Regulation unterliegt. Solche Regulationen können sowohl auf der Ebene der Ubiquitin-Ligase als auch auf der des Substrat-Proteins stattfinden. Ein Beispiel dafür ist der proteasomale Abbau des NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) Inhibitors I- κ B (*Inhibitor of NF- κ B*), der durch die posttranslationale Modifikation des Substrates reguliert wird. Zytokine wie Interleukin-1 oder TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor alpha) führen über einen speziellen Signalweg zur Aktivierung der I- κ B-Kinase, die daraufhin I- κ B phosphoryliert. Phosphorylierte I- κ B-Proteine werden durch den E3-Enzym-Komplex SCF ^{β TrCP} erkannt und für den proteasomalen Abbau ubiquitiniert (Chen, 2005). Ein weiteres Beispiel ist die Ubiquitinierung des Tumorsuppressorproteins p53 durch die RING-Finger Ubiquitin-Ligase Mdm2 (*murine double-minute protein 2*) (Fang *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Mdm2 an mehreren Aminosäure-Resten zu einer Abnahme der Ubiquitin-Ligase-Aktivität führt und dadurch in einer Stabilisierung von p53 resultiert (Fang *et al.*, 2000; Meek & Knippschild, 2003). In unserem Labor konnte mein Kollege Steve Johnson in seiner laufenden Studie zeigen, dass auch RLIM *in vivo* an verschiedenen Aminosäure-Positionen phosphoryliert wird (Daten nicht gezeigt). Bislang konnte die Konsequenz dieser posttranslationalen Modifikation noch nicht geklärt werden. Es ist jedoch denkbar, dass der Phosphorylierungszustand von RLIM die Ubiquitin-Ligase-Aktivität

beeinflusst. Da sich einige der phosphorylierten Aminosäuren innerhalb der NLS (*Nuclear Localization Signal*) befinden (Daten nicht gezeigt), besteht auch die Möglichkeit, dass die Lokalisation von RLIM reguliert wird. So wäre die Relokalisation von RLIM weg von den CLIM-Proteinen ebenfalls ein möglicher Mechanismus, um den Abbau der CLIM-Proteine durch RLIM zu regulieren. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Koexistenz von RLIM und CLIM in einer Zelle wird in der Studie von Hiratani und Kollegen vorgeschlagen. Sie vermuten, dass die CLIM-Proteine stabilisiert werden, wenn sie einen Komplex mit den LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren (LIM-HDs) bilden (Hiratani *et al.*, 2003). So wäre RLIM durch die Regulation der Konzentration von CLIM-Proteinen für korrekte Mengenverhältnisse zwischen CLIM-Kofaktoren und LIM-HD-Proteinen verantwortlich. Eine Regulation der CLIM-Proteinkonzentration ist in der Tat sehr wichtig, da die Änderung der verfügbaren Menge von CLIM-Kofaktoren zu Defekten in der Entwicklung führen kann. In *Drosophila* wurde gezeigt, dass die Störung des Gleichgewichts zwischen dem LIM-HD *Apterous*, dem Kofaktor CHIP (CLIM-Homolog in *Drosophila*) und dem *LIM-only* (LMO) Protein *Beadex* schwerwiegende Defekte in der Flügelentwicklung verursacht. *Beadex* konkurriert mit *Apterous* um die Bindung von CHIP-Proteinen und entzieht dadurch dem LIM-HD-Protein die Kofaktoren. Da die Expression von *Beadex* durch *Apterous* stimuliert wird, handelt es sich dabei um eine negative Rückkopplung, bei der einerseits die Aktivität von *Apterous* gehemmt wird und andererseits *Apterous*-Proteine verstärkt durch das Proteasom abgebaut werden (Milan *et al.*, 1998; Milan & Cohen, 1999; Kadrmas & Beckerle, 2004). In *Drosophila* konnte bislang kein RLIM-Homolog gefunden werden. Das Fehlen einer Ubiquitin-Ligase, die den Abbau von CHIP vermittelt, könnte durch den beschriebenen Mechanismus der negativen Rückkopplung ausgeglichen werden. Da in Säugetieren sowohl RLIM als auch LMOs vorhanden sind, könnte dies zur Unterstützung der Ansicht herangezogen werden, dass in der Evolution komplexer Lebewesen zusätzliche Regulationsmechanismen entwickelt wurden.

In den Neuronen des Neuralrohres von Mausembryonen ist die Verfügbarkeit der CLIM-Kofaktoren im Zusammenhang mit dem so genannten *LIM-code* für die Differenzierung von Motoneuronen wichtig. Es hat sich gezeigt, dass die Bildung des Hexamers 2xIsl1+2xCLIM+2xLhx3 für die korrekte Differenzierung von bestimmten Motoneuronen ausschlaggebend ist. Dieser Komplex kommt durch die Verdrängung der Lhx3-Proteine von den CLIM-Dimeren zustande, die auf einer höheren Affinität des LIM-HD-Proteins Isl1 für CLIM-Proteine beruht. Gleichzeitig besitzt Isl1 an seinem N-Terminus eine Interaktionsdomäne für Lhx3 (Thaler *et al.*, 2002). Eine zu hohe Menge an CLIM-Proteinen

aber könnte die Formation dieses Hexamers stören. Die Lhx3-Proteine hätten die Möglichkeit, anstelle der Bindung an den Isl1-CLIM-Komplex selbst mit überschüssigen CLIM-Dimeren zu interagieren und dadurch die Differenzierung der Neurone zu beeinträchtigen. Wie in dieser Dissertations-Arbeit gezeigt werden konnte, kolokalisiert RLIM in Zellen des Neuralrohres sowohl mit CLIM als auch mit Lhx3. Eine Kolokalisation von RLIM mit weiteren LIM-HD-Proteinen wie z.B. Isl1 in Zellen des Neuralrohres von Mausembryonen zeigten die Untersuchungen meiner Kollegin Heather Ostendorff (Ostendorff *et al.*, 2005; eingereicht). Diese Feststellungen bekräftigen die Hinweise für eine Funktion von RLIM als Regulator der CLIM-Proteinmengen im Zusammenhang mit der Aktivität von LIM-HD-Proteinen.

RLIM und CLIM zeigen während der Entwicklung des Neuralrohres von Mausembryonen ein dynamisches Expressionsprofil. Im Neuralrohr von E15-15,5 Embryonen konnten RLIM und CLIM nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Auch Lhx3 zeigt eine ähnliche Dynamik, wobei bereits zum Zeitpunkt E14-14,5 keine Lhx3-Proteine mehr im Neuralrohr nachweisbar waren. Die Verringerung der LIM-HD-Expression im Neuralrohr während der Entwicklung könnte eine Erklärung für die darauf folgende Abnahme der Proteinmengen von RLIM und CLIM sein. Bleibt die Komplexbildung mit LIM-HD-Transkriptionsfaktoren aus, werden CLIM-Proteine einem verstärkten RLIM-vermittelten Abbau ausgesetzt. Gleichzeitig wäre RLIM aufgrund seiner Autoubiquitinierungs-Aktivität in der Lage, den eigenen Abbau zu vermitteln, sobald keine weiteren Substrat-Proteine mehr verfügbar sind. So könnte die dynamische Expression von LIM-HDs im Neuralrohr die nachgeschaltete Abnahme der Proteinmengen von CLIM und anschließend RLIM durch den proteasomalen Abbau zur Folge haben. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die Ubiquitin-Ligase RLIM an der frühen Entwicklung des Säugetier-Neuralrohres im Zusammenhang mit dem LIM-HD-Proteinnetzwerk beteiligt ist. Diese Funktion scheint für Säugetiere lebenswichtig zu sein, da die Embryonen der Mausmutanten, die kein RLIM exprimieren können, vor ihrer Geburt sterben (Bossenz, 2004). Welche Defekte während der frühen Entwicklung der Mäuse das Fehlen von RLIM verursacht, wird zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe näher untersucht.

IV.2 Expression von RNF6

RNF6 ist eine RING-Finger Ubiquitin-Ligase, die eine enge Verwandtschaft mit RLIM aufweist. Diese wird durch die hochkonservierte Aminosäuresequenz beider Proteine mit

einer Identität von über 80 Prozent deutlich. Das Expressionsmuster beider Proteine ist im ventralen Teil des Neuralrohres von E13-13,5 Mausembryonen äußerst ähnlich. Dies lässt vermuten, dass beide E3-Enzyme in den gleichen Zellen exprimiert werden und somit die Möglichkeit einer gegenseitigen Regulation bestehen könnte. Einen Hinweis auf diese Möglichkeit lieferten die Ergebnisse meiner Kollegin Anne Schlüter (Schlüter, 2004), die in ihrer Doktorarbeit eine *in vitro* Ubiquitinierung von RING-Finger-deletiertem RNF6 durch RLIM zeigen konnte. Ob es zu dieser Ubiquitinierung auch in Zellen kommt und in welchem Zusammenhang sie stattfinden könnte ist bislang noch nicht geklärt.

Die Vergrößerung der Expressionsbereiche im Neuralrohr zeigt, dass RNF6 ein vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes Protein ist, während RLIM hauptsächlich in den Zellkernen lokalisiert. Mein Kollege Marvin Peters konnte in seiner Arbeit zeigen, dass RLIM und RNF6 jeweils zwei Aminosäuresequenzen aufweisen, die funktionelle Signale für eine Kern-Lokalisation (NLS = *nuclear localization signal*) und Zytoplasma-Lokalisation (NES = *nuclear export signal*) darstellen (Peters, 2004). Es stellte sich heraus, dass das NLS von RNF6 im Vergleich zur NLS von RLIM wesentlich schwächer ist, während das RNF6-NES stärker als das von RLIM ist. Diese Untersuchungen lieferten nicht nur eine Erklärung für die Lokalisation von RLIM und RNF6 im Zellkern bzw. Zytoplasma, sondern auch für Beobachtungen sowohl in unserem Labor als auch in Studien anderer Gruppen. RLIM und RNF6 können in kultivierten Säugetierzellen in geringen Mengen auch im jeweils anderen Zellkompartiment nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt; Lopez *et al.*, 2002). Als Ursache für diese Beobachtung könnte eine Regulation durch posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder Sumolierung in Frage kommen, die die Wirkung dieser Signalsequenzen verändern könnten (Shcherbik & Haines, 2004; Gill, 2004; Tamanini *et al.*, 2005; Riley *et al.*, 2005). So wäre es z.B. möglich, dass die durch bestimmte Signale vermittelte Inaktivierung der NES von RNF6 zu einer partiellen Lokalisation im Zellkern führt. Lopez und Kollegen konnten anhand der Kolo-kalisation mit PML (*promyelocytic leukemia*) und Daxx zeigen, dass nukleär lokalisiertes RNF6 mit so genannten *PML-bodies* im Nukleus assoziiert sein kann. Daxx ist ein Repressor der Glukocortikoid-Rezeptor-vermittelten Transkriptionsaktivierung. Sumolierte PML-Proteine rekrutieren Daxx zu den *PML-bodies*, so dass die Repressor-Aktivität unterdrückt wird (Muller *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2003). Ob der Assoziation von RNF6 mit *PML-bodies* ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt und welche Funktion diese Assoziation hat, ist bislang noch nicht bekannt. Es wäre jedoch denkbar, dass auch RNF6 durch die Assoziation mit den

PML-bodies von einer Bindung an z.B. LIM-Domänen abgehalten und somit eine mögliche Funktion unterdrückt wird.

Auf den Vibratonschnitten der E13-13,5 Mausembryonen konnte RNF6 sehr deutlich in den axonalen Projektionen der ventralen Motoneurone des Neuralrohres sowie in dorsalen Spinalganglien nachgewiesen werden. Da zum Zeitpunkt E13-13,5 die Entwicklung der Projektionen noch nicht abgeschlossen ist, wies diese Beobachtung auf eine Rolle für RNF6 bei der Entwicklung von Neuronen hin. Dieser Hinweis wurde dadurch bekräftigt, dass RNF6 auch in den Axonen und Wachstumskegeln von kultivierten Hippocampus-Neuronen nachgewiesen werden konnte.

IV.3 RNF6 interagiert mit LIMK1 und vermittelt dessen Polyubiquitinierung

Meine Kollegin Anne Schlüter konnte in ihrer Doktorarbeit eine *in vitro* Interaktion von RNF6 und LIMK1 nachweisen. Des Weiteren war es ihr möglich die *in vitro* Ubiquitinierung von LIMK1 durch RNF6 zu zeigen. LIM-Kinase 1 reguliert als Effektor des Rho-/Rac-Signalweges die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts in axonalen Wachstumskegeln und übt dadurch einen Einfluss auf das Wachstum der Axone aus (Endo *et al.*, 2003, Gungabisson & Bamberg, 2003; Rosso *et al.*, 2004; Foletta *et al.*, 2004).

In meiner Studie zeigte der Vergleich der LIMK1- und RNF6-Expressionsmuster auf Vibratonschnitten von E13-13,5 Mausembryonen ein sehr ähnliches Bild. Beide sind in den gleichen ventralen Bereichen des Neuralrohres exprimiert sowie in den axonalen Projektionen aus dem Neuralrohr und den Spinalganglien. Die Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen RNF6 und LIMK1 konnten in meiner Arbeit unter anderem durch Interaktions-Experimente bekräftigt werden. Die Koimmunopräzipitation von LIMK1 und RNF6 aus Proteinextrakten hippocampaler Neuronen-Kulturen wies auf eine Interaktion der beiden Proteine in Neuronen hin. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung von LIMK1 durch RNF6 eine Polyubiquitinierung darstellt, bei der die Ubiquitin-Moleküle über das Lysin 48 (K48) verknüpft sind. Diese Feststellung war wichtig, da z.B. die Monoubiquitinierung eines Proteins nicht zu einem Abbau durch das Proteasom führt. Auch eine Polyubiquitinierung muss nicht den proteasomalen Abbau zur Folge haben, da die Verknüpfung der Ubiquitin-Moleküle anhand der Lysine 6, 11, 27, 33 oder 63 nicht zu einem Abbau führt. Die Polyubiquitinierung von Proteinen, bei der die Ubiquitine über das K63 miteinander verbunden sind, scheint in einem Zusammenhang mit diversen Prozessen, wie

Endozytose, Stressantwort und DNA-Reparatur zu stehen (Soetens *et al.*, 2001; Spence *et al.*, 1995). Neben der Verknüpfung über K48 scheint auch eine Verkettung der Ubiquitine anhand von K29 die Degradation des ubiquitinierten Proteins durch das Proteasom zu bewirken. Allerdings ist dieser Prozess weniger gut charakterisiert und spielt vermutlich beim Abbau von Ubiquitin-Fusionsproteinen eine Rolle (Spence *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1995, Koegl *et al.*, 1999).

In den Kopräzipitations-Experimenten mit transfizierten Cos7-Zellen konnte auch eine schwache Präzipitation von HA-LIMK durch Myc-RLIMΔRING detektiert werden. Diese Beobachtung kann darauf zurückgeführt werden, dass einerseits RLIM, wenn auch geringfügig, im Zytoplasma vorkommt und andererseits LIMK1 auch in den Zellkern lokalisieren kann (Yang & Mizuno, 1999; Roovers *et al.*, 2003; Peters, 2004; Daten nicht gezeigt). LIM-Kinasen enthalten in der Kinase-Domäne eine NLS sowie zwei NES in der PDZ-Domäne (Yang & Mizuno, 1999). Unter welchen Umständen LIMK1 in den Zellkern transloziert, ist jedoch bislang nicht geklärt. Im Nukleus ist LIMK1 für die Repression der Rac/Cdc42-abhängigen CyclinD1-Expression verantwortlich, die bei der Regulation des Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt (Roovers *et al.*, 2003). Ob RNF6 durch die partielle Lokalisation im Zellkern oder eventuell RLIM eine Rolle bei dieser Funktion von LIMK1 spielt, ist bislang nicht bekannt.

IV.4 Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 in axonalen Wachstumskegeln

In hippocampalen Primär-Neuronen konnte RNF6 deutlich in den Wachstumskegeln der Axone nachgewiesen werden. Die Expression von LIMK1 in den Wachstumskegeln war bereits in anderen Studien beschrieben worden (Endo *et al.*, 2003, Gungabisson & Bamberg, 2003; Rosso *et al.*, 2004; Foletta *et al.*, 2004). Von den Wachstumskegeln hängt das Wachstum der Axone ganz entscheidend ab. Daher galt ihnen das Hauptaugenmerk bei den immunzytochemischen Untersuchungen mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern. In den Wachstumskegeln der hippocampalen Neurone konnten lediglich kleine Bereiche der Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 festgestellt werden. Infolge der Feststellung, dass LIMK1-Proteinmengen in den Neuronen durch das Proteasom reguliert werden, wurde geprüft, ob die Inhibition des Proteasoms einen Einfluss auf die Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 in den Wachstumskegeln haben kann. In der Tat verursachte die Inhibition des Proteasoms eine starke Zunahme der Kolokalisation von RNF6 und LIMK1 in den

Wachstumskegeln. Diese Beobachtung führte zu der Schlussfolgerung, dass die Proteasom-Aktivität für das Expressionsmuster von LIMK1 und RNF6 in den Wachstumskegeln der unbehandelten Neurone mitverantwortlich ist. Entsprechende Beobachtungen zu den Kollokalisierungen der endogenen Proteine konnten auch mit den ektopisch exprimierten Fusionsproteinen GFP-RNF6 gemacht werden. Die Überexpression des dominant-negativen RING-Finger-deletierten GFP-RNF6 Δ RING führte in den Wachstumskegeln zu ähnlichen Effekten wie die Inhibition des Proteasoms. GFP-RNF6 Δ RING zeigte eine starke Kollokalisierung mit endogener LIMK1 und führte zum Anstieg der LIMK1-Proteinmengen. Letzteres lieferte damit einen deutlichen Hinweis auf die Funktion von RNF6 als Ubiquitin-Ligase beim proteasomalen Abbau der LIMK1. Die Deletion des RING-Fingers hat zur Folge, dass die Ubiquitin-Ligase zwar an das Substrat-Protein binden kann, die Fähigkeit zur Ubiquitinierung aber nicht mehr vorhanden ist. Die Überexpression eines solchen Proteins führt zur Verdrängung der endogenen Wild-Typ Ubiquitin-Ligase, wodurch der Abbau des Substrat-Proteins unterdrückt wird. Die Zunahme der LIMK1-Proteinmengen durch GFP-RNF6 Δ RING beruht auf solch einem Effekt und ist dadurch ein Zeichen dafür, dass RNF6 den proteasomalen Abbau der LIMK1-Proteine in den Wachstumskegeln vermittelt.

IV.5 RNF6 reguliert LIMK1-Proteinmengen in axonalen Wachstumskegeln während der Entwicklung der Axone

Dass es einen Zusammenhang zwischen Proteindegradation und der Dynamik axonaler Wachstumskegel geben kann, konnte schon in einer Studie mit isolierten Wachstumskegeln aus der *Xenopus*-Retina gezeigt werden (Campbell & Holt, 2001). In ihnen konnten E1-Enzym, Ubiquitin und Proteasome nachgewiesen werden. Entscheidend war die Beobachtung, dass eine Verdopplung der ubiquitinierten Proteinmengen stattfindet, wenn die Wachstumskegel mit Signalfaktoren behandelt wurden, die eine Richtungsänderung induzieren. Überdies führte die Inhibition des Proteasoms zu einer starken Beeinträchtigung der Reaktionsfähigkeit von retinalen Wachstumskegeln auf solche richtungweisenden Signalstoffe (Campbell & Holt, 2001, Mann *et al.*, 2003). Die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts in den Wachstumskegeln ist entscheidend für die ständigen Richtungswechsel der Axone und damit auch für deren Wachstum. Für diese Prozesse muss eine schnelle Polymerisierung und Depolymerisierung von Bestandteilen des Aktin-Zytoskeletts

gewährleistet sein. Axone wechseln die Richtung ihres Wachstums, wenn auf einer Seite des Wachstumskegels Signale eingehen, die die Polymersierung bzw. Depolymerisierung der Filamente des Aktin-Zytoskeletts beeinflussen. Es gibt Signale, die entweder direkt auf die Bestandteile des Aktin-Zytoskeletts wirken oder ihre Wirkung über die Aktivierung des Rho-/Rac-/Cdc42-Signalweges entfalten (Dickson, 2001). Dieser Signalweg führt zu einer Aktivierung von LIMK1 mittels Phosphorylierung durch die Kinasen ROCK oder PAK. Infolgedessen werden aktin-depolymerisierende Faktoren wie z.B. Cofilin gehemmt (Gungabisson & Bamberg, 2003; Foletta *et al.*, 2004). In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass LIMK1 auch eine Rolle bei der Depolymerisierung von Mikrotubuli spielen könnte (Gorovoy *et al.*, 2005). So scheint LIMK1 ein zentrales Element bei der Regulation der Wachstumskegel-Dynamik anhand der Reorganisation des Zytoskeletts zu sein. LIMK1 selber wird durch Phosphorylierung aktiviert und kann durch die Phosphatase *slingshot* (Ssh) wieder deaktiviert werden (Soosairajah *et al.*, 2005). Somit stellen Phosphorylierung und Dephosphorylierung Mechanismen zur Regulation der LIMK1-Aktivität dar. Die Ergebnisse dieser Dissertations-Arbeit weisen nun auf einen weiteren Mechanismus hin, der auf der RNF6-vermittelten Degradation von LIMK1-Proteinen beruht. Diese Regulation der LIMK1-Proteinmengen durch RNF6 spielt bei der Entwicklung neuronaler Axone eine wichtige Rolle, was in dieser Studie anhand von Primärkulturen hippocampaler Neurone gezeigt werden konnte.

Kultivierte hippocampale Neurone beginnen ca. 12 Std. nach Anheftung der Zellen an die Kulturschale mit der Bildung von so genannten Neuriten. Es handelt sich bei ihnen um primäre Auswüchse, die an ihren Enden einen Wachstumskegel aufweisen. Einer der Neuriten wird innerhalb der darauf folgenden 24 Std. durch beschleunigtes Wachstum zum Axon, während die übrigen Neuriten eines Neurons sich zu Dendriten entwickeln (siehe Einleitung Abb.II.9). Welches der Neuriten zum Axon wird, scheint durch Signale reguliert zu werden, die zur Erhöhung der Aktin-Zytoskelett-Dynamik eines Wachstumskegels führen. Am Ende dieses Prozesses, der auch als Polarisation des Neurons bezeichnet wird, ist ein Auswuchs entstanden, der das Axon darstellt. (Bradtke & Dotti, 1999; Andersen & Bi, 2000; Bradtke & Dotti, 2000; da Silva & Dotti, 2002; Dickson 2003; Govek *et al.*, 2005). Rosso und Kollegen konnten zeigen, dass LIMK1 ein wichtiger Faktor bei der Ausbildung der Axone von hippocampalen Neuronen ist (Rosso *et al.*, 2004). In Übereinstimmung damit konnte ich in meiner Studie zeigen, dass die Erhöhung der LIMK1-Proteinkonzentration entweder durch Überexpression von LIMK1 oder durch RNAi gegen RNF6 während der frühen Stadien 2 bis 3 (Abb.IV.1) zu einem stärkeren Auswachsen der Neuriten führt. Diese Auswüchse wiesen

einen axonalen Charakter auf, da sie für Tau, einem Marker-Protein für Axone (Binder *et al.*, 1985), positiv waren. Dagegen hatte die Verminderung der LIMK1-Proteinmengen mittels RNAi gegen LIMK1 oder durch die Überexpression von RNF6 eine Hemmung der Axon-Entwicklung zur Folge. Die funktionale Verbindung zwischen RNF6 und LIMK1 wurde mitunter dadurch deutlich, dass diese Effekte auf das Axon-Wachstum kompensiert werden konnten. So wirkte die Überexpression von RNF6 einer Erhöhung der LIMK1-Proteinmengen entgegen und die Stimulierung des Axon-Wachstums durch RNAi gegen RNF6 unterblieb, wenn gleichzeitig auch LIMK1-Proteinmengen durch RNAi vermindert wurden. In Analogie zu diesen Ergebnissen verursachte die Unterdrückung der RNF6-Aktivität durch Überexpression des dominant-negativen Fusionsproteins GFP-RNF6 Δ RING ebenfalls ein schnelleres Axon-Wachstum während der frühen Entwicklungsstadien. Aufgrund der Erkenntnisse, die aus den Untersuchungen der Kolo-kalisation von endogener LIMK1 mit GFP-RNF6 Δ RING in den Wachstumskegeln gewonnen wurden, kann dieser Effekt auf den Anstieg von LIMK1-Proteinmengen zurückgeführt werden.

Aus der Studie von Rosso und Kollegen ging hervor, dass die langfristige Überexpression von LIMK1 das Wachstum der Axone in den späteren Stadien der Entwicklung von kultivierten hippocampalen Neuronen hemmt. Dies führten Sie auf starke Zunahme von Aktin-Filamenten (F-Aktin) in den Wachstumskegeln zurück (Rosso *et al.*, 2004). Auch diese Beobachtungen konnten in meiner Studie bestätigt werden. So führte die Erhöhung der LIMK1-Proteinmengen entweder durch Überexpression von GFP-LIMK1 oder durch RNAi gegen RNF6 zur Stagnation des Axon-Wachstums, wenn die Neurone nach der Transfektion 48 h lang inkubiert wurden. Die immunzytochemische Analyse dieser Neuronen ergab, dass die Erhöhung der LIMK1-Proteinkonzentration zu erheblich vergrößerten Wachstumskegeln der Axone mit einer Häufigkeit von ca. 30% führt. Diese Vergrößerung wurde von einer starken Zunahme des F-Aktins in den Wachstumskegeln begleitet. In mobilen Wachstumskegeln kommt es aber in der Regel nicht zu einer Akkumulation von F-Aktin (Bradke & Dotti, 1999). Im Normalfall führt der Zyklus von Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Aktin-depolymerisierenden Faktoren ADF/Cofilin, die dadurch inaktiviert bzw. aktiviert werden, zu einer konstanten Rate von Aktin-Polymerisierung und -Depolymerisierung. Dieser Prozess, an dem LIMK1 und die Phosphatase *Slingshot* (Ssh) beteiligt sind, ist eine grundlegende Voraussetzung für die Mobilität der axonalen Wachstumskegel (Niwa *et al.*, 2002; Gungabisson & Bamberg, 2003; Soosairajah *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass Lamellopodien von kultivierten Maus-Fibroblasten schneller wachsen, wenn durch die Behandlung mit EGF (*epidermal growth*

factor) der Rho-/Rac-Signalweg aktiviert wird. Ursache dafür ist eine erhöhte Aktin-Dynamik, wobei aber der Grad der Phosphorylierung von ADF/Cofilin konstant bleibt. Vielmehr scheint eine Erhöhung der Rate, mit der die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ADF/Cofilin sich abwechseln, entscheidend für die erhöhte Dynamik zu sein. Dabei wird eine erhöhte Phosphorylierungsrate ausgeglichen, indem gleichzeitig die Phosphatase-Aktivität von Ssh erhöht wird (Merberg *et al.*, 1998; Gungabisson & Bamberg, 2003). Soosairajah und Kollegen konnten zeigen, dass die Zunahme von F-Aktin die Ssh-Aktivität stimuliert. Ssh kann dann sowohl LIM-Kinasen als auch ADF/Cofilin dephosphorylieren, wodurch die Depolymerisierung von F-Aktin induziert wird (Soosairajah *et al.*, 2005). In hippocampalen Neuronen ist anzunehmen, dass eine Erhöhung der LIMK1-Proteinmengen zum Zeitpunkt des Axon-Auswuchses die Umsatzrate der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ADF/Cofilin steigert. Das wiederum verleiht dem Aktin-Zytoskelett eine höhere Dynamik, wodurch der Wachstumskegel des noch jungen Axons eine schnellere Mobilität erlangt. Hohe Mengen an LIMK1-Proteinen scheinen aber zum späteren Zeitpunkt negativ auf die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts zu wirken, was anhand der F-Aktin-Anhäufung ersichtlich ist. Dies führt zu einer Stagnation bis hin zum Stillstand des Axon-Wachstums. Die Akkumulation von F-Aktin im Wachstumskegel könnte ihre Ursache in der Zunahme der Phosphorylierung von ADF/Cofilin haben, die höchstwahrscheinlich aus einer Verschiebung des Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung resultiert. Warum hohe LIMK1-Proteinmengen in den älteren hippocampalen Neuronen diese Verschiebung verursachen könnten, ist anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht erklärbar. Vermutlich reicht die Aktivität der Ssh-Phosphatase nicht aus, um über einen längeren Zeitraum für ein Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ADF/Cofilin zu sorgen, wenn gleichzeitig eine hohe Menge an LIMK1 vorhanden ist. Nicht auszuschließen ist hierbei auch die Möglichkeit, dass die Aktivität von Ssh in älteren Neuronen generell, trotz einer artifiziellen Zunahme von F-Aktin, aktiv runterreguliert wird.

Die Wachstums-Hemmung der Axone durch Langzeit-Überexpression von GFP-LIMK1 konnte durch Kotransfektion mit Myc-RNF6 aufgehoben werden. Eine gleichzeitige Erhöhung der RNF6-Proteinmenge scheint also die erhöhte Proteinkonzentration von LIMK1 auf ein Niveau herabzuregulieren, wodurch ein weitestgehend unbeeinträchtigtes Wachstum der Axone ermöglicht wird. Interessanterweise konnte auch beobachtet werden, dass der inhibitorische Effekt durch RNAi gegen LIMK1, der während des frühen Axon-Auswuchses noch deutlich zum Ausdruck kommen konnte, mit zunehmendem Alter der Neurone

schwächer wird. Dies war nicht auf eine Abnahme des RNAi-Effektes zurückführbar, wodurch LIMK1-Proteinmengen wieder steigen würden. Die Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte aus älteren Stadien der Primärkulturen, die mit siRNA transfiziert waren, hatte eine anhaltende signifikante Reduzierung der entsprechenden Proteinmengen ergeben. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung war, dass auch die Hemmung des Axon-Wachstums durch die Erhöhung der RNF6-Proteinmengen abnimmt, wenn die Neurone älter werden. Da die Expression von Myc-RNF6 in den älteren Stadien der Neurone noch deutlich nachgewiesen werden konnte, beruhte dieses Phänomen nicht auf einer reduzierten Expression des Fusionsproteins. Vielmehr muss angenommen werden, dass die in beiden Fällen verminderte Konzentration der LIMK1-Proteine in älteren Neuronen andere Auswirkungen haben. Die niedrigeren LIMK1-Proteinmengen scheinen dem Bedarf zu entsprechen, der für ein optimales Wachstum der Axone in den älteren Stadien benötigt wird. Die Annahme einer verminderten Ssh-Aktivität in den älteren Neuronen fügt sich in dieses Erklärungsmodell ohne weiteres ein, denn der geringere Bedarf an LIMK1-Proteinen in den älteren Neuronen würde zusammen mit einer verminderten Aktivität der Ssh-Phosphatase den Erhalt des Gleichgewichts zwischen phosphorylierten und dephosphorylierten Faktoren ADF/Cofilin gewährleisten. Dadurch könnte das Aktin-Zytoskelett der Wachstumskegel in einem dynamischen Zustand gehalten werden und ein fortwährendes Wachstum der Axone ermöglichen. Gleichzeitig könnten die inzwischen längeren Axone sensitiver und schneller auf schwache Signale reagieren. Lediglich kleine Veränderungen der Aktivität von LIMK1 oder Ssh wären nötig, um z.B. einen Richtungswechsel oder auch eine Arretierung des Wachstumskegels für die Bildung von Synapsen zu induzieren. Zukünftige Untersuchungen bezüglich der Phosphatase-Aktivität von Ssh und der Phosphorylierungs-Zustände von ADF/Cofilin vor dem Hintergrund veränderter LIMK1-Proteinmengen durch RNF6 oder durch RNAi sollten zeigen, ob dieses Erklärungsmodell zutreffen kann. Die Regulation der LIMK1-Proteinmengen durch RNF6 scheint beim Axon-Wachstum der Neurone insbesondere während des frühen Auswuchses essentiell zu sein. So scheint neben der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von LIMK1 auch der RNF6-vermittelte Abbau einen regulatorischen Mechanismus darzustellen, um eine optimale Dynamik des Aktin-Zytoskeletts von Wachstumskegeln für die Entwicklung der Axone zu garantieren. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse über die Funktion von RNF6 bei der Regulation der LIMK1-Proteinmengen wurde in Abbildung IV.1 ein Modell erstellt, das die bislang bekannten Regulations-Mechanismen der LIMK1-Aktivität zusammenfasst. Über Mechanismen zur Regulation der Ubiquitin-Ligase-Aktivität von RNF6 bezüglich des Abbaus von LIMK1 kann derzeit nur

spekuliert werden. Im Rahmen meiner Untersuchungen von RNF6 konnte ich durch das Hefe-2-Hybrid (*Yeast Two Hybrid*) Verfahren, deren Ergebnisse in dieser Arbeit aus Platzgründen nicht enthalten sind, potentielle neue Interaktoren identifizieren. Für das Aktin-bindende Protein Alpha-Aktinin2 wurden mehrere unterschiedliche Klone gefunden, die in der Hefe eine Interaktion mit RNF6 zeigen. Diese Interaktion konnte inzwischen durch biochemische

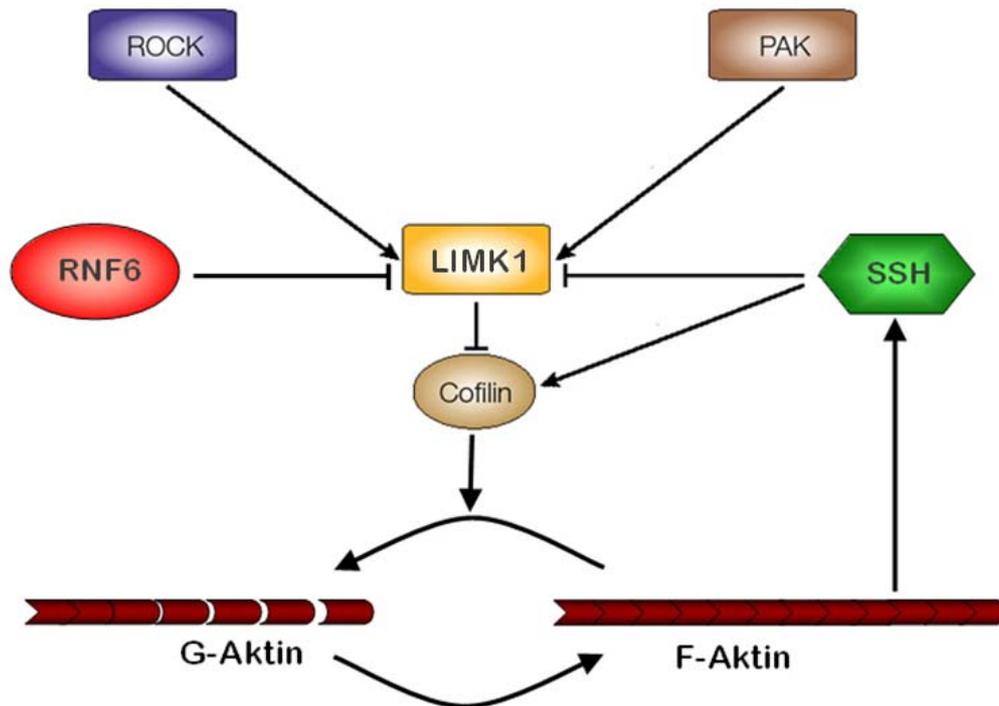


Abb.IV.1 Regulation von LIMK1. Die Kinasen ROCK und PAK sind Effektoren des Signalweges der kleinen GTPasen Rho und Rac. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren LIMK1, die dadurch ebenfalls aktiviert wird. Aktive LIMK1 phosphoryliert den aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin, wodurch dieser nicht mehr die Depolymerisierung von F-Aktin zu G-Aktin katalysieren kann. Eine Akkumulation von F-Aktin stimuliert die Phosphatase *Slingshot* (SSH), die dadurch LIMK1 und Cofilin dephosphoryliert und damit Cofilin reaktiviert. Neben der Regulation von LIMK1 durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung konnte in dieser Arbeit ein weiterer Mechanismus der LIMK1-Regulation gezeigt werden. Die Regulation der LIMK1-Proteinkonzentration durch die RING-Finger Ubiquitin-Ligase RNF6 stellt eine weitere Möglichkeit dar, um die Aktivität der LIMK1 zu regulieren.

Experimente bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen zur Ermittlung der Funktion dieser Interaktion von RNF6 mit Alpha-Aktinin2 werden derzeit in unserem Labor durchgeführt. Die Mitglieder der Alpha-Aktinin-Familie binden und vernetzen F-Aktin,

wodurch so genannte *stress fiber* entstehen (Byers & Fujiwara, 1982; Bretscher & Lynch, 1985; Pavalko & Burridge, 1991). Die Entstehung von *stress fiber* ist ein Zeichen für die Zunahme von F-Aktin und dadurch auch für die Verringerung der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts (Hasebe-Kishi & Shimada, 2000; Coghill *et al.*, 2003). So kann spekuliert werden, dass, ähnlich wie im Fall der Phosphatase *Slingshot* (Ssh), eine Akkumulation von F-Aktin auch die RNF6-Aktivität durch die lokale Zunahme von Alpha-Aktinin2 beeinflussen kann. Eine Verstärkung des Abbaus von LIMK1 durch RNF6 könnte dann zusammen mit der LIMK1-Deaktivierung durch Ssh der Anhäufung von F-Aktin entgegenwirken. Andererseits wäre auch denkbar, dass die Interaktion von RNF6 mit Alpha-Aktinin die Ubiquitin-Ligase-Aktivität hemmt, um das Aktin-Zytoskelett zu stabilisieren. Dies wäre zum Beispiel notwendig, wenn es zur Bildung der Synapsen kommt. Ob diese oder ähnliche Möglichkeiten einer Regulation von RNF6 bestehen, wird gegenwärtig in unserem Labor geprüft.

Es gibt Untersuchungen, aus deren Ergebnissen hervorgeht, dass die Regulation der LIMK1-Proteinmengen durch RNF6 eine generelle Funktion in verschiedenen Zellen haben kann. In unserem Labor konnte der Abbau von LIMK1 auch in Zelltypen wie HeLa, HEK293T und Cos7 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigten Transfektionen von HeLa-Zellen mit siRNA gegen RNF6 Effekte, die auf einen weiteren Zusammenhang von RNF6 und den LIM-Kinasen hinweisen. Es konnte unter anderem eine veränderte Adhäsionsfähigkeit der Zellen beobachtet werden, die durch Beeinträchtigung des Aktin-Zytoskeletts an den *focal adhesions* herrühren könnte (Daten nicht gezeigt). Die *focal adhesions* sind für die Zelladhäsion äußerst wichtig. Es konnte gezeigt werden, dass in Maus-Fibroblasten LIMK1 in solchen *focal adhesions* lokalisiert ist. Daher wird vermutet, dass LIMK1 zusammen mit anderen LIM-Domänen-Proteinen eine wichtige Rolle bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts an den *focal adhesions* spielt. (Toshima *et al.*, 2001; Foletta *et al.*, 2004). So könnte RNF6 durch den Abbau von LIM-Kinasen auch in den *focal adhesions* eine Funktion bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts haben.

IV.6 LIMK1 und RNF6 sind in menschliche Krankheiten involviert

Die Regulation von LIMK1 ist hinsichtlich verschiedener zellulärer Funktionen von großer Wichtigkeit. Eine überhöhte oder zu niedrige LIMK1-Aktivität kann schwerwiegende Folgen für die betroffenen Zellen haben. Die Deletion des LIMK1-Gens in Mausmutanten führte zu einer abnormen Morphologie der Dendritenfortsätze von Neuronen. Es handelt sich dabei um

Strukturen, die durch das Aktin-Zytoskelett stabilisiert werden, und auf denen es zur Bildung von Synapsen kommt. Diese LIMK1-Mausmutanten wiesen zudem eine erhöhte Langzeit-Potenzierung (LTP = *longterm potentiation*) auf, wodurch bestimmte Verschaltungen von Neuronen länger erhalten bleiben. Es wird vermutet, dass die Erhöhung des LTP auf einer veränderten synaptischen Plastizität beruht, da die Regulation des Aktin-Zytoskeletts in den Bereichen der Synapsen beeinträchtigt ist (Meng *et al.*, 2002; Hoogenraad *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen könnten eine Erklärung für die Ursache des Williams Syndroms liefern. Patienten mit dieser Krankheit leiden unter anderem an mentaler Retardation bzw. schweren neurokognitiven Defekten und dem daraus resultierendem abnormalen Sozialverhalten. Da alle Individuen mit dem Williams Syndrom hemizygot für LIMK1 sind, scheinen verringerte LIMK1-Proteinmengen nur eine ungenügende Regulation des Aktin-Zytoskeletts zu ermöglichen, wodurch es zu den beschriebenen Defekten kommen kann (Hoogenraad *et al.*, 2004; Meyer-Lindenberg *et al.*, 2005). Interessanterweise konnte in der elektronenmikroskopischen Abteilung unseres Hauses gezeigt werden, dass RNF6 verstärkt auch in den Synapsen von älteren hippocampalen Neuronen exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Zusammen mit den Erkenntnissen aus den LIMK1-Mausmutanten weist diese Beobachtung auf eine Regulation von LIMK1-Proteinmengen durch RNF6 auch in Dendriten und Synapsen hin.

LIMK1 scheint auch an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligt zu sein. Die Erhöhung der LIMK1-Proteinkonzentration durch die Überexpression von LIMK1 führte in Brust- oder Prostata-Krebszellen zu einem Anstieg der Invasivität dieser Zellen (Davila *et al.*, 2003; Yoshioka *et al.*, 2003). Der Grund dafür könnte ein Anstieg der Motilität der Krebszellen sein, wie es schon für T-Zellen durch die Erhöhung der LIMK1-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Nishata *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass RNF6 als ein mögliches Tumorsuppressor-Protein beschrieben wurde (Lo *et al.*, 2002). Lo und Kollegen konnten zeigen, dass RNF6 in Speiseröhren-Karzinomen (*esophageal squamous cell carcinoma*) häufig mutiert ist. Mutierte RNF6-Proteine könnten unter Umständen keine adäquate Regulation der LIMK1-Proteinmengen vermitteln. Da aber die meisten Krankheiten im Zusammenhang mit LIMK1 auf einer Alteration der Proteinmengen von LIMK1 beruhen, ist es möglich, dass eine fehlerhafte Ubiquitin-Ligase-Aktivität von RNF6 zu zellulären Defekten führen kann. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass noch andere E3-Enzyme an der Regulation von LIMK1-Proteinmengen beteiligt sind. Ein Beispiel für die Ubiquitinierung eines Substrates durch verschiedene E3-Enzyme ist β -catenin. Bei β -catenin handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der den Wnt-Signalweg

aktiviert und sowohl membran-gebunden als auch löslich im Zytoplasma und Nukleus vorkommt (Bienz & Clevers, 2000). Je nach Lokalisation wird er durch die Ubiquitin-Ligasen SCF^{βTrCp}, Ebi-E3 oder Hakai für den proteasomalen Abbau markiert (Liu *et al.*, 2001; Matsuzawa & Reed, 2001; Polakis, 2002; Wu *et al.*, 2003). Für LIMK1 könnte RLIM als eine alternative Ubiquitin-Ligase in Frage kommen, da LIMK1 partiell in den Nukleus lokalisieren kann und beide Proteine in den Koimmunpräzipitationen eine schwache Interaktion aufweisen. Es konnte auch eine *in vitro* Ubiquitinierung von LIMK1 durch RLIM nachgewiesen werden, die physiologische Relevanz dieser Reaktion ist aber bislang ungeklärt, da RLIM in Säugetierzellen keinen signifikanten Abbau von LIMK1 vermitteln kann (Schlüter, 2004). Ob neben RNF6 noch weitere E3-Enzyme den proteasomalen Abbau von LIMK1 vermitteln können, ist somit derzeit ungeklärt.

Ein verbessertes Verständnis der Mechanismen zur Regulation der Aktivitäten von LIM-Kinasen und RNF6 sowie der regulatorischen Prozesse, in die beide sowohl gemeinsam als auch unabhängig voneinander involviert sind, könnte zur Klärung der Entstehung von gewissen menschlichen Krankheiten und bestimmten Tumor-Arten einen wichtigen Beitrag leisten. Die gewonnen Erkenntnisse könnten für die Entwicklung von Therapien und Behandlungsmöglichkeiten in Bezug auf die entsprechenden Krankheiten eine wichtige Grundlage darstellen.

IV.7 Ubiquitin-Ligasen können verschiedene Substrat-Proteine ubiquitinieren

Ubiquitin-Ligasen können in der Regel verschiedene Proteine als Substrate ubiquitinieren (Bach & Ostendorff, 2003). RLIM kann neben den CLIM-Proteinen auch HDAC2 und LMO-Proteine ubiquitinieren (Ostendorff *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 2003; Hiratani *et al.*, 2003). Für RNF6 konnten bislang nur LIM-Kinasen als Substrat-Proteine identifiziert werden, die für den proteasomalen Abbau durch Ubiquitinierung markiert werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass auch RNF6 in der Lage ist, weitere Proteine zu ubiquitinieren. Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems (*yeast-two-hybrid*) konnten im Rahmen meiner Untersuchungen von RNF6 neue potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Diese und weitere Kandidaten werden zur Zeit in unserem Labor hinsichtlich einer möglichen Eigenschaft als neues Substrat-Protein für RNF6 geprüft. Zudem ist es nicht ausgeschlossen, dass RLIM und RNF6 entweder als Heterodimer oder durch eine konzertierte Aktivität bislang noch unbekannte Substrate ubiquitinieren können. Dies wäre möglich, da beide Proteine, wenn auch partiell,

sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert sein können und eine Interaktion beider Proteine in unserem Labor gezeigt werden konnte (Schlüter, 2004; Peters, 2004). Ein Beispiel für solche Zusammenspiele sind unter anderem die beiden RING-Finger Proteine BARD1 und BRCA1, die im engen Zusammenhang mit der Entstehung von Brustkrebs stehen (Miki *et al.*, 1994). Sie bilden einen Heterodimer, wodurch BRCA1 in den Nukleus lokalisieren kann und gleichzeitig die E3-Aktivität von BRCA1 verändert wird (Hashizume *et al.*, 2001; Ruffner *et al.*, 2001; Fabro *et al.*, 2002). In anderen Fällen kann erst die konzertierte Aktivität zweier Ubiquitin-Ligasen zu der Polyubiquitinierung eines Substrat-Proteins führen. Bei diesem Phänomen ist meist eines der beiden Enzyme für die Verlängerung der Ubiquitin-Kette verantwortlich und wird mitunter auch als E4-Enzym bezeichnet (Koegl *et al.*, 1999; Hoppe, 2005). Zukünftige Untersuchungen der beiden Ubiquitin-Ligasen RNF6 und RLIM könnten zeigen, ob hier ähnliche Mechanismen vorliegen. Zudem würden neu identifizierte Substrat-Proteine auf noch unbekannte Zusammenhänge zwischen RNF6 bzw. RLIM und andern zellulären Prozessen hinweisen.

Es kann zusammengefasst werden, dass die beiden verwandten RING-Finger Ubiquitin-Ligasen RNF6 und RLIM die zellulären Konzentrationen von Schlüsselproteinen wie LIM-Kinasen, CLIM-Proteinen, HDACs und LMO-Proteinen regulieren können (Ostendorff *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 2003; Hiratani *et al.*, 2003). Sowohl beide Ubiquitin-Ligasen als auch ihre Substrat-Proteine sind unter anderem in pathologische Prozesse wie embryonale Fehlentwicklungen, Metastasen und Invasion von Krebszellen involviert (Scanlan *et al.*, 1999; Lo *et al.*, 2002; Rabbits *et al.*, 1999; Visvader *et al.*, 2001; Yoshioka *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Da die meisten dieser Proteine auch eine wichtige Funktion für die neuronale Entwicklung haben (Becker *et al.*, 2002; Thaler *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2002, 2003), scheinen RNF6 und RLIM in zwei wesentlichen biologischen Prozessen eine zentrale Rolle zu spielen: Zum einen bei der Entwicklung bestimmter neuronaler Strukturen während der Embryogenese von Wirbeltieren und zum anderen in der Onkogenese.

V.1.2 Transfektionen von siRNA gegen LIMK1 und RNF6 sowie von GFP-LIMK1 und Myc-RNF6; Messung der Axonlängen nach 12 h

| 12h | GFP | | | GFP | | | GFP-LIMK1 | | | Myc-RNF6 | | |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|----------|--------|--------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| 1 | 19,01 | 19,88 | 21,55 | 8,91 | 12,68 | 13,13 | 10,93 | 18,73 | 29,27 | 13,94 | 17,32 | 23,14 |
| 2 | 21,89 | 23,36 | 24,30 | 13,25 | 14,37 | 14,59 | 31,12 | 31,32 | 37,09 | 24,09 | 27,46 | 29,69 |
| 3 | 26,06 | 26,25 | 27,23 | 16,20 | 17,37 | 17,50 | 37,50 | 38,78 | 40,00 | 29,70 | 31,36 | 33,88 |
| 4 | 27,50 | 28,68 | 28,68 | 18,11 | 18,15 | 18,33 | 42,30 | 43,41 | 44,44 | 37,81 | 39,40 | 41,38 |
| 5 | 29,56 | 29,70 | 30,63 | 18,55 | 19,12 | 19,12 | 47,56 | 46,02 | 48,00 | 41,94 | 43,11 | 43,17 |
| 6 | 30,81 | 31,71 | 31,73 | 19,71 | 20,42 | 20,54 | 48,45 | 47,38 | 48,40 | 44,35 | 51,37 | 51,64 |
| 7 | 32,31 | 32,50 | 34,34 | 21,14 | 21,15 | 21,46 | 51,28 | 48,85 | 50,14 | 53,29 | 53,43 | 53,85 |
| 8 | 34,64 | 34,86 | 34,95 | 21,54 | 21,67 | 21,90 | 51,60 | 51,85 | 51,90 | 55,28 | 55,53 | 58,46 |
| 9 | 36,62 | 36,97 | 38,18 | 22,26 | 22,74 | 22,89 | 52,75 | 51,89 | 53,77 | 58,68 | 58,96 | 59,20 |
| 10 | 38,45 | 38,71 | 38,96 | 22,97 | 23,09 | 23,24 | 54,78 | 56,83 | 57,04 | 59,67 | 60,55 | 60,56 |
| 11 | 39,00 | 40,71 | 41,30 | 23,24 | 23,30 | 23,57 | 58,03 | 57,15 | 58,24 | 60,98 | 61,33 | 61,35 |
| 12 | 41,47 | 41,51 | 41,68 | 23,57 | 23,80 | 24,42 | 58,38 | 58,47 | 58,57 | 62,24 | 62,54 | 62,64 |
| 13 | 42,10 | 43,29 | 43,94 | 24,65 | 24,86 | 25,45 | 60,40 | 59,57 | 60,00 | 63,43 | 63,68 | 63,85 |
| 14 | 44,12 | 44,44 | 45,00 | 25,63 | 25,81 | 25,47 | 61,15 | 61,79 | 63,16 | 64,35 | 64,75 | 64,92 |
| 15 | 45,41 | 45,85 | 46,48 | 25,97 | 26,00 | 25,90 | 64,15 | 62,22 | 64,57 | 65,01 | 65,88 | 66,30 |
| 16 | 46,67 | 49,68 | 50,92 | 26,67 | 26,68 | 26,67 | 68,43 | 67,89 | 67,97 | 66,34 | 66,94 | 67,01 |
| 17 | 51,11 | 51,43 | 52,05 | 27,16 | 27,54 | 27,14 | 69,05 | 68,85 | 70,17 | 68,00 | 68,41 | 68,05 |
| 18 | 52,06 | 53,92 | 54,19 | 27,53 | 27,79 | 27,65 | 70,82 | 69,71 | 70,21 | 69,11 | 69,19 | 68,87 |
| 19 | 54,49 | 54,74 | 55,16 | 27,67 | 29,23 | 28,06 | 71,50 | 70,91 | 71,23 | 69,46 | 70,49 | 69,22 |
| 20 | 55,56 | 55,94 | 56,13 | 28,86 | 29,63 | 29,29 | 73,60 | 72,51 | 72,80 | 71,86 | 72,31 | 70,83 |
| 21 | 56,47 | 56,67 | 57,18 | 29,41 | 30,57 | 30,00 | 74,45 | 73,76 | 73,78 | 73,11 | 74,52 | 72,63 |
| 22 | 57,50 | 58,53 | 58,80 | 30,27 | 31,15 | 30,99 | 76,49 | 74,47 | 74,67 | 77,38 | 78,48 | 75,24 |
| 23 | 60,68 | 61,11 | 63,00 | 31,11 | 33,58 | 32,33 | 77,08 | 77,20 | 77,76 | 81,15 | 82,80 | 79,11 |
| 24 | 64,29 | 64,85 | 66,21 | 33,12 | 34,29 | 32,48 | 79,02 | 80,29 | 81,31 | 85,07 | 87,30 | 84,26 |
| 25 | 68,48 | 68,53 | 72,00 | 34,07 | 34,71 | 33,95 | 81,32 | 81,72 | 82,67 | 92,39 | 89,30 | 89,02 |
| 26 | 72,68 | 73,39 | 74,64 | 34,71 | 36,33 | 34,70 | 82,31 | 82,40 | 83,46 | 94,72 | 89,64 | 90,37 |
| 27 | 80,66 | 82,86 | 77,78 | 36,13 | 36,67 | 35,33 | 83,89 | 85,18 | 85,60 | 120,95 | 91,30 | 93,20 |
| 28 | 87,04 | 90,00 | 85,56 | 36,77 | 37,04 | 35,95 | 84,44 | 85,67 | 87,39 | 129,95 | 95,44 | 96,32 |
| 29 | 96,86 | 97,06 | 95,65 | 37,42 | 37,65 | 36,49 | 86,10 | 87,00 | 88,16 | 156,27 | 98,60 | 116,21 |
| 30 | 103,5 | 104,5 | 102,60 | 38,12 | 38,33 | 37,29 | 89,56 | 93,18 | 95,04 | 162,33 | 109,17 | 131,09 |
| 31 | 107,0 | 115,6 | 105,32 | 39,20 | 38,81 | 37,78 | 95,40 | 97,29 | 98,24 | | | |
| 32 | 122,5 | 122,6 | 121,91 | 40,74 | 39,29 | 38,38 | 98,40 | 99,72 | 99,93 | | | |
| 33 | 127,1 | 128,5 | 125,22 | 42,86 | 41,30 | 39,00 | 100,10 | 103,00 | 104,33 | | | |
| 34 | 135,6 | 136,7 | 134,86 | 43,24 | 43,09 | 39,02 | 103,02 | 109,08 | 110,94 | | | |
| 35 | 170,3 | 190,0 | 154,53 | 44,64 | 43,77 | 40,51 | 107,25 | 117,00 | 118,13 | | | |
| 36 | 203,2 | | 191,30 | 45,69 | 44,71 | 42,00 | 113,57 | 120,34 | 123,22 | | | |
| 37 | | | | 48,45 | 46,02 | 43,18 | 119,35 | 122,67 | 125,22 | | | |
| 38 | | | | 51,28 | 48,85 | 44,14 | 124,00 | 125,36 | 127,16 | | | |
| 39 | | | | 54,78 | 51,85 | 45,65 | 127,16 | 126,90 | 134,12 | | | |
| 40 | | | | 58,03 | 56,83 | 48,00 | 129,23 | 128,30 | 134,86 | | | |
| 41 | | | | 61,15 | 59,57 | 50,14 | 135,68 | 131,34 | 135,06 | | | |
| 42 | | | | 69,05 | 62,22 | 50,63 | 139,63 | 136,32 | 149,23 | | | |
| 43 | | | | 77,08 | 69,71 | 55,77 | 134,22 | 146,41 | 134,53 | | | |
| 44 | | | | 84,44 | 81,72 | 57,04 | 166,12 | | 164,32 | | | |
| 45 | | | | 103,02 | 85,67 | 60,00 | 170,34 | | 190,00 | | | |
| 46 | | | | | 126,90 | 64,57 | 203,28 | | 191,30 | | | |
| 47 | | | | | | 70,21 | | | | | | |
| 48 | | | | | | 83,46 | | | | | | |
| 49 | | | | | | 83,32 | | | | | | |
| 50 | | | | | | 87,39 | | | | | | |
| 51 | | | | | | 135,06 | | | | | | |

| 12h | Kontroll-siRNA ^{RNF6} | | | RNF6-siRNA | | | LIMK1-siRNAi | | | RNF6-siRNAi | | |
|-----|--------------------------------|--------|--------|------------|--------|--------|--------------|--------|--------|-------------|--------|--------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| 1 | 13,10 | 18,59 | 19,87 | 19,12 | 19,90 | 21,89 | 10,23 | 11,03 | 11,95 | 9,85 | 14,13 | 15,76 |
| 2 | 20,74 | 23,61 | 25,09 | 25,17 | 26,10 | 28,40 | 12,37 | 14,71 | 14,90 | 15,76 | 16,21 | 17,94 |
| 3 | 25,67 | 26,67 | 27,40 | 31,46 | 31,46 | 32,80 | 15,29 | 15,87 | 15,88 | 19,07 | 19,51 | 20,27 |
| 4 | 27,65 | 28,24 | 28,65 | 33,33 | 33,81 | 35,95 | 16,25 | 16,31 | 16,77 | 20,82 | 20,98 | 21,46 |
| 5 | 29,09 | 29,62 | 29,89 | 38,11 | 41,29 | 41,45 | 16,83 | 17,70 | 18,17 | 21,92 | 22,71 | 23,08 |
| 6 | 30,13 | 30,37 | 30,51 | 41,75 | 43,68 | 44,04 | 18,46 | 18,78 | 19,00 | 23,12 | 23,12 | 23,19 |
| 7 | 30,56 | 30,77 | 30,98 | 45,00 | 45,66 | 50,00 | 19,08 | 19,17 | 19,38 | 23,22 | 23,38 | 23,55 |
| 8 | 31,71 | 32,42 | 32,92 | 52,09 | 54,05 | 55,44 | 19,40 | 19,52 | 19,54 | 24,10 | 24,64 | 24,80 |
| 9 | 32,63 | 32,80 | 33,33 | 55,56 | 55,68 | 55,74 | 20,00 | 20,59 | 20,81 | 25,33 | 25,49 | 25,54 |
| 10 | 33,54 | 33,61 | 33,96 | 56,39 | 56,46 | 57,08 | 21,23 | 21,28 | 21,60 | 25,81 | 26,66 | 26,89 |
| 11 | 35,08 | 35,38 | 35,95 | 58,11 | 59,33 | 59,75 | 21,67 | 21,86 | 22,08 | 27,36 | 28,04 | 28,13 |
| 12 | 36,00 | 37,01 | 37,38 | 59,76 | 60,75 | 60,95 | 22,67 | 23,40 | 23,61 | 28,41 | 29,39 | 29,72 |
| 13 | 39,10 | 39,33 | 39,67 | 61,28 | 61,45 | 62,81 | 24,30 | 24,44 | 24,81 | 29,89 | 29,98 | 30,15 |
| 14 | 39,73 | 40,87 | 40,87 | 62,86 | 62,92 | 63,18 | 25,40 | 25,83 | 26,67 | 31,06 | 31,37 | 31,54 |
| 15 | 41,27 | 41,50 | 41,95 | 64,68 | 65,94 | 66,38 | 26,88 | 27,78 | 28,37 | 31,77 | 31,88 | 31,99 |
| 16 | 42,09 | 42,17 | 42,61 | 69,89 | 69,59 | 71,00 | 28,71 | 29,19 | 29,51 | 32,38 | 32,49 | 32,62 |
| 17 | 42,98 | 43,00 | 43,04 | 70,00 | 70,53 | 73,77 | 29,64 | 30,00 | 30,14 | 32,68 | 32,71 | 33,39 |
| 18 | 43,94 | 44,75 | 44,92 | 71,11 | 72,50 | 77,48 | 30,15 | 30,33 | 30,83 | 34,01 | 34,14 | 35,47 |
| 19 | 45,37 | 45,60 | 46,09 | 71,98 | 78,21 | 80,00 | 30,96 | 31,11 | 31,16 | 35,93 | 36,21 | 36,73 |
| 20 | 47,27 | 47,83 | 48,33 | 77,50 | 79,44 | 81,98 | 31,38 | 31,50 | 31,75 | 37,28 | 37,91 | 38,00 |
| 21 | 49,05 | 49,74 | 49,89 | 80,26 | 79,74 | 84,40 | 32,08 | 32,43 | 32,54 | 38,37 | 39,14 | 39,75 |
| 22 | 50,00 | 50,49 | 51,50 | 81,55 | 83,96 | 89,06 | 32,78 | 33,26 | 33,85 | 40,69 | 40,85 | 41,53 |
| 23 | 52,31 | 52,73 | 53,75 | 84,05 | 86,42 | 89,39 | 34,30 | 34,34 | 34,38 | 42,56 | 42,99 | 43,32 |
| 24 | 53,91 | 55,17 | 56,00 | 84,67 | 89,65 | 90,27 | 35,00 | 35,06 | 35,15 | 43,43 | 44,63 | 45,03 |
| 25 | 56,37 | 57,00 | 58,73 | 87,65 | 92,22 | 93,87 | 35,47 | 36,27 | 36,31 | 45,81 | 45,85 | 45,96 |
| 26 | 60,33 | 60,42 | 60,48 | 88,91 | 96,92 | 94,38 | 36,43 | 36,46 | 36,52 | 46,03 | 46,31 | 47,85 |
| 27 | 60,37 | 60,74 | 60,95 | 89,12 | 96,25 | 94,45 | 36,62 | 36,67 | 38,02 | 48,36 | 49,75 | 50,57 |
| 28 | 61,30 | 61,41 | 62,42 | 89,33 | 98,49 | 96,47 | 38,12 | 38,14 | 38,35 | 51,33 | 51,73 | 51,83 |
| 29 | 62,73 | 62,22 | 63,64 | 90,70 | 100,56 | 98,54 | 38,63 | 38,77 | 39,14 | 51,87 | 51,95 | 52,33 |
| 30 | 63,45 | 63,20 | 67,54 | 90,88 | 102,45 | 102,64 | 39,19 | 39,60 | 40,00 | 52,36 | 52,38 | 52,38 |
| 31 | 66,00 | 66,55 | 68,35 | 91,94 | 107,10 | 103,00 | 42,03 | 42,54 | 42,59 | 53,45 | 54,47 | 56,78 |
| 32 | 68,07 | 68,20 | 69,06 | 96,34 | 109,69 | 108,29 | 42,89 | 43,04 | 43,55 | 56,93 | 57,05 | 57,13 |
| 33 | 68,85 | 68,92 | 71,33 | 96,77 | 110,56 | 109,82 | 43,95 | 44,15 | 43,71 | 59,53 | 59,79 | 60,57 |
| 34 | 70,33 | 72,50 | 72,80 | 99,06 | 112,60 | 110,73 | 45,71 | 46,21 | 46,89 | 61,51 | 63,63 | 63,79 |
| 35 | 71,67 | 74,91 | 75,16 | 105,49 | 121,66 | 118,33 | 47,80 | 48,45 | 48,80 | 63,87 | 66,01 | 66,88 |
| 36 | 74,71 | 79,44 | 79,70 | 109,43 | 123,10 | 140,00 | 48,84 | 49,14 | 49,62 | 67,68 | 68,82 | 68,98 |
| 37 | 74,91 | 81,41 | 83,73 | 110,42 | 126,74 | 143,46 | 50,00 | 50,16 | 50,88 | 69,27 | 69,84 | 71,01 |
| 38 | 77,93 | 84,04 | 86,86 | 112,28 | 142,00 | 144,00 | 51,49 | 51,76 | 52,38 | 71,83 | 71,95 | 72,20 |
| 39 | 80,94 | 90,40 | 90,55 | 122,86 | 145,20 | 147,06 | 54,03 | 55,00 | 56,52 | 73,99 | 74,42 | 76,16 |
| 40 | 83,93 | 90,77 | 91,14 | 140,92 | 152,00 | 155,88 | 56,62 | 58,39 | 60,00 | 76,58 | 82,85 | 84,74 |
| 41 | 89,06 | 93,33 | 93,44 | 144,84 | 167,08 | 174,24 | 60,39 | 61,11 | 61,27 | 86,13 | 86,21 | 89,84 |
| 42 | 90,73 | 95,00 | 97,36 | 147,53 | 184,24 | 184,81 | 61,94 | 63,38 | 63,48 | 92,07 | 97,45 | 98,91 |
| 43 | 91,62 | 100,21 | 100,76 | 165,25 | 186,46 | 196,00 | 63,85 | 64,13 | 65,48 | 106,99 | 109,21 | 114,09 |
| 44 | 94,35 | 109,02 | 110,24 | 166,46 | 188,68 | 235,40 | 65,30 | | | | | |

V.1.3 Transfektionen von siRNA gegen LIMK1 und RNF6 sowie von GFP-LIMK1 und Myc-RNF6; Messung der Axonlängen nach 24 h

| 24h | GFP | | | GFP | | | GFP-LIMK1 | | | Myc-RNF6 | | |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|----------|--------|--------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| 1 | 20.85 | 21.73 | 22.27 | 12.68 | 14.37 | 14.59 | 13.94 | 27.52 | 24.09 | 15.61 | 24.40 | 25.93 |
| 2 | 22.95 | 24.50 | 24.65 | 16.20 | 17.37 | 17.50 | 29.69 | 39.40 | 33.98 | 26.26 | 27.22 | 28.89 |
| 3 | 25.85 | 29.62 | 32.16 | 18.11 | 18.15 | 18.55 | 39.70 | 41.94 | 41.98 | 30.91 | 31.25 | 33.33 |
| 4 | 32.62 | 33.00 | 34.81 | 18.91 | 19.12 | 19.12 | 55.53 | 59.67 | 58.46 | 31.64 | 35.25 | 35.25 |
| 5 | 35.64 | 36.36 | 36.40 | 19.71 | 20.42 | 20.54 | 60.98 | 61.35 | 61.33 | 33.47 | 35.45 | 37.05 |
| 6 | 41.01 | 38.91 | 39.29 | 21.14 | 21.15 | 21.54 | 62.24 | 63.68 | 63.29 | 36.18 | 37.03 | 43.00 |
| 7 | 43.56 | 42.38 | 43.38 | 21.67 | 22.26 | 22.74 | 63.68 | 65.01 | 64.92 | 39.63 | 40.33 | 43.96 |
| 8 | 48.38 | 30.32 | 46.37 | 22.89 | 22.97 | 23.09 | 66.54 | 67.00 | 66.54 | 43.24 | 41.78 | 48.65 |
| 9 | 50.86 | 51.09 | 50.38 | 23.24 | 23.24 | 23.30 | 68.00 | 69.11 | 68.87 | 47.63 | 43.25 | 51.49 |
| 10 | 51.85 | 52.21 | 51.48 | 23.57 | 23.79 | 24.42 | 69.11 | 77.38 | 69.19 | 48.73 | 48.53 | 56.58 |
| 11 | 52.89 | 53.67 | 52.39 | 24.65 | 24.86 | 25.45 | 78.41 | 78.96 | 78.48 | 52.63 | 50.33 | 57.38 |
| 12 | 54.34 | 54.88 | 53.73 | 25.63 | 25.81 | 25.97 | 80.83 | 87.30 | 85.07 | 57.03 | 53.45 | 59.58 |
| 13 | 58.80 | 60.00 | 57.83 | 26.00 | 26.67 | 27.14 | 91.15 | 92.39 | 91.30 | 59.02 | 57.14 | 61.46 |
| 14 | 61.79 | 63.91 | 60.33 | 27.53 | 27.65 | 27.67 | 93.20 | 93.85 | 93.85 | 60.43 | 59.09 | 64.33 |
| 15 | 67.20 | 67.47 | 64.43 | 27.79 | 28.06 | 28.86 | 94.72 | 95.28 | 94.72 | 61.48 | 60.67 | 66.91 |
| 16 | 71.00 | 72.59 | 67.83 | 29.23 | 29.29 | 29.41 | 99.60 | 99.64 | 99.64 | 64.80 | 62.06 | 69.38 |
| 17 | 75.28 | 75.89 | 73.36 | 29.63 | 30.00 | 30.27 | 109.17 | 113.94 | 109.30 | 67.76 | 65.85 | 70.98 |
| 18 | 78.00 | 81.24 | 76.70 | 30.57 | 30.99 | 31.11 | 114.35 | 119.22 | 116.21 | 72.50 | 68.67 | 71.38 |
| 19 | 79.85 | 83.39 | 82.79 | 32.33 | 33.12 | 33.95 | 127.46 | 131.64 | 131.09 | 75.77 | 74.63 | 79.20 |
| 20 | 83.00 | 86.13 | 84.00 | 34.71 | 34.07 | 34.70 | 137.81 | 149.20 | 139.02 | 78.43 | 81.07 | 82.00 |
| 21 | 85.62 | 88.59 | 87.04 | 36.33 | 34.29 | 36.13 | 151.27 | 154.75 | 152.31 | 79.50 | 83.41 | 82.26 |
| 22 | 87.33 | 90.41 | 89.28 | 37.04 | 35.95 | 36.77 | 160.00 | 161.33 | 160.36 | 83.28 | 97.50 | 93.41 |
| 23 | 90.40 | 93.96 | 90.39 | 37.65 | 36.49 | 37.42 | 162.33 | 162.54 | 162.33 | 86.94 | 101.94 | 98.44 |
| 24 | 90.92 | 97.60 | 94.62 | 38.33 | 37.29 | 38.12 | 162.64 | 173.11 | 170.95 | 98.44 | 103.24 | 105.97 |
| 25 | 96.67 | 102.32 | 98.30 | 39.02 | 37.78 | 38.81 | 173.11 | 184.26 | 182.80 | 107.57 | 112.96 | 113.00 |
| 26 | 98.72 | 107.92 | 102.55 | 41.30 | 38.38 | 40.74 | 190.37 | 193.44 | 193.44 | 117.11 | 117.45 | 120.00 |
| 27 | 102.71 | 119.93 | 108.39 | 43.18 | 39.20 | 42.86 | 195.24 | 196.52 | 195.88 | 128.52 | 133.10 | 127.52 |
| 28 | 122.35 | 125.67 | 114.41 | 45.65 | 42.00 | 44.14 | 201.86 | 201.86 | 226.30 | 138.43 | 145.10 | 133.52 |
| 29 | 132.30 | 131.45 | 121.78 | 53.77 | 43.24 | 46.02 | 217.01 | 209.20 | 290.49 | 153.60 | 165.20 | 152.68 |
| 30 | 136.84 | 138.59 | 127.61 | 58.03 | 45.69 | 48.00 | 284.52 | 243.17 | | 167.61 | 169.17 | 167.08 |
| 31 | 144.23 | 145.26 | 141.79 | 60.00 | 48.45 | 51.85 | 311.84 | 306.67 | | 207.69 | 172.16 | 182.80 |
| 32 | 170.67 | 138.38 | 150.45 | 64.57 | 54.78 | 57.04 | | 349.88 | | | 211.63 | |
| 33 | 178.35 | 177.33 | 177.66 | 69.71 | 59.29 | 59.57 | | 472.00 | | | 280.00 | |
| 34 | 210.20 | 189.09 | | 73.09 | 61.15 | 63.77 | | | | | | |
| 35 | | 227.11 | | 81.72 | 64.71 | 69.05 | | | | | | |
| 36 | | | | 84.71 | 70.21 | 70.51 | | | | | | |
| 37 | | | | 101.28 | 73.25 | 77.08 | | | | | | |
| 38 | | | | 121.90 | 83.46 | 84.44 | | | | | | |
| 39 | | | | 127.54 | 83.67 | 87.39 | | | | | | |
| 40 | | | | 130.14 | 88.23 | 94.64 | | | | | | |
| 41 | | | | | 91.15 | 113.13 | | | | | | |
| 42 | | | | | 103.02 | 126.90 | | | | | | |
| 43 | | | | | 126.67 | | | | | | | |
| 44 | | | | | 135.06 | | | | | | | |
| 45 | | | | | 162.22 | | | | | | | |
| 46 | | | | | 148.85 | | | | | | | |

| 24h | Kontroll-siRNA ^{RNF6} | | | RNF6-siRNA ^{RNF6} | | | LIMK1-siRNA ^{LIMK1} | | | RNF6-siRNA ^{LIMK1} | | |
|-----|--------------------------------|--------|--------|----------------------------|--------|--------|------------------------------|--------|--------|-----------------------------|--------|--------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| 1 | 11.25 | 14.24 | 16.43 | 17.29 | 20.00 | 22.64 | 12.36 | 13.67 | 13.77 | 15.66 | 18.75 | 20.51 |
| 2 | 17.05 | 17.14 | 18.51 | 24.41 | 30.43 | 33.67 | 13.47 | 16.46 | 17.77 | 23.29 | 32.07 | 24.08 |
| 3 | 18.65 | 18.98 | 21.18 | 33.68 | 34.84 | 37.33 | 16.37 | 18.22 | 20.33 | 25.01 | 33.20 | 33.60 |
| 4 | 21.26 | 21.54 | 23.00 | 39.75 | 41.48 | 43.48 | 17.90 | 20.68 | 21.02 | 34.15 | 37.18 | 35.26 |
| 5 | 22.65 | 22.74 | 29.15 | 44.19 | 47.00 | 47.22 | 20.41 | 21.74 | 21.83 | 36.84 | 40.23 | 37.17 |
| 6 | 24.00 | 29.00 | 31.43 | 51.61 | 51.67 | 56.10 | 21.43 | 22.08 | 23.04 | 41.34 | 44.00 | 38.92 |
| 7 | 29.89 | 30.55 | 32.32 | 52.92 | 55.17 | 62.07 | 21.98 | 27.99 | 28.69 | 43.41 | 47.20 | 39.65 |
| 8 | 31.06 | 31.11 | 33.37 | 58.42 | 65.22 | 70.43 | 24.96 | 29.80 | 29.82 | 45.89 | 48.89 | 41.41 |
| 9 | 32.00 | 32.06 | 34.62 | 68.33 | 70.43 | 74.29 | 29.32 | 30.17 | 30.72 | 49.54 | 51.54 | 42.80 |
| 10 | 32.91 | 33.49 | 36.44 | 75.48 | 73.26 | 77.89 | 29.87 | 31.03 | 31.59 | 51.91 | 51.78 | 43.75 |
| 11 | 33.62 | 33.80 | 37.65 | 80.75 | 76.90 | 80.75 | 30.78 | 32.23 | 32.28 | 54.69 | 53.22 | 44.79 |
| 12 | 35.38 | 36.06 | 38.22 | 85.50 | 78.99 | 83.02 | 32.15 | 32.54 | 33.23 | 55.79 | 54.23 | 47.27 |
| 13 | 36.57 | 36.90 | 40.00 | 88.30 | 82.33 | 88.57 | 32.45 | 34.61 | 34.98 | 56.12 | 56.00 | 49.65 |
| 14 | 38.10 | 38.13 | 41.71 | 91.50 | 84.05 | 89.39 | 33.97 | 35.42 | 36.14 | 57.63 | 56.57 | 50.10 |
| 15 | 38.91 | 38.83 | 42.33 | 92.78 | 85.45 | 95.48 | 35.11 | 36.60 | 36.69 | 57.88 | 58.00 | 51.57 |
| 16 | 40.62 | 39.47 | 42.97 | 95.70 | 88.37 | 96.12 | 36.37 | 37.28 | 37.32 | 58.18 | 59.17 | 51.73 |
| 17 | 41.89 | 40.71 | 44.44 | 97.24 | 88.89 | 100.56 | 36.84 | 37.89 | 38.40 | 58.88 | 59.55 | 54.51 |
| 18 | 44.19 | 42.91 | 46.04 | 101.90 | 91.85 | 104.10 | 37.35 | 39.09 | 40.05 | 59.53 | 60.50 | 55.31 |
| 19 | 45.54 | 44.24 | 47.19 | 106.10 | 93.96 | 106.92 | 38.99 | 41.25 | 41.37 | 59.67 | 60.88 | 56.06 |
| 20 | 46.86 | 46.04 | 49.71 | 108.15 | 95.94 | 110.16 | 41.19 | 42.47 | 42.67 | 59.81 | 61.46 | 56.80 |
| 21 | 48.38 | 47.03 | 50.91 | 111.32 | 99.44 | 113.33 | 42.42 | 44.20 | 44.20 | 60.80 | 61.54 | 58.03 |
| 22 | 50.29 | 49.55 | 51.01 | 114.24 | 101.94 | 115.29 | 43.72 | 45.15 | 45.30 | 61.19 | 63.39 | 59.20 |
| 23 | 50.97 | 50.71 | 52.39 | 115.33 | 106.42 | 115.96 | 44.98 | 47.37 | 47.73 | 61.33 | 64.16 | 59.65 |
| 24 | 51.43 | 51.64 | 53.35 | 117.67 | 108.56 | 118.69 | 46.44 | 48.69 | 48.87 | 61.89 | 64.82 | 60.59 |
| 25 | 52.75 | 52.76 | 54.12 | 118.97 | 113.09 | 121.33 | 48.27 | 48.94 | 48.97 | 62.78 | 65.33 | 61.00 |
| 26 | 53.79 | 53.82 | 54.38 | 127.83 | 114.84 | 130.67 | 48.93 | 49.57 | 50.30 | 62.91 | 65.35 | 61.94 |
| 27 | 54.14 | 54.23 | 55.27 | 131.70 | 115.47 | 136.34 | 49.37 | 50.65 | 51.39 | 62.93 | 65.82 | 62.95 |
| 28 | 55.00 | 55.08 | 58.13 | 133.55 | 118.64 | 137.08 | 50.62 | 51.67 | 51.95 | 63.94 | 66.00 | 63.02 |
| 29 | 55.45 | 55.63 | 59.29 | 136.72 | 119.38 | 139.23 | 51.64 | 52.06 | 52.20 | 64.50 | 66.92 | 63.55 |
| 30 | 57.21 | 58.06 | 64.86 | 137.73 | 129.41 | 140.74 | 51.97 | 52.88 | 53.06 | 64.56 | 67.24 | 63.87 |
| 31 | 58.38 | 58.92 | 67.86 | 140.40 | 132.50 | 144.27 | 52.80 | 53.40 | 53.70 | 65.56 | 69.98 | 64.47 |
| 32 | 58.61 | 60.27 | 68.71 | 142.11 | 135.41 | 147.22 | 53.24 | 55.74 | 55.80 | 66.40 | 70.08 | 65.21 |
| 33 | 60.00 | 64.15 | 69.87 | 144.44 | 137.01 | 150.56 | 54.52 | 56.37 | 56.91 | 67.45 | 70.64 | 66.30 |
| 34 | 63.24 | 66.46 | 70.48 | 148.89 | 138.49 | 151.11 | 56.27 | 57.86 | 57.95 | 67.53 | 71.51 | 66.99 |
| 35 | 66.29 | 68.68 | 72.14 | 151.70 | 140.63 | 151.94 | 57.60 | 61.38 | 62.26 | 68.60 | 72.22 | 67.26 |
| 36 | 68.24 | 69.71 | 74.41 | 156.36 | 144.00 | 153.64 | 60.71 | 63.80 | 65.14 | 69.57 | 73.11 | 69.37 |
| 37 | 69.63 | 70.18 | 75.94 | 158.49 | 145.08 | 158.06 | 63.63 | 65.93 | 65.96 | 69.66 | 73.69 | 70.57 |
| 38 | 70.11 | 72.00 | 77.09 | 158.97 | 150.56 | 158.67 | 65.51 | 66.93 | 67.08 | 70.59 | 74.64 | 71.34 |
| 39 | 70.51 | 74.07 | 78.18 | 161.82 | 150.93 | 161.36 | 66.84 | 67.37 | 67.66 | 70.64 | 74.75 | 73.59 |
| 40 | 73.18 | 76.11 | 78.79 | 163.33 | 153.43 | 165.09 | 67.30 | 68.28 | 69.12 | 71.39 | 75.58 | 74.22 |
| 41 | 76.11 | 78.13 | 80.36 | 166.42 | 156.67 | 166.67 | 67.69 | 70.25 | 71.11 | 72.04 | 76.86 | 74.34 |
| 42 | 77.81 | 78.62 | 80.74 | 168.33 | 158.52 | 168.00 | 69.26 | 73.07 | 73.07 | 72.91 | 77.42 | 75.06 |
| 43 | 78.31 | 80.71 | 84.55 | 171.32 | 160.38 | 169.85 | 71.44 | 74.70 | 75.00 | 74.57 | 77.52 | 76.59 |
| 44 | 79.53 | 80.98 | 85.00 | 173.16 | 161.03 | 172.36 | 74.01 | 75.18 | 75.48 | 75.55 | 78.42 | 77.12 |
| 45 | 82.27 | 83.01 | 88.37 | 173.24 | 162.94 | 175.56 | 75.05 | 76.35 | 77.49 | 76.69 | 78.60 | 77.56 |
| 46 | 84.71 | 84.86 | 90.63 | 177.53 | 167.53 | 178.62 | 75.64 | 78.98 | 79.69 | 77.20 | 79.36 | 78.86 |
| 47 | 88.00 | 88.17 | 92.33 | 178.52 | 169.68 | 183.45 | 77.51 | 81.32 | 81.47 | 78.07 | 82.71 | 80.50 |
| 48 | 89.19 | 89.35 | 94.29 | 178.68 | 171.94 | 185.16 | 81.16 | 84.48 | 84.65 | | | |

V.1.4 Transfektionen von siRNA gegen LIMK1 und RNF6 sowie von GFP-LIMK1 und Myc-RNF6; Messung der Axonlängen nach 48 h

| 48h | GFP | | | GFP | | | GFP-LIMK1 | | | Myc-RNF6 | | |
|-----|--------|--------|--------|----------|--------|--------|-----------|--------|--------|-----------|--------|--------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Myc-RNF6 | | | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | GFP-LIMK1 | | |
| | | | | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | | | | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| 1 | 61.33 | 66.10 | 68.80 | 25.32 | 35.09 | 35.60 | 84.05 | 76.65 | 78.85 | 82.28 | 77.19 | 78.31 |
| 2 | 72.39 | 76.91 | 80.86 | 37.40 | 39.87 | 40.70 | 89.35 | 79.21 | 81.72 | 93.54 | 87.71 | 89.54 |
| 3 | 83.64 | 84.11 | 86.23 | 42.52 | 43.01 | 43.03 | 93.12 | 79.99 | 89.01 | 101.16 | 94.62 | 94.67 |
| 4 | 88.32 | 90.06 | 100.20 | 45.98 | 46.27 | 48.00 | 97.73 | 87.19 | 93.70 | 105.69 | 110.00 | 105.59 |
| 5 | 101.11 | 102.90 | 103.81 | 48.04 | 30.00 | 52.70 | 98.48 | 89.46 | 94.65 | 115.33 | 119.99 | 115.94 |
| 6 | 105.52 | 112.67 | 114.63 | 54.35 | 54.54 | 54.96 | 106.07 | 95.54 | 97.57 | 119.56 | 127.16 | 120.90 |
| 7 | 114.94 | 119.46 | 132.21 | 55.91 | 56.55 | 57.80 | 112.24 | 97.61 | 98.05 | 123.00 | 129.40 | 127.78 |
| 8 | 133.31 | 142.23 | 143.85 | 38.08 | 38.55 | 38.82 | 120.57 | 107.18 | 99.56 | 128.82 | 131.26 | 130.00 |
| 9 | 147.88 | 147.88 | 150.37 | 39.09 | 39.16 | 39.53 | 129.32 | 108.95 | 102.66 | 130.98 | 135.61 | 133.29 |
| 10 | 152.00 | 154.89 | 155.96 | 39.66 | 60.59 | 61.16 | 137.52 | 113.17 | 106.12 | 134.55 | 139.42 | 135.91 |
| 11 | 160.87 | 163.93 | 165.19 | 61.64 | 61.78 | 62.33 | 139.66 | 113.19 | 113.88 | 137.13 | 140.18 | 139.78 |
| 12 | 167.64 | 169.01 | 170.37 | 63.37 | 63.53 | 63.58 | 146.88 | 119.81 | 120.10 | 139.88 | 152.22 | 144.70 |
| 13 | 173.01 | 173.10 | 177.79 | 63.72 | 65.77 | 68.57 | 148.61 | 121.13 | 122.18 | 150.85 | 157.59 | 153.13 |
| 14 | 179.23 | 179.23 | 182.42 | 69.19 | 69.61 | 69.78 | 155.12 | 123.92 | 129.66 | 153.52 | 161.80 | 169.65 |
| 15 | 182.67 | 184.44 | 191.93 | 71.63 | 77.11 | 77.57 | 158.72 | 128.69 | 136.52 | 165.99 | 171.34 | 177.65 |
| 16 | 192.76 | 200.52 | 204.14 | 77.88 | 80.75 | 80.85 | 163.90 | 129.70 | 139.36 | 170.65 | 179.42 | 185.13 |
| 17 | 207.41 | 210.37 | 212.47 | 81.55 | 84.15 | 84.31 | 163.91 | 135.51 | 140.36 | 177.87 | 186.07 | 187.50 |
| 18 | 212.59 | 216.93 | 218.42 | 84.58 | 85.13 | 85.80 | 164.67 | 139.28 | 147.16 | 185.48 | 193.05 | 191.13 |
| 19 | 219.09 | 219.70 | 220.00 | 85.93 | 86.88 | 87.12 | 169.61 | 146.01 | 151.10 | 188.76 | 194.87 | 196.88 |
| 20 | 223.78 | 225.77 | 228.05 | 88.58 | 89.49 | 91.90 | 174.44 | 151.08 | 157.56 | 191.66 | 204.23 | 209.44 |
| 21 | 226.53 | 229.67 | 233.33 | 92.83 | 95.20 | 95.58 | 174.44 | 153.18 | 163.38 | 202.17 | 213.11 | 213.46 |
| 22 | 229.09 | 234.84 | 235.08 | 96.87 | 97.03 | 97.35 | 177.54 | 154.53 | 166.84 | 210.27 | 219.58 | 220.70 |
| 23 | 234.53 | 237.16 | 237.16 | 99.81 | 100.32 | 100.39 | 179.97 | 155.86 | 173.03 | 214.17 | 223.82 | 224.40 |
| 24 | 237.10 | 243.70 | 246.49 | 101.74 | 103.30 | 103.67 | 180.34 | 160.00 | 174.19 | 220.86 | 228.07 | 228.89 |
| 25 | 237.78 | 250.66 | 263.15 | 104.04 | 105.08 | 105.19 | 182.77 | 163.34 | 179.45 | 227.25 | 231.17 | 231.41 |
| 26 | 249.19 | 269.19 | 272.63 | 107.53 | 110.53 | 113.14 | 187.34 | 168.53 | 180.14 | 230.15 | 243.17 | 248.90 |
| 27 | 267.22 | 273.57 | 273.96 | 113.96 | 114.28 | 117.87 | 188.05 | 173.57 | 181.19 | 236.56 | 251.41 | 259.31 |
| 28 | 273.37 | 277.04 | 286.22 | 124.20 | 124.90 | 125.74 | 188.44 | 182.37 | 183.77 | 250.72 | 274.78 | 276.65 |
| 29 | 274.67 | 288.89 | 290.90 | 125.96 | 126.04 | 128.92 | 189.01 | 182.44 | 183.81 | 273.23 | 277.28 | 283.62 |
| 30 | 288.06 | 291.05 | 291.94 | 131.96 | 132.44 | 134.58 | 189.66 | 198.99 | 187.49 | 277.11 | 291.57 | 296.07 |
| 31 | 290.99 | 295.76 | 297.22 | 133.37 | 137.60 | 139.72 | 191.56 | 200.40 | 192.33 | 290.31 | 302.73 | 307.39 |
| 32 | 292.95 | 313.15 | 315.92 | 135.35 | | 142.63 | 192.57 | 206.56 | 194.29 | 297.78 | 309.61 | 313.78 |
| 33 | 301.21 | 324.51 | 327.85 | 136.07 | | 143.89 | 198.21 | 245.78 | 193.34 | 309.53 | | 316.55 |
| 34 | 316.98 | 336.65 | 338.63 | 140.70 | | 146.52 | 198.49 | | 201.48 | 315.41 | | 322.33 |
| 35 | 329.81 | 340.98 | 350.28 | 140.73 | | | 201.38 | | 204.35 | 317.73 | | 340.69 |
| 36 | 338.87 | 352.33 | 353.01 | 143.37 | | | 204.71 | | 221.16 | 321.36 | | |
| 37 | 351.27 | 357.78 | 367.27 | 143.37 | | | 208.41 | | 234.00 | 329.76 | | |
| 38 | 353.33 | 370.87 | 374.25 | 144.42 | | | 211.16 | | | 333.96 | | |
| 39 | 369.63 | 389.51 | 394.38 | 151.80 | | | 221.33 | | | 339.79 | | |
| 40 | 378.90 | | 400.71 | | | | 243.75 | | | 355.32 | | |
| 41 | 395.47 | | 430.70 | | | | 249.87 | | | | | |
| 42 | 398.81 | | | | | | | | | | | |
| 43 | 404.32 | | | | | | | | | | | |
| 44 | 413.13 | | | | | | | | | | | |
| 45 | 448.61 | | | | | | | | | | | |
| 46 | 460.35 | | | | | | | | | | | |

| 48h | Kontroll-siRNA ^{RNF6} | | | RNF6-siRNA | | | LIMK1-siRNAi | | | RNF6-siRNAi | | |
|-----|--------------------------------|--------|--------|---------------------------------|--------|--------|--------------|--------|--------|---------------------------------|--------|--------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Kontroll-siRNA ^{LIMK1} | | | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Kontroll-siRNA ^{LIMK1} | | |
| | | | | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | | | | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| 1 | 40.00 | 32.59 | 48.62 | 48.65 | 60.56 | 30.13 | 14.75 | 10.40 | 12.64 | 12.40 | 19.34 | 15.07 |
| 2 | 56.72 | 62.39 | 62.64 | 30.80 | 68.26 | 30.70 | 16.75 | 16.22 | 16.29 | 17.58 | 23.18 | 19.42 |
| 3 | 66.67 | 74.78 | 64.42 | 37.22 | 71.02 | 55.56 | 18.87 | 18.00 | 18.68 | 20.67 | 25.92 | 19.97 |
| 4 | 71.85 | 83.60 | 72.59 | 62.96 | 74.78 | 64.44 | 22.85 | 19.44 | 21.74 | 22.27 | 27.25 | 22.50 |
| 5 | 90.91 | 87.89 | 91.43 | 70.20 | 77.14 | 71.74 | 24.37 | 23.64 | 23.77 | 28.18 | 35.53 | 28.34 |
| 6 | 96.00 | 114.63 | 93.73 | 73.08 | 78.75 | 76.24 | 26.29 | 24.96 | 25.45 | 29.76 | 35.56 | 29.06 |
| 7 | 97.89 | 114.69 | 108.92 | 76.94 | 84.00 | 77.80 | 29.34 | 28.32 | 29.08 | 30.35 | 38.73 | 33.76 |
| 8 | 101.11 | 124.94 | 112.84 | 78.24 | 91.11 | 84.90 | 31.06 | 29.80 | 29.82 | 31.34 | 47.12 | 34.98 |
| 9 | 111.85 | 132.00 | 119.46 | 86.88 | 98.33 | 96.26 | 37.36 | 31.84 | 32.48 | 34.67 | 47.92 | 37.03 |
| 10 | 145.70 | 134.59 | 122.47 | 97.78 | 101.54 | 101.69 | 39.52 | 37.67 | 39.10 | 37.25 | 48.47 | 37.97 |
| 11 | 144.90 | 156.36 | 160.74 | 100.74 | 104.44 | 105.19 | 41.79 | 40.19 | 40.65 | 44.55 | 49.83 | 49.83 |
| 12 | 150.37 | 160.74 | 170.37 | 102.95 | 106.48 | 109.59 | 43.77 | 41.79 | 42.95 | 44.92 | 52.19 | 49.94 |
| 13 | 165.19 | 168.36 | 174.86 | 105.49 | 115.41 | 115.86 | 45.46 | 44.08 | 44.30 | 51.21 | 52.55 | 52.81 |
| 14 | 183.70 | 169.52 | 182.22 | 110.99 | 119.45 | 120.00 | 47.76 | 46.33 | 47.38 | 56.95 | 55.24 | 54.21 |
| 15 | 194.81 | 178.18 | 188.15 | 116.98 | 121.48 | 121.48 | 48.92 | 47.96 | 48.90 | 60.39 | 57.18 | 58.33 |
| 16 | 198.29 | 184.44 | 207.41 | 120.00 | 125.00 | 129.66 | 50.65 | 50.34 | 50.65 | 61.47 | 58.30 | 64.30 |
| 17 | 208.62 | 188.06 | 217.96 | 121.48 | 129.43 | 134.59 | 53.95 | 51.55 | 51.62 | 64.67 | 59.91 | 64.59 |
| 18 | 209.52 | 193.25 | 219.09 | 129.23 | 132.65 | 143.01 | 54.70 | 54.24 | 54.48 | 64.95 | 60.39 | 67.57 |
| 19 | 212.59 | 194.81 | 228.05 | 132.12 | 141.90 | 149.43 | 56.79 | 55.27 | 56.67 | 67.71 | 61.55 | 70.70 |
| 20 | 218.42 | 198.55 | 229.09 | 140.74 | 148.31 | 162.22 | 57.69 | 56.96 | 57.40 | 74.03 | 65.21 | 71.02 |
| 21 | 230.94 | 210.37 | 234.81 | 146.11 | 149.73 | 168.15 | 59.56 | 58.18 | 59.29 | 76.08 | 68.20 | 72.79 |
| 22 | 237.78 | 220.00 | 243.70 | 148.45 | 151.84 | 168.33 | 61.05 | 60.05 | 60.67 | 77.39 | 68.78 | 79.91 |
| 23 | 238.81 | 221.89 | 257.78 | 157.74 | 163.74 | 177.78 | 63.36 | 61.82 | 62.09 | 79.03 | 69.37 | 86.67 |
| 24 | 245.41 | 223.78 | 257.78 | 166.13 | 165.37 | 185.75 | 64.91 | 63.81 | 64.79 | 79.13 | 72.33 | 89.56 |
| 25 | 249.19 | 233.33 | 286.04 | 175.24 | 177.04 | 187.78 | 66.44 | 66.37 | 66.37 | 84.46 | 78.72 | 91.86 |
| 26 | 249.64 | 255.52 | 288.89 | 179.62 | 185.66 | 190.59 | 67.02 | 67.01 | 67.02 | 85.15 | 79.21 | 92.18 |
| 27 | 254.93 | 257.71 | 296.34 | 185.86 | 186.23 | 196.92 | 71.41 | 69.43 | 70.94 | 90.04 | 83.06 | 93.35 |
| 28 | 255.36 | 267.92 | 297.36 | 188.15 | 190.37 | 199.51 | 75.52 | 69.66 | 75.11 | 90.70 | 90.50 | 96.44 |
| 29 | 272.45 | 291.94 | 301.13 | 191.55 | 193.21 | 200.00 | 77.05 | 74.37 | 76.07 | 98.02 | 92.11 | 98.05 |
| 30 | 274.67 | 297.14 | 311.11 | 199.26 | 199.34 | 201.48 | 77.31 | 75.90 | 77.28 | 98.26 | 92.14 | 98.71 |
| 31 | 290.46 | 297.22 | 316.30 | 200.00 | 200.63 | 210.49 | 80.89 | 77.36 | 78.29 | 101.50 | 92.31 | 99.66 |
| 32 | 292.39 | 297.78 | 318.42 | 202.19 | 209.06 | 221.11 | 82.34 | 77.42 | 82.21 | 104.98 | 97.06 | 109.35 |
| 33 | 316.19 | 313.10 | 321.48 | 212.59 | 216.19 | 224.69 | 82.79 | 81.41 | 82.42 | 105.52 | 98.07 | 110.91 |
| 34 | 316.98 | 316.36 | 338.87 | 222.28 | 224.13 | 245.37 | 88.04 | 82.25 | 85.13 | 110.47 | 106.45 | 118.26 |
| 35 | 327.41 | 343.40 | 352.73 | 232.62 | 241.23 | 245.93 | 89.28 | 83.39 | 88.30 | 113.44 | 109.53 | 126.11 |
| 36 | 338.65 | 353.33 | 357.78 | 248.89 | 248.89 | 250.57 | 92.65 | 88.11 | 91.87 | 118.03 | 111.13 | 131.25 |
| 37 | 340.38 | 338.49 | 369.63 | 253.04 | 259.02 | 259.34 | 95.14 | 91.71 | 93.21 | 123.63 | 118.95 | 132.96 |
| 38 | 356.36 | 382.96 | 370.63 | 259.75 | 262.22 | 272.59 | 98.99 | 93.02 | 96.36 | 129.68 | 127.67 | 134.79 |
| 39 | 365.93 | 383.70 | 381.82 | 274.43 | 287.50 | 297.33 | 99.76 | 96.10 | 99.57 | 139.21 | 139.82 | 135.02 |
| 40 | 367.27 | 403.12 | 406.79 | 311.85 | 312.50 | 313.44 | 104.81 | 99.27 | 103.69 | 155.12 | 145.13 | 136.87 |
| 41 | 380.74 | 411.85 | 423.38 | 326.67 | 328.46 | 342.96 | 110.08 | 102.82 | 107.08 | 172.27 | 184.16 | 151.16 |
| 42 | 395.47 | 439.48 | 428.89 | 346.67 | 346.67 | 355.56 | 114.26 | 103.77 | 113.24 | 188.81 | 203.55 | 166.11 |
| 43 | 398.81 | 468.15 | 435.36 | 363.33 | 375 | | | | | | | |

V.1.5 Transfektionen von siRNA gegen LIMK1 und RNF6 sowie von GFP-LIMK1 und Myc-RNF6; Messung der Axonlängen nach 72 h

| 72h | GFP Myc | | | GFP Myc-RNF6 | | | GFP-LIMK1 Myc | | | Myc-RNF6 GFP-LIMK1 | | |
|-----|------------|--------|---------|-----------------|--------|--------|------------------|--------|--------|-----------------------|--------|--------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| 1 | 201.45 | 230.00 | 252.14 | 99.38 | 104.89 | 119.26 | 43.97 | 48.05 | 48.51 | 148.21 | 170.42 | 176.73 |
| 2 | 241.75 | 251.85 | 252.39 | 125.87 | 135.74 | 134.34 | 54.02 | 55.85 | 58.15 | 177.85 | 178.88 | 212.07 |
| 3 | 263.23 | 266.74 | 276.00 | 136.60 | 148.15 | 161.48 | 58.46 | 72.10 | 93.09 | 214.65 | 228.42 | 229.75 |
| 4 | 280.00 | 288.89 | 297.60 | 165.19 | 166.55 | 176.57 | 104.93 | 107.66 | 112.41 | 286.45 | 292.70 | 240.00 |
| 5 | 307.92 | 322.40 | 329.78 | 180.00 | 183.27 | 185.19 | 113.96 | 118.64 | 121.74 | 250.57 | 278.30 | 288.00 |
| 6 | 350.76 | 356.07 | 377.78 | 186.09 | 189.63 | 193.68 | 126.04 | 132.46 | 142.14 | 310.71 | 317.14 | 321.05 |
| 7 | 388.36 | 398.52 | 405.82 | 202.86 | 203.02 | 209.81 | 143.45 | 144.15 | 146.49 | 333.09 | 334.67 | 336.00 |
| 8 | 409.45 | 415.27 | 427.64 | 214.07 | 215.09 | 215.27 | 149.66 | 150.77 | 151.54 | 347.51 | 349.33 | 355.75 |
| 9 | 429.63 | 441.45 | 442.06 | 223.57 | 227.56 | 228.53 | 161.76 | 162.86 | 163.44 | 370.77 | 372.86 | 378.87 |
| 10 | 445.09 | 452.36 | 456.73 | 232.86 | 235.00 | 236.36 | 164.62 | 176.60 | 178.18 | 380.57 | 390.76 | 395.47 |
| 11 | 472.26 | 474.67 | 478.22 | 240.73 | 243.43 | 243.70 | 180.51 | 182.86 | 184.69 | 394.58 | 401.45 | 405.80 |
| 12 | 482.18 | 484.92 | 485.38 | 230.37 | 232.36 | 236.00 | 192.14 | 192.31 | 193.21 | 398.55 | 408.73 | 412.65 |
| 13 | 490.71 | 491.35 | 504.00 | 238.11 | 238.33 | 267.64 | 193.79 | 197.22 | 198.46 | 406.37 | 426.79 | 427.56 |
| 14 | 503.38 | 506.18 | 508.36 | 268.36 | 269.82 | 271.70 | 200.00 | 206.52 | 207.10 | 419.46 | 435.93 | 440.14 |
| 15 | 512.45 | 515.08 | 517.62 | 276.30 | 277.74 | 279.43 | 208.00 | 212.59 | 214.07 | 430.00 | 454.64 | 474.57 |
| 16 | 527.36 | 527.85 | 529.75 | 290.73 | 290.95 | 296.00 | 215.48 | 216.73 | 217.95 | 454.52 | 483.05 | 490.47 |
| 17 | 532.29 | 533.14 | 536.73 | 285.63 | 291.10 | 301.85 | 218.79 | 220.65 | 225.66 | 474.91 | 492.87 | 495.48 |
| 18 | 538.29 | 549.82 | 550.69 | 297.36 | 300.44 | 302.84 | 227.69 | 227.80 | 229.37 | 490.68 | 514.78 | 524.00 |
| 19 | 551.54 | 559.27 | 561.45 | 313.45 | 319.29 | 320.00 | 231.11 | 234.36 | 237.78 | 494.18 | 513.35 | 538.04 |
| 20 | 569.29 | 571.35 | 572.14 | 322.18 | 323.78 | 324.15 | 237.78 | 238.73 | 239.35 | 502.29 | 541.96 | 562.00 |
| 21 | 573.09 | 573.38 | 582.00 | 325.71 | 326.04 | 326.86 | 240.00 | 244.53 | 245.13 | 504.79 | 572.38 | 576.53 |
| 22 | 588.86 | 593.75 | 596.38 | 331.56 | 333.28 | 333.27 | 245.93 | 247.03 | 251.64 | 527.74 | 595.29 | 602.74 |
| 23 | 597.09 | 610.04 | 621.16 | 337.14 | 343.11 | 348.89 | 251.89 | 252.86 | 254.29 | 541.58 | 612.55 | 617.38 |
| 24 | 621.38 | 625.75 | 640.00 | 330.15 | 361.60 | 369.81 | 255.20 | 256.73 | 258.91 | 569.89 | 620.08 | 624.24 |
| 25 | 650.67 | 653.09 | 659.78 | 376.15 | 384.29 | 386.62 | 259.31 | 259.62 | 260.31 | 610.91 | 648.09 | 659.68 |
| 26 | 661.71 | 668.36 | 668.45 | 388.68 | 391.70 | 392.23 | 260.38 | 260.77 | 266.15 | 619.70 | 714.53 | 694.89 |
| 27 | 671.13 | 679.27 | 679.29 | 392.78 | 397.82 | 402.33 | 267.41 | 269.73 | 270.55 | 632.00 | 754.04 | 633.09 |
| 28 | 693.68 | 695.56 | 699.05 | 408.73 | 416.67 | 422.96 | 271.83 | 273.43 | 273.56 | 655.06 | 773.52 | 764.13 |
| 29 | 702.00 | 716.51 | 729.89 | 432.91 | 434.67 | 439.71 | 276.36 | 278.46 | 279.29 | 753.51 | 807.69 | 787.55 |
| 30 | 747.86 | 762.36 | 769.71 | 443.77 | 485.05 | 490.47 | 282.86 | 282.91 | 283.57 | 773.14 | 855.85 | 831.05 |
| 31 | 797.61 | 815.13 | 815.14 | 507.56 | 508.38 | 723.49 | 284.83 | 307.20 | 321.45 | 852.80 | 997.51 | 863.02 |
| 32 | | 848.31 | 897.43 | | | | | | | | | |
| 33 | | 888.89 | 1149.82 | | | | | | | | | |
| 34 | | 989.89 | | | | | | | | | | |
| 35 | | 1086.7 | | | | | | | | | | |
| 36 | | 1405.3 | | | | | | | | | | |

| 72h | Kontroll-siRNA ^{293T} Kontroll-siRNA ^{LIMK1} | | | RNF6-siRNA ^{293T} Kontroll-siRNA ^{LIMK1} | | | LIMK1-siRNAi ^{293T} Kontroll-siRNA | | | RNF6-siRNAi ^{293T} LIMK1-siRNA | | |
|-----|---|--------|---------|---|--------|--------|--|--------|--------|--|--------|--------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| 1 | 176.10 | 236.52 | 218.83 | 78.38 | 87.19 | 115.51 | 56.30 | 88.08 | 88.39 | 116.77 | 121.94 | 130.16 |
| 2 | 207.24 | 277.96 | 286.91 | 117.61 | 118.86 | 124.78 | 106.45 | 107.41 | 114.94 | 130.32 | 130.97 | 134.87 |
| 3 | 222.30 | 297.05 | 291.29 | 125.90 | 128.20 | 129.68 | 118.69 | 120.87 | 121.19 | 138.06 | 141.38 | 142.42 |
| 4 | 272.52 | 321.80 | 311.64 | 133.55 | 135.21 | 137.36 | 125.81 | 132.67 | 132.90 | 143.03 | 145.42 | 147.10 |
| 5 | 296.18 | 355.41 | 337.61 | 141.42 | 144.94 | 146.43 | 133.74 | 141.39 | 145.48 | 148.54 | 148.75 | 152.26 |
| 6 | 316.98 | 395.19 | 363.60 | 168.80 | 171.93 | 173.42 | 146.23 | 149.03 | 155.48 | 152.74 | 159.35 | 161.81 |
| 7 | 347.96 | 419.43 | 398.30 | 173.87 | 179.35 | 179.55 | 156.63 | 159.16 | 160.66 | 164.65 | 170.97 | 194.19 |
| 8 | 388.75 | 437.91 | 421.21 | 181.89 | 183.74 | 184.06 | 165.16 | 166.05 | 169.94 | 195.48 | 197.42 | 198.06 |
| 9 | 418.45 | 448.56 | 439.91 | 182.60 | 191.61 | 191.81 | 171.15 | 181.61 | 182.30 | 208.04 | 209.03 | 204.53 |
| 10 | 428.40 | 460.14 | 433.06 | 184.80 | 194.19 | 195.18 | 184.52 | 188.20 | 188.36 | 224.52 | 228.29 | 215.55 |
| 11 | 447.66 | 472.92 | 463.30 | 187.02 | 201.14 | 201.85 | 192.73 | 204.43 | 194.84 | 236.13 | 243.02 | 224.35 |
| 12 | 456.89 | 478.75 | 473.98 | 192.19 | 204.88 | 205.23 | 194.38 | 212.39 | 204.52 | 251.61 | 253.30 | 231.87 |
| 13 | 472.56 | 502.90 | 488.36 | 198.77 | 208.77 | 209.23 | 200.00 | 222.30 | 213.81 | 258.71 | 261.73 | 250.79 |
| 14 | 477.24 | 509.88 | 498.76 | 199.35 | 213.93 | 215.87 | 210.52 | 229.03 | 223.49 | 263.90 | 264.52 | 255.81 |
| 15 | 489.38 | 523.00 | 505.24 | 203.81 | 220.00 | 227.81 | 218.71 | 235.48 | 232.67 | 265.81 | 266.52 | 260.82 |
| 16 | 498.47 | 537.69 | 522.48 | 208.00 | 231.70 | 234.94 | 224.92 | 240.65 | 238.10 | 268.52 | 270.00 | 263.33 |
| 17 | 499.80 | 565.60 | 526.67 | 208.19 | 236.98 | 237.60 | 234.94 | 255.87 | 251.61 | 269.81 | 271.61 | 265.18 |
| 18 | 507.78 | 580.73 | 542.09 | 212.93 | 245.55 | 245.55 | 240.62 | 258.71 | 256.77 | 270.97 | 281.64 | 267.16 |
| 19 | 522.96 | 592.29 | 573.89 | 219.76 | 248.52 | 248.85 | 251.61 | 270.16 | 261.90 | 276.50 | 282.33 | 270.36 |
| 20 | 537.11 | 597.87 | 581.87 | 224.22 | 260.39 | 260.45 | 257.42 | 281.31 | 273.44 | 277.74 | 285.90 | 273.55 |
| 21 | 545.40 | 604.69 | 596.27 | 227.25 | 266.13 | 266.84 | 266.95 | 285.81 | 282.24 | 282.27 | 293.06 | 282.03 |
| 22 | 578.32 | 651.19 | 598.83 | 230.49 | 269.68 | 269.87 | 279.34 | 297.42 | 285.90 | 284.55 | 304.21 | 284.44 |
| 23 | 584.65 | 647.84 | 609.74 | 236.30 | 278.67 | 280.66 | 283.17 | 311.67 | 304.92 | 290.19 | 306.89 | 287.10 |
| 24 | 597.84 | 665.69 | 631.93 | 237.94 | 283.29 | 285.74 | 290.97 | 319.34 | 315.48 | 292.28 | 315.07 | 307.33 |
| 25 | 599.27 | 702.18 | 637.70 | 238.03 | 287.80 | 293.59 | 307.28 | 345.57 | 321.29 | 298.41 | 332.38 | 310.13 |
| 26 | 624.39 | 713.44 | 672.84 | 239.89 | 305.63 | 306.56 | 318.71 | 381.29 | 367.33 | 314.19 | 347.02 | 338.25 |
| 27 | 646.39 | 725.27 | 711.49 | 247.33 | 310.49 | 320.65 | 331.61 | 408.32 | 391.75 | 346.03 | 336.73 | 348.19 |
| 28 | 660.27 | 768.03 | 715.29 | 256.30 | 328.61 | 331.42 | 374.67 | 425.33 | 414.94 | 349.43 | 366.55 | 359.71 |
| 29 | 673.95 | 786.00 | 769.07 | 267.10 | 337.81 | 339.75 | 395.48 | 487.00 | 466.45 | 362.96 | 369.68 | 383.42 |
| 30 | 711.95 | 820.85 | 813.36 | 275.33 | 355.74 | 356.00 | 417.78 | 581.29 | 514.44 | 392.91 | 405.33 | 410.63 |
| 31 | 780.52 | 940.80 | 881.14 | 281.74 | 382.65 | 386.42 | 477.42 | 618.13 | 619.00 | 433.44 | 487.45 | 420.97 |
| 32 | 879.48 | 1377.2 | 1161.32 | 304.16 | 388.89 | 417.43 | | | | 505.81 | 497.43 | |
| 33 | 881.45 | | | 315.08 | 786.79 | 449.82 | | | | 386.79 | 302.81 | |
| 34 | | | | 321.93 | | | | | | 389.89 | 328.43 | |
| 35 | | | | | | | | | | 671.63 | | |
| 36 | | | | | | | | | | 688.89 | | |

V.2 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| ³⁵ S | Schwefel-Isotop 35 |
| A, mA | Ampere, Milliampere |
| Abb. | Abbildung |
| ADF | Aktin-depolymerisierender Faktor |
| ALP | <i>alpha-actinin associated LIM protein</i> |
| APC | <i>anaphase promoting complex</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| ca. | <i>circa</i> |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CLIM/Ldb/NLI | Kofaktor von LIM-HD-Proteinen |
| cm | Zentimeter |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CUL1 | Cullin 1 |
| dATP | Deoxyadenosin-Triphosphat |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| DAB | Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Deoxyribonuklein-Triphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Embryonaltag |
| E1 | Ubiquitin aktivierendes Enzym |
| E2 | Ubiquitin konjugierendes Enzym |
| E3 | Ubiquitin-Ligase |
| EBSS | <i>Earls Buffered Salt Solution</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EtOH | Ethanol |
| FBP | F-Box-Protein |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| g, mg, µg | Gramm, Milligramm, Mikrogramm |
| GST | Glutathion-S –Transferase |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GTP | Guanosin-Triphosphat |
| h, min | Stunde, Minute |
| HDAC | Histon-Deacetylase |
| HECT | homolog zum E6-AP C-Terminus |

| | |
|-----------|---|
| HEPES | N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2'Ethansulfonsäure |
| His | Histidin |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| Hsp | Hitzeschock-Protein |
| IgG | Immunglobulin G |
| Inha | <i>inhibin subunit alpha</i> |
| I-κB | <i>Inhibitor of NF-κB</i> |
| IPTG | Isopropylthio-b-D-Galactosidase |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| l, ml, µl | Liter, Milliliter, Mikroliter |
| LIM | konserviertes Zinkfinger-Protein-Interaktionsmotiv, abgeleitet von Lin11, Isl-1 und Mec-3 |
| LIM-HD | LIM-Homöodomänen-Protein |
| LIMK | LIM-Kinase |
| LMO | <i>LIM-only</i> Proteine |
| M, mM, µM | molar, millimolar, mikromolar |
| MeOH | Methanol |
| Mdm2 | <i>Mouse-double-minute 2</i> , E3-Enzym |
| MG132 | synthetisches Peptid-Aldehyd: Proteasom-Inhibitor |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure(messenger RNA) |
| NES | <i>nuclear export signal</i> |
| NF-κB | <i>Nuclear Factor kappa B</i> |
| NLS | <i>nuclear localization signal</i> |
| nm | Nanometer |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| OD | optische Dichte |
| p53 | Tumorsuppressor Protein 53 |
| PAK1 | p21-aktivierte Kinase |
| PBS | Phosphat gepufferte Säure |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEI | Polyethanolimin |
| PINCH | <i>particularly interesting new cysteine and histidine-rich protein</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| POU | Abkürzung für Pit1, Oct-1/2 und unc86 |
| Ras | GTPase-Protein |
| RING | <i>really interesting new gene</i> |
| Rho | Ras-Homolog |
| RLIM | RINGfinger LIM domain-binding protein |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| RNF6 | RINGfinger Protein 6 |

| | |
|----------|---|
| ROCK | Rho-Kinase |
| RT | Raumtemperatur |
| SCF | Multimere-Ubiquitin-Ligase mit den Untereinheiten Skp1 / CUL1/ FBP |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacralamid-Gelelektrophorese |
| Skp1 | <i>S-phase-kinase-associated protein-1</i> |
| siRNA | <i>short-interfering</i> RNA |
| SRF | <i>serum-response factor</i> |
| Ssh | <i>Slingshot</i> Phosphatase |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylendiamin |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| u.a. | unter anderem |
| U | <i>Unit</i> (enzymatische Wirkungseinheit) |
| UBA | Ubiquitin-assoziierte Domäne |
| UBC | Ubiquitin-konjugierendes Enzym |
| Ub | Ubiquitin |
| Upm | Umdrehung pro Minute |
| UNC | Gene in <i>C. elegans</i> , deren Deletion den Phänotyp „ <i>uncoordinated</i> “ verursacht |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| Vol | Volumen |
| X-gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-b-D-galactosidase |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

VI. Literaturverzeichnis

- Agulnick,A.D., Taira,M., Breen,J.J., Tanaka,T., Dawid,I.B., and Westphal,H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* 384, 270-272.
- Ahlgren,U., Pfaff,S.L., Jessell,T.M., Edlund,T., and Edlund,H. (1997). Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385, 257-260.
- Andersen,S.S. & Bi,G.Q. (2000). Axon formation: A molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays* 22, 172–179
- Arber,S., Barbayannis,F.A., Hanser,H., Schneider,C., Stanyon,C.A., Bernard,O., and Caroni,P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809.
- Arber,S. and Caroni,P. (1996). Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes Dev.* 10, 289-300.
- Bach,I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mechanisms of Development* 91, 5-17.
- Bach,I., Carriere,C., Ostendorff,H.P., Andersen,B., and Rosenfeld,M.G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes & Development* 11, 1370-1380.
- Bach,I. and Ostendorff,H.P. (2003). Orchestrating nuclear functions: ubiquitin sets the rhythm. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 189-195.
- Bach,I., Rhodes,S.J., Pearse,R.V., Heinzel,T., Gloss,B., Scully,K.M., Sawchenko,P.E., and Rosenfeld,M.G. (1995). P-Lim, A Lim Homeodomain Factor, Is Expressed During Pituitary Organ and Cell Commitment and Synergizes with Pit-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 2720-2724.
- Bach,I., Rodriguez-Esteban,C., Carriere,C., Bhushan,A., Krones,A., Rose,D.W., Glass,C.K., Andersen,B., Belmonte,J.C.I., and Rosenfeld,M.G. (1999). RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nature Genetics* 22, 394-399.
- Baumeister,W., Walz,J., Zuhl,F., Seemuller,E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380.
- Bays,NW., Wilhovsky,SK., Goradia,A., Hodgkiss-Harlow,K., Hampton,R.Y. (2001). HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol Biol Cell* 12, 4114-4128.
- Becker,T., Ostendorff,HP., Bossenz,M., Schluter,A., Becker,CG., Peirano,RI., Bach,I. (2002). Multiple functions of LIM domain-binding CLIM/NLI/Ldb cofactors during zebrafish development. *Mech Dev.* 117, 75-85.
- Bienz,M., Clevers,H. (2003). Armadillo/beta-catenin signals in the nucleus--proof beyond a reasonable doubt? *Nat Cell Biol.* 3, 179-182
- Binder,LI., Frankfurter,A., Rebhun,LI. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol.* 101, 1371-1378.
- Bossenz,M. (2004). Dissertation. Universität Hamburg.
- Bradke,F. & Dotti,C.G. (2000). Establishment of neuronal polarity: Lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 574–581
- Bradke,F. & Dotti,C.G. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science* 283, 1931–1934.
- Bradke,F. & Dotti,C.G. (1997). Neuronal polarity: Vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron* 19, 1175–1186.

- Bretscher, A., & Lynch, W. (1985). Identification and localization of immunoreactive forms of caldesmon in smooth and nonmuscle cells: a comparison with the distributions of tropomyosin and alpha-actinin. *J Cell Biol.* 100, 1656-1663.
- Byers, H.R., Fujiwara, K. (1982). Stress fibers in cells in situ: immunofluorescence visualization with antiactin, antimyosin, and anti-alpha-actinin. *J Cell Biol.* 93, 804-811.
- Campbell, D.S. & Holt, C.E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 6, 1013-1026.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science.* 243, 1576-1583
- Chen, Z.J. (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol.* 8, 758-765. Review
- Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K.C., Pepicelli, C.V., Gan, L., Lee, B., and Johnson, R.L. (1998). Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat. Genet.* 19, 51-55.
- Chen, L., Segal, D., Hukriede, N.A., Podtelejnikov, A.V., Bayarsaihan, D., Kennison, J.A., Ogryzko, V.V., Dawid, I.B., and Westphal, H. (2002). Ssdp proteins interact with the LIM-domain-binding protein Ldb1 to regulate development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14320-14325.
- Clark, K.A., McGrail, M., Beckerle, M.C. (2003). Analysis of PINCH function in *Drosophila* demonstrates its requirement in integrin-dependent cellular processes. *Development* 130, 2611-2621.
- Cohen-Fix O, Peters JM, Kirschner MW, Koshland D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes and Development* 24, 3081-3093.
- Coghill, I.D., Brown, S., Cottle, D.L., McGrath, M.J., Robinson, P.A., Nandurkar, H.H., Dyson, J.M., Mitchell, C.A. FHL3 is an actin-binding protein that regulates alpha-actinin-mediated actin bundling: FHL3 localizes to actin stress fibers and enhances cell spreading and stress fiber disassembly. *J Biol Chem* 26, 24139-24152.
- Craig, A.M. & Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci.* 17, 267-310. Review.
- DaSilva, J.S. & Dotti, C.G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neurogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 9, 694-704. Review.
- Davila, M., Frost, A.R., Grizzle, W.E., Chakrabarti, R. (2003). LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer. *J Biol Chem* 278, 36868-36875.
- Dawid, I.B., Breen, J.J., and Toyama, R. (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends in Genetics* 14, 156-162.
- Dawid, I.B., Chitnis, A.B. (2001) Lim homeobox genes and the CNS: a close relationship. *Neuron.* 30, 301-303. Review
- Dickson, B.J. (2001). Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol.* 1, 103-110. Review.
- Dickson, B.J. (2003). Development. Wiring the brain with insulin. *Science* 300, 440-441.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 4, 1454-1468.
- Dover, J., Schneider, J., Tawiah-Boateng, M.A., Wood, A., Dean, K., Johnston, M., Shilatifard, A. (2002). Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem.* 277, 28368-28371.

- Elenbaas,B., Dobbstein,M., Roth,J., Shenk,T., and Levine,A.J. (1996). The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Molecular Medicine* 2, 439-451.
- Endo,M., Ohashi,K., Sasaki,Y., Goshima,Y., Niwa,R., Uemura,T., Mizuno,K. (2003). Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J Neurosci.* 23, 2527-2537.
- Fabbro,M. and Henderson,B.R. (2003). Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Experimental Cell Research* 282, 59-69.
- Fabbro,M., Rodriguez,JA., Baer,R., Henderson,BR. (2002). BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. *J Biol Chem.* 24, 21315-21324.
- Fan,C.M., & Maniatis,T. (1991). Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* 354, 395-398.
- Fang,S., Jensen,J.P., Ludwig,R.L., Vousden,K.H., and Weissman,A.M. (2000). Mdm2 Is a RING Finger-dependent Ubiquitin Protein Ligase for Itself and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 8945-8951.
- Fernandez-Funez,P., Lu,CH., Rincon-Limas,DE., Garcia-BellidoA., BotasJ. (1998). The relative expression amounts of apterous and its co-factor dLdb/Chip are critical for dorso-ventral compartmentalization in the *Drosophila* wing. *EMBO J.* 23, 6846-6853.
- Feuerstein,R., Wang,X.K., Song,D.C., Cooke,N.E., and Liebhaber,S.A. (1994). The Lim/Double Zinc-Finger Motif Functions As A Protein Dimerization Domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10655-10659.
- Fire,A. (1999). RNA-triggered gene silencing. *Trends in Genetics* 15, 358-363.
- Foletta,V.C., Moussi,N., Sarmiere,P.D., Bamberg,J.R., and Bernard,O. (2004). LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Experimental Cell Research* 294, 392-405.
- Freemont,P.S. (2000). Ubiquitination: RING for destruction? *Current Biology* 10, R84-R87.
- Frey,N. & Olson,EN.(2002). Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J Biol Chem.* 277, 13998-134004.
- German,M.S., Wang,J.H., Chadwick,R.B., and Rutter,W.J. (1992). Synergistic Activation of the Insulin Gene by A Lim Homeo Domain Protein and A Basic Helix Loop Helix Protein - Building A Functional Insulin Minienhancer Complex. *Genes & Development* 6, 2165-2176.
- Gill,G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes & Development* 17, 2046-2059.
- Gorovoy,M, Niu,J., Bernard,O., Profirovic,J., Minshall,R., Neamu,R., Voyno-Yasenetskaya,T. (2005). LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 28, 26533-26542.
- Govek,EE., Newey,SE., VanAelst,L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 1, 1-49. Review.
- Groll,M., Bajorek,M., Kohler,A., Moroder,L., Rubin,D.M., Huber,R., Glickman,M.H., Finley,D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7, 1062-1067.
- Gungabissoon,RA. & Bamberg,JR. (2003). Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J Histochem Cytochem.* 4, 411-420. Review.
- Hammond,S.M., Caudy,A.A., and Hannon,G.J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics* 2, 110-119.

- Hasebe-Kishi,F., Shimada,Y. (2000). Dynamics of actin and alpha-actinin in nascent myofibrils and stress fibers. *J Muscle Res Cell Motil.* 8, 717-724.
- Hashizume,R., Fukuda,M., Maeda,I., Nishikawa,H., Oyake D., Yabuki,Y., Ogata,H., Ohta,T. (2001). The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem.* 276, 14537-14540.
- Hatfield,PM., Callis,J., Vierstra,RD. (1990). Cloning of ubiquitin activating enzyme from wheat and expression of a functional protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 15265, 15813-1587.
- Hershko,A. (1996). Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* 21, 445-449.
- Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* 67, 425-479.
- Hicke,L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.
- Hicke,L. and Dunn,R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19, 141-172.
- Hilt,W. (2005). Das Ubiquitin-Proteasom-System in Proteinqualitätskontrolle und Regulation. *Biospektrum* 4, 446-449.
- Hiratani,I., Yamamoto,N., Mochizuki,T., Ohmori,S.Y., and Taira,M. (2003). Selective degradation of excess Ldb1 by Rnf12/RLIM confers proper Ldb1 expression levels and Xlim-1/Ldb1 stoichiometry in *Xenopus* organizer functions. *Development* 130, 4161-4175.
- Hobert,O. & Westphal,H. (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends in Genetics* 16, 75-83.
- Hobert,O., Moerman,DG., Clark,KA., Beckerle,MC., Ruvkun,G. (1999). A conserved LIM protein that affects muscular adherens junction integrity and mechanosensory function in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol.* 144, 45-57.
- Hochstrasser,M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-439.
- Hoegge,C., Pfander,B., Moldovan,GL., Pyrowolakis,G., Jentsch,S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.
- Hoogenraad,CC., Akhmanova,A., Galjart,N., DeZeeuw,CI. (2004). LIMK1 and CLIP-115: linking cytoskeletal defects to Williams syndrome. *Bioessays.* 2, 141-150. Review.
- Hoppe,T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci.* 4,183-187.
- Jackson,P.K., Eldridge,A.G., Freed,E., Furstenthal,L., Hsu,J.Y., Kaiser,B.K., and Reimann,J.D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10, 429-439.
- Jentsch,S. (1992). The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* 26, 179-207.
- Joazeiro,C.A.P. and Weissman,A.M. (2000). RING finger proteins: Mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-552.
- Johnson,E.S., Ma,P.C., Ota,I.M., and Varshavsky,A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol. Chem.* 270, 17442-17456.
- Jones,D.O., Cowell,I.G., and Singh,P.B. (2000). Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays* 22, 124-137.
- Jurata,L.W. and Gill,G.N. (1997). Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI. *Molecular and Cellular Biology* 17, 5688-5698.
- Jurata,L.W., Kenny,D.A., and Gill,G.N. (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11693-11698.

- Jurata, L.W., Pfaff, S.L., and Gill, G.N. (1998). The nuclear LIM domain interactor NLI mediates homo- and heterodimerization of LIM domain transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273, 3152-3157.
- Kadmas, J.L. & Beckerle, M.C. (2004). The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 920-931. Review.
- Kaffman, A. and O'Shea, E.K. (1999). Regulation of nuclear localization: A key to a door. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15, 291-339.
- Kania, A., Johnson, R.L., Jessell, T.M. (2000) Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell.* 102, 161-173.
- Khurana, T., Khurana, B., Noegel, A.A. (2002). LIM proteins: association with the actin cytoskeleton. *Protoplasma* 219, 1-12. Review.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 5, 635-644.
- Kramer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M.A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzel, T., and Gottlicher, M. (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *Embo Journal* 22, 3411-3420.
- Labouesse M, Georges-Labouesse E. (2003) Cell adhesion: parallels between vertebrate and invertebrate focal adhesions. *Current Biology.* 13, 528-530. Review.
- Lee, S.K. and Pfaff, S.L. (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat. Neurosci.* 4 Suppl, 1183-1191.
- Lin, L., & Ghosh, S. (1996). A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol Cell Biol* 16, 2248-2254.
- Lin, L., & Kobayashi, M. (2003). Stability of the Rel homology domain is critical for generation of NF-kappa B p50 subunit. *J Biol Chem* 278, 31479-31485.
- Lin, D.Y., Lai, M.Z., Ann, D.K., Shih, H.M. (2003). Promyelocytic leukemia protein (PML) functions as a glucocorticoid receptor co-activator by sequestering Daxx to the PML oncogenic domains (PODs) to enhance its transactivation potential. *J Biol Chem.* 278, 15958-15965.
- Li, H., Witte, D.P., Branford, W.W., Aronow, B.J., Weinstein, M., Kaur, S., Wert, S., Singh, G., Schreiner, C.M., Whitsett, J.A., Scott, W.J., and Potter, S. (1994). Gsh-4 encodes a LIM-type homeodomain, is expressed in the developing central nervous system and is required for early postnatal survival. *EMBO J.* 13, 2876-2885.
- Liu T, DeCostanzo AJ, Liu X, Wang Hy, Hallagan S, Moon RT, Malbon CC. (2001). G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway. *Science* 2921, 718-722
- Lo, H.S., Hu, N., Gere, S., Lu, N., Su, H., Goldstein, A.M., Taylor, P.R., and Lee, M.P. (2002). Identification of somatic mutations of the RNF6 gene in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 62, 4191-4193.
- Lopez, P., Vidal, F., Martin, L., Lopez-Fernandez, L.A., Rual, J.F., Rosen, B.S., Cuzin, F., and Rassoulzadegan, M. (2002). Gene control in germinal differentiation: Rnf6, a transcription regulatory protein in the mouse Sertoli cell. *Molecular and Cellular Biology* 22, 3488-3496.
- Lucero, P., Penalver, E., Vela, L., and Lagunas, R. (2000). Monoubiquitination is sufficient to signal internalization of the maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 182, 241-243.
- Lund, P.K., Moats-Staats, B.M., Simmons, J.G., Hoyt, E., D'Ercole, A.J., Martin, F., Van Wyk, J.J. (1985). Nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding human ubiquitin reveals that ubiquitin is synthesized as a precursor. *J Biol Chem.* 260, 7609-7613.

- Lundquist, E.A., Herman, R.K., Shaw, J.E., Bargmann, C.I. (1998). UNC-115, a conserved protein with predicted LIM and actin-binding domains, mediates axon guidance in *C. elegans*. *Neuron* 21, 385-392.
- Macdonald, D.H.C., Lahiri, D., Sampath, A., Chase, A., Sohal, J., and Cross, N.C.P. (1999). Cloning and characterization of RNF6, a novel RING finger gene mapping to 13q12. *Genomics* 58, 94-97.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999). Signaling from rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898.
- Mann, F., Miranda, E., Weinl, C., Harmer, E., Holt, C.E. (2003). B-type Eph receptors and ephrins induce growth cone collapse through distinct intracellular pathways. *J Neurobiol.* 57, 323-336.
- Matthews, J.M., Visvader, J.E. (2003). LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins. *EMBO Rep.* 12, 1132-1137. Review.
- Matsuzawa, S.I., Reed, J.C. (2001). Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Molecular Cell* 5, 915-926.
- McGrath, J.P., Jentsch, S., Varshavsky, A. (1991). UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *Embo J* 10, 227-236.
- Meberg, P.J., Ono, S., Minamide, L.S., Takahashi, M., Bamburg, J.R. (1998). Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2, 172-190.
- Meek, D.W. and Knippschild, U. (2003). Posttranslational Modification of MDM2. *Mol Cancer Res* 1, 1017-1026.
- Meier, B.C., Price, J.R., Parker, G.E., Bridwell, J.L., and Rhodes, S.J. (1999). Characterization of the porcine Lhx3/LIM-3/P-Lim LIM homeodomain transcription factor. *Mol. Cell Endocrinol.* 147, 65-74.
- Meng, Y.H., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., Lu, W.Y., MacDonald, J.F., Wang, J.Y., Falls, D.L., and Jial, Z.P. (2002). Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35, 121-133.
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Falls, D.L., Jia, Z. (2003). Regulation of spine morphology and synaptic function by LIMK and the actin cytoskeleton. *Rev Neurosci.* 3, 233-240. Review
- Meyer-Lindenberg, A., Mervis, C.B., Sarpal, D., Koch, P., Steele, S., Kohn, P., Marenco, S., Morris, C.A., Das, S., Kippenhan, S., Mattay, V.S., Weinberger, D.R., Berman, K.F. (2005). Functional, structural, and metabolic abnormalities of the hippocampal formation in Williams syndrome. *J Clin Invest.* 115, 1888-1895.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W., et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.
- Milan, M. and Cohen, S.M. (1999). Regulation of LIM homeodomain activity in vivo: A tetramer of dLDB and apterous confers activity and capacity for regulation by dLMO. *Molecular Cell* 4, 267-273.
- Milan, M., Diaz-Benjumea, F.J., and Cohen, S.M. (1998). Beadex encodes an LMO protein that regulates Apterous LIM-homeodomain activity in *Drosophila* wing development: a model for LMO oncogene function. *Genes Dev.* 12, 2912-2920.
- Mitchison, T. & Kirschner, M. (1998). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 9, 761-772. Review.
- Mochizuki, T., Karavanov, A.A., Curtiss, P.E., Ault, K.T., Sugimoto, N., Watabe, T., Shiokawa, K., Jamrich, M., Cho, K.W.Y., Dawid, I.B., and Taira, M. (2000). Xlim-1 and LIM domain binding protein 1 cooperate with various transcription factors in the regulation of the goosecoid promoter. *Developmental Biology* 224, 470-485.

- Morcillo,P., Rosen,C., Baylies,M.K., and Dorsett,D. (1997). Chip, a widely expressed chromosomal protein required for segmentation and activity of a remote wing margin enhancer in *Drosophila*. *Genes Dev.* 11, 2729-2740.
- Morgan,TE., Lockerbie,RO., Minamide,LS., Browning,MD., Bamberg, JR. (1993). Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J Cell Biol.* 122, 623-633.
- Mukhopadhyay,M., Teufel,A., Yamashita,T., Agulnick,A.D., Chen,L., Downs,K.M., Schindler,A., Grinberg,A., Huang,S.P., Dorward,D., and Westphal,H. (2003). Functional ablation of the mouse *Ldb1* gene results in severe patterning defects during gastrulation. *Development* 130, 495-505.
- Muller,S., Matunis,MJ., Dejean,A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* 17, 61-70.
- Muller, JM., Metzger,E., Greschik,H., Bosserhoff,AK., Mercep,L., Buettner,R., Schule,R.(2002). The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *EMBO J* 21, 736-748.
- Nagata,K., Ohashi,K., Yang,N., Mizuno,K. (1999). The N-terminal LIM domain negatively regulates the kinase activity of LIM-kinase 1. *Biochem J.* 343, 99-105.
- Niwa,R., Nagata-OhashiK., Takeichi,M., Mizuno,K., Uemura,T. (2002). Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 108, 233-246.
- O'Keefe,D.D., Thor,S., and Thomas,J.B. (1998). Function and specificity of LIM domains in *Drosophila* nervous system and wing development. *Development* 125, 3915-3923.
- O'Keefe,K., Li,H.P., and Zhang,Y.P. (2003). Nucleocytoplasmic shuttling of p53 is essential for MDM2-mediated cytoplasmic degradation but not ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology* 23, 6396-6405.
- Ohashi,K., Nagata,K., Maekawa,M., Ishizaki,T., Narumiya,S., and Mizuno,K. (2000). Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J. Biol. Chem.* 275, 3577-3582.
- Ohta,T., Michel,JJ., SchotteliusAJ., Xiong,Y. (1999). ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Molecular Cell.* 4, 535-541.
- Ostendorff,H.P., Peirano,R.I., Peters,M.A., Schluter,A., Bossenz,M., Scheffner,M., and Bach,I. (2002). Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature* 416, 99-103.
- Ozkaynak,E., Finley,D., Varshavsky,A. (1984). The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature.* 312, 663-666.
- Palombella,V.J., Rando,O.J., Goldberg,A.L., Maniatis,T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78, 773-785.
- Pashmforoush,M., Pomies,P., Peterson,KL., Kubalak,S., Ross,J .Jr., Hefti,A., Aebi,U., Beckerle,MC., Chien,KR.(2001). Adult mice deficient in actinin-associated LIM-domain protein reveal a developmental pathway for right ventricular cardiomyopathy. *Nat Med.* 7, 591-597.
- Pavalko,FM., Burridge,K. (1991). Disruption of the actin cytoskeleton after microinjection of proteolytic fragments of alpha-actinin. *J Cell Biol.*114, 481-491.
- Perez-Alvarado,GC., Miles,C., Michelsen,JW., Louis,HA., Winge,DR., Beckerle,MC., Summers,MF. (1994). Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP. *Nat Struct Biol.* 6, 388-398.
- Peters,M. (2004). Dissertation. Universität Hamburg.
- Pfaff,SL, Mendelsohn,M., Stewart,CL., Edlund,T., Jessell, TM. (1996). Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell.* 26, 309-320.

- Pickart CM. (1988). Ubiquitin activation and ligation. In Ubiquitin, ed. M.Rechsteiner, 77–100. New York: Plenum
- Pickart,C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. Annual Review of Biochemistry 70, 503-533.
- Pickart,C.M. (2004). Back to the future with ubiquitin. Cell 116, 181-190.
- Pickart,CM., Cohen,RE. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. (2004) Nat Rev Mol Cell Biol. 3, 177-87. Review
- Pinto do,O.P., Kolterud,A., and Carlsson,L. (1998). Expression of the LIM-homeobox gene LH2 generates immortalized steel factor-dependent multipotent hematopoietic precursors. EMBO J. 17, 5744-5756.
- Pirrotta,V. (1998). Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. Cell 93, 333-336.
- Polakis,P. (2002). Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. Current Biology 12, 499-501. Review.
- Pollard,V.W. and Malim,M.H. (1998). The HIV-1 Rev protein. Annual Review of Microbiology 52, 491-532.
- Porter,F.D., Drago,J., Xu,Y., Cheema,S.S., Wassif,C., Huang,S.P., Lee,E., Grinberg,A., Massalas,J.S., Bodine,D., Alt,F., and Westphal,H. (1997). Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. Development 124, 2935-2944.
- Rabbitts,T.H. (1998). LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. Genes & Development 12, 2651-2657.
- Retaux,S. and Bachy,I. (2002). A short history of LIM domains (1993-2002) From protein interaction to degradation. Molecular Neurobiology 26, 269-281.
- Riento,K., Ridley,AJ. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. Nat Rev Mol Cell Biol. 6, 446-456. Review.
- Riethmacher,D, Sonnenberg-Riethmacher,E., Brinkmann,V., Yamaai,T., Lewin,GR., Birchmeier,C. (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. Nature 389, 725-730.
- Riley,BE., Zoghbi,HY., Orr,HT. (2005). SUMOylation of the polyglutamine repeat protein, ataxin-1, is dependent on a functional nuclear localization signal. J Biol Chem. 280, 21942-21948.
- Rodriguez-Esteban,C., Schwabe,J.W., Pena,J.D., Rincon-Limas,D.E., Magallon,J., Botas,J., and Belmonte,J.C. (1998). Lhx2, a vertebrate homologue of apterous, regulates vertebrate limb outgrowth. Development 125, 3925-3934.
- Roovers,K., Klein,E.A., Castagnino,P., and Assoian,R.K. (2003). Nuclear translocation of LIM kinase mediates Rho-Rho kinase regulation of cyclin D1 expression. Developmental Cell 5, 273-284.
- Rose,IA., Warms,JV. (1983). An enzyme with ubiquitin carboxy-terminal esterase activity from reticulocytes. Biochemistry.22, 4234-4237.
- Rosso,S., Bollati,F., Bisbal,M., Peretti,D., Sumi,T., Nakamura,T., Quiroga,S., Ferreira,A., Caceres,A.. (2004). LIMK1 regulates Golgi dynamics, traffic of Golgi-derived vesicles, and process extension in primary cultured neurons. Mol Biol Cell. 7, 3433-3449.
- Rotin,D., Staub,O., Haguenaer-Tsapis,R. (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. J Membr Biol 176, 1-17.
- Ruffner,H., Joazeiro,CA., Hemmati,D., Hunter,T., Verma,IM. (2001). Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. Proc Natl Acad Sci USA 9, 5134-5139.
- Ryan,A.K. and Rosenfeld,M.G. (1997). POU domain family values: Flexibility, partnerships, and developmental codes. Genes & Development 11, 1207-1225.

- Sanchezgarcia,I. and Rabbitts,T.H. (1994). The Lim Domain - A New Structural Motif Found in Zinc-Finger-Like Proteins. *Trends in Genetics* 10, 315-320.
- Scanlan,MJ., Gordan,JD., Williamson,B., Stockert,E., Bander,NH., Jongeneel,V., Gure,AO., Jager,D., Jager,E., Knuth,A., Chen,YT., Old,LJ. (1999). Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 83, 456-464.
- Scheffner,M., Werness,BA., Huibregtse,JM., Levine,AJ., Howley,PM. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 63, 1129-1136.
- Scheffner,M., Huibregtse,J.M., Vierstra,R.D., and Howley,P.M. (1993). The Hpv-16 E6 and E6-Ap Complex Functions As A Ubiquitin-Protein Ligase in the Ubiquitination of P53. *Cell* 75, 495-505.
- Schlesinger,D.H., Goldstein,G., Niall, H.D. (1975). The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* 14, 2214-2218.
- Schlüter,A. (2004). Dissertation. Universität Hamburg.
- Schmeichel,K.L. and Beckerle,M.C. (1994). The Lim Domain Is A Modular Protein-Binding Interface. *Cell* 79, 211-219.
- Sharma,K., Sheng,H.Z., Lettieri,K., Li,H., Karavanov,A., Potter,S., Westphal,H., and Pfaff,S.L. (1998). LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell* 95, 817-828.
- Sharma,K., Leonard,AE., Lettieri,K., Pfaff,SL (2000). Genetic and epigenetic mechanisms contribute to motor neuron pathfinding. *Nature*.406, 515-519.
- Sheng,H.Z., Moriyama,K., Yamashita,T., Li,H., Potter,S.S., Mahon,K.A., and Westphal,H. (1997). Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 278, 1809-1812.
- Sheng,H.Z., Zhadanov,A.B., Mosinger,B., Jr., Fujii,T., Bertuzzi,S., Grinberg,A., Lee,E.J., Huang,S.P., Mahon,K.A., and Westphal,H. (1996). Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3. *Science* 272, 1004-1007.
- Shcherbik,N., Haines,DS. (2004). Ub on the move. *J Cell Biochem*. 93, 11-19.
- Shirasaki,R., Pfaff,SL. (2002). Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu Rev Neurosci*. 25, 251-81. Review
- Soetens,O., De Craene,J.O., Andre,B. (2001). Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J Biol Chem* 276, 43949-43957.
- Sommer,T., & Wolf,D.H. (1997). Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *Faseb J* 11, 1227-1233.
- Song,H. & Poo,M. (2001). The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol*. 3, 81-88.
- Soosairajah,J., Maiti,S., Wiggan,O., Sarmiere,P., Moussi,N., Sarcevic,B., Sampath,R., Bamburg,,JR, Bernard,O. (2005). Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J*. 3, 473-486.
- Spence,J., Sadis,S., Haas,AL., Finley,D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol*. 15, 1265-1273.
- Stanyon,CA. & Bernard,O. (1999). LIM-kinase1. *Int J Biochem Cell Biol*. 31, 389-394. Review.
- Struckhoff,EC. & Lundquist,EA. (2003). The actin-binding protein UNC-115 is an effector of Rac signaling during axon pathfinding in *C. elegans*. *Development* 130, 693-704.
- Sun,ZW., Allis,CD. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104-108.

- Tamanini,F., Yagita,K., Okamura,H., van der Horst,GT. (2005). Nucleocytoplasmic shuttling of clock proteins. *Methods Enzymol.* 393, 418-435.
- Tang,Z., Li,B., Bharadwaj,R., Zhu,H., Ozkan,E., Hakala,K., Deisenhofer,J., Yu,H. (2001). APC2 Cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol. Biol. Cell* 12, 3839-3851.
- Thaler,J.P., Lee,S.K., Jurata,L.W., Gill,G.N., and Pfaff,S.L. (2002). LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions. *Cell* 110, 237-249.
- Thor,S., Andersson,S.G., Tomlinson,A., and Thomas,J.B. (1999). A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. *Nature* 397, 76-80.
- Tiedt,R., Bartholdy,B.A., Matthias,G., Newell,J.W., and Matthias,P. (2001). The RING finger protein Siah-1 regulates the level of the transcriptional coactivator OBF-1. *Embo Journal* 20, 4143-4152.
- Tobias,JW., Varshavsky,A. (1991). Cloning and functional analysis of the ubiquitin-specific protease gene UBP1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 266, 12021-12028.
- Torii,S., Egan,DA., Evans,RA., Reed,JC. (1999). Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J.* 18, 6037-6049.
- Toshima,J., Ohashi,K., Okano,I., Nunoue,K., Kishioka,M., Kuma,K., Miyata,T., Hirai,M., Baba,T., Mizuno,K. (1995). Identification and characterization of a novel protein kinase, TESK1, specifically expressed in testicular germ cells. *J Biol Chem.* 270, 31331-31337.
- Toshima,J., Toshima,JY., Amano,T., Yang,N., Narumiya,S., Mizuno,K. (2001). Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell.*12, 1131-1145.
- Toyama,R., Kobayashi,M., Tomita,T., and Dawid,I.B. (1998). Expression of LIM-domain binding protein (ldb) genes during zebrafish embryogenesis. *Mech. Dev.* 71, 197-200.
- Tsuchida,T., Ensini,M., Morton,SB., Baldassare,M., Edlund,T., Jessell,TM., and Pfaff,S.L. (1994). Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell* 79, 957-97
- Ulrich,H.D., Jentsch, S. (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO J* 19, 3388-3397.
- VanMeyel,D.J., O'Keefe,D.D., Jurata,L.W., Thor,S., Gill,G.N., and Thomas,J.B. (1999). Chip and apterous physically interact to form a functional complex during *Drosophila* development. *Molecular Cell* 4, 259-265.
- VanMeyel,D.J., Thomas,J.B., and Agulnick,A.D. (2003). Ssdp proteins bind to LIM-interacting co-factors and regulate the activity of LIM-homeodomain protein complexes in vivo. *Development* 130, 1915-1925.
- Vatta,M., Mohapatra,B., Jimenez,S., Sanchez,X., Faulkner,G., Perles,Z., Sinagra,G., Lin,JH., Vu,TM., Zhou,Q., Bowles,KR., DiLenarda,A., Schimmenti,L., Fox,M., Chrisco,MA., Murphy,RT., McKenna,W., Elliott,P., Bowles, NE., Chen,J., Valle,G., Towbin,JA.(2003). Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *J Am Coll Cardiol.* 42, 2014-2027.
- Visvader,J.E., Mao,X., Fujiwara,Y., Hahm,K., and Orkin,S.H. (1997). The LIM-domain binding protein Ldb1 and its partner LMO2 act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 13707-13712.
- Visvader,J.E., Venter,D., Hahm,K., Santamaria,M., Sum,E.Y.M., O'Reilly,L., White,D., Williams,R., Armes,J., and Lindeman,G.J. (2001). The LIM domain gene LMO4 inhibits differentiation of mammary epithelial cells in vitro and is overexpressed in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14452-14457.
- Vodermaier,H.C. (2004). APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol* 14, 787-796.

- Wadman, I.A., Osada, H., Grutz, G.G., Agulnick, A.D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16, 3145-3157.
- Warren, A.J., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J., Smith, A.J., and Rabbitts, T.H. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 78, 45-57.
- Weihe, U., Milan, M., Cohen, S.M. (2001). Regulation of Apterous activity in *Drosophila* wing development. *Development*, 4615-4622.
- Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 169-178.
- Welchman, R.L., Gordon, C., Mayer, R.J. (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 599-609. Review.
- Wu, L.C., Wang, Z.W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., Xu, X.L., Yang, M.C., Hwang, L.Y., Bowcock, A.M., Baer, R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet.* 4, 430-440.
- Wu, G., Xu, G., Schulman, B.A., Jeffrey, P.D., Harper, J.W., Pavletich, N.P. (2003). Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Molecular Cell* 6, 1445-1456.
- Xu, Y., Baldassare, M., Fisher, P., Rathbun, G., Oltz, E.M., Yancopoulos, G.D., Jessell, T.M., and Alt, F.W. (1993). LH-2: a LIM/homeodomain gene expressed in developing lymphocytes and neural cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 227-231.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature.* 393, 809-812.
- Yang, N. & Mizuno, K. (1998). Cytoplasmic localization of LIM-kinase 1 is directed by two nuclear export signals within the PDZ domain. *Molecular Biology of the Cell* 9, 186A.
- Yang, N. & Mizuno, K. (1999). Nuclear export of LIM-kinase 1, mediated by two leucine-rich nuclear-export signals within the PDZ domain. *Biochem J.* 338, 793-798.
- Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O., and Itoh, K. (2003). A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7247-7252.
- Zeng, C., Justice, N.J., Abdelilah, S., Chan, Y.M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1998). The *Drosophila* LIM-only gene, dLMO, is mutated in Beadex alleles and might represent an evolutionarily conserved function in appendage development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 10637-10642.
- Zhao, Y., Sheng, H.Z., Amini, R., Grinberg, A., Lee, E., Huang, S., Taira, M., and Westphal, H. (1999). Control of hippocampal morphogenesis and neuronal differentiation by the LIM homeobox gene Lhx5. *Science* 284, 1155-1158.
- Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., et al. (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F box Skp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703-709.
- Zhu, T.H., Bodem, J., Keppel, E., Paro, R., and Royer-Pokora, B. (1995). A single ancestral gene of the human LIM domain oncogene family LMO in *Drosophila*: characterization of the *Drosophila* Dlmo gene. *Oncogene* 11, 1283-1290.
- Zhong, S., Salomon, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., Pandolfi, P.P. (2000). Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med.* 191, 631-640.
- Zhou, Q., Ruiz-Lozano, P., Martone, M.E., Chen, J. (1999). Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C. *J Biol Chem.* 274, 19807-19813.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz besonders PD Dr. Ingolf Bach danken, der mir das Thema dieser Doktorarbeit zur Verfügung gestellt hat. Vor allem möchte ich ihm für die sehr angenehme Betreuung und die freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Seine ständige Diskussionsbereitschaft, nicht nur in Bezug auf wissenschaftliche Daten, war mir eine große Hilfe und ermöglichte mir, den Beruf des Wissenschaftlers auch aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten.

Frau Prof. Dr. Elke Pratje möchte ich ganz herzlich für ihre Bereitschaft danken, die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen. Darüber hinaus danke ich ihr für die vielen Gespräche und Ratschläge, die mir bei meinen Entscheidungsfindungen immer eine große Hilfe waren.

Allen Mitarbeitern der AG-Bach danke ich für die tolle Zusammenarbeit und für die einmalige Arbeitsatmosphäre! Ein besonderer Dank gilt Micky und Birte, die mich bei vielen Projekten tatkräftig unterstützt haben. Birte möchte ich ganz besonders dafür danken, dass sie sich des Yeast-Two-Hybrid-Systems angenommen hat, dessen Ergebnisse in dieser Arbeit leider keinen Platz gefunden haben. Dem Kollegen und Freund Alexander danke ich für die Gesellschaft im Labor zu später Stunde und die vielen Lachkrämpfe. Marvin danke ich für seine enorme Hilfsbereitschaft und seine ehrlichen Kritiken. Meiner Kollegin Anne möchte ich nicht nur für ihre Beharrlichkeit danken, wodurch das RNF6-Projekt erst ins Leben gerufen wurde, sondern auch für die lebhaften und amüsanten Diskussionen. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Steve, der mich stets mit wichtigen wissenschaftlichen Informationen versorgt hat und den ich für seine unbeschwerte Art sehr schätze. Bei Cenap möchte ich mich für eine weitere Steigerung des Unterhaltungswertes unserer Gruppe bedanken und bei Kerstin für die vielen fröhlichen Momente und das immunhistochemische Know How. Michi und Heather danke ich für die freundliche und heitere Zusammenarbeit sowie für die aufregenden Erlebnisse in und außerhalb des Labors.

Allen Mitarbeitern der Forschergruppen des ZMNH danke ich für die vielen netten Momente und den Austausch von Informationen jeglicher Art in unserer gemeinsamen Küche.

Ein besonderer Dank gilt dem *Boehringer Ingelheim Fonds*. Durch hervorragend organisierte Veranstaltungen konnte ich viele neue Bekanntschaften mit anderen Stipendiaten knüpfen. Der rege Austausch war und ist eine Bereicherung für meinen wissenschaftlichen Werdegang.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich dafür, dass sie mich stets liebevoll daran erinnern, wie wichtig die eigene Familie ist. Sie hat mir den Willen und die Motivation gegeben, diesen Weg zu gehen.

Julia möchte ich für ihre Geduld, Opferbereitschaft und nicht zuletzt für ihre Liebe danken, aus der ich die Kraft schöpfe, die ich für diese Phase meines Lebens brauche.

Publikationsliste

Tursun,B., Schluter,A., Peters,MA., Viehweger,B., Ostendorff,HP., Soosairajah,J., Drung,A., Bossenz,M., Johnsen,S.A., Schweizer,M., Bernard,O., Bach,I.
The ubiquitin ligase Rnf6 regulates local LIM kinase 1 levels in axonal growth cones.
Genes Dev. 2005 Oct 1;19(19):2307-19.

Heather,P.O.* , **Tursun,B.***, Cornils,K., Schlüter,A., Drung,A., Bach,I.
Expression of LIM domain-binding cofactors in the developing murine neural tube.
Dev Dyn. im Druck.

Michaelis,G., Esser,K., **Tursun,B.**, Stohn,JP., Hanson,S., Pratje,E.
Mitochondrial signal peptidases of yeast: the rhomboid peptidase Pcp1 and its substrate cytochrome C peroxidase.
Gene. 2005 Jul 18;354:58-63

Becker,T., Bossenz,M., **Tursun,B.**, Schluter,A., Peters,M.A., Becker,C.G., Ostendorff,H.P., Bach I.
Comparing protein stabilities during zebrafish embryogenesis.
Methods Cell Sci. 2003;25(1-2):85-9

Esser,K., **Tursun,B.**, Ingenhoven,M., Michaelis,G., Pratje,E.
A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1.
J Mol Biol. 2002 Nov 8;323(5):835-43.

* Co-Erstautoren