



Universität Hamburg

Department Biologie



**Untersuchungen zur Interaktion
zwischen dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM und
dem multiple PDZ-Domänen-enthaltenden Protein
MUPP1 im Nervensystem der Maus
(*Mus musculus*, Linné 1758)**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rerum naturalium

des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von Daniel Novak

Hamburg, Januar 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. M. SCHACHNER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 27. Februar 2009

Hamburg, den 13. Februar 2009



Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

1.	Einleitung	1
1.1	Zelladhäsion.....	1
1.2	Zelladhäsionsmoleküle.....	1
1.3	<u>Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM</u>	2
1.3.1	Die Struktur von NCAM.....	2
1.3.2	Expression von NCAM.....	4
1.3.3	Funktionen von NCAM.....	5
1.3.4	Intrazelluläre Bindungspartner von NCAM.....	9
1.3.5	Beeinflussung von Kaliumkanälen durch NCAM.....	9
1.4	<u>PDZ-Domänen-Proteine</u>	10
1.4.1	Aufbau von PDZ-Domänen.....	10
1.4.2	Bindungseigenschaften von PDZ-Domänen.....	13
1.4.3	Funktionen von PDZ-Domänen-Proteinen.....	16
1.5	<u>Das multiple PDZ-Domänen-enhaltende Protein MUPP1</u>	18
1.5.1	Aufbau von MUPP1.....	18
1.5.2	Expression von MUPP1.....	19
1.5.3	Interaktionspartner von MUPP1.....	20
1.6	<u>Einwärtsgerichtete K⁺ Kanäle (Kir)</u>	25
1.6.1	Einwärtsgerichtete K ⁺ Kanäle im Allgemeinen.....	25
1.6.2	G-Protein-aktivierte, einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (Kir3).....	26
1.6.3	Intrazellulärer Transport von Kir3-Kanälen.....	28
1.7	Ziel der Arbeit.....	30
 2.	 Material	 31
2.1	<u>Lösungen, Puffer und Medien</u>	31
2.1.1	Lösungen und Puffer.....	31
2.1.2	Nähr- und Zellkulturmedien.....	35
2.2	Chemikalien.....	36
2.3	Enzyme, Reagenzien und DNA- bzw. Protein-Größenstandards.....	36
2.4	Kits.....	36
2.5	Vektoren.....	37
2.6	Bakterienstämme und Zelllinien.....	37
2.7	Primäre Antikörper.....	38
2.8	Sekundäre Antikörper.....	40
2.9	Computergestützte Sequenzanalysen.....	40
 3.	 Methoden	 41
3.1	<u>Molekularbiologische Techniken</u>	41
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	41
3.1.2	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	41
3.1.3	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	42

3.1.4	Ligation von DNA.....	42
3.1.5	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	43
3.1.6	Transformation von Bakterien.....	43
3.1.7	Plasmidisolierung aus 3 ml <i>E.coli</i> -Bakterienkulturen.....	43
3.1.8	Plasmidisolierung aus 200 ml <i>E.coli</i> -Bakterienkulturen.....	44
3.1.9	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren.....	44
3.1.10	Herstellung eines Glycerin- <i>Stocks</i> zur Langzeitlagerung von Bakterienkulturen.....	44
3.1.11	Gelelektrophorese von DNA.....	45
3.1.12	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	45
3.1.13	DNA-Reinheitsanalyse und -Konzentrationsbestimmung.....	45
3.1.14	DNA-Sequenzanalyse.....	46
<u>3.2</u>	<u>Proteinbiochemische Techniken.....</u>	<u>46</u>
3.2.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit dem <i>bicinchoninic acid</i> (BCA)-Test.....	46
3.2.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	46
3.2.3	Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	47
3.2.4	<i>Western Blot</i> -Analyse.....	47
3.2.5	Strippen einer Nitrocellulosemembran.....	47
3.2.6	Rekombinante Expression His-markierter Proteine mit dem pQE-System in <i>E.coli</i> und deren Aufreinigung.....	48
3.2.7	Rekombinante Expression GST-markierter Proteine mit dem pGEX-System in <i>E.coli</i> und deren Aufreinigung.....	48
3.2.8	Direkter Bindungstest mit Hilfe eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , ELISA).....	49
<u>3.3</u>	<u>Zellbiologische Techniken.....</u>	<u>50</u>
3.3.1	Auftauen von Zellen.....	50
3.3.2	Kultivierung von CHO-Zellen.....	50
3.3.3	Kultivierung von HEK-Zellen.....	50
3.3.4	Kultivierung von N2A-Zellen.....	51
3.3.5	Langzeitlagerung von Zelllinien.....	51
3.3.6	Transfektion von Zellen mit Lipofectamin.....	51
3.3.7	Transfektion von Zellen mit MATRa.....	52
3.3.8	Transfektion von Zellen mit FuGENE 6.....	52
3.3.9	Ernte und Lyse der transfizierten Zellen.....	53
3.3.10	Zelloberflächenbiotinylierung transient transfizierter CHO-Zellen.....	53
3.3.11	Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin.....	54
3.3.12	Einzelzellkulturen hippocampaler Neurone.....	54
3.3.13	Transfektion hippocampaler Neurone.....	54
3.3.14	Lebendfärbung hippocampaler Neurone.....	54
3.3.15	Immunzytochemie fixierter hippocampaler Neurone.....	55
3.3.16	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	55

4.	Ergebnisse	56
4.1	Klonierung der GST-MUPP-Fusionskonstrukte.....	56
4.2	Nachweis der direkten Interaktion von MUPP1 und NCAM.....	57
4.2.1	Direkte Bindung von GST-MUPP1-Fusionsproteinen an die intrazelluläre Domäne von NCAM180.....	57
4.2.2	Direkte Bindung von GST-MUPP1-Fusionsproteinen an die intrazelluläre Domäne von NCAM140.....	59
4.3	ELISA mit verschiedenen Chargen GST-MUPP-PDZ 3-4 zur Klärung der Frage, ob die Interaktionen mit den intrazellulären Domänen von NCAM140 und 180 spezifisch sind.....	60
4.4	Ist die Aminosäuresequenz ESKA am C-Terminus von NCAM an der MUPP1-Bindung beteiligt?	61
4.5	Bindung einzelner PDZ-Domänen von MUPP1 an His-NCAM180 ID.....	63
4.6	ELISA mit GST-MUPP-Fusionsproteinen von einzelnen PDZ-Domänen und His-NCAM140 ID Δ N.....	64
4.7	ELISA mit GST-MUPP-Fusionsproteinen von einzelnen PDZ-Domänen und His-Kir3.2 C-Terminus (CT).....	66
4.8	Beeinflussung der Oberflächenlokalisierung neuronaler Kir3.1/3.2-Kanäle durch MUPP1.....	68
4.8.1	Analyse mittels Zelloberflächenbiotinylierungsexperimenten nach Co-Expression von Kir3.1/3.2, NCAM und EGFP-MUPP1-Fusionskonstrukten.....	68
4.8.2	Analyse der Oberflächenlokalisierung neuronaler Kir3.1/3.2-Kanäle mittels immunzytochemischer Färbung hippocampaler Neurone nach Co-Transfektion mit Kir3.1/3.2 und EGFP-MUPP1-Fusionskonstrukten.....	71
4.9	Beeinflussung der Oberflächenlokalisierung von NCAM140 durch MUPP1.....	74
4.10	Einfluss von MUPP1 auf die NCAM-Menge in transient transfizierten HEK-Zellen.....	76
5.	Diskussion	80
5.1	Die direkte Interaktion von NCAM140 und NCAM180 mit MUPP1.....	80
5.2	Die Bedeutung von MUPP1 für die NCAM-abhängige Oberflächenlokalisierung von Kir3.1/3.2.....	88
5.3	Der Effekt der Co-Expression von MUPP1 und NCAM auf das Proteinniveau von NCAM.....	97
5.4	Zusammenfassende Überlegungen und Ausblick.....	99
6.	Zusammenfassung	101
7.	Literaturverzeichnis	104
8.	Anhang	124

1. Einleitung

1.1 Zelladhäsion

Eine Grundvoraussetzung für die strukturelle Integrität von Geweben und Organen, und damit letztlich für die Existenz mehrzelliger Organismen, ist die Zelladhäsion. Zelladhäsion bezeichnet den über Zelladhäsionsmoleküle vermittelten Kontakt sowohl zwischen benachbarten Zellen (Zell-Zell-Adhäsion) als auch zwischen Zellen und Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) (Zell-Matrix-Adhäsion). Diese Kontakte sind von essentieller Bedeutung für den korrekten Ablauf diverser Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen sowie deren Aggregation. In adulten Organismen beruhen viele physiologische Abläufe wie Wundheilung und Wanderung weißer Blutzellen, aber auch pathologische Vorgänge wie Tumorentstehung und –wachstum sowie Metastasierung auf der dynamischen Ausbildung und Lösung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten (Ruoslahti und Öbrink, 1996).

Zell-Zell-Adhäsionsvorgänge vermitteln die Zellaggregation sowie die Loslösung einzelner Zellen oder größerer Zellgruppen aus einem Zellverband (Segregation und Dispersion) während der Histogenese. Zell-Matrix-Interaktionen sind von Bedeutung für die Migration von Zellen. Die räumlich und zeitlich differentiell regulierte Expression von Adhäsionsmolekülen trägt zum normalen Ablauf morphogenetischer Vorgänge bei.

Zelladhäsionsmoleküle sind in der Lage, Signale aus dem sie umgebenden extrazellulären Milieu aufzunehmen und in die Zelle zu übertragen. Man spricht in diesem Zusammenhang von sogenannten Adhäsionsrezeptoren. Diese Signale beeinflussen zentrale Vorgänge in der Zelle wie z.B. Genexpression, Zellzyklus und Apoptose (Aplin et al., 1998).

1.2 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle sind in der Regel transmembrane Glykoproteine. In einigen Fällen sind sie aber auch nur über einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker in der Membran verankert. Generell kann man Ca^{2+} -abhängige und –unabhängige Adhäsionsmoleküle unterscheiden. Ca^{2+} -abhängige Adhäsionsmoleküle sind im Wesentlichen für die gewebespezifische Zell-Zell-Adhäsion zuständig.

Auf der Basis struktureller Merkmale unterscheidet man vier Hauptgruppen von Zelladhäsionsmolekülen: Cadherine, Integrine, Selektine und die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) (Aplin et al., 1998).

Cadherine sind Typ-I transmembrane Glykoproteine, die starke Ca^{2+} -abhängige Zell-Zell-Adhäsion über homophile Bindung vermitteln. Homophil bedeutet, dass zwei gleichartige Moleküle miteinander interagieren, wohingegen der Begriff heterophil ausdrückt, dass verschiedenartige Moleküle aneinander binden. Man unterscheidet die E-(epithelialen)-Cadherine, die N-(neuronalen und neuroendokrinen)-Cadherine, die P-(plazentalen) und die R-(retinalen)-Cadherine (Takeichi, 1995), je nachdem in welchen Geweben sie exprimiert werden.

Die Integrine sind transmembrane, heterodimere Glykoproteine, die involviert sind in Zell-Matrix- als auch Zell-Zell-Adhäsionsvorgänge. Durch die Kombination verschiedener α -mit unterschiedlichen β -Untereinheiten entsteht eine Vielzahl diverser Varianten (Juliano, 2002). Die Gruppe der Selektine umfasst die drei Mitglieder E-(Endothel)-, L-(Leukocyten)- und P-(Plättchen)-Selektin, die ausschließlich auf Endothel- und Blutzellen zu finden sind (Lasky, 1995; Rosen und Bertozzi, 1994; Springer, 1994). Sie binden mit ihrer extrazellulären Lektindomäne Ca^{2+} -abhängig an einen Bestandteil ihrer Liganden, das sogenannte Sialyl-Lewis_x-Tetrasaccharid (Erbe et al., 1993; Foxall et al., 1992).

Im Blickpunkt der vorliegenden Arbeit stand mit dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, weshalb diese Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen im Folgenden etwas detaillierter dargestellt werden soll.

1.3 Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM

1.3.1 Die Struktur von NCAM

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM (*neural cell adhesion molecule*) ist ein Protein aus der Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle. Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch eine variable Anzahl an Ig-ähnlichen Domänen im extrazellulären Teil aus. NCAM hat fünf Ig-ähnliche Domänen und zwei Fibronectin-Typ-(III)-Domänen. Das letztgenannte Motiv wurde erstmals in Fibronectin, einem Protein der extrazellulären Matrix gefunden (Kornblihtt et al., 1985). Es konnte später jedoch auch in

weiteren EZM-Molekülen nachgewiesen werden (Engel, 1991). Fibronectin-Typ-(III)-Domänen vermitteln Interaktionen zwischen Zellen und der EZM (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987) und haben verschiedene Funktionen, u. a. fördern sie das Neuritenwachstum (Dorries et al., 1996; Xiao et al., 1996).

NCAM war das erste Zelladhäsionsmolekül der Ig-Superfamilie, das isoliert und genauer untersucht wurde (Brackenbury et al., 1977; Cunningham et al., 1987; Hoffman et al., 1982). Durch alternatives Spleißen eines Primärtranskripts werden insgesamt 27 verschiedene NCAM-Isoformen generiert. Entsprechend ihrer molekularen Massen von 120, 140 und 180 kDa werden die drei Hauptisoformen NCAM120, NCAM140 und NCAM180 genannt (Cunningham et al., 1987). Der extrazelluläre Abschnitt (extrazelluläre Domäne, ED) ist bei allen drei Formen identisch. Strukturell verschieden sind die Membranverankerung bzw. der intrazelluläre Anteil. Bei NCAM140 und 180 handelt es sich um Transmembranproteine mit zytoplasmatischen Domänen. Der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Isoformen ist ein 261 Aminosäuren langes Fragment, das in die intrazelluläre Domäne (ID) von NCAM180 eingefügt ist (Abb. 1). Das zusätzliche Fragment wird von Exon 18 des NCAM-Gens kodiert. NCAM120 besitzt keinen intrazellulären Anteil. Es ist über einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker in der äußeren Seite der Plasmamembran verankert.

Neben den membrangebundenen Isoformen gibt es noch lösliche Varianten von NCAM, deren Entstehung auf drei unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen ist. Matrix-Metalloproteinasen können die extrazelluläre Domäne in Membrannähe schneiden und so ein lösliches Fragment erzeugen (Hubschmann et al. 2005; Kalus et al., 2006). Alternativ kann die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) den GPI-Anker von NCAM120 spalten (He et al., 1987). Darüber hinaus kann auch alternatives Spleißen eine sezernierte Isoform hervorbringen (Bock et al., 1987; Gower et al., 1988).

Homologe Moleküle, die NCAM sowohl in struktureller als auch funktioneller Hinsicht ähneln, sind in Nagetieren, Huhn und Mensch identifiziert worden. Auch Fasciclin II (FasII) aus *Drosophila* und apCAM aus *Aplysia* sind potentielle Homologe zu NCAM (Brümmendorf und Rathjen, 1994).

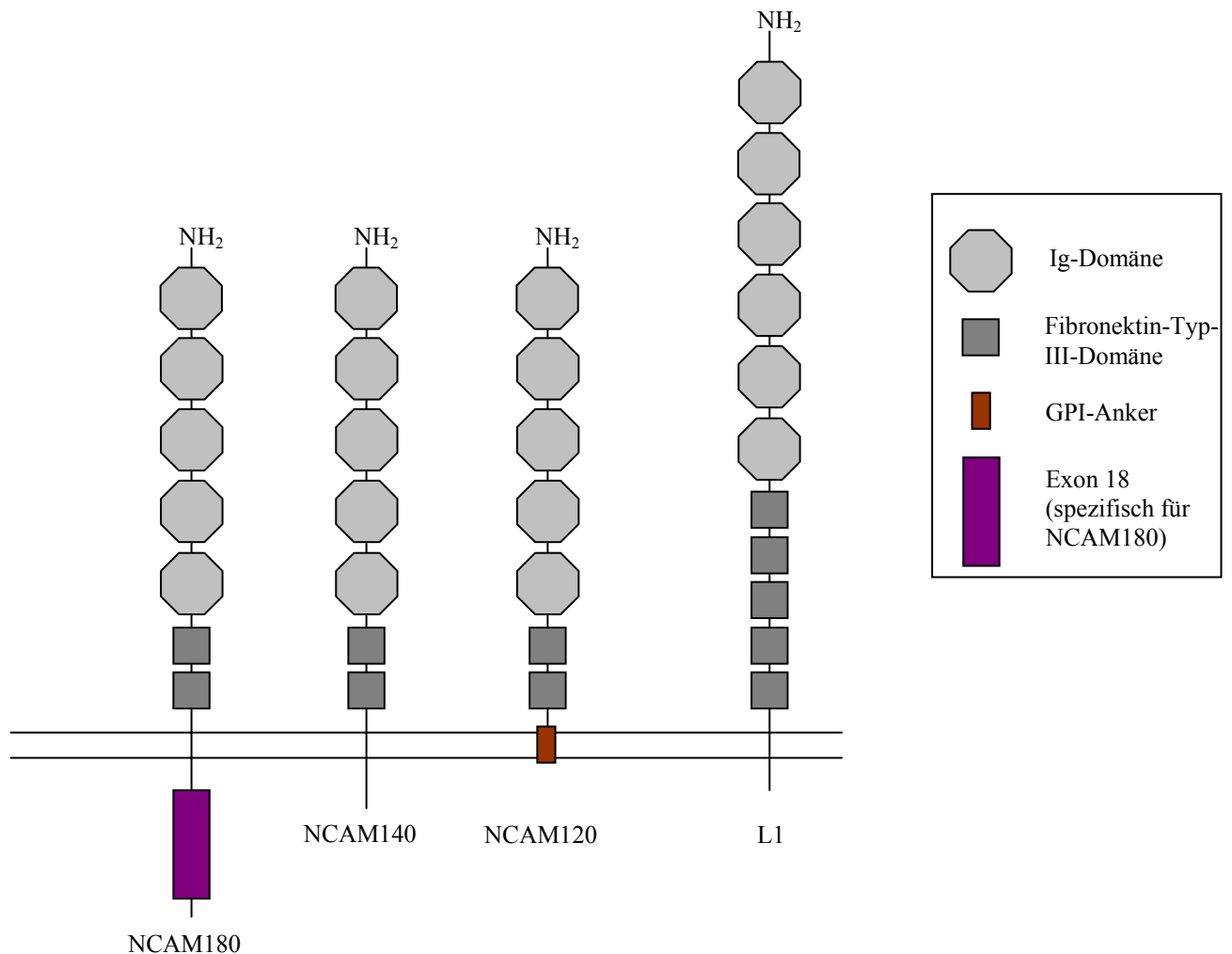


Abbildung 1: Beispiele für Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie.

1.3.2 Expression von NCAM

NCAM wird nicht nur im Nervensystem exprimiert, sondern auch in der Lunge, Teilen des Verdauungstrakts, den Nieren (Filiz et al., 2002), dem Herzen (Burroughs et al., 1991), der Leber, der Bauchspeicheldrüse (Kolkova, 2008) und in der Skelettmuskulatur (Fidzianska und Kaminska, 1995). Natürliche Killerzellen werden in zwei Untergruppen eingeteilt, je nachdem ob sie NCAM exprimieren oder nicht (Carson und Caligiuri, 1996; Farag und Caligiuri, 2006). Wie der Name bereits andeutet, kommt NCAM in besonders großen Mengen im Nervensystem vor. Die Expression der unterschiedlichen Isoformen ist

nicht nur zeitlich, sondern auch in ihrer Zelltypspezifität differentiell reguliert (Jorgensen, 1995). NCAM120 ist die vorherrschende Isoform in Gliazellen (Keilhauer et al., 1985) und sensorischen Neuronen der Spinalganglien (Rosen et al., 1992). NCAM140 und 180 werden in neuronalen Zellen exprimiert (Keilhauer et al., 1985). NCAM140 ist dabei in prä- und postsynaptischen Membranen nachweisbar. NCAM180 sammelt sich vornehmlich in postsynaptischen Dichten reifer Neurone an (Persohn et al., 1989; Pollerberg et al., 1985). Die Biosynthese von NCAM140 und 180 nimmt mit steigendem Alter ab. Im Gegensatz dazu nimmt die Expression von NCAM120 und anderen hochmolekularen NCAM-Isoformen deutlich zu (Lyles et al., 1984; Hansen et al., 1985; Linnemann et al., 1993).

1.3.3 Funktionen von NCAM

Die extrazelluläre Domäne von NCAM vermittelt Ca^{2+} -unabhängige Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen. Diese spielen bei der Proliferation, der Zellmigration, dem Neuritenwachstum, der Axonbündelung und bei der Ausbildung von synaptischen Kontakten eine wichtige Rolle (Cremer et al., 1997a; Doherty et al., 1990; Doherty and Walsh, 1992; Fields and Itoh, 1996; Jorgensen, 1995; Schachner, 1991; Sporns et al., 1995). NCAM kann sowohl homophile als auch heterophile Wechselwirkungen eingehen. Heterophile Interaktionen sind mit verschiedenen Partnern möglich. NCAM bindet an Heparin, eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix (Cole et al., 1986a; Cole et al., 1986b; Cole and Glaser, 1986), die Heparansulfatproteoglykane Agrin (Storms et al., 1996a) und Kollagen XVIII (Storms et al., 1996b) sowie die Chondroitinsulfatproteoglykane Neurocan (Storms und Rutishauser, 1998) und Phosphacan (Grumet et al., 1993). Außerdem bindet NCAM Kollagen I-VI und IX (Probstmeier et al., 1989). NCAM kann mit L1, einem anderen Zelladhäsionsmolekül der Ig-Superfamilie, heterophil in *cis* interagieren. „*Cis*“ bedeutet, dass die interagierenden Moleküle auf derselben Zelle lokalisiert sind. Befinden sich die interagierenden Moleküle auf benachbarten Zellen, spricht man von *trans*-Interaktion. Die *cis*-Interaktion zwischen NCAM und L1 verstärkt die homophile *trans*-Interaktion von L1 (*assisted homophilic binding*) (Kadmon et al., 1990a; Kadmon et al., 1990b) und bewirkt dessen Phosphorylierung (Heiland et al., 1998). Paratcha et al. (2003) zeigten, dass NCAM140 als Rezeptor für verschiedene Mitglieder der GDNF-(*glial cell line-derived neurotrophic*

factor)-Liganden-Familie (GFL) dient. GFLs sind essentiell für die Entwicklung und Erhaltung bestimmter Gruppen zentraler und peripherer Neurone. Die Bindung von GDNF an NCAM fördert das Neuritenwachstum (Paratcha et al., 2003), die Synaptogenese hippocampaler Neurone (Ledda et al., 2007), die Migration neuronaler Vorläuferzellen im sogenannten *rostral migratory stream* (Paratcha et al., 2003 und 2006) und reguliert die Migration und Funktion von Schwannschen Zellen (Paratcha et al., 2003; Iwase et al., 2005). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass NCAM140 *cis*-Interaktionen mit Vertretern der GDNF-Rezeptor-Familie α (GFR α) eingehen kann. Die Bindung von GFR α s an NCAM140 erhöht dessen Affinität für GFLs und schwächt die homophile NCAM-NCAM-Interaktion (Paratcha et al., 2003). Des Weiteren bindet die extrazelluläre Domäne von NCAM noch an das Prionprotein (Schmitt-Ulms et al., 2001) und TAG-1, ein Zelladhäsionsmolekül aus der Ig-Superfamilie (Milev et al., 1996).

Es ist schon länger bekannt, dass das unglykosylierte Rückgrat von NCAM und sogar einzelne Domänen Funktionen bei der Zellerkennung übernehmen können. Werden die erste und zweite Ig-Domäne *in vitro* als Substrat angeboten, so bewirken sie die Adhäsion neuronaler Zellen. Die erste, zweite und vierte Ig-Domäne sind in die Migration von Zellen aus Kleinhirnexplantaten involviert. Neuritenwachstum wird durch die erste bis fünfte Ig-Domäne sowie durch die zweite Fibronectin-Typ-(III)-Domäne stimuliert (Probstmeier et al., 1989).

NCAM erfährt diverse posttranslationale Modifikationen. Serin- und Threoninreste werden phosphoryliert, einige Cysteine der intrazellulären Domäne werden palmitoyliert und die ED wird an verschiedenen Stellen glykosyliert. NCAM besitzt sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen, die allesamt glykosyliert werden (Albach et al., 2004). Nur GPI-verankertes NCAM aus Skelettmuskel wird zusätzlich an einer Stelle O-glykosyliert (Walsh et al., 1989). Eine Besonderheit ist, dass NCAM als einziges Wirbeltierprotein durch Anhängen von Polysialinsäure-(PSA)-Ketten modifiziert wird. Es handelt sich hierbei um ein lineares α -2,8-verknüpftes Polymer aus bis zu 200 Sialinsäure-Resten, das bei allen NCAM-Isoformen an die fünfte Ig-Domäne angehängt werden kann (Schachner und Martini, 1995). Im Hippocampus wird nur NCAM180 auf diese Weise modifiziert (Doyle et al., 1992). Im Embryonalstadium macht PSA ca. 30 %, in adulten Hirnen jedoch nur noch ca. 10 % des Gewichtes von NCAM aus (Rothbard et al., 1982). Das PSA-Epitop modifiziert die Eigenschaften des NCAM-Proteinrückgrats bei neuraler Migration, der axonalen Wegfindung und synaptischer Plastizität und spielt auf diese Weise eine Rolle bei regenerativen Prozessen und der synaptischen Reorganisation (Angata et al., 2004;

Becker et al., 1996; Doherty et al., 1995; Eckhardt et al., 2000; Muller et al., 1996; Regan und Fox, 1995; Weinhold et al., 2005). Zudem vermindert PSA die adhäsiven Eigenschaften von NCAM und verstärkt NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum (Rutishauser, 1990). Möglicherweise vermindert PSA die homophile NCAM-Wechselwirkung aufgrund seiner starken negativen Ladung und seines großen Hydratationsvolumens (Johnson et al., 2005).

Bemerkenswert ist ebenfalls, dass NCAM das sogenannte *human natural killer-1*-Epitop (HNK-1) trägt. Es handelt sich um ein Kohlenhydrat mit terminalem 3-Sulfoglukuronylrest (Chou et al., 1985). Die Modifikation von NCAM mit HNK-1 ist zelltypspezifisch, da nur NCAM180 und NCAM140 im Gehirn dieses Epitop tragen (Kruse et al., 1984). HNK-1 spielt eventuell eine Rolle bei der Neuron-Gliazell-Adhäsion (Keilhauer et al., 1985).

NCAM-defiziente Mäuse (*Ncam*^{-/-}) zeigen einen relativ milden Phänotyp (Cremer et al., 1994; Cremer et al., 1997). Es fällt auf, dass der olfaktorische Bulbus bei *Ncam*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp stark verkleinert ist. Dies liegt wahrscheinlich an verminderter Migration von Zellen in diese Region. Ähnliche Beobachtungen konnten für NCAM180-defiziente Mäuse (Tomasiewicz et al., 1993) und für Wildtypmäuse, bei denen durch Behandlung mit Endoneuraminidase N NCAM-assoziiertes PSA entfernt wurde (Ono et al., 1994), gemacht werden. Ferner scheint NCAM eine Rolle beim axonalen Wachstum und der axonalen Wegfindung zu spielen (Cremer et al., 1997). *Ncam*^{-/-}-Mäuse haben deutliche Defizite im räumlichen Lernen („*Morris water maze*“-Test) (Cremer et al., 1994). Die geringere Moosfaserdichte im Hippocampus könnte eine Erklärung für diese Tatsache sein (Cremer et al., 1997). Männliche *Ncam*^{-/-}-Mäuse zeigen zusätzlich ein deutlich aggressiveres Verhalten und leicht verminderte Explorationsaktivität (Cremer et al., 1994; Stork et al., 1997).

Komplexe Prozesse wie synaptische Plastizität oder Neuritenwachstum erfordern eine Weiterleitung von Signalen in die Zelle. NCAM fungiert bei homophilen und heterophilen Interaktionen entweder als Ligand oder Rezeptor. Am besten untersucht sind die Signaltransduktionsvorgänge, die beim NCAM-vermittelten Neuritenwachstum ablaufen (Crossin und Krushel, 2000). Alle drei NCAM-Isoformen sind aufgrund der identischen extrazellulären Domäne in der Lage, das Neuritenwachstum zu stimulieren (Doherty et al., 1989; Doherty et al., 1990). Homophile oder heterophile Interaktionen mit Molekülen auf benachbarten Zellen oder in der ECM lösen NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum aus (Crossin und Krushel, 2000). Dieses wird durch Inhibitoren von Rezeptortyrosinkinasen

gehemmt. Daraus folgerten Williams und Mitarbeiter, dass NCAM-induziertes Neuritenwachstum ausschließlich über den Fibroblastenwachstumsfaktor-(FGF)-Rezeptor vermittelt wird (Williams et al., 1994a; Williams et al., 1994b; Williams et al., 1995). Dieser Theorie zufolge bewirkt NCAM auf noch unbekannte Weise die Dimerisierung und Autophosphorylierung des FGF-Rezeptors. Dies wiederum löst eine Signalkaskade unter Beteiligung der Phospholipase C γ aus. Die von Williams et al. aufgestellte Hypothese wurde schon bald durch eine neue Beobachtung entkräftet. Es konnte gezeigt werden, dass das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum von Neuronen, die die zytoplasmatische Tyrosinkinase fyn nicht exprimieren, gehemmt ist (Beggs et al., 1994). Später wurde durch Co-Immünpräzipitation belegt, dass fyn ausschließlich mit NCAM140 assoziiert ist (Beggs et al., 1997). Die Rezeptorproteintyrosinphosphatase RPTP α vermittelt die Assoziation zwischen NCAM140 und fyn, indem sie beide Proteine bindet und räumlich zusammenführt. NCAM induziert daraufhin die Dephosphorylierung und damit Aktivierung von fyn durch RPTP α (Bodrikov et al., 2005). Im Anschluss daran aktiviert fyn die Fokal-Adhäsions-Kinase (FAK) (Beggs et al., 1997). Diese Signalkaskade mündet in den MAP-(*mitogen-activated protein*)-Kinaseweg, was zu einer Aktivierung der beiden Proteinkinasen ERK1 und ERK2 (ERK: *extracellular-signal regulated kinase*) führt (Schmid et al., 1999). In PC12-Zellen wurde gezeigt, dass der FGF-Rezeptor- und der fyn-FAK-Signaltransduktionsweg am NCAM-vermittelten Neuritenwachstum beteiligt sind (Kolkova et al., 2000a).

NCAM kann ebenfalls als alternativer Rezeptor für die Mitglieder der GDNF-Liganden-Familie (GFL) fungieren. In Abwesenheit von GFR α bindet GDNF nur mit sehr geringer Affinität an NCAM. Assoziieren NCAM und GFR α , bindet GDNF mit hoher Affinität an NCAM und löst eine Signaltransduktionskaskade über fyn und FAK aus (Paratcha et al., 2003).

In Kulturen von Astrozyten und Cerebellumneuronen folgt auf die Stimulation durch NCAM die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und damit eine Erhöhung der NF κ B-abhängigen Transkription (Krushel et al., 1999). NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum und die Aktivierung von NF κ B können teilweise durch Überexpression der ID von NCAM gehemmt werden (Kolkova et al., 2000b; Little et al., 2001). Daraus lässt sich schließen, dass es intrazelluläre Bindungspartner für NCAM geben muss, die an der Vermittlung des Neuritenwachstums und der Aktivierung von NF κ B direkt beteiligt sind. Es ist daher ein wichtiges Anliegen, intrazelluläre Interaktionspartner für NCAM zu identifizieren und zu charakterisieren.

1.3.4 Intrazelluläre Bindungspartner von NCAM

Die intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 interagieren mit einer Vielzahl von Proteinen. Der erste identifizierte Bindungspartner war das Zytoskelettprotein Spectrin (Pollerberg et al., 1987). Sowohl NCAM180 als auch NCAM140 binden an Spectrin, wobei NCAM 180 mit deutlich höherer Affinität bindet (Leshchyn'ska et al., 2003). Spectrin könnte als eine Art Gerüst wirken, das verschiedene Proteine einander räumlich annähert und im Bereich der Plasmamembran lokalisiert. Ein Beispiel dafür ist die Bildung eines Komplexes, bestehend aus NCAM, Spectrin und diversen in Signaltransduktionswege involvierten Proteinen wie der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII), *postsynaptic density-95* (PSD-95) und dem NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor, in postsynaptischen Dichten (Sytnyk et al., 2006).

In Kapitel 1.3.3 wurde die Rezeptorproteintyrosinphosphatase RPTP α bereits als Bindungspartner, der an der NCAM-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist, erwähnt (Bodrikov et al., 2005).

Die Phospholipase C γ , die auch im Verlauf NCAM-vermittelter Signaltransduktion aktiviert wird, interagiert ebenfalls mit NCAM (Büttner et al., 2005).

Büttner et al. wiesen zudem das *leucine-rich acidic nuclear protein* (LANP) als NCAM-Bindungspartner nach. Die N-terminale Domäne von LANP beinhaltet Leucin-reiche Sequenzen, die wahrscheinlich Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglichen (Opal et al., 2003).

Des Weiteren konnte eine direkte Interaktion zwischen NCAM und der Rezeptortyrosinkinase TrkB festgestellt werden (Claudia Friedrich, Dissertation, 2005). TrkB ist ein Rezeptor für den *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und für Neurotrophin-4 (Chao, 2003).

1.3.5 Beeinflussung von Kaliumkanälen durch NCAM

Es gibt nur wenige Beispiele von Kaliumkanälen, die durch NCAM oder seine Homologe moduliert werden. Sontheimer et al. wiesen Anfang der neunziger Jahre nach, dass die Stimulation glialer Vorläuferzellen mit NCAM-Antikörpern eine Verringerung der Amplituden von A-Typ- und verzögertem Gleichrichter-Kaliumstrom bewirkt. Es wird

vermutet, dass dieser Effekt durch Proteinkinasen wie z.B. die Proteinkinase C (PKC), vermittelt wird (Sontheimer et al., 1990).

Auch Fasciilin II (FasII), das Drosophila-Ortholog von NCAM, kann Kaliumkanäle beeinflussen. FasII induziert über das intrazelluläre Linker-Protein *discs large* (Dlg) die Akkumulation von sogenannten *Shaker*-Kaliumkanälen an der Zellmembran. Der spannungsabhängige Kaliumkanal und FasII binden an das PDZ-Domänen-Protein Dlg und werden so in räumliche Nähe zueinander gebracht (Thomas et al., 1997). Das ändert zwar nicht die Eigenschaften des Kanals, ist aber wichtig für die strukturelle Organisation der Synapse. Diese Co-Lokalisation konnte allerdings bei NCAM und SAP-97 (*synapse-associated protein 97*), den Säugetier-Orthologen von FasII und Dlg, nicht nachgewiesen werden.

NCAM-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Sensitivität des 5-Hydroxytryptamin-_{1A}-Rezeptors gegenüber seinen Agonisten 8-Hydroxydipropylaminotetralin (8-OH-DPAT) und Bupirion (Stork et al., 1999). Jedoch konnte gezeigt werden, dass NCAM den 5-HT-_{1A}-Rezeptor nicht direkt beeinflusst. Daraus resultierte die Vermutung, dass NCAM auf Komponenten der 5-HT-_{1A}-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionskaskade einwirkt. Im Hippocampus werden G-Protein-aktivierte, einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (Kir3) maßgeblich durch 5-HT-_{1A}-Rezeptoren gesteuert. Delling et al. gingen 2002 deshalb der Frage nach, ob NCAM einen Effekt auf die Kir3-Kanäle ausübt und beobachteten in diesem Zusammenhang, dass NCAM die Oberflächenlokalisierung neuronaler Kir-Kanäle, bestehend aus Kir3.1- und Kir3.2-Untereinheiten (siehe dazu Kapitel 1.6.2), reduziert. Da keine direkte Interaktion zwischen NCAM und Kir3.1 bzw. Kir3.2 nachgewiesen werden konnte, wird vermutet, dass ein intrazelluläres Bindeglied zwischen NCAM und Kaliumkanal vermittelt (Delling et al., 2002). Auf diesen Punkt wird in Kapitel 1.5.3 noch einmal genauer eingegangen.

1.4 PDZ-Domänen-Proteine

1.4.1 Aufbau von PDZ-Domänen

PDZ-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsmodule, die etwa 80 bis 90 Aminosäuren umfassen. Sie bestehen aus fünf bis sechs antiparallelen β -Strängen (β A- β F), die eine Art

Sandwich bilden, welches von zwei α -Helices (α A und α B) flankiert wird (Sheng und Sala, 2001; Nourry et al., 2003) (Abb. 2).

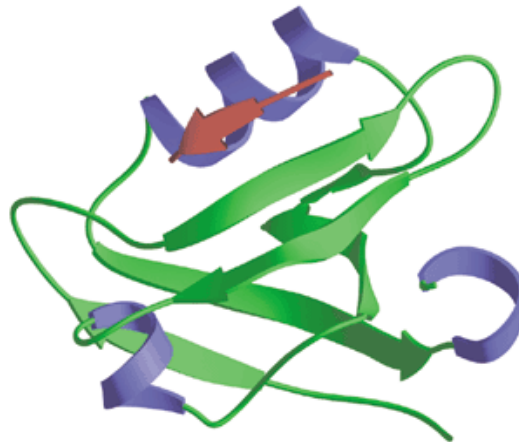


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur einer PDZ-Domäne. Grüne Pfeile repräsentieren β -Faltblätter, violette Spiralen stehen für α -Helices (entnommen aus Doyle et al., 1996).

Die Abkürzung PDZ leitet sich von **PSD-95** (*postsynaptic density-95*), **Dlg** (*discs large*) und **ZO-1** (*Zonula occludens-1*) ab. In diesen drei Proteinen wurden PDZ-Domänen zuerst gefunden. Ein weiteres gemeinsames Merkmal von PSD-95, Dlg und ZO-1 ist, dass sie neben drei PDZ-Domänen auch eine SH3-Domäne und eine Guanylatkinase-Domäne besitzen (Sheng und Sala, 2001). PSD-95 ist ein Bestandteil der sogenannten postsynaptischen Dichte. Die postsynaptische Dichte (*postsynaptic density*, PSD) ist eine spezialisierte subzelluläre Struktur an der Postsynapse, die aus regulatorischen und Zytoskelett-Proteinen besteht und der Organisation der Signaltransduktionsmaschinerie an der postsynaptischen Membran dient (Firestein et al., 1999). Dlg findet sich in Invertebraten-spezifischen Verschlusskontakten (*septate junctions*), und ZO-1 ist ein Protein epithelialer Verschlusskontakte (*tight junctions*) bei Vertebraten (Sheng und Sala, 2001).

Proteine mit PDZ-Domänen sind in der Natur weit verbreitet. Sie finden sich sowohl bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten. Die PFAM (*Protein Families*) Datenbank prognostiziert allein für den Menschen 343 PDZ-Domänen-Proteine mit insgesamt 545 PDZ-Domänen (Zimmermann, 2006). Überraschenderweise fand man bei *Schizosaccharomyces pombe* nur drei und bei *Saccharomyces cerevisiae* nur zwei Proteine

mit PDZ-Domänen. In Abbildung 3 sind einige Beispiele für PDZ-Domänen-Proteine dargestellt.

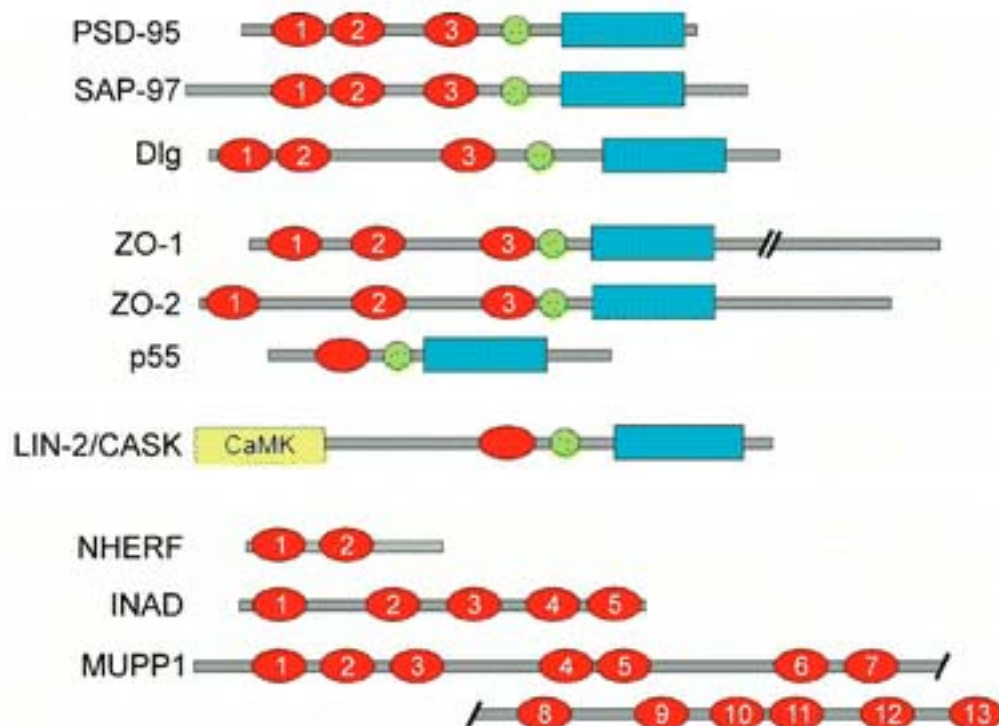


Abbildung 3: Beispiele für PDZ-Domänen-Proteine. Gezeigt sind die Domänenstrukturen verschiedener PDZ-Domänen-Proteine. PDZ-Domänen sind als Ovale dargestellt (vom N-Terminus durchnummeriert); SH3-Domänen als Kreise; Guanylatkinase-Domänen als Rechtecke. CaMK steht für Calmodulin-abhängige, Proteinkinase-ähnliche Domäne (nach Sheng und Sala, 2001).

Es gibt drei verschiedene Familien von PDZ-Domänen-Proteinen. Die erste Familie umfasst Proteine, die ausschließlich PDZ-Domänen haben. Beispiele hierfür sind Syntenin und NHERF (*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*). Membran-assoziierte Guanylatkinasen bilden die zweite Familie. Charakteristisch für sie sind eine bis drei PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne und eine Guanylatkinase-Domäne. Die bereits erwähnten Moleküle PSD-95, Dlg und ZO-1 gehören zu dieser Gruppe. Proteine der dritten Familie zeichnen sich dadurch aus, dass sie neben PDZ-Domänen noch weitere Protein-Protein-Interaktionsdomänen wie z. B. L27-, WW-, C2- oder PH-Domänen besitzen. Das *multi-PDZ domain protein 1* (MUPP1) mit seinen 13 PDZ-Domänen und der N-terminalen L27-Domäne ist hierfür ein Beispiel (Nourry et al., 2003).

1.4.2 Bindungseigenschaften von PDZ-Domänen

Ein Maß für die Stärke einer Bindung zwischen einem Protein und seinem Liganden ist die Dissoziationskonstante K_D . Die meisten K_D -Werte diverser Protein-Protein-Interaktionen rangieren zwischen dem unteren nanomolaren und dem millimolaren Bereich. Die Dissoziationskonstanten für PDZ-Domänen und ihre Liganden liegen in der Regel bei 1-50 μM (Jemth und Gianni, 2007).

PDZ-Domänen binden für gewöhnlich kurze C-terminale Peptide. Diese Peptide kann man aufgrund ihrer Sequenz in drei Klassen PDZ-bindender Motive einteilen (Tab. 1). Grundlage für die Einteilung sind ausgehend vom C-Terminus die Aminosäurereste an Position 0 (absoluter C-Terminus) und -2. Klasse I-Motive haben ein Serin oder Threonin an Position -2 und eine hydrophobe Aminosäure an Position 0. Klasse II-Motive zeichnen sich durch hydrophobe Aminosäuren an beiden Positionen aus. Klasse III-Motive sind charakterisiert durch ein Aspartat oder Glutamat an Position -2 und eine hydrophobe Aminosäure an Position 0. Für alle drei Klassen gilt, dass die Reste an Position -1 und -3 variabel sein können.

Eine aktuelle Studie von Stiffler et al. aus dem Jahr 2007 kommt zu dem Ergebnis, dass die traditionelle Einteilung der PDZ-bindenden Motive in drei Klassen nur bedingt haltbar sei. Vielmehr trügen die Reste an Position -4 bis -1 (vom C-Terminus aus gerechnet) gleichermaßen zur Bindungsspezifität bei. Demzufolge wären die Bindungsspezifitäten der PDZ-Domänen über ein weites Spektrum verteilt, welches ebenfalls die drei herkömmlichen Klassen mit einschließt (Stiffler et al., 2007). Trotz dieses Einwandes hat sich das Klassifizierungssystem bisher bewährt und findet in Publikationen nach wie vor rege Verwendung.

Die Aminosäurereste von PDZ-bindenden Motiven sind an Position -2 und 0 hoch konserviert (Tab. 1). Der Rest an Position -2 hat sich als besonders wichtig für die Interaktion mit Bindungspartnern herausgestellt und ist daher auch die Grundlage für die Einteilung der PDZ-bindenden Motive in drei Klassen. Peptidliganden werden in einer Furche zwischen den Helices αB und βB der PDZ-Domäne gebunden. Die stets hydrophobe Seitenkette des C-terminalen Restes taucht dabei in eine hydrophobe Tasche ein. Der Rest an Position -2 geht Wechselwirkungen mit dem ersten Rest von αB (αB1) ein. Befindet sich an Position -2 ein Serin oder Threonin, so ist der korrespondierende Rest αB1 ein Histidin. Peptide mit einem hydrophoben Rest an Position -2 werden von

PDZ-Domänen mit hydrophobem Rest an Position α B1 erkannt. Aspartat oder Glutamat an Position -2 wird von Tyrosin an Position α B1 erkannt. Die Reste an Position -3 und -1 sind ebenfalls wichtig für die spezifische Erkennung der zugehörigen PDZ-Domäne, können aber in vielen Fällen ausgetauscht werden, ohne dass die Bindungsfähigkeit verlorenght (Songyang et al., 1997) (vgl. Tab. 1).

Klasse	C-terminale Sequenz	interagierendes Protein	PDZ-Domänen-Protein
Klasse I			
X-S oder T-X-V	E-T-D-V	<i>Shaker</i> -Kaliumkanal	PSD-95 (PDZ2)
	D-S-W-V	δ -Catenin	Erbin
X-S oder T-X-L	D-S-S-L	β 2-adrenerger Rezeptor	NHERF (PDZ1)
	D-T-R-L	CFTR	NHERF (PDZ1)
Klasse II			
X- Ψ -X- Ψ	E-Y-Y-V	Neurexin	CASK
	E-Y-F-I	Glycophorin C	p55
Klasse III			
X-D oder E-X- Ψ	V-D-S-V	Melatoninrezeptor	nNOS
	G-E-P-L	KIF17	mLIN10

Tabelle 1: Klassifizierung von PDZ-Domänen gemäß ihrer Spezifität für C-terminale Peptide (entnommen aus Nourry et al., 2003). X – beliebige Aminosäure, Ψ – hydrophobe Aminosäure.

Es gibt mittlerweile Hinweise darauf, dass mehr als vier C-terminale Reste für die spezifische Interaktion mit PDZ-Domänen notwendig sind (Kozlov et al., 2000; Niethammer et al., 1998). Songyang et al. (1997) gehen davon aus, dass in einigen Fällen die Reste bis Position -8 für die spezifische Bindung wichtig sind.

Zwischen β A und β B befindet sich eine Konsensussequenz (K/R-XXX-GLGF), die als Carboxylat-bindende Schleife bezeichnet wird. Diese Schleife interagiert spezifisch mit der terminalen Carboxylgruppe des Peptidliganden. Der zweite und vierte Rest des GLGF-Motivs sind nicht absolut konserviert, aber es finden sich immer nur hydrophobe Reste an diesen Stellen. Das zweite Glycin ist absolut konserviert. Das erste Glycin ist in einigen Fällen gegen Serin, Threonin oder Prolin ausgetauscht (Sheng und Sala, 2001).

Es ist bekannt, dass nicht nur C-terminale Sequenzen an PDZ-Domänen binden können. In einigen Fällen binden auch interne Sequenzen an PDZ-Domänen. Diese Sequenzen falten sich in Form sogenannter β -Haarnadelschleifen. Über diesen Mechanismus bindet z.B. der Calciumkanal TRP (*transient receptor potential*) an eine der PDZ-Domänen von INAD (*inactivation-no-after potential D*) (Chevesich et al., 1997). Erstaunlich ist, dass viele PDZ-Domänen mit einer Vielzahl von Liganden spezifisch interagieren können, obwohl diese sehr unterschiedliche C-terminale Sequenzen haben (Sheng und Sala, 2001). Für INAD ist nachgewiesen, dass die dritte und vierte PDZ-Domäne je drei verschiedene Liganden binden können (Shawn Xu et al., 1998). Die Zahl der Liganden pro Domäne kann aber noch weitaus höher liegen.

Die Wechselwirkungen zwischen PDZ-Domänen und ihren Liganden können auf mehrere Arten beeinflusst werden. Einige Beispiele zeigen, dass die Phosphorylierung von Serin oder Threonin an Position -2 des Peptidliganden einen deutlichen Effekt hervorruft. Die Phosphorylierung des Kir2.3-Kaliumkanals durch Proteinkinase A (PKA) unterbindet die Interaktion mit PSD-95 (Cohen et al., 1996). Solche Fälle sind auch für MUPP1 bekannt und werden in Abschnitt 1.5.3 eingehender behandelt. Ferner kann die Interaktion durch Phosphorylierung der PDZ-Domäne selber reguliert werden. Im Vergleich zur Phosphorylierung eines Peptidliganden wurde dieser Mechanismus bisher jedoch deutlich seltener beobachtet. Die Phosphorylierung der ersten PDZ-Domäne von SAP-97 unterbindet deren Wechselwirkung mit der NR2A-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (Gardoni et al., 2003).

Darüber hinaus beeinflusst die Interaktion eines Liganden mit seinem Zelloberflächenrezeptor oft dessen Wechselwirkung mit einem PDZ-Domänen-Protein. So bindet NHERF nur an den aktivierten β_2 -adrenergen Rezeptor (Hall et al., 1998).

Für eine Reihe von PDZ-Domänen-Proteinen wurde gezeigt, dass sie multimerisieren können. INAD bildet Homomultimere, indem die dritte und/oder vierte PDZ-Domäne verschiedener INAD-Moleküle aneinander binden (Shawn Xu et al., 1998). Auch die Multimerisierung ohne Beteiligung von PDZ-Domänen ist möglich. PSD-95 z.B. multimerisiert mit Hilfe seiner N-terminalen Region (Hsueh et al., 1997).

Erst seit kurzem weiß man, dass PDZ-Domänen auch Lipide spezifisch binden können. Zimmermann et al. (2002) zeigten, dass Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns-4,5-P₂) an Syntenin bindet. Die Interaktion wird durch eine PDZ-Domäne vermittelt. Ein Überschuss an PtdIns-4,5-P₂ konnte die Interaktion von Syntenin mit dem FYA-Syndecan-

Peptid, dem eigentlichen Liganden, unterbinden. Das spricht dafür, dass Lipid- und Peptidbindungsstelle in diesem Fall überlappen (Zimmermann et al., 2002). Die Forschung auf diesem Gebiet befindet sich allerdings noch in den Anfängen.

1.4.3 Funktionen von PDZ-Domänen-Proteinen

PDZ-Domänen-Proteine fungieren in erster Linie als Adaptoren, die verschiedene Proteine binden, in räumliche Nähe zueinander bringen und dadurch Wechselwirkungen ermöglichen. Sie bilden das Fundament für den Aufbau supramolekularer Komplexe (Sheng und Sala, 2001). Wie das Beispiel von INAD zeigt, werden viele wichtige Komponenten einer Signaltransduktionskaskade von einem Protein gebunden und in unmittelbare Nähe zueinander gebracht. INAD interagiert mit Rhodopsin, dem lichtsensitiven Calciumkanal TRP (*transient receptor potential*), der Proteinkinase C, der Phospholipase C und Calmodulin, allesamt beteiligt an der Phototransduktion in *Drosophila*. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung zwischen Mitgliedern dieser Signalkaskade und schirmt sie gleichzeitig von anderen Einflüssen ab (Kumar und Shieh, 2001; Shawn Xu et al., 1998). Da es sich bei vielen der bisher identifizierten Liganden diverser PDZ-Domänen-Proteine um Zelloberflächenrezeptoren und Kanäle handelt, liegt die Schlußfolgerung nahe, dass die meisten PDZ-Domänen-Proteine an der Organisation und dem Aufbau supramolekularer Signaltransduktionskomplexe beteiligt sind (Nourry et al., 2003; Sheng und Sala, 2001). PDZ-Domänen-Proteine bringen nicht nur funktionell zusammengehörige Proteine zusammen, sondern sorgen auch dafür, dass deren Liganden an die richtigen Stellen in der Zelle gelangen. PSD-95 beispielsweise akkumuliert Glutamatrezeptoren und Kaliumkanäle im Bereich der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen (Sheng und Sala, 2001).

In vielen Fällen tragen PDZ-Domänen-Proteine dazu bei, die Stabilität ihrer Liganden deutlich zu erhöhen. Durch die Bindung des GABA_B-Rezeptors an MUPP1 wird dessen Halbwertszeit deutlich erhöht (Balasubramanian et al., 2007). Die Deletion des PDZ-bindenden Motivs von Aquaporin-4 führt dazu, dass dieses Protein vermehrt abgebaut wird (Neely et al., 2001). Es gibt noch weitere Beispiele, die einen offensichtlichen Zusammenhang zwischen PDZ-Domänen-Interaktion und Stabilität eines PDZ-Domänen-Liganden erkennen lassen. Über den Mechanismus der Stabilisierung herrscht nach wie

vor Unklarheit. Möglicherweise verhindern PDZ-Domänen-Proteine den Transport ihrer Liganden zu lysosomalen oder proteasomalen Kompartimenten. Eventuell verhindert die Interaktion einfach nur den proteolytischen Abbau.

Es häufen sich die Hinweise, dass PDZ-Domänen-Proteine bei der Bestimmung und Aufrechterhaltung der Polarität von Epithel-, Endothel- und Nervenzellen von Bedeutung sind (Doe, 2001; Medina et al., 2002; Ohno, 2001; Wodarz, 2002). In polarisierten Zellen sind viele Membranproteine (z.B. Ionenkanäle, Transportproteine, Ionenpumpen) nicht gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt, sondern in bestimmten Bereichen akkumuliert. Vieles deutet darauf hin, dass PDZ-Domänen-Proteine die korrekte Verteilung von Membranproteinen in polarisierten Zellen und deren Verbleib im Zielkompartiment steuern (Brône und Eggermont, 2005).

In Neuronen konnte nachgewiesen werden, dass PDZ-Domänen-Proteine nicht nur Proteinkomplexe an der Plasmamembran organisieren, sondern auch am intrazellulären Proteintransport beteiligt sind, indem sie einerseits das zu transportierende Protein und andererseits spezielle Motorproteine binden. Auf diese Weise können vorgefertigte Proteinkomplexe entlang der Mikrotubuli oder der Actinfilamente zu ihren Bestimmungsorten gelangen (Kim und Sheng, 2004). Das PDZ-Domänen-Protein GRIP (*glutamate receptor interacting protein*) z.B. bindet an das Motorprotein Kinesin und gleichzeitig an den AMPA-(α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure)-Rezeptor, der über diesen Mechanismus zu den Dendriten gebracht wird (Setou et al., 2002).

Es wird immer deutlicher, dass PDZ-Domänen-Proteine an zentralen, für die Funktion der Zelle wichtigen Vorgängen beteiligt sind. In diesem Zusammenhang nennenswert ist, dass einigen von ihnen eine Rolle als Tumorsuppressor zukommt. Es gibt Hinweise darauf, dass PDZ-Domänen-Proteine den Zellzyklus, die Zellstruktur und die Zelladhäsion kontrollieren (Nguyen et al., 2003).

1.5 Das multiple PDZ-Domänen-enthaltende Protein MUPP1 (*multi-PDZ domain protein 1*)

1.5.1 Aufbau von MUPP1

MUPP1 ist Mitglied einer Familie von multi PDZ-Domänen-Proteinen, zu der auch CIPP (*channel-interacting PDZ domain protein*), INADL (*INAD-like protein*) und das putative *Caenorhabditis elegans*-Polypeptid C52A11.4 gehören. Diesen Proteinen ist gemeinsam, dass sie mehrere tandemartig angeordnete PDZ-Domänen, aber keine katalytische Domäne besitzen. MUPP1 hat 13 PDZ-Domänen, C52A11.4 hat zehn, CIPP und INADL haben 4 bzw. 7 PDZ-Domänen (Bécamel et al., 2001). Die PDZ-Domänen dieser vier Proteine zeigen hohe Sequenzübereinstimmungen, wobei die Übereinstimmung zwischen MUPP1 und INADL am größten ist. Die Sequenzhomologie beschränkt sich auf die PDZ-Domänen. Darüber hinaus sind ähnliche Domänen in diesen Proteinen vom N- zum C-Terminus in der gleichen Reihenfolge angeordnet (Ullmer et al., 1998) (Abb. 4). Die Abschnitte zwischen den PDZ-Domänen sind sehr variabel. Zusätzlich enthält MUPP1 mögliche Bindungsmotive für die SH3-Domänen der Adaptorproteine Crk1 (zwischen der sechsten und siebten PDZ-Domäne) und Grb2 (zwischen der siebten und achten PDZ-Domäne (Schneeberger, D., persönliche Mitteilung, 2003).

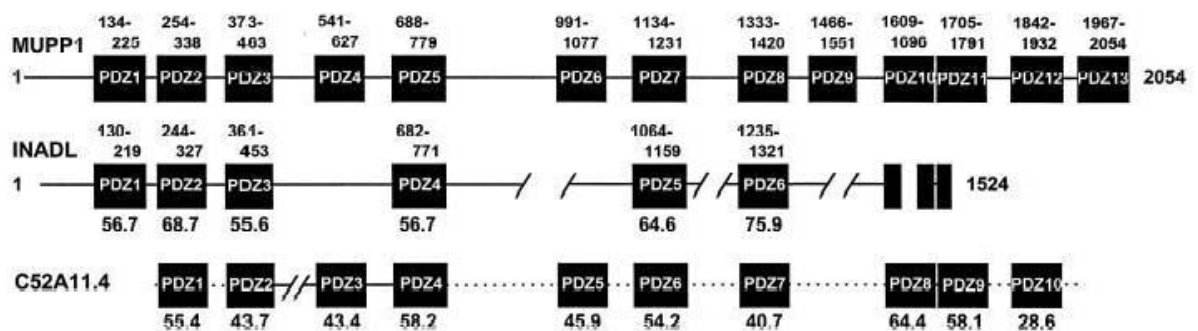


Abbildung 4: Aufbau von MUPP1 und verwandten PDZ-Proteinen (entnommen aus Ullmer et al., 1998).

1.5.2 Expression von MUPP1

MUPP1 wird in verschiedenen Geweben exprimiert. Durch *Northern Blot*-Analysen konnte festgestellt werden, dass MUPP1-mRNA in Hirn, Herz, Plazenta, Leber, Skelettmuskel, Nieren, Hoden, Milz und Bauchspeicheldrüse zu finden ist (Mancini et al., 2000; Ullmer et al., 1998). Mittels *Western Blot* konnte MUPP1-Protein in Hirn, Herz, Leber, Skelettmuskel, Nieren und Lunge nachgewiesen werden. MUPP1 ist in nahezu allen Bereichen des Gehirns zu finden. *In-situ*-Hybridisierung und immunhistochemische Untersuchungen ergaben vergleichbare Verteilungsmuster für MUPP1-mRNA und -Protein im Gehirn. In besonders hoher Konzentration findet man MUPP1 im Plexus choroideus, Hippocampus, in den Kernen der Amygdala, den Brückenkernen des verlängerten Rückenmarks und im piriformen Cortex. Auch der Cortex des Endhirns und der des Kleinhirns exprimieren MUPP1 (Sitek et al., 2003). Nur im Neuropil der weißen Substanz in End- und Kleinhirn ist MUPP1-Expression nicht nachweisbar (Sitek et al., 2003).

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass alternative Formen von MUPP1 in verschiedenen Geweben vorkommen. Transkription des MUPP1-Gens erzeugt ein 8,5 kb langes Transkript, das nach Translation ein Protein von 220 kDa Masse liefert. Ullmer et al. (1998) fanden mittels *Northern Blot* zwei Transkripte, die nicht dem vollständigen MUPP1 entsprechen. Ein 5 kb langes Transkript konnte in Herz, Leber und Nieren gefunden werden. Ein 4 kb langes Transkript wurde im Gehirn nachgewiesen (Ullmer et al., 1998). Weitere Transkripte von 7,5 kb und 5 kb Länge ließen sich im Skelettmuskel und in der Leber nachweisen, ein 1 kb langes Transkript wurde in Herz, Skelettmuskel und Leber beobachtet (Mancini et al., 2000). Dieselbe Gruppe isolierte aus einer Hirn- und einer Milz-cDNA-Bibliothek zwei verschiedene MUPP1-Fragmente. Bei MUPP1 aus der Hirn-cDNA-Bibliothek fehlte der Abschnitt zwischen PDZ-Domäne drei und vier sowie kurze Stücke der jeweiligen Domänen. Bei MUPP1 aus der Milz-cDNA-Bibliothek dagegen fehlte der 3'-Abschnitt der siebten PDZ-Domäne (Mancini et al., 2000). Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass durch alternatives Spleißen oder posttranslationale Modifikation in verschiedenen Geweben unterschiedliche Formen von MUPP1 erzeugt werden (Mancini et al., 2000; Sitek et al., 2003; Ullmer et al., 1998). Für die zelluläre Ebene lässt sich festhalten, dass MUPP1 relativ homogen im Zytoplasma verteilt ist. An Zell-Zell-Kontakten akkumuliert MUPP1. In polarisierten Epithelzellen ist

MUPP1 ausschließlich im apikalen Bereich an *tight junctions* konzentriert (Hamazaki et al., 2001).

1.5.3 Interaktionspartner von MUPP1

Einige Bindungspartner von MUPP1 sind bereits bekannt. An dieser Stelle sollen nur einige der zahlreichen Beispiele erwähnt werden. Verschiedene Rezeptoren wie z.B. die 5-Hydroxytryptamin-_{2A-C}-Rezeptoren (5-HT-_{2A-C}), die R2 Untereinheit des γ -Aminobuttersäurerezeptors Typ B (GABA_BR2) und der MT₁ Melatoninrezeptor (MT₁) binden an MUPP1 (Balasubramanian et al., 2007; Guillaume et al., 2008; Ullmer et al., 1998). Auch die Kir3.2-Untereinheit der sogenannten Kir3-Kaliumkanäle (Delling, M., persönliche Mitteilung, 2002) und der Chloridkanal CLIC6 konnten als Bindungspartner identifiziert werden (Griffon et al., 2003). Eine weitere Gruppe von MUPP1-Interaktionspartnern sind Proteine, die spezifisch für Verschlusskontakte sind. Zu dieser Gruppe gehören u.a. die Claudine (Hamazaki et al., 2001; Jeansonne et al., 2003; Lanaspa et al., 2008; Poliak et al., 2002).

Mehrere Proteine, die im Verlauf von Signaltransduktionskaskaden eine Rolle spielen, binden direkt an MUPP1. Es handelt sich zum einen um GDP/GTP-Austauschfaktoren wie z.B. Kalirin-7 und zum anderen um das GTPase-aktivierende Protein SynGAP (Krapivinsky et al., 2004; Penzes et al., 2001).

Außerdem zählen auch einige viralen Onkoproteine und die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) zu den Bindungspartnern von MUPP1 (Krapivinsky et al., 2004; Lee et al., 2000). Eine vollständige Übersicht über die bisher bekannten Bindungspartner von MUPP1 liefert Abbildung 5.

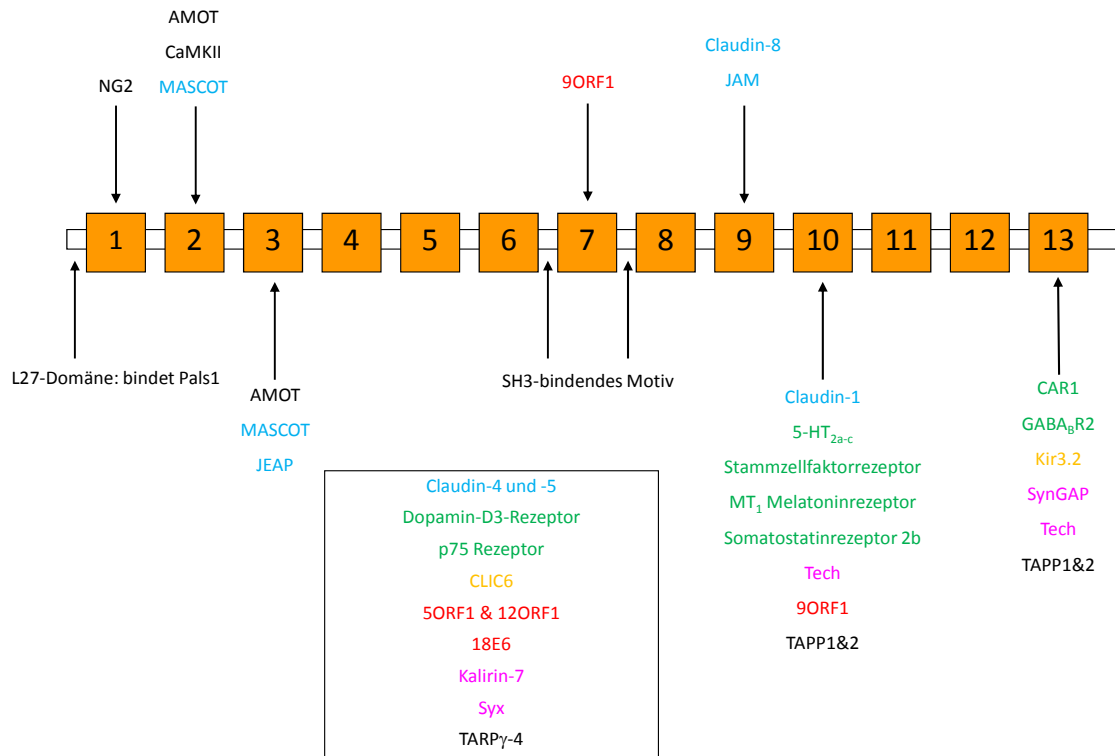


Abbildung 5: Übersicht über die bisher identifizierten Bindungspartner von MUPP1. Für die im Kasten aufgelisteten Proteine wurde die Bindungsstelle nicht näher bestimmt. Einzelheiten zu den Bindungspartnern können Kapitel 1.3.3 entnommen werden. **gelb:** Ionenkanäle, **grün:** Zelloberflächenrezeptoren, **blau:** Proteine, die spezifisch für Verschlusskontakte sind, **rot:** virale Onkoproteine, **lila:** GDP/GTP-Austauschfaktoren und GTPase-aktivierende Proteine, **schwarz:** Sonstige (Balasubramanian et al., 2007; Barritt et al., 2000; Coyne et al., 2004; Dakoji et al., 2003; Ernkvist et al., 2008; Estevez et al., 2008; Griffon et al., 2003; Guillaume et al., 2008; Hamazaki et al., 2001; Jeansonne et al., 2003; Kimber et al., 2002; Krapivinsky et al., 2004; Lanasa et al., 2008; Lee et al., 2000; Mancini et al., 2000; Penzes et al., 2001; Poliak et al., 2002; Roh et al., 2002; Stiffler et al., 2007; Sugihara-Mizuno et al., 2007; Ullmer et al., 1998).

MUPP1 wurde erstmals 1998 von Ullmer et al. beschrieben. Bei einem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* mit dem C-Terminus des 5-HT_{2C}-Rezeptors wurde MUPP1 als Interaktionspartner dieses Rezeptors identifiziert (Ullmer et al., 1998). Später konnte gezeigt werden, dass nicht nur der 5-HT_{2C}-Rezeptor, sondern auch der 5-HT_{2A}- und der 5-HT_{2B}-Rezeptor spezifisch an die zehnte PDZ-Domäne von MUPP1 binden. Die Wechselwirkung zwischen MUPP1 und dem 5-HT_{2C}-Rezeptor induziert eine Konformationsänderung bei MUPP1. Weitere Untersuchungen ergaben, dass MUPP1 den 5-HT_{2C}-Rezeptor an der Zelloberfläche in „Clustern“ anhäuft (Bécamel et al., 2001). Die Phosphorylierung eines Serinrestes am C-Terminus des 5-HT_{2C}-Rezeptors unterbindet die Wechselwirkung mit MUPP1 (Parker et al., 2003). Die Phosphorylierung des 5-HT_{2C}-

Rezeptors erfolgt nach Aktivierung des Rezeptors durch Ligandenbindung. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der Modulation der Bindungsfähigkeit von PDZ-bindenden Motiven eine wichtige Rolle bei der Regulation von intrazellulären Signalkaskaden zukommen könnte. 5-HT_{2C}-Rezeptoren spielen bei der Kontrolle der Nozizeption, endokriner Sekretion, Thermoregulation, Modulation des Appetits und der Produktion cerebrospinaler Flüssigkeit eine Rolle (Fone et al., 1998; Lucki et al., 1989; Millan et al., 1997; Murphy et al., 1991; Tecott et al., 1995). Inwieweit sich MUPP1 an diesen Prozessen beteiligt, ist zum Zeitpunkt noch unbekannt.

Balasubramanian et al. konnten zeigen, dass MUPP1 und GABA_BR2 an der Plasmamembran cerebellärer Körnerzellen co-lokalisieren und dass die 13. PDZ-Domäne von MUPP1 direkt an den Rezeptor bindet.

γ -Aminobuttersäurerezeptoren vom Typ B (GABA_BR) sind heterodimere G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR), die im zentralen Nervensystem die langsame, inhibitorische synaptische Übertragung durch Bindung des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) vermitteln (Bowery et al., 2002). Der heterodimere Rezeptor besteht wiederum aus zwei einzelnen GABA_B-Rezeptoren, dem GABA_BR1 und dem GABA_BR2 (Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998; White et al., 1998). Die Heterodimerisierung ist eine Voraussetzung für den Transport von GABA_BR1 zur Zelloberfläche (Margeta-Mitrović et al., 2000). Im dimeren Verbund kommt GABA_BR1 die Aufgabe zu, den Liganden zu binden (Galvez et al., 1999), wohingegen GABA_BR2 die primäre Kontaktstelle zum G-Protein darstellt (Robbins et al., 2001).

Eine interessante Beobachtung von Balasubramanian et al. war, dass die Stabilität des GABA_B-Rezeptors von der Bindung an MUPP1 abhängig ist. Wenn die Interaktion unterbunden wird, wird der Rezeptor deutlich schneller degradiert. Auch auf funktionaler Ebene hat diese direkte Wechselwirkung Konsequenzen. MUPP1 steigert die GABA_BR-vermittelte Signalübertragung. Wird das PDZ-Domänen-Protein durch siRNA ausgeschaltet, verkürzt sich die Dauer des GABA_BR-vermittelten Signals (Balasubramanian et al., 2007).

Zu den an MUPP1 bindenden Zelloberflächenrezeptoren gehört auch der MT₁ Melatoninrezeptor. MT₁ interagiert mit der zehnten PDZ-Domäne (Guillaume et al., 2008).

Es handelt sich hierbei um einen G_i-Protein gekoppelten Rezeptor, der sich inhibierend auf die Aktivität der Adenylatzyklase auswirkt und damit wichtige von Melatonin beeinflusste

neurobiologische Wirkungen vermittelt, u.a. die Modulation des zirkadianen Rhythmus (Brydon et al., 1999).

Guillaume et al. wiesen erst kürzlich nach, dass der Interaktion zwischen MUPP1 und MT₁ eine wichtige Rolle bei der durch MT₁ bewirkten Signaltransduktion zukommt.

Demnach stabilisiert MUPP1 den Komplex aus G-Protein und aktiviertem Melatoninrezeptor. Wenn MT₁ an MUPP1 gebunden ist, kann der Rezeptor nach Aktivierung mit hoher Affinität an ein G-Protein binden und auf diese Weise effektiv die Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) unterdrücken. Wird die Interaktion zwischen dem PDZ-Domänen-Protein und dem Rezeptor verhindert, resultiert dies in einer Destabilisierung der Wechselwirkung zwischen MT₁ und dem G-Protein und im Folgenden in einer Aufhebung der Signalweiterleitung (Guillaume et al., 2008).

Eine große Gruppe von MUPP1-Bindungspartnern sind Proteine, die die strukturelle Grundlage für Verschlusskontakte liefern. Hamazaki et al. konnten zeigen, dass Claudin-1 an die zehnte PDZ-Domäne von MUPP1 bindet (Hamazaki et al., 2001). Auch Claudin-8 wurde später als Ligand für die neunte PDZ-Domäne von MUPP1 identifiziert (Jeansonne et al., 2003). Claudin-5 und MUPP1 co-lokalisieren in den sogenannten autotypischen Verschlusskontakten der Schmidt-Lanterman-Inzisuren von Schwannschen Zellen. Das beruht auf direkter Interaktion zwischen diesen Molekülen (Poliak et al., 2002). Die Bindungsstelle für Claudin-5 ist aber bisher noch nicht genauer eingegrenzt worden. Dies gilt auch für Claudin-4, das nach neuesten Erkenntnissen direkt an MUPP1 bindet (Lanaspa et al., 2008). Claudine sind Transmembranproteine, durch deren Polymerisation das Gerüst der *tight junctions* geformt wird. Zudem können Claudine benachbarter Zellen miteinander interagieren (Furuse et al., 1999; Tsukita und Furuse, 2000).

Mehr und mehr wird ersichtlich, dass MUPP1 über seine Interaktionen an Signaltransduktionskaskaden beteiligt ist und diese eventuell sogar maßgeblich beeinflusst.

Einen direkten Beweis für die Beteiligung von MUPP1 an Signaltransduktionsvorgängen lieferte die Arbeit von Krapivinsky et al. aus dem Jahr 2004. Diese Arbeitsgruppe stellte fest, dass die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) an die zweite und das GTPase-aktivierende Protein SynGAP an die 13. PDZ-Domäne von MUPP1 binden. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass die CaMKII über eine interne β -Haarnadelschleife mit seinem Interaktionspartner in Kontakt tritt.

MUPP1 bringt nun die CaMKII und SynGAP in räumliche Nähe zueinander. In Neuronen ist dies eine Voraussetzung für den normalen Ablauf einer Signaltransduktionskaskade,

die hier näher erläutert werden soll. Erst durch die räumliche Zusammenführung kann CaMKII SynGAP phosphorylieren. Dieser Zustand herrscht in ruhenden Neuronen. Durch wiederholte synaptische Aktivität werden postsynaptische NMDA-Rezeptoren aktiviert, was seinerseits in einer erhöhten postsynaptischen Calciumkonzentration resultiert. Calcium bindet an Calmodulin und der Calcium/Calmodulin-Komplex lagert sich an die CaMKII an. Dieser Schritt veranlasst die CaMKII dazu, sich vom MUPP1-SynGAP-Komplex zu lösen. Daraufhin wird SynGAP von nicht näher charakterisierten Phosphatasen dephosphoryliert und dadurch aktiviert. Aktives SynGAP inaktiviert die kleine GTPase Rap (*Ras proximate*), was letztlich dazu führt, dass die Aktivität der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 (p38 MAPK) gemindert wird (Krapivinsky et al., 2004). Die abschließende Konsequenz dieser Kaskade ist eine erhöhte Inkorporation funktioneller AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran. Dieser NMDA-Rezeptor-abhängige Transport von AMPA-Rezeptoren zur postsynaptischen Membran ist nach Ansicht vieler Autoren ein Schlüsselement synaptischer Plastizität (Luscher et al., 1999; Shi et al., 1999). Die Unterbindung der Wechselwirkung zwischen SynGAP und MUPP1 mittels spezifischer Kompetitoren hat die gleichen Konsequenzen, wie die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration über NMDA-Rezeptoren und veranschaulicht zusätzlich die Bedeutung der von MUPP1 bewirkten räumlichen Annäherung der CaMKII und SynGAP für die beschriebene Signaltransduktionskaskade (Krapivinsky et al., 2004).

Einige Onkoproteine aus nicht näher verwandten DNA-Tumorzellen konnten nachweislich als Bindungspartner von MUPP1 identifiziert werden. Ein Beispiel ist das E6-Onkoprotein (18E6) aus dem humanen *high-risk* Papillomavirus Typ 18 (HPV-18). Die Bindung von 18E6 an MUPP1 bewirkt die Degradation des PDZ-Domänen-enthaltenden Proteins. 18E6 verringert die Halbwertszeit von MUPP1 um mehr als das Vierfache (Lee et al., 2000). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass MUPP1 an der negativen Regulation des Zellzyklus beteiligt sein könnte (Lee et al., 2000). Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Kontakte sind wichtige Strukturen, die die Proliferation von Zellen bremsen. MUPP1 als Bestandteil solcher Kontakte könnte für die sogenannte Kontaktinhibition von Bedeutung sein. Es sei nicht auszuschließen, dass MUPP1 ein neues Tumorsuppressorprotein darstelle (Lee et al., 2000). Die Verifizierung dieser Hypothese steht noch aus.

Eine weitere Gruppe von MUPP1-Liganden bilden Ionenkanäle. Eine besondere Rolle für das Thema der vorliegenden Dissertation spielen die neuronalen Kir3-Kaliumkanäle.

Kir3-Kanäle sind G-Protein-gekoppelte Kanäle, die Kaliumströme ins Zellinnere leiten (siehe Kapitel 1.6.2). Neuronale Kir3-Kanäle bestehen aus zwei Kir3.1- und zwei Kir3.2-Untereinheiten (Kir3.1/3.2). Bei einem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* wurde die Kir3.2-Untereinheit als Bindungspartner der 13. PDZ-Domäne von MUPP1 identifiziert (Delling und Novak, 2002, Projektarbeit). Auf die Bedeutung von Kir3.1/3.2 für dieses Projekt wird in Kapitel 1.6.3 genauer eingegangen.

1.6 Einwärtsgerichtete K^+ Kanäle (Kir)

1.6.1 Einwärtsgerichtete K^+ Kanäle im Allgemeinen

Die erstmalige Beschreibung einwärtsgerichteter Kaliumkanäle (Kir) im Skelettmuskel datiert aus dem Jahr 1949 (Katz, 1949). Mittlerweile sind über 20 Kir-Proteine beschrieben worden, die wiederum anhand ihrer molekularen und elektrophysiologischen Eigenschaften in fünf Subfamilien eingeteilt werden können (siehe Tabelle 2). Alle Kir-Kanäle sind Tetramere aus identischen oder unterschiedlichen Kir-Untereinheiten, wobei jede Untereinheit zwei transmembrane Segmente aufweist (Isomoto et al., 1997).

Kir-Kanäle zeichnen sich dadurch aus, dass sie unter physiologischen Bedingungen eine höhere Leitfähigkeit für K^+ ins Zellinnere hinein als aus der Zelle hinaus haben (Lu, 2004). Der Grund dafür ist, dass Mg^{2+} und Polyamine im Inneren der Zelle die Pore des Kanals blockieren, wenn der elektrochemische Gradient einen Ausstrom von K^+ begünstigt (Matsuda et al, 1987; Vandenberg, 1987; Lopatin et al, 1994).

Darüber hinaus können die Eigenschaften dieser Kanäle durch intrazelluläre Faktoren und sekundäre Botenstoffe maßgeblich verändert werden (Nichols und Lopatin, 1997; Ruppertsberg, 2000; Ruppertsberg und Fakler, 1996). Gut untersuchte Beispiele für diese Regulierbarkeit sind u.a. die Kontrolle der Kir1-Kanäle durch intrazelluläres K^+ und den pH-Wert (Wang et al., 1997), der Einfluss von G-Proteinen auf die Funktion von Kir3-Kanälen (Krapivinsky et al., 1995; Wickman und Clapham, 1995) und die ATP-Abhängigkeit der Kir6-Kanäle (Ashcroft et al., 1984; Ashcroft und Rorsman, 1989).

Kir-Kanäle spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, der Regulation des Aktionspotentials, der Rezeptor-abhängigen Kontrolle der zellulären Erregbarkeit und der K^+ -Homöostase.

Subfamilie	Subtyp	Physiologische Funktionen
Klassische einwärtsgerichtende Kaliumkanäle	Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3	<ul style="list-style-type: none"> - Repolarisation des Aktionspotentials (AP) - Modulation der Form des kardialen AP - Einstellen des Ruhepotentials auf den Wert des E_K
G-Protein-aktivierte Kaliumkanäle	Kir3.1, Kir3.2, Kir3.3, Kir3.4	<ul style="list-style-type: none"> - Verlangsamung der Herzfrequenz - Modulation der Neurotransmitterfreisetzung durch Neurone - Erniedrigung der Membranerregbarkeit durch Hyperpolarisation des RMP
ATP-sensitive Kaliumkanäle	Kir6.1, Kir6.2	<ul style="list-style-type: none"> - Aufrechterhaltung des RMP während der metabolischen Inhibition - Regulation der neuronalen Erregbarkeit und Neurotransmitterfreisetzung - Kopplung der Insulinsekretion an den metabolischen Status in pankreatischen β-Zellen
ATP-abhängige Kaliumkanäle	Kir1.1a, Kir4.1	<ul style="list-style-type: none"> - Aufnahme von K^+ in die Zelle - Bereitstellung von K^+ für Na^+/K^+- und Protonenpumpen - Wassertransport in Assoziation mit Aquaporin-4
Sonstige	Kir5.1, TASK1-5, TREK1,2	<ul style="list-style-type: none"> - Kopplung von K^+- und Protonentransport in der Niere - Modulation der CO_2-Sensitivität chemorezeptorischer Neurone (Kir5.1) - Aufrechterhaltung einer Hintergrundleitfähigkeit für K^+ (K^+-Leck) - Beteiligt an der myogenischen Muskelkontraktion - Regulation der Erregbarkeit - Beteiligt am Ionen- und Wassertransport - Beeinflussung des Säure-Basen-Haushaltes und der Hormonsekretion (TASK und TREK)

Tabelle 2: Klassifizierung einwärtsgerichtender K^+ Kanäle (teilweise entnommen aus Butt und Kalsi, 2003). AP - Aktionspotential, E_K – Kaliumgleichgewichtspotential, RMP – Ruhemembranpotential.

1.6.2 G-Protein-aktivierte, einwärtsgerichtende Kaliumkanäle (Kir3)

Ein Charakteristikum der Kir3-Kanäle ist die Tatsache, dass sie normalerweise als Heterotetramere auftreten. Die Untereinheit Kir3.1 alleine ist nicht in der Lage, funktionale Kanäle zu bilden (Chan et al., 1996) und wird auch nicht zur Zellmembran transportiert, wenn sie in Oozyten exprimiert wird (Stevens et al., 1997). In heterologen Expressionssystemen konnte elektrophysiologisch nachgewiesen werden, dass Kir3.1 mit den drei anderen Kir3-Untereinheiten funktionierende Kanäle bildet (Mark und Herlitze, 2000; Isomoto et al., 1997). Es assoziieren dabei immer zwei Kir3.1- mit zwei 3.2-, 3.3-

oder 3.4-Untereinheiten. Kir3.1/3.2- und Kir3.1/3.3-Kanäle werden als neuronale Kir3-Kanäle bezeichnet, da sie in verschiedenen Gehirnbereichen exprimiert werden (Karschin und Karschin, 1997) und dort funktionsfähige Kanäle bilden (Lüscher et al., 1997; Kofuji et al., 1995). Kir3.2-enthaltende Kanäle im Gehirn werden durch diverse Neurotransmitter aktiviert und erzeugen langsame, inhibitorische, postsynaptische Potentiale (Wickman und Clapham, 1995; Lüscher et al., 1997; Signorini et al., 1997; Yamada et al., 1998).

Demgegenüber stehen die kardialen Kir3.1/3.4-Kanäle. Kir3.4 wird hauptsächlich im Herzen exprimiert (Karschin und Karschin, 1997) und Kir3.1/3.4 wird durch Acetylcholin über den muskarinischen m2 Rezeptor aktiviert, was wiederum eine Rolle bei der Verlangsamung der Herzfrequenz spielt (Mark und Herlitzke, 2000).

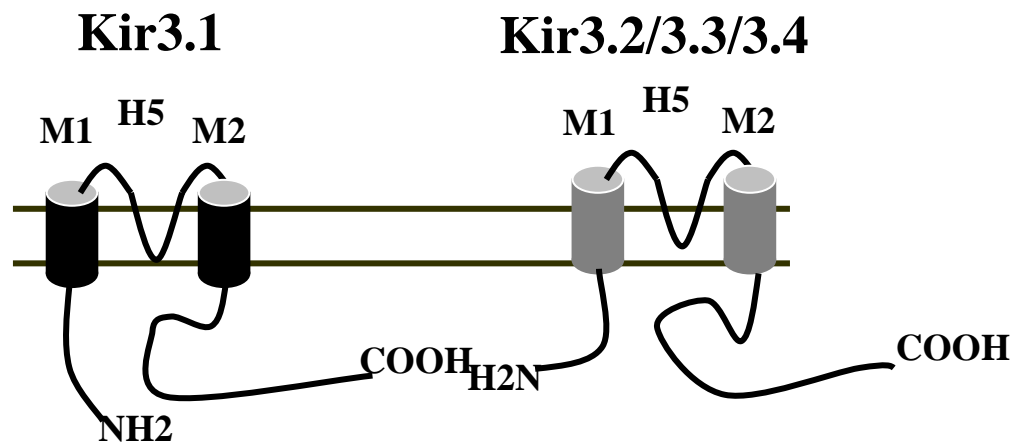


Abbildung 6: Struktur und Aufbau G-Protein-aktivierter, einwärtsgerichteter Kaliumkanäle (Kir3). Alle Kir-Untereinheiten bestehen aus zwei transmembranen Domänen (M1 und M2) und einer Poren-formenden Region (H5). Sowohl der N- als auch der C-Terminus befinden sich intrazellulär. Kir3-Kanäle sind Heterotetramere, die sich aus zwei 3.1- und zwei variablen Untereinheiten zusammensetzen.

Darüber hinaus gibt es Arbeiten, die von funktionalen Kir3.2-Homomeren und Kir3.2/3.3-Kanälen berichten (Inanobe et al., 1999; Jelacic et al., 2000; Wischmeyer et al., 1997).

Der bedeutendste Mechanismus der Aktivierung von Kir3-Kanälen basiert auf einem Drei-Komponenten-System bestehend aus einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR), einem Pertussistoxin-sensitiven heterotrimeren G-Protein (G_i) und dem Kir3-Kanal. Der stimulatorische Effekt geht dabei von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins aus, die an den Kir3-Kanal bindet und ihn auf diese Weise aktiviert (Dascal, 1997). Kir3-

Kanäle werden durch adrenerge, dopaminerge, muskarinische, opioide und GABA_B-Rezeptoren aktiviert und sind bedeutsam für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials und die Kontrolle der Erregbarkeit von Neuronen (Hille, 1992).

Des Weiteren ist bekannt, dass Kir3-Kanäle auch durch die G α -Untereinheit der Phospholipase C-(PLC)-aktivierenden G-Proteine (G_q) inhibiert werden können (Mao et al., 2004). Die aktivierende Wirkung von G $\beta\gamma$ ist jedoch deutlich stärker als die inhibierende von G α .

1.6.3 Intrazellulärer Transport von Kir3-Kanälen

Ma und Kollegen untersuchten 2002 grundlegende Mechanismen des intrazellulären Transports von Kir3-Kanälen. Sie fanden heraus, dass Kir3.1-Homotetramere nicht zur Plasmamembran transportiert werden können, da ihnen ein funktionelles ER-(endoplasmatisches Retikulum)-Exportsignal fehlt. Stattdessen akkumulieren sie im endoplasmatischen Retikulum.

Kir3.2 und Kir3.4 hingegen besitzen in ihrer Sequenz Signale, die den Transport vom ER zur Plasmamembran veranlassen und weitere Signale, die den Transport zwischen Plasmamembran und Endosomen regeln. Kir3.1/3.2- und Kir3.1/3.4-Heterotetramere werden demnach über spezifische Transportsequenzen in Kir3.2 bzw. 3.4 zur Zellmembran dirigiert.

Abweichend davon konnte in Kir3.3 kein ER-Exportsignal, dafür aber ein Signal für den Transport zu den Lysosomen ausfindig gemacht werden. Die 3.3-Untereinheit der Kir3.1/3.3-Kanäle verhindert die Plasmamembranlokalisation des Kanals, indem sie ihn in Richtung Lysosom steuert.

Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Phosphorylierung den Transport von Kir3-Kanälen modifizieren kann. Kir3.2 enthält eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die Casein Kinase II. Wird ein phosphorylierbares Threonin gegen Alanin ausgetauscht, so ist die Menge an Kir3.1/3.2 an der Zelloberfläche deutlich reduziert. Ein Austausch von Threonin gegen Aspartat, der eine permanente Phosphorylierung imitiert, erhöht die Zelloberflächenexpression von Kir3.1/3.2 (Ma et al., 2002).

Der Transport von Proteinen an ihren korrekten Bestimmungsort und die dauerhafte Lokalisation in einem definierten Kompartiment sind in nicht wenigen Fällen abhängig von der Bindung an ein PDZ-Domänen-Protein (Sheng und Sala, 2001). Auch für

einwärtsgerichtete Kaliumkanäle sind solche Beispiele bekannt. Kir1.1 z.B. bindet an eine der PDZ-Domänen von NHERF-1 bzw. NHERF-2 (*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*), ein für den Transport des Kanals an die Zelloberfläche wichtiger Schritt. Diese Interaktion erhöht die Oberflächenlokalisation von Kir1.1 deutlich (Yoo et al., 2004).

Kir3.2 und 3.3 besitzen beide das C-terminale Klasse I-PDZ-bindende Motiv ESKV. Daher könnten beide Untereinheiten mit PDZ-Domänen-Proteinen interagieren, die eventuell auch den intrazellulären Transport der Kanäle beeinflussen. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl Kir3.2 als auch Kir3.3 an die einzige PDZ-Domäne von SNX27 (*sorting nexin 27*) binden. SNX27 gehört zu einer Familie von Proteinen, deren Mitglieder generell an intrazellulären Transport- und Sortierungsvorgängen beteiligt sind. Die Sortierung erfolgt dabei über endosomale Kompartimente. Die Bindung von SNX27 an Kir3.3 hat zur Folge, dass funktionale Kanäle bestehend aus 3.1- und 3.3-Untereinheiten vermehrt endozytiert und degradiert werden. Auf diese Weise wird die Oberflächenexpression eines Kir-Kanals durch die Interaktion mit einem PDZ-Domänen-Protein reguliert.

Obwohl Kir3.2 an SNX27 bindet, konnte ein vergleichbarer Effekt hier nicht festgestellt werden. Eine mögliche Ursache ist das Vorhandensein von mehreren Transportsignalen in der Sequenz von Kir3.2, die einem von SNX27 vermittelten Transport entgegenwirken (Lunn et al., 2007).

Wie in Kapitel 1.5.3 bereits erwähnt wurde, bindet Kir3.2 an die 13. PDZ-Domäne von MUPP1. Einige Beobachtungen deuten darauf hin, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen MUPP1, Kir3.2 und NCAM hinsichtlich des Transports neuronaler Kir3-Kanäle zur Zelloberfläche besteht. Da dieser Zusammenhang für diese Dissertation von zentraler Bedeutung ist, soll an dieser Stelle näher darauf eingegangen werden.

Delling et al. konnten 2002 zeigen, dass NCAM140 und 180 die Plasmamembranlokalisation der neuronalen Kir3-Kanäle, bestehend aus Kir3.1- und Kir3.2-Untereinheiten, wesentlich reduzieren. NCAM140 und 180 beeinflussten nicht die Expression der genannten Untereinheiten, sondern nur deren Transport zur Plasmamembran. Dabei war die Lokalisation von NCAM in „*lipid rafts*“ unerlässlich. Wie weiter gezeigt werden konnte, geschieht dies nicht durch direkte Interaktion zwischen NCAM und Kir3.1 bzw. Kir3.2 (Delling et al., 2002). Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass es einen bisher unbekanntem intrazellulären Vermittler zwischen NCAM und den neuronalen Kir3-Kanälen geben muss. Die Suche nach intrazellulären

Bindungspartnern der Kir3.1- bzw. Kir3.2-Untereinheit war daher eine logische Folge. In einem Laborpraktikum unter der Anleitung von Markus Delling im Institut für die Biosynthese neuraler Strukturen konnte ich in einem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* MUPP1 als Interaktionspartner von Kir3.2 identifizieren. Die Interaktion wird durch PDZ-Domäne 13 vermittelt. Vergleichende Sequenzuntersuchungen zwischen MUPP1 und INAD sowie NCAM und Opsin aus *Drosophila* gaben den ersten Hinweis darauf, dass NCAM möglicherweise ebenfalls an MUPP1 binden könnte. INAD ist das *Drosophila*-Ortholog zu INADL und umfasst fünf PDZ-Domänen. INAD bindet und verbindet mehrere Proteine in den Photorezeptorzellen von *Drosophila*, die an der Phototransduktion beteiligt sind. Es handelt sich um einen lichtsensitiven Calciumkanal (TRPL), Phospholipase C (PLC), Rhodopsin, Proteinkinase C (PKC) und Calmodulin (Shawn Xu et al., 1998). INAD stellt gewissermaßen die Plattform für die Bildung eines makromolekularen Signaltransduktionskomplexes dar (Kumar und Shieh, 2001). Eine analoge Funktion für MUPP1 als Adaptor zwischen Kir3.2 und NCAM lässt sich aufgrund der zuvor erwähnten Sequenzhomologien und der beobachteten Bindung von MUPP1 an Kir3.2 vermuten.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die potentielle direkte Interaktion zwischen MUPP1 und NCAM nachzuweisen. Im Fall einer direkten Interaktion sollte darüber hinaus die PDZ-Domäne von MUPP1 bestimmt werden, die für diese Interaktion verantwortlich ist und welcher Bereich der intrazellulären Domäne von NCAM das PDZ-bindende Motiv beinhaltet.

Für den Fall einer direkten Interaktion sollte zusätzlich der Frage auf den Grund gegangen werden, ob die NCAM-abhängige Reduzierung der Plasmamembranlokalisation der neuronalen Kir3-Kanäle durch MUPP1 als Verbindungsglied vermittelt wird, da MUPP1 ebenfalls direkt an Kir3.2 bindet.

2. Material

2.1. Lösungen, Puffer und Medien

2.1.1 Lösungen und Puffer

(in alphabetischer Reihenfolge)

Soweit nicht anders erwähnt, wurde je 1 l der Lösungen und Puffer mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

BCA-Reagenz A (<i>BCA-Test</i>)	1	% (v/v)	Bicinchoninsäure Dinatriumsalz
	1,7	% (w/v)	Na ₂ CO ₃ x H ₂ O
	0,16	% (w/v)	Natriumtartrat
	0,4	% (w/v)	NaOH
	0,95	% (w/v)	NaHCO ₃ , pH 11,25
BCA-Reagenz B (<i>BCA-Test</i>)	4	% (w/v)	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
Blockierungslösung (<i>ELISA</i>)	3	% (w/v)	bovines Serumalbumin in 1 x TBS
Blockierungslösung (<i>Immunzytochemie</i>)	1	% (w/v)	bovines Serumalbumin in PBS
Blockierungslösung (<i>Western Blot</i>)	3	% (w/v)	fettfreies Milchpulver in 1 x TBS
Blottingpuffer (5 x) (<i>Western Blot</i>)	72	g	Glycin
	15	g	Tris

Coomassie-Lösung (<i>Proteingele</i>)	40	% (v/v)	Ethanol
	10	% (v/v)	Essigsäure
	0,1	% (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R250
Coomassie-Entfärber (<i>Proteingele</i>)	30	% (v/v)	Ethanol
	10	% (v/v)	Essigsäure
Elutionspuffer (<i>GST-Fusionsproteine</i>)	20	mM	reduziertes Glutathion
	50	mM	Tris, pH 8.0
	1	%	Triton-X-100
Elutionspuffer (<i>His-Fusionsproteine</i>)	250	mM	Imidazol
	300	mM	NaCl
	50	mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8 mit NaOH eingestellt
Entwicklerlösung (<i>ELISA</i>)	4,75	ml	0,1 M Na-Acetat, pH 5.0
	0,25	ml	2 % ABTS in H ₂ O
	3,5	µl	30 % H ₂ O ₂
Fixierungslösung (<i>Immunzytochemie</i>)	4	% (w/v)	Paraformaldehyd in 1 x PBS
Lysispuffer (<i>GST-Fusionsproteine</i>)	1	x	PBS
	1	%	Triton-X-100
Lysispuffer (<i>His-Fusionsproteine</i>)	10	mM	Imidazol
	300	mM	NaCl
	50	mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8 mit NaOH
10 x PBS	1,37	M	NaCl
	100	mM	Na ₂ HPO ₄
	27	mM	KCl
	20	mM	KH ₂ PO ₄

PBSCM	1	x	PBS
<i>(Biotinylierung)</i>	0,2	mM	CaCl ₂
	2	mM	MgCl ₂
PBST	0,05	%	TWEEN 20 in 1 x PBS
RIPA-Puffer	150	mM	NaCl
	50	mM	Tris, pH 7,5
	1	%	Triton-X-100
	1	x	Complete-Proteaseinhibitor
Sammelgel (5 %ig)	3,77	ml	bidestilliertes Wasser
<i>(SDS-PAGE)</i>	0,32	ml	1 M Tris, pH 6,8
	0,05	ml	10 % SDS
	0,83	ml	Acrylamid-Bis 29:1
	25	µl	10 % APS
	5	µl	TEMED
5 x SDS Probenpuffer	2,2	ml	bidestilliertes Wasser
<i>(SDS-PAGE)</i>	0,5	ml	Tris, pH 6,8
	1,6	ml	10 % SDS
	3,2	ml	Glycerol
	0,1	ml	2 % Bromphenolblau
	0,4	ml	β-Mercaptoethanol
10 x SDS Laufpuffer	10	g	SDS
<i>(SDS-PAGE)</i>	30,2	g	Tris
	144,2	g	Glycin
“Stripping”-Lösung	0,5	M	NaCl
	0,5	M	Essigsäure

10 x TBS	1,5	M	NaCl
	100	mM	Tris, pH 8
TBST	0,05	%	Tween 20 in 1 x TBS
TFB I	30	mM	K-Acetat
	50	mM	MnCl ₂
	100	mM	RbCl
	10	mM	CaCl ₂
	15	%	Glycerin
	0,2	N	Acetat, pH 5,8
TFB II	10	mM	Na-MOPS
	75	mM	CaCl ₂
	10	mM	RbCl
	15	%	Glycerin, pH 7 mit NaOH
Trenngel (10 %ig) (SDS-PAGE)	3,92	ml	bidestilliertes Wasser
	5,26	ml	1 M Tris, pH 8,8
	0,14	ml	10 % SDS
	4,7	ml	Acrylamid-Bis 29:1
	70	µl	10 % APS
	7	µl	TEMED
Waschpuffer (GST-Fusionsproteine)	1	x	PBS
	163	mM	NaCl
	1	%	Triton-X-100
Waschpuffer 1 (His-Fusionsproteine)	10	mM	Imidazol
	600	mM	NaCl
	50	mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8 mit NaOH

Waschpuffer 2	20	mM	Imidazol
<i>(His-Fusionsproteine)</i>	300	mM	NaCl
	50	mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8 mit NaOH
Waschpuffer 3	40	mM	Imidazol
<i>(His-Fusionsproteine)</i>	300	mM	NaCl
	50	mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8 mit NaOH
Waschpuffer 4	60	mM	Imidazol
<i>(His-Fusionsproteine)</i>	300	mM	NaCl
	50	mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8 mit NaOH

2.1.2 Nähr- und Zellkulturmedien

LB-Medium	10	g/l	NaCl
	10	g/l	Bakto-Trypton
	5	g/l	Hefeextrakt
LB ^{amp} -Medium	100	mg/l	Ampicillin in LB-Medium
LB ^{kan} -Medium	25	mg/l	Kanamycin in LB-Medium
LB ^{amp} -Platten	20	g/l	Agar in LB-Medium
	100	mg/l	Ampicillin
LB ^{kan} -Platten	20	g/l	Agar in LB-Medium
	25	mg/l	Kanamycin
Glasgow's Minimal	10	% (v/v)	fötale Kälberserum
Essential Medium	50	U/ml	Penicillin/Streptomycin
(GMEM)	5	% (v/v)	Mastermix

Opti-Minimal	10	% (v/v)	fötale Kälberserum
Essential Medium (Opti-MEM)	50	U/ml	Penicillin/Streptomycin

2.2 Chemikalien

Chemikalien wurden – sofern nicht anders vermerkt – in p. a.-Qualität von folgenden Firmen bezogen: Biorad, Invitrogen, Perbio, Polysciences, Roth, Serva und Sigma-Aldrich. Die Ni-NTA-Agarosebeads stammten von der Firma Qiagen. Die Glutathion-Agarosebeads wurden von Sigma hergestellt. Die Streptavidin-gekoppelten Agarosebeads wurden bei Polysciences Europe geordert.

2.3 Enzyme, Reagenzien und DNA- bzw. Protein-Größenstandards

Enzyme zur Modifikation bzw. Spaltung von Nukleinsäuren wurden von New England Biolabs und Invitrogen bezogen. Die 100-bp-DNA-Leiter und die 1-kb Plus-DNA-Leiter waren Produkte der Firma Invitrogen. Von Bio-Rad wurde der *Precision Plus Protein Dual Color Standards* Protein Marker bezogen, wohingegen die *SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder* von Fermentas bezogen wurde (s. Anhang).

2.4 Kits

Verwendung fanden das QIAquick® PCR Purification Kit, das QIAquick® Gel Extraction Kit und Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen sowie das GFXTM Micro Plasmid Prep Kit der Firma Amersham Pharmacia.

2.5 Vektoren

pQE30 (Qiagen): Prokaryotischer Expressionsvektor, der für die rekombinante Expression von His-Fusionsproteinen benutzt wurde. Dabei befindet sich ein 6 x His-Epitop am N-Terminus des Fusionsproteins. Ampicillinresistenz.

pGEX-4T-2 (Amersham Pharmacia): Prokaryotischer Expressionsvektor, der für die rekombinante Expression von Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsproteinen eingesetzt wurde. Das GST-*tag* befindet sich am N-Terminus des Fusionsproteins. Ampicillinresistenz.

pGEM-T Easy (Promega): Vektor für die Subklonierung von PCR-Fragmenten über T/A-Klonierung. Ampicillinresistenz.

pcDNA3 (Invitrogen): Eukaryotischer Expressionsvektor für die Transfektion von Säugerzellen. Ampicillinresistenz.

pEGFP-C1 (Clontech): Eukaryotischer Expressionsvektor für die Transfektion von Säugerzellen. EGFP-(*enhanced green fluorescent protein*)-*tag* am N-Terminus des Fusionsproteins. Kanamycinresistenz.

pEGFP-N1 (Clontech): Eukaryotischer Expressionsvektor für die Transfektion von Säugerzellen. EGFP-*tag* am C-Terminus des Fusionsproteins. Kanamycinresistenz.

2.6 Bakterienstämme und Zelllinien

***E. coli* DH5 α** (Clontech) kam im Zuge der Klonierung von DNA-Konstrukten zum Einsatz.

Genotyp: *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17* ($r_k^- m_k^+$), *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, $\Delta(\text{lacZYA-argFV169})$, $\Phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$, F⁻.

***E. coli* BL21(DE3)** (Novagen) wurde für die Expression von GST-Fusionsproteinen benutzt.

Genotyp: ompT, hsdS_B (r_B⁻m_B⁻), gal, dcm (DE3), F⁻.

***E. coli* M15(pREP4)** (Qiagen) wurde für die Expression von His-Fusionsproteinen verwendet.

Genotyp: NaI^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺, F⁻.

CHO-K1 (Chinese hamster ovary) (ATCC CCL-61): Dehydrofolatreduktase-defiziente Hamsterzelllinie (Puck, 1958).

HEK293 (Human embrionic kidney) (ATCC CRL-1573) (Graham et al., 1977).

N2A: Maus-Neuroblastoma-Zelllinie 2A (ATCC CCL-131). Etabliert von einem spontanen Tumor eines Albino A-Mäusestammes (Klebe und Ruddle, 1969).

2.7 Primäre Antikörper

Anti-Flag (M2) (Sigma-Aldrich): aus Maus. Monoklonaler Antikörper, der das DYKDDDDK-Motiv erkennt. Verdünnung für Immunzytochemie: 1:50.

Anti-GAPDH (14C10) (Cell Signaling Technology): aus Kaninchen. Monoklonaler Antikörper. Verdünnung im *Western Blot*: 1:5000 in 5 % Milchpulver/TBS.

Anti-Glutathion-S-Transferase (GST) (Amersham Pharmacia): aus Ziege. Monoklonaler Antikörper. Verdünnung im *Western Blot*: 1:4000 in 5 % Milchpulver/TBS. Verdünnung für ELISA: 1:1000 in 3 % BSA/TBS.

Anti-green fluorescent protein (GFP) (Chemicon): aus Maus. Monoklonaler Antikörper. Verdünnung im *Western Blot*: 1:2000 in 5 % Milchpulver/TBS.

Anti-Hsp70 (Santa Cruz Biotechnology): aus Maus. Monoklonaler Antikörper. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS.

Anti-Kir3.1: aus Kaninchen. Polyklonaler Antikörper. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS. Verdünnung für Immunzytochemie: 1:50. Zur Verfügung gestellt von R.W. Veh, Berlin.

Anti-Kir3.2 (C-20) (Santa Cruz Biotechnology): aus Ziege. Polyklonaler Antikörper, der den C-Terminus von Kir3.2 detektiert. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS.

Anti-Mpdz 2: aus Kaninchen. Polyklonaler Antikörper, der die dritte PDZ-Domäne von MUPP1 bindet. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS.

Anti Mpdz 4: aus Kaninchen. Polyklonaler Antikörper, der die PDZ-Domänen elf, zwölf und 13 von MUPP1 nachweist. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS.

Anti-MUPP1: aus Kaninchen. Polyklonaler Antikörper, der die PDZ-Domänen drei bis sechs von MUPP1 detektiert. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS.

Anti-Myc (9E10) (Santa Cruz Biotechnology): aus Maus. Monoklonaler Antikörper, der die C-terminale Domäne von c-Myc erkennt. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS.

Anti-NCAM (D3): aus Maus. Monoklonaler Antikörper, der gegen das von Exon 18 kodierte Insert von NCAM180 gerichtet ist. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS. Verdünnung für ELISA: 1:1000 in 3 % BSA/TBS.

Anti-NCAM (1B2) (Zellkulturüberstand): aus Kaninchen. Polyklonaler Antikörper, der die extrazelluläre Domäne von NCAM erkennt. Verdünnung im *Western Blot*: 1:5000 in 5 % Milchpulver/TBS.

Anti-NCAM (5B8) (Zellkulturüberstand): aus Maus. Monoklonaler Antikörper, der den absoluten C-Terminus der intrazellulären Domäne von NCAM140 und 180 erkennt. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS. Verdünnung für ELISA: 1:1000 in 3 % BSA/TBS.

Anti-NCAM (P61): aus Maus. Monoklonaler Antikörper, der an die intrazelluläre Domäne von NCAM140 und 180 bindet. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS.

Anti-pentaHis (Qiagen): aus Maus. Monoklonaler Antikörper, der das 5 x His-Epitop erkennt. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS.

rbAnti-PDZ10: aus Kaninchen. Polyklonaler Antikörper, der die zehnte PDZ-Domäne von MUPP1 detektiert. Verdünnung im *Western Blot*: 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS. Zur Verfügung gestellt von H. J. Kreienkamp, Hamburg.

2.8 Sekundäre Antikörper

Die *horseradish peroxidase*-(HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper stammten von der Firma Jackson ImmunoResearch (Vertrieb durch Dianova). Die Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:10000 in 3 % Milchpulver/TBS im *Western Blot* eingesetzt. Im ELISA wurden sie 1:1000 verdünnt in 3 % BSA/TBS appliziert.

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden mit Cy2-, Cy3- und Cy5-gekoppelte Sekundärantikörper (Dianova) in einer Verdünnung von 1:200 in 1 % BSA/PBST eingesetzt.

2.9 Computergestützte Sequenzanalysen

Sequenzanalysen und –vergleiche wurden mit Hilfe des Programms DNASTAR der Firma Lasergene durchgeführt (www.dnastar.com). Die folgenden Datenbanken wurden für die Untersuchungen genutzt: Medline-, BLASTN- und BLASTP-Server der NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov), ExPASy Molecular Biology Server (<http://us.expasy.org/>), BCM Search Launcher (Baylor College of Medicine, <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>), Coudes (<http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/Coudes/COUDES.html>), Chou-Fasman (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1), PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>), BetaTPred2 (<http://www.imtech.res.in/raghava/betapred2/server.html>).

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Techniken

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA wurde in 50 μ l Ansätzen durchgeführt. Dazu wurden die folgenden Reagenzien auf Eis zusammenpipettiert und die DNA je nach Anwendung entweder mit Hilfe von *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen) oder *Pfu*- bzw. *Pfx*-DNA-Polymerase (ebenfalls Invitrogen) vervielfältigt.

DNA	×	ng
Oligonukleotid 1	10	pmol
Oligonukleotid 2	10	pmol
dNTP	5	nmol je Nukleotid
10 x PCR-/ <i>Pfu</i> -/ <i>Pfx</i> -Puffer	5	μ l
Polymerase	2,5	U
50 mM MgCl ₂ /MgSO ₄	1-15	μ l
DMSO	2,5	μ l
ddH ₂ O	auf 50	μ l

Bei Verwendung von Oligonukleotiden (Metabion) mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen (T_m) wurde die PCR bei der niedrigeren T_m durchgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden in MJ Research PTC-200 Thermocyclern durchgeführt.

3.1.2 Aufreinigung von PCR-Produkten (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen)

PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Aufreinigungskit der Firma Qiagen aufgereinigt. Es wurde dabei nach dem vom Hersteller angegebenen PCR-Aufreinigungsprotokoll mittels Mikrozentrifuge verfahren.

3.1.3 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsreaktionen wurden in 10- μ l-Ansätzen durchgeführt und nach folgendem Schema auf Eis zusammenpipettiert.

DNA	x	ng
Restriktionsenzym A	6	U
Restriktionsenzym B	6	U
10 x Restriktionspuffer	1	μ l
10 mM DTT (bei Bedarf)	1	μ l
ddH ₂ O	auf 10	μ l

Der Verdau fand bei einer für die Enzyme (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers optimalen Temperatur für 1-2 h statt. Für die Reaktionen wurden die mitgelieferten Puffer benutzt.

3.1.4 Ligation von DNA

Für die Ligation wurde eine bestimmte Menge Plasmid-DNA mit einem drei- bis neunfachen Überschuß an Insert-DNA versetzt und mit folgenden Reagenzien (Roche) auf Eis zusammenpipettiert.

Plasmid-DNA	x	mol
Insert-DNA	3-6 x	mol
T ₄ -Ligase	1	U
10 x Ligasepuffer	1	μ l
ddH ₂ O	auf 10	μ l

Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur (RT) 2-3 h lang inkubiert und anschließend für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien benutzt.

3.1.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (Inoue et al., 1990)

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde eine Bakterienkolonie auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde von einem Klon eine 10 ml-Kultur in LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde mit 100 ml LB-Medium versetzt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,3-0,4 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis gekühlt, anschließend 5 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert, das Pellet in 30 ml TFB I-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis gekühlt und erneut 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 4 ml TFB II-Puffer resuspendiert, erneut 10 min auf Eis gekühlt und anschließend in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

3.1.6 Transformation von Bakterien

Zur Transformation der *E.coli*-Stämme BL21, M15 und DH5α wurden 100 µl einer Suspension der chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA (10-100 ng) oder einem Ligationsansatz (50 ng DNA) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (3 min bei 42°C) und Abkühlung (3 min im Eisbad) wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden sedimentiert (1 min, 2000 rpm, RT), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert, auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

3.1.7 Plasmidisolierung aus 3 ml *E.coli*-Bakterienkulturen (GFX™ Micro Plasmid Prep Kit, Amersham Pharmacia)

Die Plasmide aus den 3 ml-Übernachtskulturen wurden mit dem GFX™ Micro Plasmid Präparationskit von Amersham Pharmacia laut Protokoll 1 (Aufreinigung aus 1-1,5 ml Kulturen) isoliert.

3.1.8 Plasmidisolierung aus 200 ml *E.coli*-Bakterienkulturen (QIAfilter Plasmid Maxi Kit, Qiagen)

Die Plasmide aus den 200 ml-Übernachtskulturen wurden mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen nach dem Protokoll „*Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kits*“ isoliert.

3.1.9 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Die DNA-Präparationen wurden mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) - Gemisch versetzt (1 ml Gemisch / ml DNA-Präparation) und gevortext. Das Gemisch wurde zwecks besserer Phasentrennung 5 min bei RT und 13000 x g zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von Chloroform (1 ml Chloroform / ml obere Phase) wurde erneut 5 min bei RT und 13000 x g zentrifugiert, und die obere Phase abermals in ein neues Gefäß pipettiert. Anschließend wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und das 2,5 fache Volumen 100%igen Ethanol beigemischt, gut gevortext und der Ansatz über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde für 30 min bei RT und 13000 x g zentrifugiert und das DNA-Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Abschließend wurde 5 min bei RT und 13000 x g zentrifugiert, die DNA getrocknet und in einem angemessenen Volumen H₂O gelöst.

3.1.10 Herstellung eines Glycerin-Stocks zur Langzeitlagerung von Bakterienkulturen

Ausgewählte Bakterienstämme wurden in Flüssigkultur (OD₆₀₀ 0,5-0,6) 1:1 mit 100% Glycerin gemischt und bei -80°C gelagert.

3.1.11 Gelelektrophorese von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele in 1 x TAE-Puffer gefahren (SubCell® GT Elektrophoresekammern, BIO-RAD). Je nach Fragmentgrößen wurden 0,8-2%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese wurde je nach Anwendung und Gelgröße bei 90-120 V durchgeführt. Die DNA wurde mit der entsprechenden Menge 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Nach dem Ende der Elektrophorese wurden die Gele 30 min in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml in 1 x TAE-Puffer) gefärbt und mit Hilfe eines Imagesystems (E.A.S.Y. RH Imager, HEROLAB) im UV-Licht analysiert.

3.1.12 DNA-Isolierung aus Agarosegelen (QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen)

DNA-Banden aus Restriktionsansätzen oder PCR-Reaktionen wurden nach Ethidiumbromidfärbung mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten (vgl. 3.1.11). Danach wurde das zugehörige DNA-Fragment bzw. PCR-Produkt mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel eluiert (siehe QIAquick Gel Extraction Kit Protocol) und in 30 µl 10 mM Tris, pH 8,0 resuspendiert.

3.1.13 DNA-Reinheitsanalyse und -Konzentrationsbestimmung

Die Reinheit und Konzentration von DNA wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt. Dabei wurden UV/Vis-Spektren im Bereich zwischen 320 nm und 190 nm Wellenlänge gemessen. DNA-Präparationen mit einem Extinktionsverhältnis E260/E280 zwischen 1,8 und 2,0 wurden für ausreichend rein befunden und für weitere Versuche eingesetzt.

3.1.14 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse von DNA erfolgte in der Sequenzierabteilung des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH). Hierzu wurde 1 µg DNA in 6 µl ddH₂O gelöst und mit 1 µl des entsprechenden Sequenzierprimers (10 pM) versetzt.

3.2 Proteinbiochemische Techniken

3.2.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit dem *bicinchoninic acid* (BCA)-Test

Die Bestimmung der Konzentration von Proteingemischen wurde mit Hilfe des *BCA Protein Assay Reagent Kits* der Firma Pierce (Bonn) in Mikrotiter-Platten durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurden Reagenz A und B im Verhältnis 50:1 gemischt. Je 10 µl Proteinlösung wurden mit 200 µl dieser BCA-Lösung versetzt, gemischt und 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei 560 nm in einem ELISA-Meßgerät und die Ermittlung des Proteingehaltes durch Korrelation mit einer BSA-Eichreihe.

3.2.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen und Proteingemischen wurden SDS-Polyacrylamidgele (Trenngel 10%ig, Sammelgel 5%ig, 1 mm Dicke) in Mini-Protean III-Elektrophoresekammern (BIO-RAD) verwendet. Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge 5 x SDS Probenpuffer versetzt, 5 min aufgekocht und kurz abzentrifugiert. Die Elektrophorese in 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer wurde mit 80 V gestartet. Nach 10 min wurde die angelegte Spannung auf 130 V erhöht. Die Laufzeit richtete sich nach den aufzutrennenden Proteingrößen. Als Molekulargewichtsstandard und zur Überprüfung des Transfers im anschließenden *Western Blot* wurde die vorgefärbte BenchMarkTM-Leiter (Invitrogen) benutzt.

3.2.3 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Alle Schritte erfolgten bei RT unter leichtem Schütteln. Das Gel wurde 1 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Danach wurde es in die Coomassie-Entfärberlösung gelegt. Es wurde so lange entfärbt, bis sich die Banden deutlich vom Hintergrund abhoben. Danach wurde das Gel in 1 x PBS aufbewahrt.

3.2.4 Western Blot-Analyse

Nach der Elektrophorese wurde das Transfersandwich unter Blotpuffer zusammengebaut. Es wurden Nitrocellulosemembranen (Protran Nitrocellulose BA 85, 0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) verwendet. Zur Durchführung des Transfers bei konstanter Spannung wurde eine Mini-Trans-Blot-Transferzelle von BIO-RAD benutzt (120 min, 80 V, Eiskühlung oder 30 V über Nacht bei 4°C).

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran mit der proteingebundenen Seite nach oben in eine Glasküvette gelegt. Dann wurden 10 ml Blockierungslösung zugegeben und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht appliziert. Die Membran wurde dann 5 x 10 min mit TBST gewaschen und 1 h bei RT mit dem passenden, mit *horseradish peroxidase*-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST (s. o.) wurden die Proteinbanden mit Hilfe verstärkter Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Nitrocellulosemembran wurde mit der SuperSignal West-Detektionslösung (Pierce, 1:1-Mischung der Lösungen I und II) beträufelt und luftblasenfrei zwischen zwei Cellophanfolien gelegt. Die Auswertung erfolgte durch Belichtung eines Röntgenfilms (Biomax-MR, Kodak).

3.2.5 Strippen einer Nitrocellulosemembran

Zur Detektion eines weiteren Antigens auf einer bereits benutzten Nitrocellulose-Membran wurde diese mit einer *Stripping*-Lösung versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Dies führt zum Ablösen der bereits

gebundenen Antikörper. Nach einer kurzen anschließenden Inkubation mit 1 M Tris-HCl (pH 8,0) wurde die Detektion wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt.

3.2.6 Rekombinante Expression His-markierter Proteine mit dem pQE-System in *E.coli* und deren Aufreinigung (The QIAexpressionist™ Handbuch, Qiagen, 2002)

Bakterien vom *E.coli*-Stamm M15(pREP4) wurden mit den Expressionskonstrukten im pQE30-Vektor transformiert und auf LB-Amp/Kan-Platten ausgestrichen. 100 ml LB-Amp/Kan-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. 5 l LB-Amp/Kan-Medium wurden mit der Vorkultur inokuliert und bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,7 geschüttelt. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und die Kultur weitere 4,5 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 3500 x g sedimentiert und bis zur Lyse bei -20°C gelagert. Die Bakterien wurden in Lysispuffer resuspendiert und durch dreimalige Behandlung mit einer French Press aufgeschlossen. Die native Proteinaufreinigung aus den aufgeschlossenen Bakterien erfolgte mit Hilfe des N-terminalen His-tags und Nickel-beads nach Protokoll 12 (mit Ausnahme der Waschschriffe) des QIAexpressionist™ Handbuchs. Die Nickel-beads wurden je einmal mit jedem Waschpuffer 30 min bei 4°C gewaschen. Elutionsfraktionen wurden vereinigt und bei 3000 x g in Vivaspin–Aufkonzentrierungsröhrchen (Vivascience) zentrifugiert. Die His-Fusionsproteine wurden auf diese Weise in 1 x PBS eingengt.

3.2.7 Rekombinante Expression GST-markierter Proteine mit dem pGEX-System in *E.coli* und deren Aufreinigung (Sambrook et al., 2001)

Bakterien vom *E.coli*-Stamm BL21 wurden mit dem Expressionskonstrukt im pGEX-4T-2-Vektor transformiert und auf LB-Amp-Platten ausgestrichen. 25 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. 500 ml LB-Amp-Medium wurden mit der Vorkultur inokuliert und bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,5-0,7 geschüttelt. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und die Kultur weitere 3 h bei 30°C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 3500 x g sedimentiert

und bis zur Lyse bei -20°C gelagert. Die Bakterien wurden in Lysispuffer resuspendiert und durch dreimalige Behandlung mit einer French Press aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei $10000 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Verhältnis 3:1 mit einer 50%igen Glutathion-Agarosesuspension (Sigma-Aldrich) versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Nach der Inkubation mit Glutathion-Agarose wurde mit Waschpuffer viermal je 30 min bei 4°C auf dem Schüttler gewaschen. Dann wurde dreimal je 1 h bei 4°C unter leichtem Invertieren mit Elutionspuffer eluiert. Nach jedem Wasch- und Elutionsschritt wurden die *beads* bei $500 \times g$ und 4°C 5 min abzentrifugiert. Die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden per SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Elutionsfraktionen wurden gegebenenfalls vereinigt bei $3000 \times g$ in Vivaspin-Aufkonzentrierungsröhrchen (Vivascience) zentrifugiert. Die GST-Fusionsproteine wurden auf diese Weise in 1 x PBS eingeeengt.

3.2.8 Direkter Bindungstest mit Hilfe eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA)

Die Beschichtung der *wells* der 96-*well*-Platten (Nunc-Immuno Module, VWR, Darmstadt) erfolgte über Nacht bei 4°C mit jeweils $50 \mu\text{l}$ einer Proteinlösung definierter Konzentration. Die Proteine wurden zu diesem Zweck in PBS verdünnt. Anschließend wurde für 1 h bei RT mit $50 \mu\text{l}$ Blockierungslösung blockiert. Anschließend wurde zweimal mit je $300 \mu\text{l}$ TBS pro *well* gewaschen. Nun wurden $50 \mu\text{l}$ des zweiten Proteins (des potentiellen Bindungspartners) – gelöst in Blockierungslösung – hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei RT auf einem Schüttler. Im Anschluss daran wurde dreimal mit je $300 \mu\text{l}$ TBS gewaschen. Die Ansätze wurden mit jeweils $50 \mu\text{l}$ primärem Antikörper – 1:1000 verdünnt in der Blockierungslösung – für eine Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubiert und dann dreimal mit je $300 \mu\text{l}$ TBS gewaschen. $50 \mu\text{l}$ des sekundären Antikörpers, der ebenfalls 1:1000 in der Blockierungslösung verdünnt wurde, wurden ebenfalls für eine Stunde auf einem Schüttler bei RT auf den Ansätzen belassen. Im Folgenden wurde viermal mit $300 \mu\text{l}$ TBS gewaschen. Abschließend wurden je *well* $50 \mu\text{l}$ Entwicklerlösung verabreicht. Nach maximal fünf bis zehn Minuten wurde die Absorption im ELISA-Messgerät bei 405 nm gemessen.

3.3 Zellbiologische Techniken

3.3.1 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden im 37°C Wasserbad schnell aufgetaut und in 10 ml des entsprechenden Mediums in einer Kulturflasche ausgesät.

3.3.2 Kultivierung von CHO-Zellen

Für die Kultivierung der *chinese hamster ovary*-(CHO)-Zelllinie wurde GME-Medium der Firma PAA Laboratories (Cölbe) verwendet. Dem Basalmedium GMEM wurden 10 % FCS (fötales Kalberserum), 5 % Mastermix und 2 % Penicillin/Streptomycin zugefügt. Für die Kultivierung wurden Kulturflaschen in einer Größe von 75 cm² verwendet.

Die Passage der Zellen wurde bei ungefähr 90 %iger Konfluenz der Zellen durchgeführt. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen einmal mit 10 ml Hank's gepufferter Salz-Lösung (HBSS, PAA Laboratories, Cölbe) gewaschen. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche erfolgte bei RT durch eine Inkubation von 2–5 min mit 3 ml Trypsin-EDTA (1x) (PAA, Cölbe). Nach einer Zugabe von weiteren 7 ml GMEM wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und vereinzelt. 1-2 ml der Zellsuspension wurden in eine neue Flasche überführt und mit GMEM auf 10 ml aufgefüllt.

3.3.3 Kultivierung von HEK-Zellen

Für die Kultivierung der *human embryonic kidney*-(HEK)-Zelllinie wurde Opti-ME-Medium der Firma Invitrogen benutzt. Dem Basalmedium wurden 10 % FCS und 2 % Penicillin/Streptomycin beigefügt. Die Kultivierung erfolgte ansonsten wie die Kultivierung der CHO-Zellen.

3.3.4 Kultivierung von N2A-Zellen

Die Neuro-2A-Zellen (N2A) wurden in Opti-ME-Medium der Firma Invitrogen (Karlsruhe) kultiviert. Das Basalmedium Opti-MEM wurde mit 5 % FCS und 2 % Penicillin/Streptomycin supplementiert. Auch hier verlief die Kultivierung analog der bereits für CHO- und HEK-Zellen beschriebenen Vorgehensweise.

3.3.5 Langzeitlagerung von Zelllinien

Für die Langzeitlagerung der Zelllinien wurden die Zellen einer konfluenten Kulturflasche, einmal mit 10 ml HBSS gewaschen, wie beschrieben trypsinisiert und anschließend in 7 ml HBSS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 1-2 ml Einfriermedium aufgenommen. Aliquots der einzufrierenden Zellen wurden in Isopropanol in speziellen Einfrierbehältern auf -80°C gekühlt, die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C bzw. in flüssigem Stickstoff bei -169°C.

3.3.6 Transfektion von Zellen mit Lipofectamin

(Lipofectamine Plus manual, Invitrogen)

CHO-, HEK- und N2A-Zellen wurden mit dem Lipofectamin Plus Kit nach dem Lipofectamin Plus manual transfiziert.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen derart verdünnt ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Dichte von 80-90 % erreicht hatten. DNA und Plus Reagenz wurden im jeweiligen Basalmedium ohne Zusätze vorkomplexiert. Je *well* der 6-*well*-Platte wurden 6 µl Plus Reagenz und 2 µg DNA in 100 µl Medium ohne Zusätze gemischt. Zunächst wurde die DNA, dann das Plus Reagenz ins Medium pipettiert. Die Ansätze wurden 15 min bei RT inkubiert.

Im Anschluß wurde in Medium ohne Zusätze gelöstes Lipofectamin zu dem DNA-Plus Reagenz-Komplex zugegeben. Je *well* eines 6-*wells* wurden 4 µl Lipofectamin in 100 µl Medium gelöst.

Das Gemisch aus Plus Reagenz, DNA und Lipofectamin wurde 30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und 0,8 ml frisches Medium ohne Zusätze in jedes *well* vorgelegt.

Nach Ablauf der halbstündigen Inkubation wurde das DNA/Lipofectamin-Gemisch auf die Zellen pipettiert, das ganze 4-5 h bei 37°C inkubiert und dann 1 ml Medium mit 20 % FCS aber ohne Penicillin/Streptomycin zugefügt. Die Zellen wurden für 24-48 h bei 37°C im Inkubator belassen und dann geerntet.

3.3.7 Transfektion von Zellen mit MATRa

(*Magnet Assisted Transfection*, IBA BioTAGnology)

CHO-, HEK- und N2A-Zellen wurden mit der *Magnet Assisted Transfection* Methode von IBA BioTAGnology transfiziert.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so verdünnt ausgesäht, dass sie am Tag der Transfektion eine Dichte von 30-60 % erreicht hatten. Zunächst wurden je *well* eines 6-*well* 3 µg DNA in 200 µl Medium ohne Zusätze verdünnt. Nun wurden je Ansatz 3 µl MATRa-A Reagenz beigefügt und das ganze 20 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Reaktionsansätze direkt auf die Zellen pipettiert und das 6-*well* für 15 min bei RT auf der zum MATRa-System gehörigen Magnetplatte inkubiert.

Danach wurden die Zellen weitere 24-48 h bei 37°C kultiviert und anschließend geerntet.

3.3.8 Transfektion von Zellen mit FuGENE 6

(*FuGENE 6 transfection manual*, Roche)

CHO-, HEK- und N2A-Zellen wurden mit dem FuGENE 6 Transfektionsreagenz von Roche transfiziert.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen verdünnt ausgesäht, so dass sie am Folgetag eine Dichte von 50-80 % erreicht hatten.

Pro *well* eines 6-*wells* wurden zunächst 3 µl FuGENE 6 Reagenz in 97 µl Medium ohne Zusätze gelöst. Es folgte eine Inkubation bei RT für 5 min. Anschließend wurden 2 µg DNA beigemischt und bei RT für 15-45 min inkubiert. Schließlich wurde das fertige

Gemisch direkt auf die Zellen pipettiert und die Zellen bei 37°C für 24-48 h wachsen gelassen und dann geerntet.

3.3.9 Ernte und Lyse der transfizierten Zellen

24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in eiskaltem PBS geerntet, bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer für 1 h bei 4°C auf einem Rotor lysiert und anschließend die Zelltrümmer bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, einer Proteinkonzentrationsbestimmung unterzogen und stand anschließend für weiterführende Experimente zur Verfügung.

3.3.10 Zelloberflächenbiotinylierung transient transfizierter CHO-Zellen

Die Zelloberflächenbiotinylierung wurde in Anlehnung an das Protokoll von Schmidt et al. (1997) durchgeführt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBSCM gewaschen. Biotinylierung der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, USA) in PBSCM für 10 min bei 4° C.

Die Biotinylierungsreaktion wurde gestoppt durch Inkubation mit 20 mM Glycin in PBSCM bei 4° C für 10 min. Es folgte ein Waschschrift mit PBSCM.

Die Zellen wurden sofort in RIPA-Puffer lysiert und der Überstand nach Zentrifugation bei 14000 x g bei 4 °C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Test festgestellt.

Durch Inkubation mit Streptavidin-gekoppelten Agarose-*beads* bei 4° C über Nacht wurden die biotinylierten Proteine herausgefischt. Die *beads* wurden abzentrifugiert und zweimal mit RIPA-Puffer gewaschen. Abschließend erfolgte die Zugabe von SDS-Probenpuffer zu den *beads* und dann die Auswertung mittels SDS-PAGE und *Western Blot*.

3.3.11 Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin

Die Deckgläschen (VWR, Darmstadt) mit einem Durchmesser von 15 mm wurden 30 min in einem Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler mit Aceton gewaschen. Anschließend wurden sie dreimal mit Wasser gewaschen, um das Aceton zu entfernen. Die Beschichtung der Deckgläschen mit poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) erfolgte ü.N. bei 4°C. Zu diesem Zweck wurden sie in einer 0,01 %igen Lösung von poly-L-Lysin (PLL) in PBS auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten wiederum drei Waschschrte mit Wasser. Im Anschluss wurden die Deckgläschen unter der Sterilbank in einer zuvor mit Alufolie bedeckten und mit UV-Licht bestrahlten Wanne einzeln ausgelegt und getrocknet. Die getrockneten Deckgläschen wurden anschließend 15 min mit UV-Licht bestrahlt und unter sterilen Bedingungen bei RT aufbewahrt.

3.3.12 Einzelzellkultur hippocampaler Neurone

Hippocampale Neurone aus dem Gehirn neonataler Mäuse wurde dankenswerterweise von Dr. Vladimir Sytnyk (ZMNH, Inst. Prof. Schachner) präpariert und kultiviert, wie bei Andreyeva (Aksana Andreyeva, Dissertation, 2008) beschrieben.

3.3.13 Transfektion hippocampaler Neurone

Die Transfektion hippocampaler Neurone wurde, wie bei Andreyeva (Aksana Andreyeva, Dissertation, 2008) beschrieben, ebenfalls von Dr. Sytnyk durchgeführt.

3.3.14 Lebendfärbung hippocampaler Neurone

Die auf Deckgläschen adhärennten Zellen wurden kurz mit warmem Medium ohne Zusätze gewaschen. Der Primärantikörper wurde in Medium ohne Zusätze verdünnt und für 15 min bei 37°C auf den Zellen belassen. Danach wurde dreimal mit warmem Medium gewaschen. Nun wurden die Zellen für 15 min im Dunklen bei 37°C mit dem in Medium ohne Zusätze verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Wieder wurde dreimal mit

warmem Medium gewaschen. Die lebendgefärbten Zellen wurden anschließend fixiert, permeabilisiert und dann zusätzlichen Immunfärbungen unterzogen.

3.3.15 Immunzytochemie fixierter hippocampaler Neurone

Die auf Deckgläschen adhärennten Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen und anschließend zum Fixieren in 4 % Paraformaldehyd in PBS bei RT für 15-20 min inkubiert. Danach wurde zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei RT mit 1 % BSA/PBS blockiert. Der Primärantikörper, der in 0,1 % BSA/PBS verdünnt wurde, wurde über Nacht bei 4°C auf den Zellen belassen. Zu diesem Zweck wurden 30 µl der Antikörperlösung in einer feuchten Kammer auf die Zellen getropft. Am nächsten Tag wurde dreimal für 5 min mit eiskaltem PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem in 0,1 % BSA/PBS 1:200 verdünnten Sekundärantikörper. Diese wurde für 1 h bei RT in der feuchten Kammer und im Dunklen durchgeführt. Es schlossen sich drei weitere Waschschriffe über 5 min mit eiskaltem PBS an.

Abschließend wurden die Proben eingebettet, indem die Deckgläschen zunächst kurz mit ddH₂O gewaschen und gleich darauf mit Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, USA) auf Objektträger gedeckelt wurden. Zum Deckeln wurde ein Tropfen Fluoromount G auf den Objektträger getan und das Deckgläschen mit der mit Zellen bewachsenen Seite voran auf den Tropfen aufgesetzt.

Die fertigen Präparate wurden einer eingehenden mikroskopischen Analyse unterzogen und ansonsten bei 4°C im Dunklen gelagert.

3.3.16 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Alle Aufnahmen von hippocampalen Neuronen wurden mit einem Zeiss LSM510 Argon-Krypton konfokalen Laser-Scanning Mikroskop gemacht. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 1024x1024 gescannt. Die Signalverstärkung und Tiefendiskriminierung wurden derart eingestellt, dass ein optimales Verhältnis von Signal zu Hintergrund vorlag.

4. Ergebnisse

Einige Hinweise aus früheren Untersuchungen gaben Anlass zu der Vermutung, dass MUPP1 und NCAM miteinander interagieren. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Interaktion zwischen MUPP1 und NCAM zu untersuchen.

Durch Co-Immunpräzipitation aus transient transfizierten CHO-Zellen und *Crosslinking* aus Gehirnhomogenat von Mäusen konnte eine Assoziation von MUPP1 und NCAM180 nachgewiesen werden (Delling, M., und Friedrich, C.; persönliche Mitteilung, 2002). Aufgrund von Sequenzhomologie konnte ein mögliches PDZ-Bindemotiv am C-Terminus von NCAM140 und 180 identifiziert werden (ESKA, siehe Abb. 7). Dies impliziert eine direkte Interaktion mit einer der PDZ-Domänen von MUPP1. Mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) sollte die direkte Interaktion gezeigt und die betroffene PDZ-Domäne identifiziert werden. Dazu wurden je 1-3 PDZ-Domänen von MUPP1 als GST-Fusionsproteine und die intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 aus der Ratte als His-Fusionsproteine (His-NCAM140 ID bzw. His-NCAM180 ID) in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt.

```
MDITCYFLNKCGLLMCIAVNLCGKAGPGAKGKDMEEGKAAFSKDESKEPIVEVRTEEERTPNHDG
GKHTEPNETTPLEPELPADTTATVEDMLPSVTTVTTNSDTITETFATAQNSPTSETTLTSSIAPPAT
TVPESNSVPAGQATPSKGV TASSSSPPASVPKVAPPVDLSDTPTSAPSANNLSSTVLANQGAVLSPS
TPASAGETSKVPATSKPSPTPTTPAGAASPLAAVAAPATEAPQAKQEAPSTKGLDPEPTQPGTVK
NPTEAATAPASPKSKAPSVSTTNPSQGEDLKMDEGNFKTPDIDLAKDVFAALGSPAPATGASGQA
SELAPSTADSAVPPAPAKTEKGPVETKSEPQSEAKPAPTEVKTPNEATQTKENESKA
```

Abbildung 7: Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne von NCAM. Der von Exon 18 kodierte Abschnitt, der nur in NCAM180 vorkommt, wurde blau hervorgehoben. Das potentielle PDZ-bindende Motiv am absoluten C-Terminus ist hier in rot dargestellt.

4.1 Klonierung der GST-MUPP-Fusionskonstrukte

Die PDZ-Domänen 1, 2, 3-4, 5-6, 7-9 und 10-13 von murinem MUPP1 wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend über EcoRI- und XhoI-Schnittstellen im Leseraster in den pGEX-4T-2-Expressionsvektor kloniert. Der Vektorabschnitt 5' des Inserts kodiert für

die Glutathion-S-Transferase (GST), so dass die Fusionsproteine das GST-tag am N-Terminus tragen. Diese Konstrukte wurden für die Expression in *E.coli* BL21(DE3) verwendet.

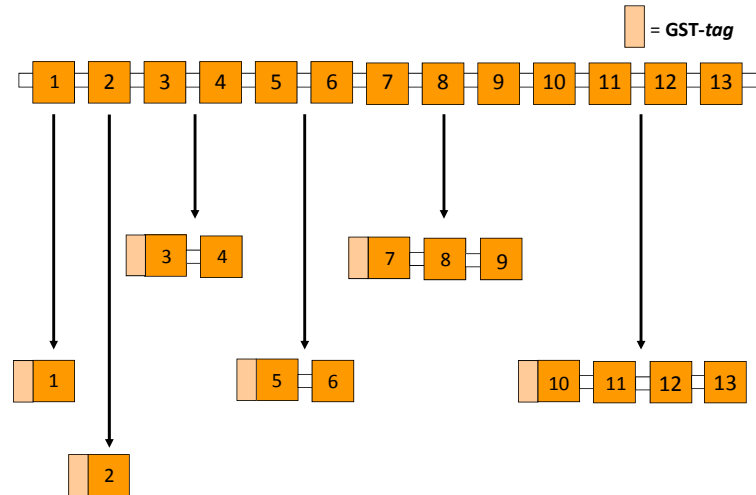


Abbildung 8: Schematische Darstellung der GST-MUPP-Fusionsproteine.

4.2 Nachweis der direkten Interaktion von MUPP1 und NCAM

4.2.1 Direkte Bindung von GST-MUPP1-Fusionsproteinen an die intrazelluläre Domäne von NCAM180

Die GST-MUPP-Fusionsproteine und His-NCAM180 ID wurden für ELISA-Bindungsexperimente eingesetzt. 96-well-Platten wurden mit den GST-MUPP-Fusionsproteinen beschichtet und His-NCAM180 ID in steigenden Konzentrationen hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde GST zum Beschichten verwendet und in gleicher Weise mit His-NCAM180 ID inkubiert. Zum Nachweis von His-NCAM180 ID wurde ein α -NCAM-Antikörper (5B8) benutzt, der spezifisch die intrazelluläre Domäne (ID) der beiden transmembranen Isoformen von NCAM erkennt. Abbildung 9 gibt eine Übersicht über das Bindungsverhalten der GST-MUPP-Fusionsproteine.

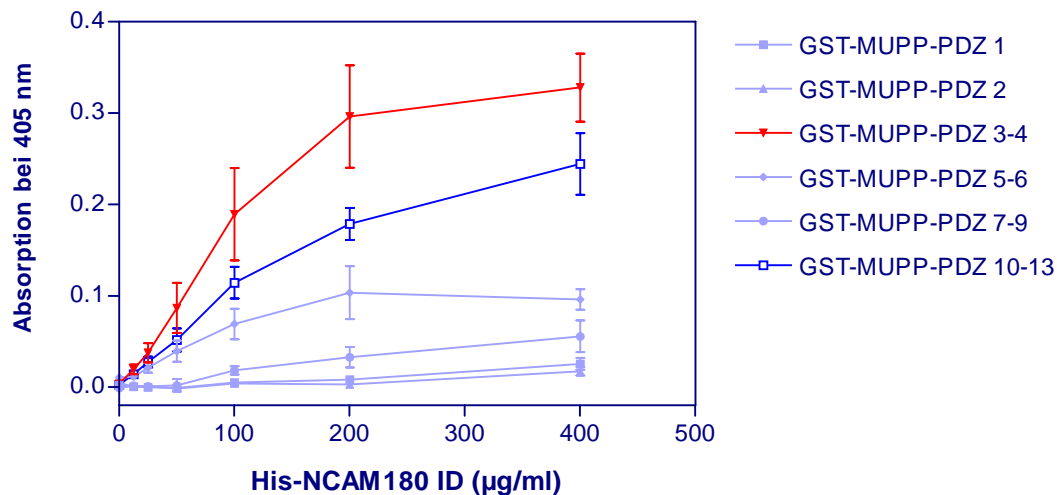


Abbildung 9: Ergebnis der Bindungsstudie mit GST-MUPP-Fusionsproteinen und His-NCAM180 ID. Mit GST-MUPP-Fusionsproteinen beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit der als His-Fusionsprotein exprimierten intrazellulären Domäne von NCAM180 (His-NCAM180 ID) in steigenden Konzentrationen inkubiert. Für den Nachweis von gebundenem His-NCAM180 ID wurde der NCAM-Antikörper 5B8 eingesetzt. Um mögliche unspezifische Bindungen von NCAM180 an GST zu berücksichtigen, wurden alle Messungen parallel mit GST-beschichteten Vertiefungen durchgeführt. Die hier dargestellten Absorptionswerte sind bereits durch Abzug des entsprechenden „GST-Wertes“ korrigiert. Die grafische Darstellung zeigt die Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten.

Die für GST gemessene Absorption wurde von den Absorptionswerten, die für die einzelnen Fusionsproteine gemessen wurden, abgezogen. Sowohl für GST-MUPP-PDZ 3-4 als auch GST-MUPP-PDZ 10-13 konnte eine Bindung an die intrazelluläre Domäne von NCAM180 nachgewiesen werden. Die Bindungskurven zeigten einen konzentrationsabhängigen Verlauf und eine Sättigung bei höheren Konzentrationen von His-NCAM180 ID. Die Bindungskurve für GST-MUPP-PDZ 5-6 zeigte einen leichten Anstieg mit anschließender Sättigung, blieb bei den gemessenen Absorptionswerten aber deutlich hinter GST-MUPP-PDZ 3-4 und 10-13 zurück. Für alle weiteren getesteten GST-MUPP-Fusionsproteine konnte keine Bindung an His-NCAM180 ID beobachtet werden, was gleichzeitig als Kontrolle dafür dient, dass His-NCAM180 ID nicht unspezifisch an jegliche angebotene PDZ-Domäne oder gar GST alleine bindet. Dieses Ergebnis stützt die Co-Immunpräzipitations- und *Crosslinking*-Ergebnisse (Delling, M., und Friedrich, C, 2002) und legt nahe, dass MUPP1 und NCAM direkt aneinander binden.

4.2.2 Direkte Bindung von GST-MUPP1-Fusionsproteinen an die intrazelluläre Domäne von NCAM140

NCAM140 und 180 unterscheiden sich voneinander durch eine 261 Aminosäuren lange Sequenz, die in die intrazelluläre Domäne (ID) von NCAM180 eingefügt ist und vom Exon 18 des NCAM-Gens kodiert wird. M. Delling und C. Friedrich (persönliche Mitteilung, 2002) zeigten in ihren Co-Immunpräzipitations- und *Crosslinking*-Experimenten eine Assoziation von NCAM180 und MUPP1, aber nicht NCAM140 und MUPP1. Da eine direkte Interaktion zwischen NCAM180 und MUPP1 verifiziert werden konnte, stellte sich die Frage, ob auch NCAM140 direkt an MUPP1 bindet. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden ELISA-Experimente mit GST-MUPP-Fusionsproteinen und His-NCAM140 ID analog zu 4.2.1. durchgeführt. Zum Nachweis von His-NCAM140 ID wurde ebenfalls der α -NCAM-Antikörper 5B8 verwendet. Das Ergebnis der ELISA-Experimente ist in Abbildung 10 zu sehen.

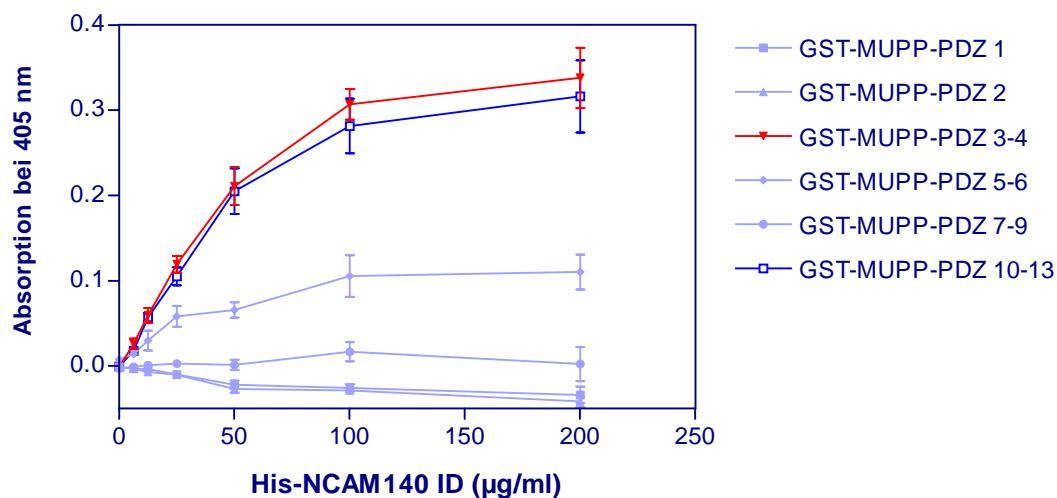


Abbildung 10: Ergebnis der Bindungsstudie mit GST-MUPP-Fusionsproteinen und His-NCAM140 ID. Mit GST-MUPP-Fusionsproteinen beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit der als His-Fusionsprotein exprimierten intrazellulären Domäne von NCAM140 (His-NCAM140 ID) in steigenden Konzentrationen inkubiert. Für den Nachweis von NCAM140 ID wurde der NCAM-Antikörper 5B8 eingesetzt. Um mögliche unspezifische Bindungen von NCAM140 an GST zu berücksichtigen, wurden alle Messungen parallel mit GST-beschichteten Vertiefungen durchgeführt. Die hier dargestellten Absorptionswerte sind bereits durch Abzug des entsprechenden „GST-Wertes“ korrigiert. Die grafische Darstellung zeigt die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

Die für GST gemessene Absorption wurde auch in diesem Fall von den Absorptionswerten, die für die einzelnen Fusionsproteine gemessen wurden, abgezogen. Es konnte gezeigt werden, dass NCAM180 ID und NCAM140 ID dieselben PDZ-Domänen von MUPP1 binden. GST-MUPP-PDZ 3-4 und GST-MUPP-PDZ 10-13 banden im ELISA an die intrazelluläre Domäne von NCAM140. Die Bindungskurven wiesen einen konzentrationsabhängigen Verlauf und eine Sättigung, vergleichbar mit dem bei NCAM180 ID beobachteten Ergebnis auf. Auch für GST-MUPP-PDZ 5-6 ließ sich eine Bindungskurve mit einem leichten Anstieg und anschließender Sättigung beobachten. Die gemessenen Absorptionswerte blieben aber wie bei NCAM180 deutlich hinter GST-MUPP-PDZ 3-4 und 10-13 zurück. Für die anderen getesteten GST-MUPP-Fusionsproteine konnte keine Bindung an His-NCAM140 ID festgestellt werden. Dieses Ergebnis untermauert die Resultate der ELISA-Experimente mit NCAM180 ID und spricht dagegen, dass MUPP1 bevorzugt an den von Exon 18 des *Ncam*-Gens kodierten Bereich bindet. Denn im letztgenannten Fall hätte NCAM140 im Vergleich zu NCAM180 eine deutlich schwächere Bindung an die MUPP-PDZ-Domänen gezeigt.

4.3 ELISA mit verschiedenen Chargen GST-MUPP-PDZ 3-4 zur Klärung der Frage, ob die Interaktionen mit den intrazellulären Domänen von NCAM140 und 180 spezifisch sind

In den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.2 wurde berichtet, dass sowohl für GST-MUPP-PDZ 3-4 als auch GST-MUPP-PDZ 10-13 eine Bindung an NCAM 140 ID und NCAM180 ID nachgewiesen werden konnte. Die Bindung an GST-MUPP-PDZ 10-13 konnte mit mehreren Chargen aus voneinander unabhängigen Proteinaufreinigungen reproduziert werden und durch den Nachweis der Interaktion zwischen GST-MUPP-PDZ 10 und den intrazellulären Domänen beider NCAM-Isoformen bestätigt werden (siehe dazu auch Kapitel 4.5). Auch von GST-MUPP-PDZ 10 wurden mehrere voneinander unabhängige Chargen positiv auf die Bindung an NCAM ID getestet.

Für GST-MUPP-PDZ 3-4 stellte sich jedoch heraus, dass der zunächst beobachtete Effekt mit neuen Chargen aufgereinigten Proteins nicht reproduziert werden konnte. Wie sich herausstellte, hatte GST-MUPP-PDZ 3-4, welches an NCAM140 und 180 ID band, die Eigenschaft, mehrere getestete Proteine ebenfalls unspezifisch zu binden. Abbildung 11

belegt, dass GST-MUPP-PDZ 3-4 aus zwei voneinander unabhängigen Aufreinigungen nicht an NCAM140 ID bindet.

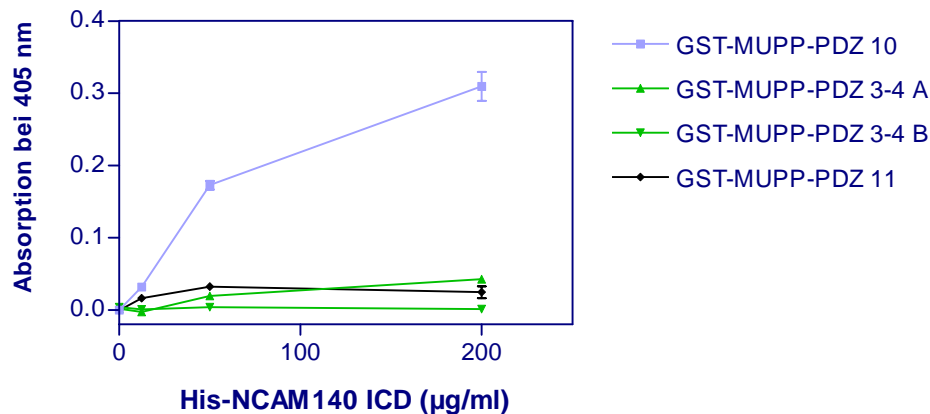


Abbildung 11: Ergebnis der Bindungsstudie mit verschiedenen Chargen GST-MUPP-PDZ 3-4 und His-NCAM140 ID. Mit GST-MUPP-Fusionsproteinen beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit der als His-Fusionsprotein exprimierte intrazelluläre Domäne von NCAM140 (His-NCAM140 ID) in steigenden Konzentrationen inkubiert. GST-MUPP-PDZ 3-4 aus zwei voneinander unabhängigen Aufreinigungen A und B band nicht an His-NCAM140 ID. Für den Nachweis von NCAM140 ID wurde der NCAM-Antikörper 5B8 eingesetzt. Die hier dargestellten Absorptionswerte sind bereits durch Abzug des entsprechenden „GST-Wertes“ korrigiert. Die grafische Darstellung zeigt die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

4.4 Ist die Aminosäuresequenz ESKA am C-Terminus von NCAM an der MUPP1-Bindung beteiligt?

Liganden von PDZ-Domänen binden in der Regel mit dem absoluten C-Terminus an dieselbe. Insbesondere die vier C-terminalen Aminosäuren eines PDZ-Domänen-Liganden sind essentiell für die Interaktion (Songyang et al, 1997). PDZ-bindende Motive am C-Terminus eines Proteins werden anhand ihrer Sequenz in drei Klassen eingeteilt (Noury et al, 2003). Auf der Grundlage dieser Klassifizierung wurde das C-Terminale ESKA-Motiv von NCAM als PDZ-bindendes Motiv der Klasse I identifiziert (Delling, M; persönliche Mitteilung, 2002). Daher stellte sich die Frage, ob das C-terminale ESKA-Motiv der transmembranen NCAM-Isoformen eine Rolle bei der Vermittlung der Interaktion mit MUPP1 spielen könnte. Um diese Frage zu beantworten, wurden ELISA-Experimente mit GST-MUPP-Fusionsproteinen und dem rekombinanten Protein His-NCAM180 ID Δ ESKA (zur Verfügung gestellt von A. Dityatev, Hamburg) durchgeführt.

His-NCAM180 ID Δ ESKA fehlt das C-terminale potentiell PDZ-bindende Motiv. Es sollte daher nicht an MUPP1 binden, sofern dem absoluten C-Terminus eine Rolle bei der Interaktion zukommt. Als Positivkontrolle im ELISA-Bindungstest diente His-NCAM180 ID. Zum Nachweis wurde nicht der 5B8-, sondern der D3-Antikörper eingesetzt. 5B8 hat sein Epitop am absoluten C-Terminus und erkennt daher die Δ ESKA-Form nicht. D3 ist ein Antikörper, der spezifisch NCAM180 bindet (Schlosshauer, 1989). Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 12 dargestellt.

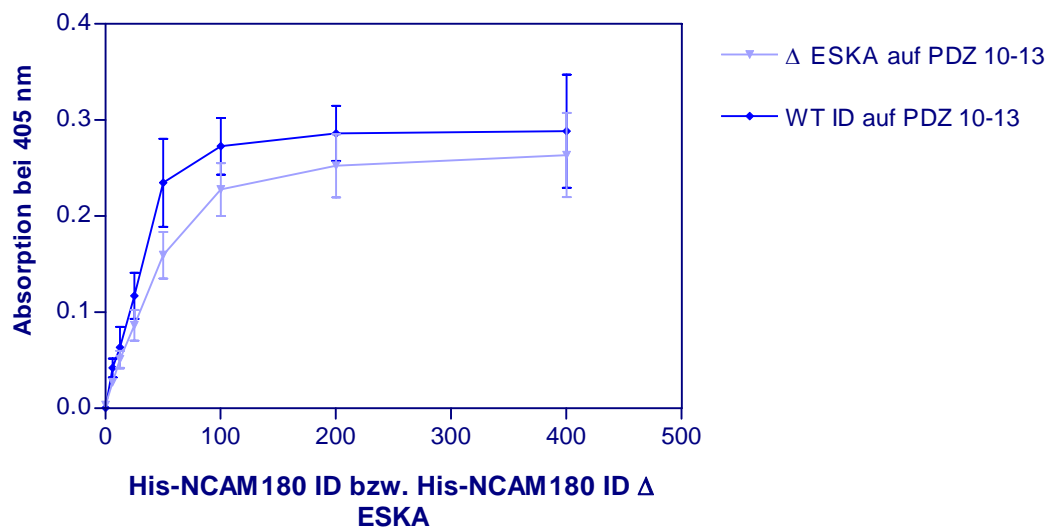


Abbildung 12: Ergebnis der Bindungsstudie mit GST-MUPP-Fusionsproteinen und His-NCAM180 ID Δ ESKA. Mit GST-MUPP-Fusionsproteinen beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit der als His-Fusionsprotein exprimierten intrazellulären Domäne von NCAM180 (WT ID) bzw. NCAM180 Δ ESKA in steigenden Konzentrationen inkubiert. Für den Nachweis von His-NCAM180 ID bzw. His-NCAM180 ID Δ ESKA wurde der NCAM-Antikörper D3 eingesetzt. Die hier dargestellten Absorptionswerte sind bereits durch Abzug des entsprechenden „GST-Wertes“ korrigiert. Die grafische Darstellung zeigt die Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten.

His-NCAM180 ID und die C-terminal deletierte Form His- NCAM180 Δ ESKA verhielten sich gegenüber den untersuchten MUPP1-Fusionsproteinen nahezu identisch. His-NCAM180 ID Δ ESKA interagiert ohne Einschränkung mit GST-MUPP-PDZ 10-13. Die Bindungskurve zeigte Konzentrationsabhängigkeit und Sättigung, wie bereits schon für His-NCAM180 und 140 ID beobachtet. Offensichtlich ist das C-terminale ESKA-Motiv von NCAM nicht an der Interaktion mit MUPP1 beteiligt.

4.5 Bindung einzelner PDZ-Domänen von MUPP1 an His-NCAM180 ID

Die bereits geschilderten Ergebnisse belegen eindeutig, dass GST-MUPP-PDZ 10-13 mit NCAM180 und NCAM140 ID direkt interagiert. Um eine genauere Eingrenzung der für die Interaktion wesentlichen PDZ-Domänen vornehmen zu können, wurden Konstrukte verwendet, die für einzelne PDZ-Domänen von MUPP1 kodieren. Die cDNAs für GST-MUPP-PDZ 10, 11, 12 und 13 wurden zur Verfügung gestellt von M. Deak, Dundee.

Die rekombinant hergestellten Proteine wurden in einem ELISA-Bindungstest verwendet. Die Vorgehensweise unterschied sich dabei nicht von der in Absatz 4.2.1 beschriebenen. Die Abbildung 13 gibt die Ergebnisse dieser Untersuchung wieder.

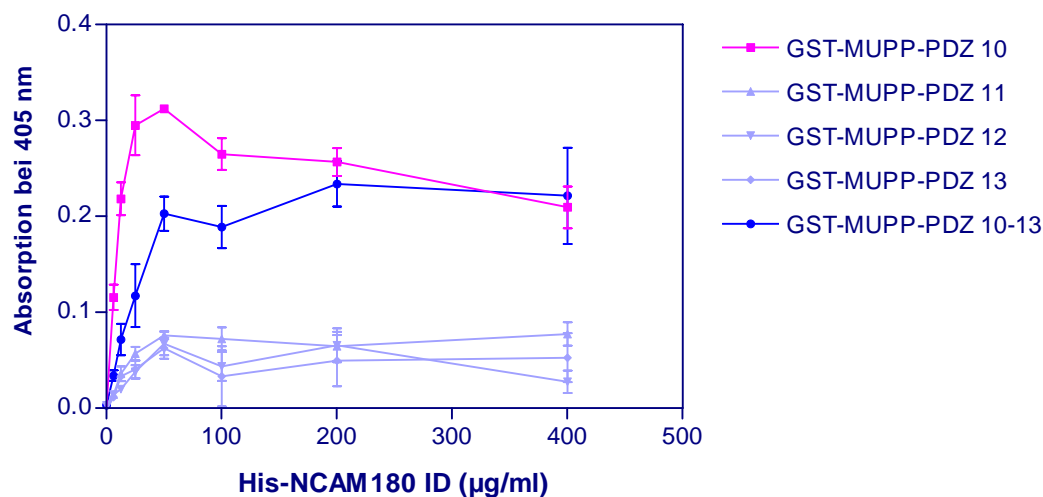


Abbildung 13: Ergebnis der Bindungsstudie mit GST-MUPP-Fusionsproteinen von einzelnen PDZ-Domänen und His-NCAM180 ID. Mit GST-MUPP-Fusionsproteinen beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit der als His-Fusionsprotein exprimierte intrazelluläre Domäne von NCAM180 (His-NCAM180 ID) in steigenden Konzentrationen inkubiert. Für den Nachweis von NCAM180 ID wurde der NCAM-Antikörper 5B8 eingesetzt. Die hier dargestellten Absorptionswerte sind bereits durch Abzug des entsprechenden „GST-Wertes“ korrigiert. Die grafische Darstellung zeigt die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

Die Unterteilung von GST-MUPP-PDZ 10-13 in die vier einzelnen Domänen und deren Test im ELISA gab Aufschluss darüber, welche Domäne die eigentlich bindende ist. Als Positivkontrolle diente GST-MUPP-PDZ 10-13. Es stellte sich heraus, dass die zehnte PDZ-Domäne von MUPP1 direkt an NCAM180 ID bindet. Die Bindungskurve zeigte einen konzentrationsabhängigen Verlauf und erreichte die Sättigung. Anhand der

Messwerte aus den ELISA-Experimenten konnte eine Dissoziationskonstante K_D von 100 nM für die Bindung zwischen NCAM180 ID und GST-MUPP-PDZ 10 abgeleitet werden. Für die Domänen elf bis 13 konnte keine Wechselwirkung mit His-NCAM180 ID gezeigt werden.

4.6 ELISA mit GST-MUPP-Fusionsproteinen von einzelnen PDZ-Domänen und His-NCAM140 ID Δ N

Wie in Kapitel 4.4 bereits beschrieben wurde, ist der absolute C-Terminus von NCAM140 und NCAM180 nicht essentiell für die Interaktion von NCAM mit MUPP1. Es stellt sich also die Frage, welcher Abschnitt der zytoplasmatischen Domäne von NCAM die Bindung an MUPP1 vermittelt. Zur Klärung dieser Frage wurde ein Deletionskonstrukt der intrazellulären Domäne von NCAM140 konstruiert. Ein um das N-terminale Drittel verkürztes Fragment der für die intrazelluläre Domäne von NCAM140 kodierenden cDNA wurde mittels PCR amplifiziert und anschließend über BamHI-Schnittstellen in den pQE30-Expressionsvektor kloniert. Dieses Konstrukt wurde für die Expression als His-Fusionsprotein in *E.coli* M15 verwendet und wird im Folgenden als NCAM140 ID Δ N bezeichnet.

MDITCYFLNKGLLMCIAVNLCGKAGPGAKGKDMEEGKAAFSKD ESKEPIVEVRTEEERTPNHDG
GKHTEPNETTPLTEPEKGPVETKSEPQESEAKPAPTEVKTVPNEATQTKENESKA

Abbildung 14: Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne von NCAM140. Der rot unterlegte Abschnitt fehlt im Deletionskonstrukt NCAM140 Δ N.

Im ELISA wurde das Bindungsverhalten von NCAM140 ID und NCAM140 ID Δ N gegenüber der zehnten und elften PDZ-Domäne von MUPP1 verglichen. Die 96-well-Platten wurden mit NCAM140 ID bzw. NCAM140 ID Δ N beschichtet und GST-MUPP-Fragmente in steigenden Konzentrationen hinzugefügt. Als Negativkontrolle diente GST. Zum Nachweis der GST-MUPP-Fragmente wurde ein α GST-Antikörper benutzt.

Das Bindungsverhalten beider NCAM140 ID-Fusionsproteine gegenüber der zehnten PDZ-Domäne von MUPP1 unterschied sich deutlich. Aus Abbildung 15 geht hervor, dass die Deletionsmutante von NCAM140 ID nicht an die zehnte PDZ-Domäne bindet. Der N-terminale Bereich der intrazellulären Domäne von NCAM140 ist also offenbar essentiell für die Interaktion mit MUPP1. Ob weitere Abschnitte des Proteins zwischen Aminosäure 45 und Aminosäure 117 für die Bindung von MUPP1 eine Rolle spielen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, da wiederholte Versuche zur Klonierung weiterer Deletionskonstrukte nicht erfolgreich waren.

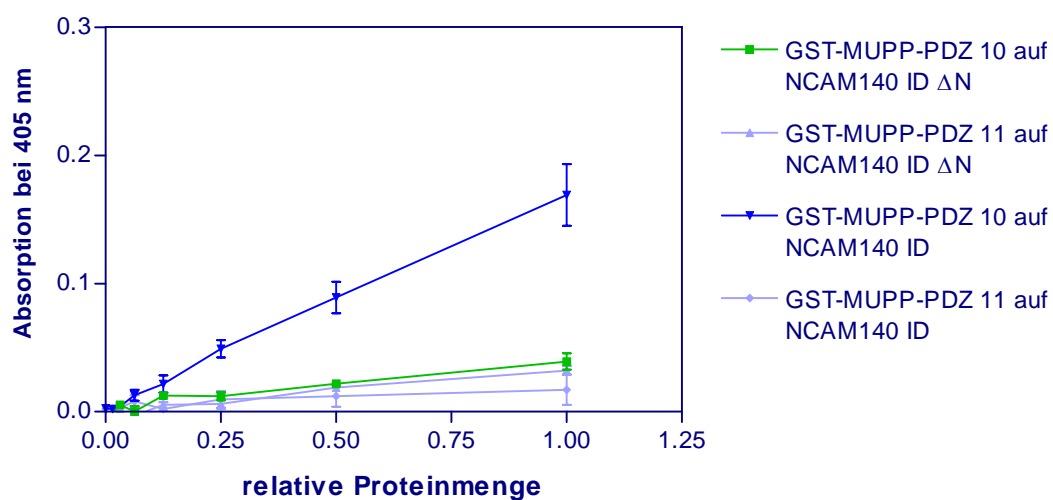


Abbildung 15: Vergleich des Bindungsverhaltens von NCAM140 ID und NCAM140 ID Δ N. Mit His-NCAM140 ID bzw. His-NCAM140 ID Δ N beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit GST-MUPP-Fusionsproteinen in steigenden Konzentrationen inkubiert. Für den Nachweis der GST-MUPP-Fragmente wurde ein α GST-Antikörper verwendet. Eine Korrektur des „GST-Hintergrundes“ erfolgte, indem die beschichteten Mikrotiterplatten mit steigenden Konzentrationen an GST inkubiert wurden und die erhaltenen „GST-Absorptionswerte“ von den entsprechenden Werten für die einzelnen GST-MUPP-Konstrukte abgezogen wurden. Die grafische Darstellung zeigt die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

4.7 ELISA mit GST-MUPP-Fusionsproteinen von einzelnen PDZ-Domänen und His-Kir3.2 C-Terminus (CT)

Ausgehend von der Beobachtung, dass NCAM die Oberflächenlokalisierung von neuronalen Kir-3-Kanälen bestehend aus zwei Kir3.1- und zwei Kir3.2-Untereinheiten reduziert, ohne jedoch direkt mit Kir3.1 oder Kir3.2 zu interagieren, wurde nach Bindungspartnern für Kir3.2 gesucht, die möglicherweise als Bindeglied zwischen Kaliumkanal und NCAM fungieren könnten (Delling et al., 2002).

MUPP1 wurde ursprünglich in einem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* als Interaktionspartner von Kir3.2 identifiziert (Delling und Novak, 2002, Projektarbeit). Vermutlich wird diese Interaktion auf Seiten von Kir3.2 durch das potentielle PDZ-bindende Motiv ESKV am absoluten C-Terminus vermittelt. Als Kir3.2-bindende Domäne von MUPP1 wurde die 13. PDZ-Domäne ermittelt. Dieses Ergebnis sollte durch ELISA-Bindungsexperimente verifiziert werden, da das *Yeast-Two-Hybrid-System* alleine nicht aussagekräftig genug ist.

GST-MUPP-Fusionsproteine und rekombinant in Bakterien exprimiertes His-Kir3.2 C-Terminus (CT) wurden für ELISA-Bindungstests eingesetzt. His-Kir3.2 CT umfasst die letzten 60 C-terminalen Aminosäuren von Kir3.2 aus der Ratte. GST-MUPP-PDZ 6 und 7 wurden von S. Chung (Houston) und GST-MUPP-PDZ 8 und 9 von A. Mancini (Hannover) zur Verfügung gestellt. GST-MUPP-PDZ 1 bis 5 wurden selbst kloniert. Die einzelnen PDZ-Domänen wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend über EcoRI- und XhoI-Schnittstellen im Leseraster in den pGEX-4T-2-Expressionsvektor kloniert. Der Vektorabschnitt 5' des Inserts kodiert für die Glutathion-S-Transferase (GST), so daß die Fusionsproteine das GST-tag am N-Terminus tragen. Diese Konstrukte wurden für die Expression in *E.coli* BL21(DE3) verwendet.

96-well-Platten wurden mit His-Kir3.2 CT beschichtet und GST-MUPP-Fusionsproteine in steigenden Konzentrationen hinzugefügt. Als Kontrolle diente GST alleine. Zum Nachweis der GST-Fusionsproteine wurde ein α GST-Antikörper verwendet. Abbildung 16 gibt eine Übersicht über das Bindungsverhalten der GST-MUPP-Fragmente.

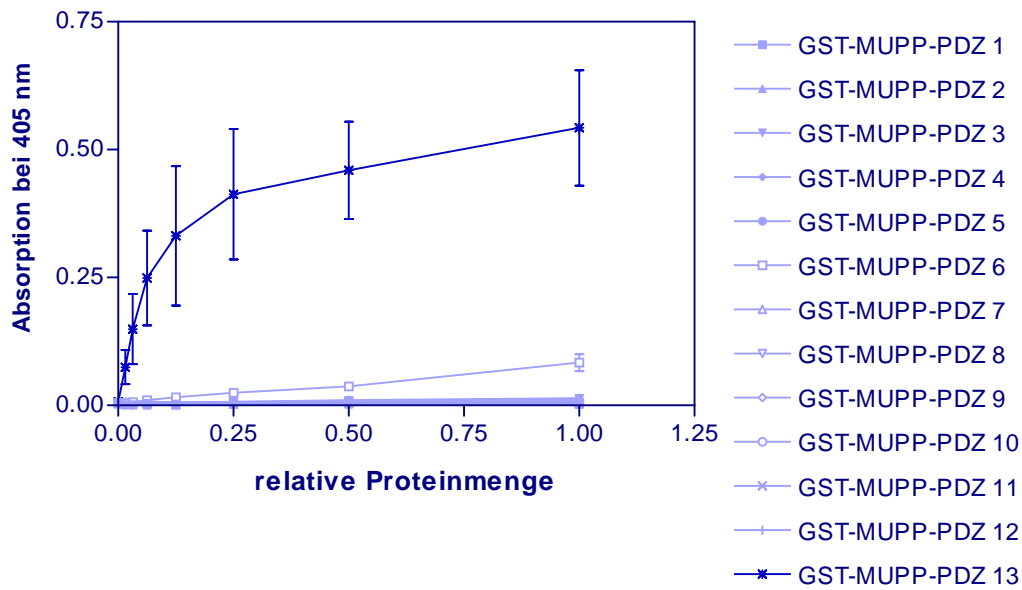


Abbildung 16: Ergebnis der Bindungsstudie mit GST-MUPP-Fusionsproteinen und His-Kir3.2 CT. Mit His-Kir3.2 CT beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit GST-MUPP-Fusionsproteinen in steigenden Konzentrationen inkubiert. Für den Nachweis der GST-MUPP-Fragmente wurde ein α GST-Antikörper benutzt. Eine Korrektur des „GST-Hintergrundes“ erfolgte, indem die beschichteten Mikrotiterplatten mit steigenden Konzentrationen an GST inkubiert wurden und die erhaltenen „GST-Absorptionswerte“ von den entsprechenden Werten für die einzelnen GST-MUPP-Konstrukte abgezogen wurden. Die grafische Darstellung zeigt die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

Es ist gut zu erkennen, dass ausschließlich GST-MUPP-PDZ 13 an His-Kir3.2 CT bindet. Die Bindungskurve zeigte einen konzentrationsabhängigen Verlauf und erreichte die Sättigung. Die anhand der Messwerte ermittelte Dissoziationskonstante K_D für diese Interaktion lag bei 70 nM. Für keines der anderen zwölf Fragmente konnte eine Bindung gezeigt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten des *Yeast-Two-Hybrid-Screens* überein.

4.8 Beeinflussung der Oberflächenlokalisierung neuronaler Kir3.1/3.2-Kanäle durch MUPP1

4.8.1. Analyse mittels Zelloberflächenbiotinylierungsexperimenten nach Co-Expression von Kir3.1/3.2, NCAM und EGFP-MUPP1-Fusionskonstrukten

Wie aus den Untersuchungen von Delling et al. (2002) bekannt war, beeinflusst NCAM die Oberflächenlokalisierung neuronaler Kir-Kanäle, die aus Kir3.1- und Kir3.2-Untereinheiten bestehen. Demnach ist weniger Kir3.1/3.2 an der Zelloberfläche vorhanden, wenn NCAM co-exprimiert wird. NCAM interagiert weder direkt mit Kir3.1 noch mit Kir3.2. Am NCAM-vermittelten Effekt auf die Oberflächenlokalisierung von Kir3.1/3.2 ist also aller Voraussicht nach mindestens ein weiterer bisher unbekannter Faktor beteiligt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intrazellulären Domänen sowohl von NCAM als auch von Kir3.2 direkt mit PDZ-Domänen von MUPP1 interagieren. MUPP1 kommt aufgrund dieser Voraussetzungen als Bindeglied zwischen NCAM und Kir3.1/3.2 in Frage. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Zelloberflächenbiotinylierungsexperimente mit transient transfizierten CHO-Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zunächst die erste, zehnte und 13. PDZ-Domäne von MUPP1 mittels PCR amplifiziert und anschließend über BamHI- und EcoRI-Schnittstellen in den eukaryotischen Expressionsvektor EGFP-N1 kloniert. Der Vektorabschnitt stromabwärts des Inserts kodiert für das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), so daß die Fusionsproteine das EGFP-tag am C-Terminus tragen. Diese Konstrukte werden im Folgenden als EGFP-PDZ 1, 10 oder 13 bezeichnet (siehe Abbildung 17).



Abbildung 17: Schematische Darstellung eines EGFP-MUPP1-Fusionsproteins. Auf die PDZ-Domäne folgt das C-terminale EGFP-tag.

Die Zellen wurden nun mit cDNA-Expressionskonstrukten für Kir3.1/3.2 (Delling et al., 2002), NCAM und die EGFP-MUPP1-Fusionsproteine EGFP-PDZ 1, PDZ 10 oder PDZ

13 co-transfiziert. Oberflächenständige Proteine wurden mit Biotin markiert und nach Lyse der Zellen über Streptavidinbeads aus dem Lysat extrahiert. Mit Hilfe von *Western Blot*-Analyse und anschließender densitometrischer Auswertung wurde die Menge an oberflächenständigem Kir3.1/3.2 quantifiziert und zwischen den verschiedenen Ansätzen verglichen (Abb. 18).

Die Auswertung der densitometrischen Daten ergab, dass es sowohl auf die Kir3.1/3.2-Gesamtmenge im Lysat als auch auf die oberflächenständige Kir3.1/3.2-Menge bezogen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen gab (Abb. 18, rechte Spalte). Das Streudiagramm (Abb. 18 C) deutet allerdings darauf hin, dass Kir3.1/3.2 in Abwesenheit von NCAM in erhöhtem Maße an die Zelloberfläche gelangt, da zwei von drei Messwerten deutlich über dem Referenzwert (Kir3.1/3.2 + NCAM140-exprimierende Zellen) liegen. Dies stünde im Einklang mit den von Delling et al. (2002) publizierten Daten.

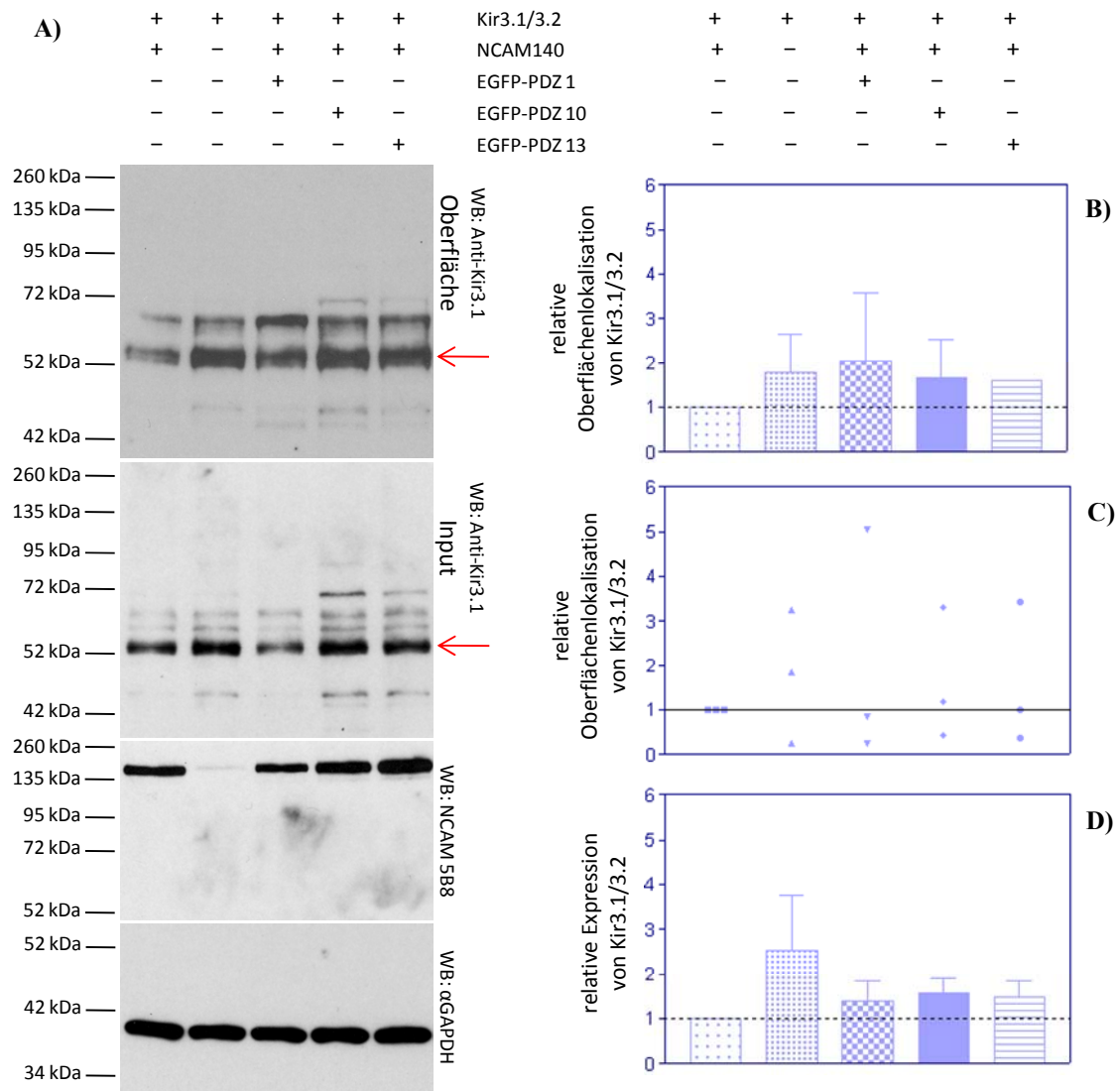


Abbildung 18: Analyse der Oberflächenlokalisation neuronaler Kir3.1/3.2-Kanäle mittels Zelloberflächenbiotinylierung. (A) CHO-Zellen wurden mit cDNA-Expressionskonstrukten für NCAM140, Kir3.1/3.2 und EGFP-PDZ 1, EGFP-PDZ 10 oder EGFP-PDZ 13 co-transfiziert. Oberflächenständiges und Gesamt-Kir3.1/3.2 wurden im Western-Blot mit einem Anti-Kir3.1-Antikörper sichtbar gemacht (hier durch einen roten Pfeil hervorgehoben). Das Zellysate wurde auf das Vorhandensein von NCAM und EGFP-PDZ-Konstrukten getestet. Bis auf EGFP-PDZ 1 konnten alle EGFP-MUPP1-Fusionsproteine detektiert werden (hier nicht gezeigt). Allerdings konnte EGFP-MUPP1 durch die grüne Fluoreszenz von EGFP nachgewiesen werden. Als Ladungskontrolle diente GAPDH. (B) Das Blockdiagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden für oberflächenständiges Kir3.1/3.2 aus drei unabhängigen Experimenten. Der mit NCAM und Kir3.1/3.2 co-transfizierte Ansatz wurde als Bezugspunkt gewählt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. In keinem Fall ist ein statistisch signifikanter Unterschied zur Bezugsprobe festzustellen (One sample t test; $p < 0,05$). (C) Das Streudiagramm gibt eine Übersicht über die normalisierten Messwerte der einzelnen Proben. (D) Das Blockdiagramm veranschaulicht graphisch die densitometrische Auswertung der Banden für Gesamt-Kir3.1/3.2 im Lysat aus drei unabhängigen Experimenten.

4.8.2 Analyse der Oberflächenlokalisierung neuronaler Kir3.1/3.2-Kanäle mittels immunzytochemischer Färbung hippocampaler Neurone nach Co-Transfektion mit Kir3.1/3.2 und EGFP-MUPP1-Fusionskonstrukten

Um den Einfluss von dominant-negativen EGFP-MUPP1-Fusionskonstrukten auf das NCAM-abhängige Trafficking von Kir3.1/3.2 in einem System zu untersuchen, welches am wahrscheinlichsten die Vorgänge im lebenden Organismus widerspiegelt, wurden hippocampale Neurone präpariert, mit Kir3.1/3.2 sowie EGFP-MUPP1-Konstrukten transfiziert und immunzytochemisch analysiert. Hippocampale Neurone exprimieren endogen NCAM, Kir3.1/3.2 und MUPP1. Sie stellen demnach ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Bedeutung von MUPP1 für die NCAM-abhängige Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisierung dar. In diesem Experiment wurden die Hippocampi neonataler Mäuse präpariert und die Neurone auf Deckgläschen ausgesät. Einen Tag später wurden die Zellen mit einem Expressionskonstrukt für Kir3.1/3.2, das ein internes FLAG-*tag* besitzt (Delling et al., 2002), und dem leeren EGFP-N1-Vektor bzw. einem von drei EGFP-MUPP1-Konstrukten transfiziert. Nach einwöchiger Kultivierung wurde zunächst durch eine Inkubation der lebenden Zellen mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop oberflächenständiges Kir3.1/3.2 markiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen Kir3.1 die Gesamtmenge an Kir3.1/3.2 in der Zelle markiert. Passende Sekundärantikörper mit gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff dienten der indirekten Fluoreszenzmarkierung von Kir3.1/3.2. Unter Zuhilfenahme eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops wurden die Fluoreszenzsignale sichtbar gemacht und aufgenommen (siehe Abb. 19). Auf den erhaltenen Bildern wurden die Intensitäten der Fluoreszenz von Kir3.1/3.2 und EGFP mit einer speziellen Software gemessen und die erhaltenen Daten unter Verwendung adäquater statistischer Methoden ausgewertet.

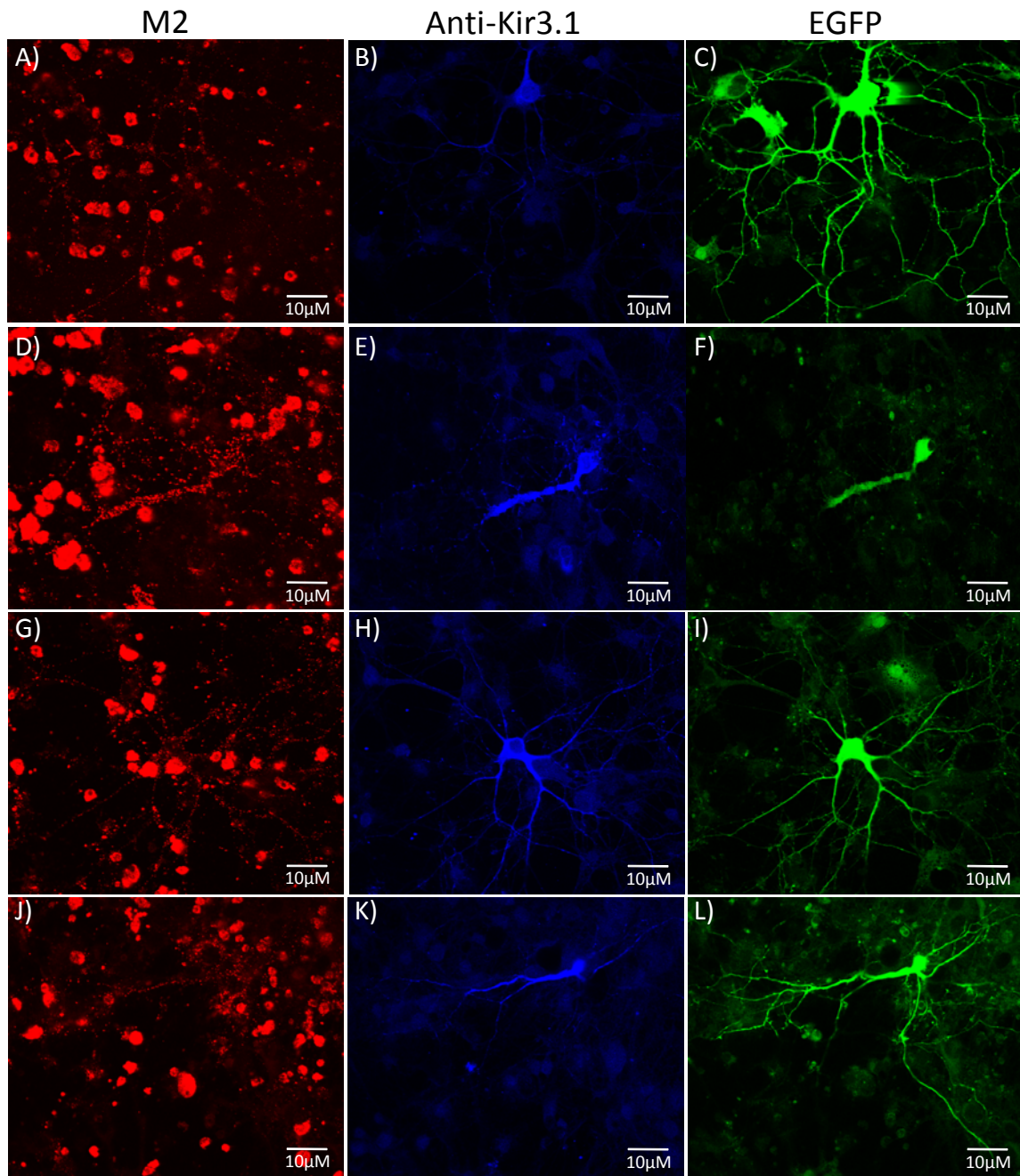


Abbildung 19: Immunzytochemische Färbung hippocampaler Neurone nach Co-Transfektion mit Kir3.1/3.2 und EGFP-N1, EGFP-PDZ 1, 10 oder 13. Neurone aus den Hippocampi neonataler Mäuse wurden mit einem Expressionskonstrukt für Kir3.1/3.2, das ein internes FLAG-tag besitzt, und dem leeren EGFP-N1-Vektor bzw. einem von drei EGFP-MUPP1-Konstrukten transfiziert. Nach einwöchiger Kultivierung wurde zunächst in einer Lebendfärbung mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop (M2) oberflächenständiges Kir3.1/3.2 markiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen Kir3.1 die Gesamtmenge an Kir3.1/3.2 in der Zelle detektiert. Die Abbildungen A-C repräsentieren ein mit EGFP-N1 und Kir3.1/3.2 co-transfiziertes Neuron. D-E zeigen eine mit EGFP-PDZ 1 und Kir3.1/3.2 co-transfizierte Zelle. G-I zeigen ein Beispiel einer mit Kir3.1/3.2 und EGFP-PDZ 10 co-transfizierten Zelle. J-L repräsentieren ein Neuron, das mit EGFP-PDZ 13 und Kir3.1/3.2 co-transfiziert wurde.

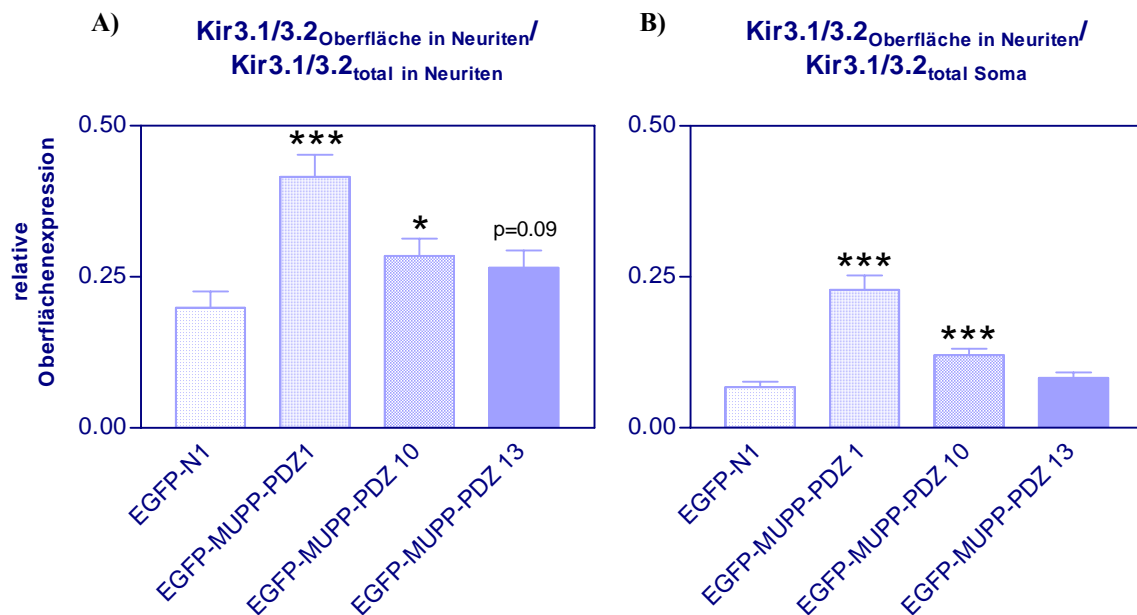


Abbildung 20: Auswertung der immunzytochemischen Färbung von hippocampalen Neuronen. Primärkulturen hippocampaler Neurone der Maus wurden mit Expressionskonstrukten für Kir3.1/3.2 und EGFP-N1, EGFP-PDZ 1, EGFP-PDZ 10 oder EGFP-PDZ 13 co-transfiziert. Kir3.1/3.2 an der Zelloberfläche wurde mit einem FLAG-Antikörper nachgewiesen. Gesamt-Kir3.1/3.2 wurde mit einem Anti-Kir3.1-Antikörper markiert. Nach Applikation von spezifischen, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern, wurden die Fluoreszenzsignale mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen und mit spezieller Software (Image J) quantifiziert. **(A)** Dargestellt sind die auf die Fluoreszenzintensität von Gesamt-Kir3.1/3.2 in Neuriten normalisierten Werte der Kir3.1/3.2-Oberflächenfluoreszenz in Neuriten. Co-Expression von EGFP-PDZ 1 und 10 führt zu einer signifikanten Zunahme der Kir3.1/3.2-Menge an der Zelloberfläche im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (EGFP-N1). Die bei Co-Expression von EGFP-PDZ 13 beobachtete Erhöhung der Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisation ist zwar nicht signifikant, zeigt aber zumindest eine Tendenz hin zur Signifikanz (p=0.09). **(B)** Gezeigt ist die Kir3.1/3.2-Oberflächenfluoreszenz in Neuriten, normalisiert auf die Fluoreszenzintensität von Gesamt-Kir3.1/3.2 im Zellkörper. Auch hier ist für EGFP-PDZ 1 und 10 eine signifikant erhöhte Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisation erkennbar (Unpaired t test; p<0,05). Die Präparation und Transfektion der Zellen wurde dankenswerterweise von Dr. Vladimir Sytnyk (ZMNH, Inst. für Biosynthese neuraler Strukturen) durchgeführt.

Die Auswertung ergab, dass sowohl die Co-Expression von EGFP-PDZ 1 als auch EGFP-PDZ 10 die Oberflächenlokalisation von Kir3.1/3.2 signifikant erhöhen. Da die Kir3.1/3.2-Oberflächenfluoreszenz auf die Fluoreszenzintensität von Gesamt-Kir3.1/3.2 in Neuriten und Zellkörper normalisiert wurde, kann gefolgert werden, dass der beobachtete signifikante Effekt nicht auf einem erhöhten Gesamt-Kir3.1/3.2-Gehalt in den Neuriten oder dem Zellkörper beruht. Dies schließt aus, dass lediglich deshalb mehr Kir3.1/3.2 an der Oberfläche vorliegt, weil die Zellen insgesamt mehr Kanalprotein enthalten. Betrachtet man die auf die Fluoreszenzintensität von Gesamt-Kir3.1/3.2 in

Neuriten normalisierten Werte, so fällt auf, dass die Co-Expression von EGFP-PDZ 13 eine mit Tendenz zur Signifikanz hin ($p=0,09$) erhöhte Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisation bewirkt.

4.9 Beeinflussung der Oberflächenlokalisation von NCAM140 durch MUPP1

In Kapitel 4.5 wurde beschrieben, dass NCAM direkt mit der zehnten PDZ-Domäne von MUPP1 interagiert. Es gibt einige Beispiele für PDZ-Domänen-enthaltende Proteine, die den Transport ihrer Liganden zur Zelloberfläche regulieren. Z.B. ist die Interaktion des NMDA-Rezeptors mit MALS (*mammalian lin-seven protein*) sehr wichtig für den Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche (Setou et al., 2000). So stellte sich die Frage, ob MUPP1 eine Rolle beim Transport von NCAM an die Zelloberfläche spielt. Ist EGFP-PDZ 10 als dominant-negativ wirkendes Konstrukt vielleicht in der Lage, die Interaktion von NCAM mit MUPP1 zu blockieren und so den Transport von NCAM zur Zelloberfläche zu modulieren? Zur Klärung dieser Frage wurden CHO-Zellen mit NCAM, Kir3.1/3.2 und EGFP-PDZ1, PDZ 10 oder PDZ 13 co-transfiziert. Oberflächenständige Proteine wurden mit Biotin markiert und nach Lyse der Zellen über Streptavidinbeads aus dem Lysat extrahiert. Mit Hilfe von *Western Blot*-Analyse und anschließender densitometrischer Auswertung wurde die Menge an oberflächenständigem NCAM quantifiziert und zwischen den verschiedenen Ansätzen verglichen.

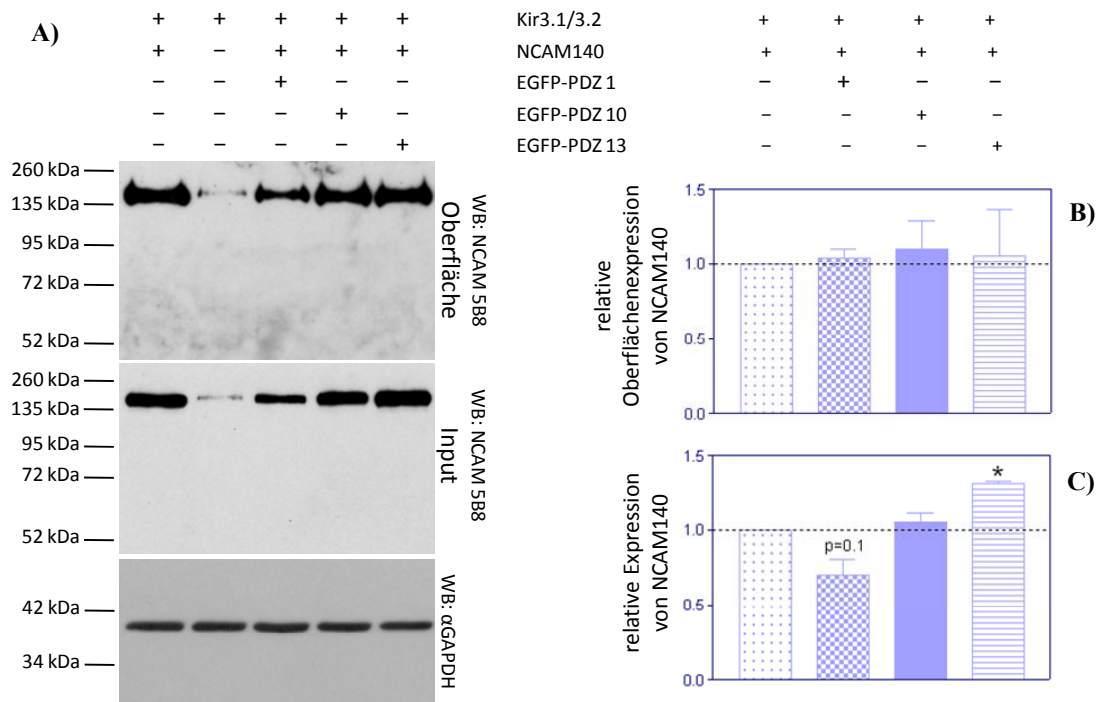


Abbildung 21: Analyse der Oberflächenlokalisierung von NCAM140 mittels Zelloberflächenbiotinylierung. (A) CHO-Zellen wurden mit cDNA-Expressionskonstrukten für NCAM140, Kir3.1/3.2 und EGFP-PDZ 1, EGFP-PDZ 10 oder EGFP-PDZ 13 (vgl. 4.7.1) co-transfiziert. Oberflächenständiges und Gesamt-NCAM wurden im Western-Blot mit dem 5B8-Antikörper sichtbar gemacht. Als Ladungskontrolle diente GAPDH. (B) Das Blockdiagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden für oberflächenständiges NCAM aus drei unabhängigen Experimenten. Der mit NCAM und Kir3.1/3.2 co-transfizierte Ansatz wurde als Bezugspunkt gewählt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. In keinem Fall ist ein statistisch signifikanter Unterschied zur Bezugsprobe festzustellen (One sample t test; $p < 0,05$). (C) Dieses Blockdiagramm fasst die densitometrische Auswertung der Banden für Gesamt-NCAM aus drei unabhängigen Experimenten zusammen. Der mit NCAM und Kir3.1/3.2 co-transfizierte Ansatz wurde als Bezugspunkt gewählt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. Werden NCAM140, Kir3.1/3.2 und EGFP-PDZ 13 co-transfiziert, so kann eine statistisch signifikante Erhöhung der nachweisbaren NCAM-Proteinmenge im Vergleich zur Bezugsprobe festgestellt werden (One sample t test; $p < 0,05$).

Die auf die im Lysat vorhandene Gesamtmenge an NCAM140 bezogenen Mengen an oberflächenständigem NCAM140 unterschieden sich bei den einzelnen Gruppen nicht voneinander. Die im *Western Blot* beobachtbaren Unterschiede bezüglich der NCAM-Proteinmenge beruhen auf unterschiedlichen NCAM-Mengen im Lysat. Ein genauerer Vergleich der Proteinmengen im Lysat zeigte jedoch, dass zumindest hier ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vorlag. Die Co-Expression der 13. PDZ-Domäne von MUPP1 mit Kir3.1/3.2 und NCAM140 hatte eine im Vergleich zur Bezugsprobe (Kir3.1/3.2 und NCAM140) signifikant erhöhte NCAM-Proteinmenge zur Folge. Im Fall

der Co-Expression der 1. PDZ-Domäne von MUPP1 mit Kir3.1/3.2 und NCAM140 war die NCAM-Menge gegenüber der Bezugsprobe tendenziell, aber nicht signifikant verringert ($p=0,1$).

4.10 Einfluss von MUPP1 auf die NCAM-Menge in transient transfizierten HEK-Zellen

Bei Testexperimenten zur Co-Transfektion von NCAM- und MUPP-Konstrukten machte ich eine interessante Beobachtung. Hierbei wurden HEK-Zellen gleichzeitig mit zwei Konstrukten transfiziert, die die Expression von GFP-MUPP1 und NCAM180 bzw. NCAM140 ermöglichen. Bei dem GFP-MUPP1-Konstrukt handelt es sich um MUPP1 voller Länge, das N-terminal mit einem EGFP-*tag* fusioniert ist (erhalten von Y. Hamazaki, Kyoto). Zur Kontrolle wurden HEK-Zellen auch mit einem EGFP-Expressionskonstrukt (EGFP-C1) und NCAM180- bzw. NCAM140-Konstrukten co-transfiziert.

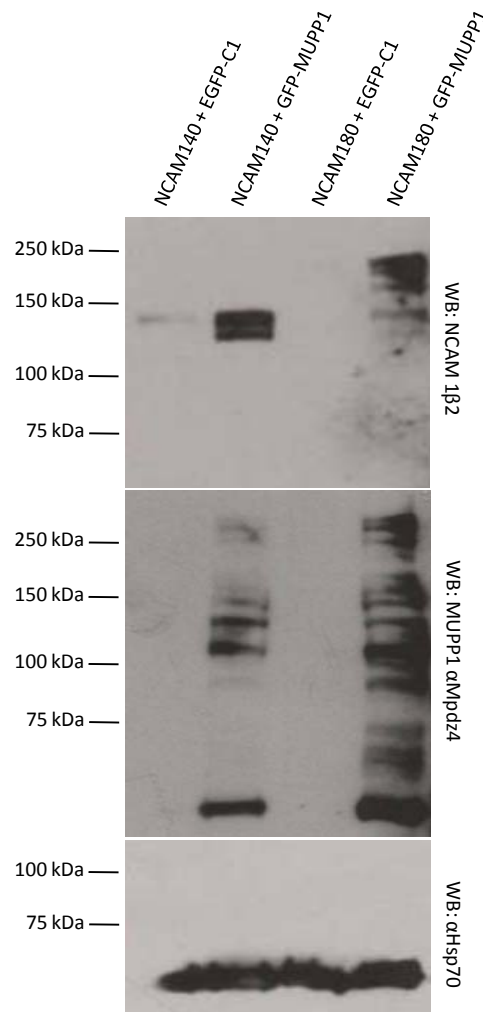


Abbildung 22: Einfluss der Co-Expression von MUPP1 auf die Menge an exprimiertem NCAM140 und 180. HEK-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für GFP-MUPP1 bzw. EGFP-C1 und NCAM140 oder NCAM180 co-transfiziert. Das Zellysate wurde im Western-Blot auf das Vorhandensein von NCAM und MUPP1 getestet. Als Ladungskontrolle wurde Hsp70 nachgewiesen. Sowohl NCAM140 als auch NCAM180 sind in größerer Menge vorhanden, wenn MUPP1 co-exprimiert wird.

Die Western-Blot-Analyse (Abb. 22) zeigte deutlich, dass bei gleichzeitiger Expression von MUPP1 die Menge an NCAM180 und NCAM140 im Zellysate erhöht ist. Dieser Effekt ist nicht auf unterschiedliche Mengen an aufgetragenem Protein zurückzuführen, wie anhand der Ladungskontrolle mit Hsp70 ersichtlich wird.

Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob auch die Co-Expression von NCAM mit der zehnten PDZ-Domäne von MUPP1 einen Einfluss auf die von HEK-Zellen exprimierte

NCAM-Menge hat. Da die zehnte PDZ-Domäne direkt mit NCAM interagiert, wäre dies durchaus vorstellbar. Deshalb wurden auch Co-Expressionsversuche mit NCAM180 und EGFP-PDZ 1, 10 und 13 durchgeführt.

Die statistische Auswertung von vier unabhängigen Experimenten ergab, dass GFP-MUPP1 und EGFP-PDZ 10 einen Einfluss auf die Menge an exprimiertem NCAM180 in HEK-Zellen haben. In Anwesenheit von MUPP1 voller Länge konnte mehr NCAM180 als in EGFP-C1-co-transfizierten Zellen nachgewiesen werden, wohingegen die Co-Expression von EGFP-PDZ 10 zu einem verringerten NCAM-Proteinlevel führte. Die Co-Expression von EGFP-PDZ 1 hatte zwar keinen signifikanten Effekt, der niedrige p-Wert von 0,07 zeigt jedoch, dass eine Tendenz zu einer Erhöhung der nachweisbaren NCAM-Proteinmenge relativ zur Bezugsgruppe (EGFP-C1) besteht. EGFP-PDZ 1 konnte als einziges EGFP-MUPP1-Fusionsprotein nicht im *Western Blot* detektiert werden. Allerdings konnte das Konstrukt durch die grüne Fluoreszenz von EGFP nachgewiesen werden.

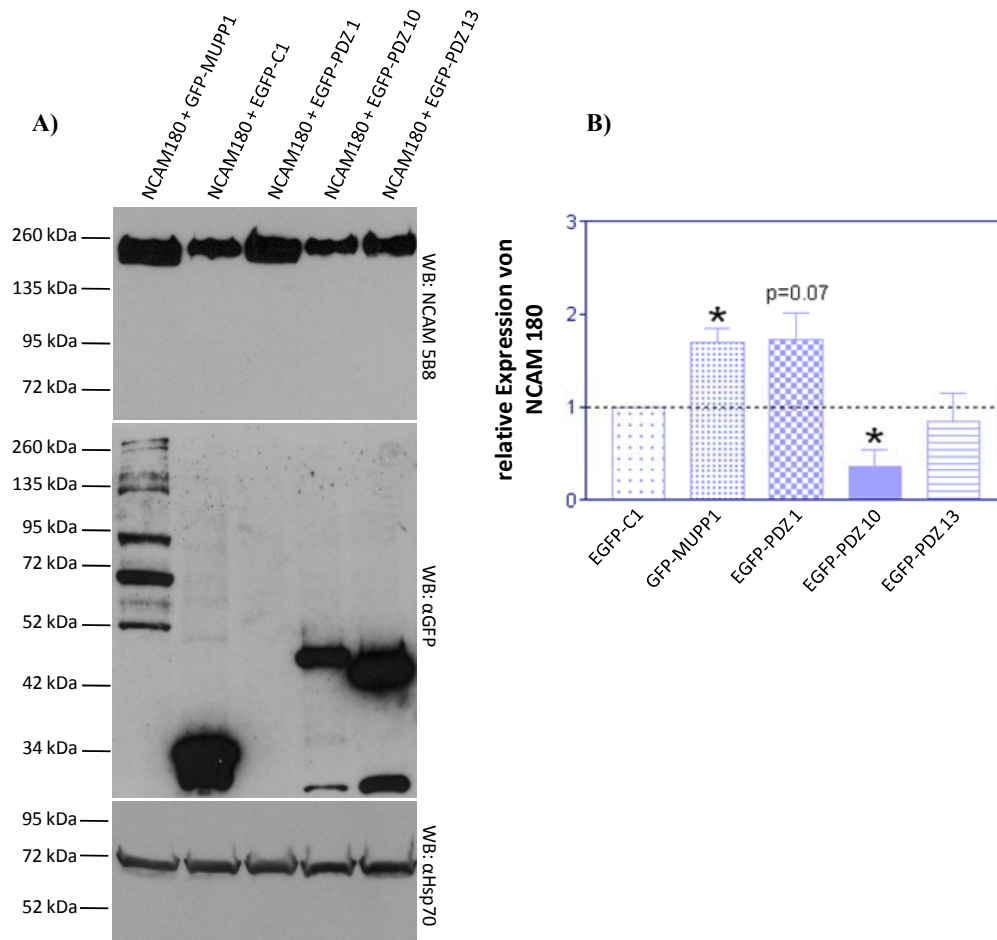


Abbildung 23: Einfluss der Co-Expression von NCAM und verschiedenen MUPP-EGFP-Fusionskonstrukten auf die Menge an exprimiertem NCAM180. (A) HEK-Zellen wurden mit einem cDNA-Expressionskonstrukt für NCAM180 transfiziert. Dazu wurde je eines der folgenden Konstrukte co-transfiziert: EGFP-C1, GFP-MUPP1, EGFP-PDZ 1, EGFP-PDZ 10 oder EGFP-PDZ 13. Die Expression von NCAM und MUPP1 wurde mittels Western Blot überprüft. Bis auf EGFP-PDZ 1 konnten alle EGFP-MUPP1-Fusionsproteine detektiert werden. Allerdings konnte EGFP-PDZ 1 durch die grüne Fluoreszenz von EGFP nachgewiesen werden. Als Ladungskontrolle diente Hsp70. (B) Das Blockdiagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden aus vier unabhängigen Experimenten. Die relative NCAM-Expression (auf Hsp70 bezogen) im mit EGFP-C1 co-transfizierten Ansatz wurde gleich eins gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. Ein Stern weist auf einen statistisch signifikanten Unterschied zum Bezugswert hin ($p < 0,05$; *one sample t test*). Die Differenz der relativen NCAM-Expression zwischen EGFP-C1- und EGFP-PDZ 1-co-transfizierten Zellen ist nahezu signifikant ($p = 0,07$; *one sample t test*).

5. Diskussion

5.1 Die direkte Interaktion von NCAM140 und NCAM180 mit MUPP1

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Interaktion zwischen NCAM und MUPP1 untersucht und verifiziert. Ferner wurde die Bedeutung der Interaktion zwischen NCAM und MUPP1 sowie zwischen MUPP1 und Kir3.2 für die Regulation der Oberflächenlokalisierung neuronaler Kir3.1/3.2-Kanäle erforscht.

Ausgangspunkt des vorliegenden Projektes war die Beobachtung, dass *Drosophila*-Rhodopsin und die transmembranen NCAM-Isoformen NCAM140 und 180 das identische potentiell PDZ-bindende Motiv Asparagin-Serin-Lysin-Alanin (ESKA) am absoluten C-Terminus besitzen. Rhodopsin bindet spezifisch an das PDZ-Protein INAD (Shawn Xu et al., 1998). INAD ist homolog zu INADL, und INADL wiederum zeigt hohe Sequenzhomologie zu MUPP1 (Ullmer et al., 1998). Diese Überlegungen führten zu der Hypothese, dass NCAM an MUPP1 bindet (Delling, M., persönliche Mitteilung, 2003).

Claudia Friedrich aus dem Institut für Biosynthese neuraler Strukturen am ZMNH konnte mittels *Crosslinking* zeigen, dass aufgereinigtes NCAM180 mit MUPP1 aus Hirnhomogenat und Membranfraktionen aus Gehirn interagiert (Friedrich, C., persönliche Mitteilung, 2002). Zudem wurde nachgewiesen, dass auch NCAM180 und MUPP1 aus CHO-Zelllysat co-immunpräzipitieren (Delling, M., persönliche Mitteilung, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit gelang mit ELISA-Bindungsexperimenten der Nachweis, dass NCAM und MUPP1 direkt miteinander interagieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung ausschließlich über die zehnte PDZ-Domäne von MUPP1 vermittelt wird. Die Spezifität dieser Bindung konnte mit Fragmenten aus voneinander unabhängigen Proteinaufreinigungen untermauert werden. Zudem lieferten ELISA-Experimente mit dem C-Terminus des Kaliumkanalproteins Kir3.2 (Kir3.2 CT) den Beweis, dass die für die Versuche eingesetzten GST-MUPP-PDZ-Konstrukte ein Bindungsverhalten zeigten, wie es zu erwarten war. Die von Markus Delling und mir im Jahr 2002 im *Yeast-Two-Hybrid* gefundene Interaktion zwischen Kir3.2 und der 13. PDZ-Domäne von MUPP1 konnte mittels ELISA verifiziert werden. Kir3.2 CT band in diesen Versuchen nur an die 13. PDZ-Domäne von MUPP1. Dies legt den Schluss nahe, dass die Interaktion beider Proteine auf Seiten von MUPP1 ausschließlich durch diese Domäne vermittelt wird.

Anhand der ELISA-Daten wurden für die Interaktion zwischen NCAM und der zehnten sowie Kir3.2 CT und der 13. PDZ-Domäne von MUPP1 Dissoziationskonstanten (K_D) abgeleitet, um einen Anhaltspunkt für die Stärken der Bindungen zu haben. Für die Interaktion zwischen der intrazellulären Domäne von NCAM180 (NCAM180 ID) und der zehnten PDZ-Domäne von MUPP1 wurde eine Dissoziationskonstante (K_D) von 100 nM festgestellt. Die K_D für die Wechselwirkung zwischen Kir3.2 CT und GST-MUPP-PDZ 13 lag sogar bei nur 70 nM. Diese niedrigen K_D -Werte im nanomolaren Bereich lassen sehr starke Bindungen vermuten. Im Einklang hiermit wurde für die Bindung des Melatoninrezeptors MT_1 an ein GST-MUPP-PDZ 10 Konstrukt aus ELISA-Daten eine Dissoziationskonstante von 3.8 nM errechnet (Guillaume et al., 2008). Die Dissoziationskonstanten für die meisten Interaktionen zwischen PDZ-Domänen und Peptiden, die die C-Termini ihrer Liganden imitieren, liegen hingegen im Bereich von 1-50 μ M. Diese Werte wurden mit Hilfe fluorometrischer und mikrokalorimetrischer Methoden ermittelt, bei denen die Interaktionspartner beweglich in Lösung vorliegen (Jemth und Gianni, 2007). Bei einem ELISA ist einer der beiden Bindungspartner an einer Plastikoberfläche immobilisiert. Es ist schon länger bekannt, dass bei solchen Messungen mit immobilisierten Proteinen relativ niedrige K_D -Werte abgeleitet werden, die möglicherweise nicht sehr aussagekräftig sind (Harris und Lim, 2001; Myszka, 1999a; Myszka, 1999b). Insofern sollten aus ELISA-Daten gewonnene Dissoziationskonstanten kritisch betrachtet und nach Möglichkeit mit fluorometrischen oder mikrokalorimetrischen Methoden überprüft werden.

Einer der Gründe, weswegen eine Interaktion zwischen NCAM und MUPP1 postuliert worden war, war das Vorhandensein des putativen PDZ-bindenden Motivs ESKA am absoluten C-Terminus des Zelladhäsionsmoleküls. Nachdem die Interaktion bestätigt worden war, sollte die Frage geklärt werden, ob der C-Terminus von NCAM für diese Bindung tatsächlich eine entscheidende Rolle spielt. Durch den Einsatz einer um das ESKA-Motiv verkürzten Mutante von NCAM180 ID (NCAM180 ID Δ ESKA) wurde deutlich, dass dieser Teil des Moleküls nicht das PDZ-bindende Motiv ist. NCAM180 ID Δ ESKA unterschied sich in seinem Bindungsverhalten nicht von wildtypischer NCAM180 ID. Da die intrazelluläre Domäne von NCAM180 also nicht über ihren absoluten C-Terminus an die zehnte PDZ-Domäne von MUPP1 bindet, stellt sich die Frage, mit welchem anderen Teil der NCAM180 ID MUPP1 interagieren könnte.

Es konnten bisher elf Bindungspartner für die zehnte PDZ-Domäne von MUPP1 identifiziert werden, die alle über ein PDZ-bindendes Motiv der Klasse I oder III am absoluten C-Terminus mit MUPP1 in Verbindung treten (Estévez et al., 2008; Guillaume et al., 2008; Hamazaki et al., 2002; Kimber et al., 2002; Lee et al., 2000; Mancini et al., 2000; Stiffler et al., 2007; Ullmer et al., 1998). Es sind jedoch einige Proteine bekannt, deren PDZ-Bindungsstelle nicht an ihrem absoluten C-Terminus liegt. Den ersten Hinweis auf solche internen PDZ-Bindemotive lieferte die Untersuchung der Interaktion zwischen der neuronalen Form der Stickoxid-Synthase (nNOS) und PSD-95 bzw. α -1-Syntrophin (Brenman et al., 1996). Eine nNOS-Variante mit einer Deletion im N-terminalen Bereich band nicht mehr an PSD-95 und Syntrophin. Später konnte gezeigt werden, dass nNOS über einen sogenannten β -Finger an PDZ-Domänen bindet. An Stelle eines C-terminalen PDZ-bindenden Motivs liegt hier ein internes Motiv der Klasse I vor, das Teil einer β -Haarnadelschleife ist. Diese Schleife imitiert einen freien C-Terminus (siehe Abb. 24) (Hillier et al., 1999).

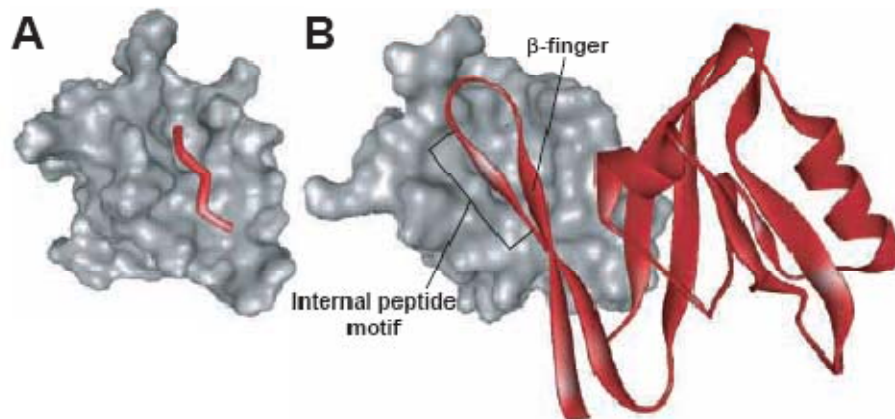


Abbildung 24: Die PDZ-Domäne von α -1-Syntrophin kann mit strukturell unterschiedlichen Liganden interagieren. Die PDZ-Domäne von Syntrophin ist hier in grau dargestellt. **(A)** Gezeigt ist die Bindung eines linearen Peptids (in rot) (NH₂-VKESLV-COOH), welches einen freien C-Terminus imitiert (Schultz et al., 1998). **(B)** In diesem Fall ist die Bindung des β -Fingers von nNOS (in rot) an die PDZ-Domäne veranschaulicht. Die Lage des internen PDZ-bindenden Motivs ist hervorgehoben (Hillier et al., 1999) (entnommen aus Baruch und Wendell, 2001).

Seit seiner Entdeckung ist das interne PDZ-bindende Motiv in Form von β -Fingern bei weiteren Proteinen gefunden worden, beispielsweise bei dem GTPase-aktivierenden Protein SPA-1, das mit der PDZ-Domäne des Zytoskelett-assoziierten Proteins AF-6

interagiert (Su et al., 2003). Allen diesen Motiven ist gemeinsam, dass eine PDZ-bindende Konsensussequenz Teil eines β -Faltblattes ist, gefolgt von einer β -Haarnadelschleife und einem weiteren β -Faltblatt. Abbildung 25 verdeutlicht diesen Aufbau anhand des β -Fingers von SPA-1.

```

EIMFHVSTMLPYTPNMQQLLRKRHIGNDIVTIVFQEPGSKPFCPTTIRSHFQHVFLVVR
EEEEEEEEEEEE      EEEEE      EEEEEEEEE      EEEEEEEEEEEEEEEEE
          TT  T      T      T      T      T      T      T

```

Abbildung 25: β -Finger von SPA-1. In der oberen Zeile ist ein Abschnitt der Aminosäuresequenz von SPA-1 abgebildet. Die mittlere Zeile zeigt die Position von potentiellen β -Faltblättern (E) und die untere Zeile die Position von potentiellen β -Schleifen (T) an. Der β -Finger ist rot und das PDZ-bindende Motiv grün hervorgehoben. Die Strukturvorhersage wurde nach der Methode von Chou und Fasman durchgeführt (Chou und Fasman, 1974).

Der β -Finger ist jedoch nicht das einzige bekannte interne PDZ-bindende Motiv. Das PDZ-Domänen-Protein *Dishevelled* (Dvl) ist ebenso ein Bestandteil von Wnt-Signaltransduktionswegen, wie der membrangebundene Rezeptor *Frizzled* (Fz) und das Cystein-reiche Protein Idax. Sowohl Idax als auch Fz binden an die einzige PDZ-Domäne von Dvl. Beide Proteine bedienen sich dabei eines untypischen PDZ-bindenden Motivs. Für Idax wurde ein KTXXXI- und für Fz ein KTXXXW-Hexapeptid als bindungsrelevant identifiziert. Es konnte zudem gezeigt werden, dass beide an der gleichen Stelle von Dvl binden, die normalerweise von klassischen PDZ-bindenden Motiven besetzt wird (London et al., 2004; Wong et al., 2003).

Im Jahr 2004 konnten Penkert et al. einen außergewöhnlichen Mechanismus für die Bindung eines internen Motivs an eine PDZ-Domäne entschlüsseln. Sie untersuchten die Bindung von Pals1 an das PDZ-Domänen-Protein Par-6. Par-6 spielt eine zentrale Rolle bei der Polarisierung von Zellen. Die Wechselwirkung zwischen Par-6 und Pals1 ist wichtig für die Ausbildung von *tight junctions* in Epithelzellen. Penkert et al. wiesen nach, dass die interne Sequenz HREMAV von Pals1 die Bindungstasche der PDZ-Domäne von Par-6 einnimmt. Anders als andere PDZ-bindende Motive induziert dieses jedoch eine Konformationsänderung der PDZ-Domäne, welche die Bindung erst ermöglicht. Herkömmliche PDZ-bindende Motive passen sich den sterischen Beschränkungen der Bindungsfurche der PDZ-Domäne an, Pals1 hingegen passt die Furche seinen sterischen Anforderungen an (Penkert et al., 2004).

Diese Beispiele zeigen, dass interne Motive in mehreren Fällen die Bindung eines Liganden an eine PDZ-Domäne vermitteln. Somit könnte auch im Fall von NCAM, das für die Bindung an MUPP1 nicht auf das putative PDZ-bindende Motiv ESKA am C-Terminus angewiesen ist, ein internes Motiv mit MUPP1 interagieren.

Aufgrund des identischen Bindungsverhaltens der intrazellulären Domänen beider NCAM-Transmembran-Isoformen (NCAM140 und NCAM180) gegenüber MUPP1 war davon auszugehen, dass sich der mit MUPP1 interagierende Bereich innerhalb der Sequenz der intrazellulären Domäne von NCAM140 befindet. Denn diese Sequenz ist beiden Isoformen gemein. Um die Lage der MUPP-Bindungsstelle in NCAM einzugrenzen, sollte daher zunächst durch Deletion des N-terminalen Drittels von NCAM140 ID dessen Beteiligung an der Interaktion eruiert werden. Dabei zeigte sich, dass die erwähnte Deletion die Interaktion zwischen NCAM und MUPP1 unterbindet. Möglicherweise befindet sich also das PDZ-bindende Motiv von NCAM140 in diesem Abschnitt seiner intrazellulären Domäne. Gibt es im N-terminalen Abschnitt der ID von NCAM140 interne PDZ-bindende Motive, wie sie zuvor für andere Proteine beschrieben wurden? Eine Sequenz, die einem KTXXXI/W-Motiv, wie in Fz bzw. Idax (siehe oben), vergleichbar wäre, findet sich in der Aminosäuresequenz der ID von NCAM140 nicht. Auch eine Sequenz mit Homologie zu dem Hexapeptid HREMAV von Pals1 ist nicht zu entdecken.

Sucht man hingegen *in silico* nach klassischen PDZ-bindenden Motiven (Klasse I, II und III; vgl. Tabelle 1) in der Sequenz der ersten 44 N-terminalen Aminosäuren von NCAM140 ID, so finden sich einige interne Tetrapeptide, die einer der drei Klassen zugeordnet werden können. Vergleicht man die Positionen dieser Tetrapeptidsequenzen mit den Positionen potentieller β -Haarnadelschleifen, so fällt ein Bereich auf, der die Voraussetzungen für die Bildung eines β -Fingers mit PDZ-bindendem Motiv annähernd erfüllt (siehe Abb. 26). Bei den folgenden Ausführungen zu Sekundärstrukturvorhersagen sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass diese Methoden in ihrer Voraussagefähigkeit begrenzt sind und dass das Ergebnis manchmal von Methode zu Methode schwanken kann. Sekundärstrukturvoraussagen können nützliche Hinweise auf vorhandene Struktur motive liefern, ersetzen aber in keinsten Weise strukturanalytische Verfahren.

1	MD <u>ITCY</u> FLNKCGLLMCIAVNL <u>CGKAGPGAKGKDMEEGKA</u> AFSKDES <u>KEPI</u> VEVRTEEERT	140	ID
1	CC <u>EEEEEH</u> CCCC <u>EEHE</u> HHHHHCCCCCCCCCCCC <u>HHCC</u> HHCCCCCCCC <u>EEEE</u> CCCCCCC		BTP2
1	NNNNNNNN <u>TTTT</u> NNNNNNNNNN <u>TTTTTTTTTT</u> NNN <u>TTTT</u> NNNNNN <u>TTTT</u> NNNNNNNN <u>TTTT</u>		BTP2
1	C <u>EEEEEEE</u> CCCC <u>HHHHHHHH</u> CCCCCCCCCCCC <u>HHHHHHHHHH</u> CCCC <u>EEEE</u> CCCCCCC		Coudes
1	NNNNNNNN <u>TTTT</u> NNNNNNNNNN <u>TTTTTTTTTT</u> NNNNNNNNNNNNNNNN <u>TTTT</u> NNNNNN <u>TTTT</u>		Coudes
1	<u>NEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE</u> NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN <u>EEEE</u> NNNNNN		Ch/Fas
1	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN <u>TNN</u> <u>TT</u> <u>NN</u> <u>TT</u> <u>NNNN</u> <u>TT</u> <u>NNNN</u> <u>TT</u> <u>NN</u>		Ch/Fas
61	PNHDGGKHTEPNE <u>TTPL</u> TEPEKGPVETKSEPQ <u>ESEAKPA</u> <u>PTEV</u> KTVPNPEATQTKENESKA	140	ID
61	CCCCCCCCCCCCCCCC <u>CH</u> CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC <u>EEEE</u> CCCCCCCCCCCCCCC		BTP2
61	<u>TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT</u> NNNNNNNN <u>TTTTTTTTTTTTTTTT</u> NNNNNN <u>TTTT</u> NNNN <u>TTTT</u> TNN		BTP2
61	CCCCCCCCCCCCCCCC <u>CH</u> CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC <u>EEEE</u> CCCCCCCCCCCCCCC		Coudes
61	<u>TTTTTTTTTTTTTTTTTT</u> NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN <u>TTTT</u> NNNN <u>TTTT</u> TNN <u>TTTT</u> TNN		Coudes
61	NNNNNNNNNNNNNN <u>EEEE</u> NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN <u>EEEE</u> NNNNNNNNNNNNNN		Ch/Fas
61	NNNN <u>TT</u> <u>NN</u> <u>TT</u> <u>NNNN</u> <u>TT</u> <u>NN</u> <u>TT</u> <u>NNNN</u> <u>TT</u> <u>NN</u> <u>TT</u> <u>NNNN</u> <u>TT</u> <u>NN</u> <u>TT</u> <u>NN</u>		Ch/Fas

Abbildung 26: Vorhersage von Sekundärstrukturelementen und internen PDZ-bindenden Motiven in der Sequenz der NCAM140 ID. Potentielle Sekundärstrukturelemente wurden mit drei unterschiedlichen computergestützten Methoden (BTP2, Coudes und Ch/Fas, s. u.) vorausgesagt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Jeder Methode sind zwei Zeilen zugeordnet. Die untere gibt Hinweise auf das Vorhandensein von β -Haarnadelschleifen, wohingegen die obere die Position von potentiellen β -Faltblättern und α -Helices markiert. In der Aminosäuresequenz der NCAM140 ID sind putative PDZ-bindende Konsensusmotive hervorgehoben. Klasse-I-Motive (X-S/T-X-L/V) sind hellblau markiert, Klasse-II-Motive (X- Φ -X- Φ) sind unterstrichen (zu beachten ist, dass diese stellenweise überlappen) und das einzige Motiv der Klasse-III (X-D/E-X- Φ) ist in orange dargestellt. Mit einem Rechteck ist der Abschnitt des Proteins umgeben, der bei NCAM140 Δ N deletiert ist. Innerhalb dieses Bereiches ist die Position eines potentiellen β -Fingers durch eine hellgraue Markierung angezeigt. E = β -Faltblatt, H = α -Helix, C = random coil. X – beliebige Aminosäure, ψ – hydrophobe Aminosäure. BTP2 = BetaTPred2 (<http://www.imtech.res.in/raghava/betatpred2/server.html>), Coudes (<http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/Coudes/COUDES.html>), Ch/Fas = Chou-Fasman (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1).

Das Tetrapeptid ITCY in der Nähe des absoluten N-Terminus stellt ein Klasse-I-PDZ-bindendes Motiv dar, das laut dreier verschiedener Methoden zur Vorhersage der Sekundärstruktur Teil eines β -Faltblattes ist (hellgraue Markierung in Abb. 26). Zwei der Methoden sagen vorher, dass dieses Faltblatt von einer β -Schleife gefolgt wird. Auf diese Schleife folgen dann Faltblatt- oder Helixstrukturen. Ein Punkt, der gegen das Vorhandensein eines β -Fingers am absoluten N-Terminus der ID von NCAM sprechen würde, ist die unmittelbare Nähe dieses Bereiches zur Plasmamembran. Vergleicht man die Sekundärstrukturvoraussagen für NCAM140 ID mit und ohne Transmembranregion, ergibt sich gleich ein anderes Bild in Bezug auf den potentiellen β -Finger am N-Terminus

(siehe Abb. 27). Man erkennt eine lange α -Helix, die sich noch über sieben Aminosäuren in die ID erstreckt. Unter diesen sieben Aminosäuren ist auch das ITCY-Tetrapeptid, das laut Abbildung 26 noch Teil eines potentiellen β -Fingers gewesen wäre. Zudem ist es fraglich, ob die unmittelbare Nähe der Plasmamembran eine Protein-Protein-Interaktion unter sterischen Gesichtspunkten zulassen würde.

1	PANGSPTAGLST	GAIVGILIVIFVLLLVVMD	ITCY	FLNKCGLLMCI	AVNL	140	ID + TD	
1	CCCCCCCCCCCC	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHH	CCCC	EEHHHHHH	140	ID + TD	
1	-----	-----	CCCC	EEEE	EEHEHHHH	140	ID	
1	-----	-----	MD	ITCY	FLNKCGLLMCI	140	ID	
51	CGKAGPGA	KGKDMEEGKAAFSKDESKEPI	IVEVRTEEERTPNHDGGKHTEP			140	ID + TD	
51	CCCCCCCCCCCC	CCCC	CCCCCCCC	EEEE	CCH	CCCCCCCCCCCC	140	ID + TD
51	CCCCCCCCCCCC	HHCC	HHCCCC	EEEE	CCCCCCCCCCCC	140	ID	
51	CGKAGPGA	KGKDMEEGKAAFSKDESKEPI	IVEVRTEEERTPNHDGGKHTEP			140	ID	
101	NETTPLTEPEK	GPVETKSEPQESEAKPAPTEV	KTVPN	NEATQTKENESKA		140	ID + TD	
101	CCCCCCCCCCCC	CCCC	HH	CCCC	EEEE	CCCCCCCCCCCC	140	ID + TD
101	CCCCCCCC	CCCCCCCCCCCCCCCC	CCCC	EEEE	CCCCCCCCCCCC	140	ID	
101	NETTPLTEPEK	GPVETKSEPQESEAKPAPTEV	KTVPN	NEATQTKENESKA		140	ID	

Abbildung 27: Vergleich der Vorhersagen für die Sekundärstrukturen von NCAM140 ID und NCAM140 ID inklusive Transmembrandomäne (TD). Potentielle Sekundärstrukturelemente wurden mit BetaTPred2 (<http://www.imtech.res.in/raghava/betatpred2/server.html>) vorausgesagt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die jeweils oberste und unterste Zeile zeigen die Aminosäuresequenzen von 140 ID + TD bzw. 140 ID. Die beiden mittleren Zeilen stellen die dazugehörigen Sekundärstrukturvoraussagen nach BetaTPred2 dar. In der Aminosäuresequenz von NCAM140 ID + TD ist die Transmembrandomäne rot hervorgehoben. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Präsenz der transmembranen Helix auf die Struktur des N-terminalen Teils der ID auswirkt. Der potentielle β -Finger nach Strukturvoraussage für die ID von NCAM140 ohne TD ist durch einen ein Rechteck umrandet. Das darin enthaltene putative Klasse I PDZ-bindende Motiv ist gelb unterlegt. E = β -Faltblatt, H = α -Helix, C = *random coil*.

Die Beteiligung der ITCY-Sequenz an der NCAM-MUPP1-Bindung ist zwar aus den genannten Gründen fraglich. Jedoch gibt es weitere Tetrapeptide im N-terminalen Drittel der ID von NCAM140, die Eigenschaften von klassischen PDZ-bindenden Motiven zeigen (Abb. 26). Hierbei handelt es sich um Motive der Klasse II. Wenn auch unter den bisher identifizierten Bindungspartnern von MUPP1 keiner ist, der über ein Motiv der Klasse II an die zehnte PDZ-Domäne bindet, kann eine solche Interaktion keineswegs ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit geschilderten Beispiele interner PDZ-bindender Motive haben gezeigt, dass das simple Modell eines C-terminalen Tetrapeptids, das an eine PDZ-Domäne bindet, nicht immer das tatsächliche Bindungsverhalten von

PDZ-Domänen ausreichend beschreibt. Vielleicht befindet sich auch im N-terminalen Drittel von NCAM140 ID ein bisher noch nicht charakterisiertes neues PDZ-bindendes Motiv.

Die bisherigen Überlegungen gingen davon aus, dass MUPP1 an ein Motiv im N-terminalen Drittel der NCAM140 ID bindet. Es ist aber auch durchaus denkbar, dass die Deletion eines Drittels der NCAM140 ID, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit, drastische Konsequenzen für die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins mit sich bringt.

```

1 MDITCYFLNKCGLLMCIAVNLGKAGPGAKGKDMEEGKAAAFSKDESKEPIVEVRTEEERT 140 ID
1 CCHEEEEECCCCHEEEHHHHCCCCCCCCCHHHHHHHCCCCCCCCHEEEEECCCC 140 ID
1 -----CCCCCHEEECCCC 140 ID ΔN
1 -----ESKEPIVEVRTEEERT 140 ID ΔN

61 PNHDGGKHTEPNETTPLTEPEKGPVETKSEPOESEAKPAPTEVKTPVNEATQTKENESKA 140 ID
61 CCCCCCCCCCCCCCCCCCHHCCCCCCCCCCCCHECCCCHEEECCCCCCCCCCCCCCCC 140 ID
61 CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHECCCCCCCCCCCCCCCC 140 ID ΔN
61 PNHDGGKHTEPNETTPLTEPEKGPVETKSEPOESEAKPAPTEVKTPVNEATQTKENESKA 140 ID ΔN

```

Abbildung 28: Vergleich der Sekundärstrukturen von NCAM140 ID und NCAM140 ID ΔN. Es wird deutlich, dass durch die Deletion des N-terminalen Drittels die Struktur in anderen Bereichen des Proteins Veränderungen unterworfen ist. Je nach angewandter Methode der Strukturvorhersage sind diese Unterschiede stärker oder schwächer ausgeprägt. Die jeweils oberste und unterste Zeile zeigen die Aminosäuresequenzen von 140 ID bzw. 140 ID ΔN. Die beiden mittleren Zeilen stellen die dazugehörigen Sekundärstrukturvoraussagen dar. Hier ist beispielhaft die Strukturvorhersage nach PSIPRED abgebildet (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>). Putative PDZ-bindende Konsensusmotive der Klassen-I (hellblau) und -III (orange) in der Sequenz von NCAM140 ID ΔN sind farblich hervorgehoben. E = β -Faltblatt, H = α -Helix, C = *random coil*.

Änderungen der Struktur eines Proteins können dazu führen, dass z.B. eine Bindungsstelle plötzlich maskiert wird und nicht mehr zugänglich ist. So könnte ein PDZ-bindendes Motiv, das zwischen Aminosäure 44 und 120 der NCAM140 ID liegt, durch die Deletion des N-terminalen Drittels (Aminosäuren 1-44) ebenfalls beeinträchtigt werden. Abbildung 28 zeigt, dass fünf potentielle PDZ-bindende Motive in NCAM140 ID ΔN vorhanden sind, davon drei der Klasse I und eines der Klasse III. Es ist nicht ausgeschlossen, dass eines davon für die Bindung an MUPP1 wichtig ist. Durch den Einsatz weiterer Deletionskonstrukte von NCAM140 ID könnte die Bindungsstelle noch weiter eingengt werden. Dann würde sich auch zeigen, ob das N-terminale Drittel des Proteins tatsächlich das PDZ-bindende Motiv beherbergt.

5.2 Die Bedeutung von MUPP1 für die NCAM-abhängige Oberflächenlokalisation von Kir3.1/3.2

Delling et al. (2002) zeigten, dass NCAM die Oberflächenlokalisation neuronaler Kir-Kanäle, die aus je zwei Kir3.1- und Kir3.2-Untereinheiten bestehen, beeinflussen kann. Elektrophysiologische Untersuchungen an hippocampalen Neuronen, Oozyten von *Xenopus* und CHO-Zellen hatten gezeigt, dass NCAM die Amplitude Kir3-vermittelter einwärtsgerichteter Kaliumströme vermindert. Zellbiologische und immunzytochemische Experimente bestätigten die Vermutung, dass die verminderten einwärtsgerichteten Kaliumströme auf eine erniedrigte Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisation zurückzuführen sind. Der genaue Mechanismus, über den NCAM die Menge an Kir3.1/3.2 an der Zelloberfläche reduziert, konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Es scheint jedoch so, als ob bestimmten Membranmikrodomänen, sogenannten *lipid rafts*, eine wesentliche Funktion bei diesem Prozess zukommt. Alle NCAM-Isoformen sind in *lipid rafts* zu finden (Niethammer et al., 2002). Auch Kir3.1/3.2 kann in besagten Membranmikrodomänen nachgewiesen werden. Entfernung von NCAM aus oder Zerstörung von *lipid rafts* mit Lovastatin heben den NCAM-vermittelten Effekt auf den Kir3.1/3.2-Transport auf. In Abwesenheit von NCAM hat die Zerstörung von *lipid rafts* keinen Einfluss auf den Kir3-Transport. Interessanterweise konnten Ackermann et al. kürzlich zeigen, dass MUPP1 mit *lipid rafts* aus Membranfraktionen von Rattenhirn assoziiert ist (Ackermann et al., 2008). Eine solche *raft*-Lokalisation von MUPP1 könnte auch für eine Adaptorwirkung bei der Reduzierung der Kir3.1/3.2-Menge durch NCAM wichtig sein.

Ferner gelang es Markus Delling, zu zeigen, dass der N-Terminus von Kir3.2 der Abschnitt des Proteins ist, der die Sensitivität gegenüber NCAM vermittelt. Durch Substitution des N-Terminus von Kir3.2 gegen den N-Terminus von Kir3.4 konnte der NCAM-vermittelte Effekt auf die Oberflächenlokalisation von Kir3.1/3.2 aufgehoben werden (Delling et al.; 2002).

Der absolute C-Terminus von Kir3.2 stellt mir seiner ESKV-Sequenz ein PDZ-bindendes Motiv der Klasse I dar. Es wurde nicht untersucht, ob es sich tatsächlich um die Bindestelle für die 13. PDZ-Domäne von MUPP1 handelt. Wie das Beispiel von NCAM gezeigt hat, muss ein optimales C-terminales Motiv nicht bedeuten, dass ein PDZ-Domänen-Protein daran bindet. *Yeast-Two-Hybrid*- und ELISA-Untersuchungen haben jedoch klar gezeigt, dass die Bindungsstelle für MUPP1 in der C-terminalen Domäne zu

finden ist. Wie ist das in Einklang zu bringen mit der Tatsache, dass der N-terminale Part von Kir3.2 die Sensitivität gegenüber NCAM bedingt? Vielleicht ist MUPP1 in erster Linie dafür zuständig, NCAM und Kir3.1/3.2 in räumliche Nähe zueinander zu bringen. Doch was geschieht am N-Terminus von Kir3.2, wenn sowohl NCAM als auch MUPP1 dort nicht angreifen? Es ist keineswegs unwahrscheinlich, dass ein weiteres, noch nicht identifiziertes Protein an der Regulation der Oberflächenlokalisierung von Kir3.1/3.2 beteiligt ist.

Da eine direkte Interaktion zwischen NCAM und Kir3.1 oder Kir3.2 nicht nachgewiesen werden konnte (Delling et al., 2002), stellte sich die Frage, ob es möglicherweise ein Protein gibt, das sowohl mit NCAM als auch mit Kir3.1/3.2 wechselwirkt und auf diese Weise den Effekt von NCAM auf die Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisierung vermittelt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das multiple PDZ-Domänen-enthaltende Protein MUPP1 mit NCAM und der Kir3.2-Untereinheit der neuronalen Kir3.1/3.2-Kanäle direkt interagiert. MUPP1 könnte demnach die Rolle des Vermittlers zwischen NCAM und Kir3.1/3.2 übernehmen.

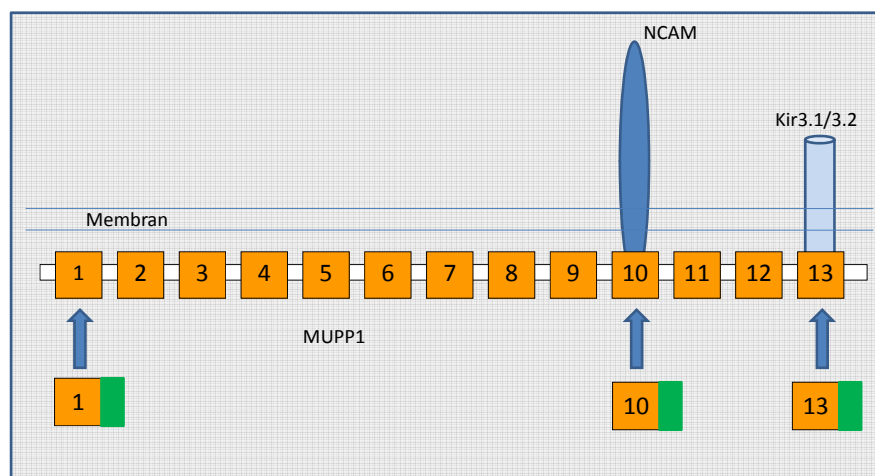


Abbildung 29: Schematische Darstellung eines Komplexes aus MUPP1, NCAM und Kir3.1/3.2. Die Abbildung verdeutlicht die relative Lage der Bindungsstellen von NCAM und Kir3.1/3.2 zueinander. Die EGFP-MUPP1-Fusionsproteine sind als grün-orange Rechtecke dargestellt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Experimente durchgeführt, mit deren Hilfe die Bedeutung von MUPP1 für die NCAM-abhängige Oberflächenlokalisierung von Kir3.1/3.2 geklärt werden sollte. Immunzytochemische Untersuchungen an

hippocampalen Neuronen ergaben, dass die Kir3.1/3.2-Menge an der Zelloberfläche durch die Expression einzelner PDZ-Domänen von MUPP1 als EGFP-Fusionsproteine verändert werden kann. Dabei ging ich von der Annahme aus, dass die NCAM-bindende zehnte und die Kir3.2-bindende 13. PDZ-Domäne einen dominant-negativen Effekt haben, denn sie sollten mit endogenem MUPP1 um die Bindung an NCAM bzw. Kir3.2 kompetieren. Die Expression des Fusionsproteins EGFP-PDZ 1 war als Kontrolle vorgesehen, da diese Domäne weder an NCAM noch an Kir3.2 bindet. Überraschenderweise bewirkte nicht nur EGFP-PDZ 10, sondern auch EGFP-PDZ 1 eine signifikante Zunahme der Kir3.1/3.2-Oberflächenexpression in Neuriten. Diese Zunahme ist nicht auf eine gesteigerte Expression oder einen erhöhten Gehalt an Kir3.1/3.2 in Neuriten zurückzuführen.

EGFP-PDZ 13 hingegen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Menge an Kir3.1/3.2 an der Zelloberfläche. Jedoch deutet der knapp über der Signifikanzgrenze liegende p-Wert von 0,06 an, dass durchaus eine Tendenz besteht, dass dieses Konstrukt die Menge des Kanals an der Oberfläche erhöht.

Geht man davon aus, dass NCAM an MUPP1 binden muss, um die Oberflächenlokalisierung von Kir3.1/3.2 zu modulieren, kann der Effekt von EGFP-PDZ 10 folgendermaßen interpretiert werden: EGFP-PDZ 10 wird in den Zellen überexprimiert und konkurriert mit endogenem MUPP1 um Bindungspartner. Aufgrund der Überexpression von EGFP-PDZ 10 wird nahezu das gesamte endogene NCAM an dieses Fusionsprotein gebunden. Vorgänge in der Zelle, deren korrekte Abläufe einer Interaktion von NCAM mit MUPP1 bedürfen, sind dadurch in hohem Maße beeinträchtigt oder komplett ausgeschaltet.

Es ist offensichtlich, dass MUPP1 mit vielen verschiedenen Liganden interagieren und auf diese Weise einen supramolekularen Komplex organisieren könnte. Unter diesem Gesichtspunkt ist es gut möglich, dass NCAM, Kir3.1/3.2, MUPP1 und eventuell noch weitere Proteine einen solchen Komplex bilden, der den Transport von Kir3.1/3.2 zur Zelloberfläche reguliert. In diesem Zusammenhang kann der beobachtete Effekt von EGFP-PDZ 10 auf die Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisierung darauf zurückzuführen sein, dass NCAM aus dem Komplex verdrängt wurde und dieser dadurch seine Funktionalität verliert.

Unter Berücksichtigung des Konzepts supramolekularer Komplexe auf der Basis von PDZ-Domänen Proteinen lässt sich der Effekt von EGFP-PDZ 1 auf die Oberflächenlokalisierung von Kir3.1/3.2 interpretieren. EGFP-PDZ 1 war ursprünglich als Kontrolle gedacht. Die Analyse der Daten aus der immunzytochemischen Färbung

hippocampaler Neurone zeigte jedoch, dass EGFP-PDZ 1 die Menge an Kir3.1/3.2 an der Oberfläche dieser Zellen signifikant erhöht. Der Effekt ist sogar noch stärker ausgeprägt, als bei EGFP-PDZ 10. Könnte es sein, dass ein Ligand der ersten PDZ-Domäne von MUPP1 ein weiterer Bestandteil eines Proteinkomplexes ist, der die Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisation beeinflusst? Es ist vorstellbar, dass NCAM an die zehnte und ein hypothetischer Ligand an die erste PDZ-Domäne von MUPP1 binden müssen, um die Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisation zu reduzieren. Zwar sind die erste und zehnte PDZ-Domäne nicht benachbart, aber MUPP1 könnte eine Konformation einnehmen, in der die erste PDZ-Domäne in räumliche Nähe zur zehnten und 13. gelangt, so dass sich die verschiedenen Liganden gegenseitig beeinflussen können. Eine andere Möglichkeit wäre, dass MUPP1 über seine erste PDZ-Domäne an ein Protein bindet, das MUPP1 in definierten Kompartimenten innerhalb der Zelle festhält. Bis heute konnte nur das transmembrane Proteoglykan NG2 als Ligand der ersten PDZ-Domäne identifiziert werden (Barritt et al., 2000). NG2 wird jedoch nicht von Neuronen exprimiert (Karram et al., 2005). Wenn EGFP-PDZ 1 die Oberflächenlokalisation von Kir3.1/3.2 erhöht, indem es mit MUPP1 um Bindungspartner der ersten PDZ-Domäne kompetiert, dann kann es sich bei diesem Liganden also nicht um NG2 handeln. Um Klarheit in dieser Angelegenheit zu gewinnen, müsste gezielt nach Bindungspartnern der ersten PDZ-Domäne von MUPP1 gesucht werden.

EGFP-PDZ 1 war das einzige EGFP-MUPP1-Fusionsprotein, das nicht im *Western Blot* detektiert werden konnte. Allerdings konnte EGFP-PDZ 1 durch die grüne Fluoreszenz von EGFP nachgewiesen werden. Da bei den mit EGFP-PDZ 1 transfizierten hippocampalen Neuronen eine signifikante Erhöhung der Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisation zu beobachten war, ist es unwahrscheinlich, dass EGFP-PDZ 1 nicht exprimiert wurde. Es ist vielmehr von einem Nachweisproblem auszugehen. Eventuell beeinflusst die PDZ-Domäne bei diesem Fusionsprotein die Struktur des EGFP-tags derart, dass das Epitop, das von dem α GFP-Antikörper erkannt wird, nicht zugänglich ist.

Da EGFP-PDZ 13 mit MUPP1 um die Bindung an Kir3.1/3.2 konkurriert, sollte die Überexpression von EGFP-PDZ 13 theoretisch dafür sorgen, dass alles vorhandene Kir3.1/3.2 an das EGFP-Fusionsprotein bindet und nicht mehr mit MUPP1 in Verbindung treten kann. Wenn man davon ausgeht, dass die Bindung von Kir3.1/3.2 an MUPP1 für die Regulation der Oberflächenexpression des Kanals wichtig ist, so würde man einen signifikanten Effekt erwarten, wenn diese Bindung blockiert wird. Die Analyse der

immunzytochemischen Daten zeigte jedoch nur eine Tendenz zur Erhöhung der Menge von Kir3.1/3.2 an der Zelloberfläche. Diese Tendenz könnte durch das Zusammenwirken zweier Effekte von EGFP-PDZ 13 zustande kommen. Auf der einen Seite könnte man annehmen, dass tatsächlich mehr Kir3.1/3.2 an die Zelloberfläche gelangt, wenn die Interaktion mit MUPP1 blockiert ist. Auf der anderen Seite könnte die Bindung an EGFP-PDZ 13 auch einen vermehrten Abbau von Kir3.1/3.2 zur Folge haben. Ein Komplex aus EGFP-PDZ 13 und Kir3.1/3.2 kommt normalerweise nicht in Zellen vor und könnte deshalb einem raschen Abbau unterliegen. Es wäre denkbar, dass solche proteolytischen Prozesse das oberflächenständige Kir3.1/3.2 stärker betreffen, als zytoplasmatisch lokalisiertes und daher ein vermehrter Transport an die Zelloberfläche durch den vermehrten Abbau relativiert wird. Möglich wäre auch, dass EGFP PDZ 13 nicht nur die Interaktion von Kir3.1/3.2 mit MUPP1 unterbindet, sondern auch andere natürliche Bindungspartner des Kaliumkanals an der Kontaktaufnahme hindert oder wenigstens beeinträchtigt. Vielleicht bewirkt dies, dass der Transport von Kir3.1/3.2 zur Membran nicht mehr optimal abläuft und ein Teil der Kanäle an einen falschen Bestimmungsort gelangt. Eventuell stabilisieren Interaktionen von Kir3.1/3.2 mit anderen Transmembranproteinen den Kanal an der Zelloberfläche und haben einen Einfluss auf dessen Recyclingrate. EGFP-PDZ 13 könnte solche Interaktionen stören und dadurch eine erhöhte Internalisation des Kanals bewirken, die einen vermehrten Transport zur Oberfläche ebenfalls relativiert.

Es gibt eine wachsende Zahl an Beispielen, die solche Mechanismen beschreiben. Das mit der Golgi-Membran assoziierte Protein ATBP50 (AT₂-receptor-binding protein of 50 kDa) bindet an den zytoplasmatischen C-terminus des G-Protein-gekoppelten Angiotensin AT₂-Rezeptors und kontrolliert dadurch dessen Zelloberflächenexpression. Der Rezeptor verbleibt in intrazellulären Kompartimenten, wenn die ATBP-Expression inhibiert wird (Wruck et al., 2005). Für viele Proteine ist bekannt, dass sie durch Assoziation mit dem Zytoskelett in der Membran stabilisiert werden. Eine Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase ist über Ankyrin G mit dem Aktin-Spektrin-Zytoskelett verbunden. Die Interaktion wird über zytoplasmatische Domänen vermittelt. In polarisierten Epithelzellen wird Na⁺/K⁺-ATPase zur apikalen und basolateralen Membran transportiert. Nur an der basolateralen Seite wird die ATPase durch Anheftung ans Zytoskelett stabilisiert. An der apikalen Seite wird sie sehr rasch wieder aus der Membran entfernt (Devarajan et al., 1994; Hammerton et al., 1991; Thevananther et al., 1998).

Der Einfluss von EGFP-PDZ 13 auf die Kir3.1/3.2-Oberflächenexpression ließe sich also theoretisch wie folgt erklären:

Wenn Kir3.1/3.2 nicht an die 13. PDZ-Domäne von MUPP1 bindet, gelangt mehr von dem Kaliumkanal an die Zelloberfläche.

Wenn Kir3.1/3.2 nicht an MUPP1 bindet, kann der C-Terminus mit bisher unbekanntem Proteinen, die den Transport des Kanals zur Plasmamembran oder die Stabilisierung an der Oberfläche vermitteln, interagieren.

EGFP-PDZ 13 schwächt jedoch auch diese Wechselwirkungen. Im Endeffekt ist das Resultat eine Erhöhung der Kir3.1/3.2-Menge an der Oberfläche, die aber nicht signifikant ist.

Es ist durchaus denkbar, dass die Interaktion von MUPP1 mit Kir3.1/3.2 in einem anderen Zusammenhang steht, als bisher angenommen. Möglicherweise ist die direkte Interaktion nicht wichtig für den Transport an sich. MUPP1 könnte den Transport indirekt beeinflussen, indem es ein Protein in der Membran von Transportvesikeln, die u.a. auch dem Transport von Kir3.1/3.2 dienen, bindet. Vielleicht spielt MUPP1 eine allgemeinere Rolle beim Transport von Vesikeln, und die veränderte Oberflächenlokalisierung von Kir3.1/3.2 ist demnach nur ein Nebeneffekt eines generell veränderten Vesikeltargetings.

Aus all diesen Überlegungen ergibt sich ein mögliches Szenario der Wirkung von NCAM und MUPP1 auf die Oberflächenlokalisierung von Kir3.1/3.2.

Demnach verhindert die Interaktion von MUPP1 mit Kir3.1/3.2 dessen Wechselwirkung mit Faktoren, die für den Transport des Kanals zur Membran essentiell sind. NCAM stabilisiert die Bindung zwischen MUPP1 und neuronalem Kir-Kanal, indem es selbst an die zehnte PDZ-Domäne bindet. Das gleiche gilt auch für ein bisher unidentifiziertes Protein, das sich an die erste PDZ-Domäne anlagert. NCAM und der hypothetische Ligand der ersten PDZ-Domäne wirken dabei kooperativ. Fehlt eines der beiden Proteine, so löst sich Kir3.1/3.2 von MUPP1, bindet an spezifische Transportproteine und gelangt in erhöhtem Maße an die Oberfläche.

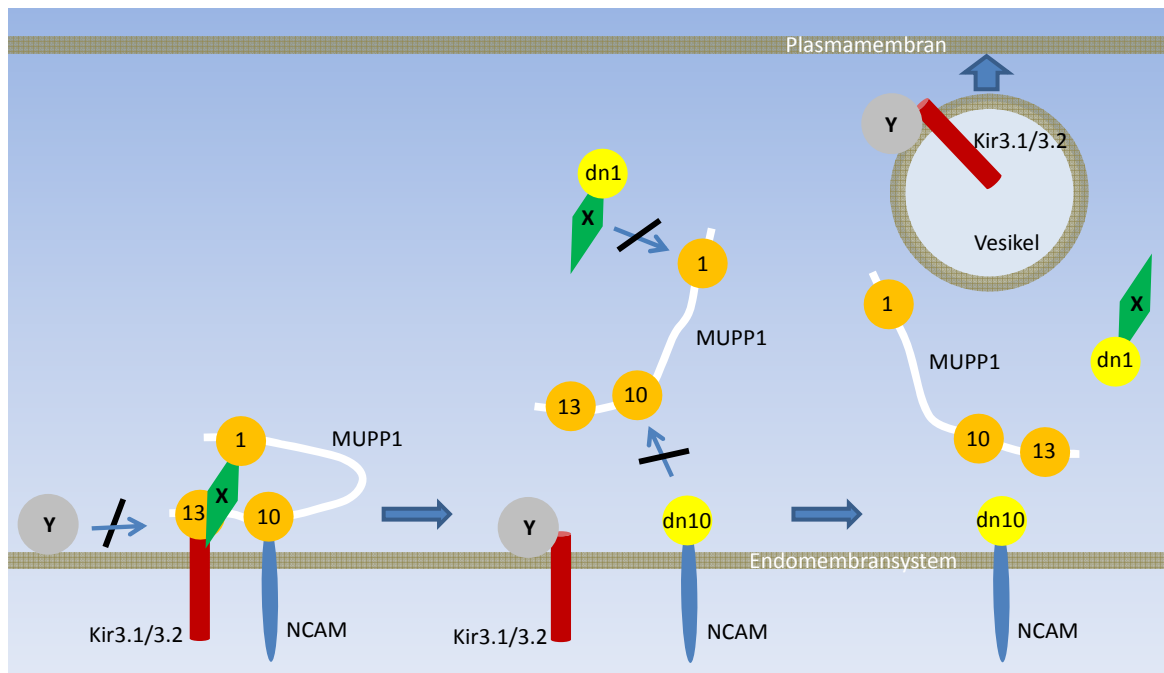


Abbildung 30: Modell zur Regulation der Oberflächenlokalisation von Kir3.1/3.2 durch MUPP1, NCAM und einen hypothetischen Liganden (X) der ersten PDZ-Domäne von MUPP1. NCAM (dunkelblau) und ein hypothetischer Ligand X (grün) der ersten PDZ-Domäne von MUPP1 bilden mit Kir3.1/3.2 (rot) und MUPP1 (weiß-orange) einen supramolekularen Komplex. In diesem Komplex stabilisieren sowohl NCAM als auch X die Bindung von Kir3.1/3.2 an die 13. PDZ-Domäne von MUPP1. Dadurch ist die Interaktion mit einem putativen Faktor Y (grau), der für den Transport von Kir3.1/3.2 zur Plasmamembran verantwortlich wäre, blockiert. Die dominant-negativen Fusionsproteine EGFP-PDZ 1 (gelb, dn1) und EGFP-PDZ 10 (gelb, dn10) kompetieren mit MUPP1 um die Bindung an NCAM und X. Sobald X und NCAM nicht mehr an MUPP1 gebunden sind, löst sich auch Kir3.1/3.2 aus dem Komplex und kann nun mit Y interagieren. Dies wiederum induziert den Transport von Kir3.1/3.2 via Vesikel zur Plasmamembran. Der Übersichtlichkeit wegen sind nur die PDZ-Domänen 1, 10 und 13 von MUPP1 abgebildet.

Die immunzytochemische Untersuchung der Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisation in Abhängigkeit von der Co-Expression dominant-negativer EGFP-MUPP-Fusionsproteine hat gezeigt, dass MUPP1-vermittelte Interaktionen bedeutsam sind für den Transport neuronaler Kir-Kanäle zur Oberfläche. Die Blockierung der Bindung von NCAM an MUPP1 liefert eine mögliche Erklärung, wie NCAM den Transport von Kir3.1/3.2 zur Zelloberfläche regulieren könnte. Bei der Bewertung der beobachteten Effekte darf aber nicht außer Acht gelassen werden, dass MUPP1 mit sehr vielen verschiedenen Proteinen interagieren kann. Insbesondere für die zehnte und 13. PDZ-Domäne sind zahlreiche Liganden identifiziert worden. Man muss davon ausgehen, dass dominant-negative Konstrukte alle Interaktionen einer PDZ-Domäne mit ihren spezifischen Liganden

blockieren. Insofern kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Liganden der zehnten PDZ-Domäne von MUPP1 ebenfalls eine Rolle beim Transport neuronaler Kir-Kanäle spielen. Die Daten von Delling et al. aus dem Jahr 2002 machen es zwar sehr wahrscheinlich, dass der bei Co-Expression von Kir3.1/3.2 und EGFP-PDZ 10 beobachtete Effekt auf die Inhibierung der Bindung zwischen MUPP1 und NCAM zurückzuführen ist, die Beteiligung eines anderen Liganden der zehnten PDZ-Domäne muss aber durch weitere Experimente geprüft werden. Dies gilt natürlich auch für die Liganden der 13. PDZ-Domäne. In diesem Zusammenhang kommt der genauen Charakterisierung der PDZ-bindenden Motive von Kir3.2 und NCAM eine tragende Rolle zu. Durch den Austausch einzelner Aminosäuren in den PDZ-bindenden Motiven könnte man selektiv die Interaktionen von Kir3.1/3.2 und NCAM mit MUPP1 verhindern, ohne dass andere Liganden der zehnten und 13. PDZ-Domäne in ihrer Bindung beeinträchtigt wären. Durch Co-Expression in heterologen Expressionssystemen könnte man erforschen, ob solche nicht an MUPP1 bindende Mutanten die Oberflächenlokalisierung neuronaler Kir-Kanäle verändern.

Um zu erklären, warum sowohl EGFP-PDZ 1 als auch EGFP-PDZ 10 einen signifikanten Effekt auf die Oberflächenlokalisierung von Kir3.1/3.2 haben, wurde die Vermutung angestellt, dass MUPP1, NCAM, Kir3.1/3.2 und ein weiteres noch unbekanntes Protein einen sogenannten supramolekularen Komplex bilden, der den Transport des Kanals zur Oberfläche reguliert.

Es gibt einige Beispiele von PDZ-Domänen-enthaltenden Proteinen, die mehrere Liganden binden und auf diese Weise einen Komplex räumlich organisieren und stabilisieren. Das am besten untersuchte Beispiel ist die Phototransduktionsmaschinerie in den Lichtsinneszellen von *Drosophila*. Im Zentrum dieses sogenannten „Signalplex“ steht das PDZ-Domänen-enthaltende Protein INAD mit fünf PDZ-Domänen sowie der licht-sensitive Kationenkanal TRP (*transient receptor potential*), eine Proteinkinase C (PKC) und eine Phospholipase C (PLC). INAD dirigiert jedes der drei Proteine an den korrekten Bestimmungsort innerhalb der Lichtsinneszelle. Weitere Mitglieder des Signalkomplexes sind u.a. Rhodopsin und Calmodulin (CaM). Xu et al. fanden klare Hinweise darauf, dass INAD-Moleküle über ihre dritten und vierten PDZ-Domänen multimerisieren und auf diese Weise ein noch größeres Netzwerk bilden (Xu et al., 1998). Es ist leicht vorzustellen, dass es für einen effizienten Ablauf der Phototransduktion von Vorteil ist, wenn alle Komponenten auf engstem Raum gebündelt sind. Abbildung 31 stellt den INAD-Signalkomplex schematisch dar.

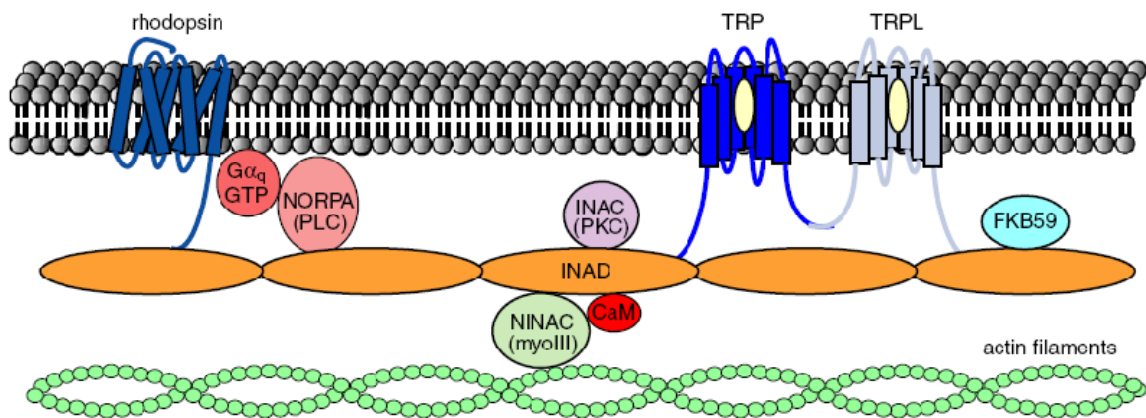


Abbildung 31: Der INAD-Signalkomplex. Der Hauptkomplex besteht aus INAD, TRP, PLC (NORPA) und PKC (INAC). Bestandteile des Hauptkomplexes müssen miteinander assoziiert sein, um an den korrekten Bestimmungsort innerhalb der Lichtsinneszelle zu gelangen. Weitere Mitglieder des Komplexes sind Rhodopsin, TRPL, NINAC, CaM und FKB59 (entnommen aus Wang und Montell, 2007).

Es gibt auch Beispiele für Proteinkomplexe mit PDZ-Domänen-enthaltenden Proteinen, die hauptsächlich Transportfunktionen übernehmen. In Neuronen werden NMDA-Rezeptor-enthaltende Vesikel entlang der Mikrotubuli zu den Dendriten transportiert. Daran sind sogar drei PDZ-Domänen Proteine beteiligt, namentlich CASK (*Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase*), MALS (*Mammalian lin-seven protein*) und MINT1 (*munc-18 interacting 1*). Die NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2B interagiert über ihr C-terminales PDZ-bindendes Motiv mit MALS. CASK bindet sowohl an MALS als auch an MINT1 und nimmt damit eine zentrale Rolle in diesem Komplex ein. MINT1 wiederum interagiert mit KIF17, einem Motorprotein aus der Kinesin-Superfamilie. Der gesamte Komplex wandert schließlich entlang von Mikrotubuli zu den Dendriten (Setou et al., 2000). Ein ähnlicher Komplex bestehend aus CASK, SAP-97, MINT1 und Veli übernimmt den Transport von Kir2.2 in polarisierten epithelialen Zellen zur basolateralen Membran (Leonoudakis et al., 2004).

Der Effekt dominant-negativer EGFP-MUPP-Fusionsproteine auf die Oberflächenexpression von Kir3.1/3.2 wurde nicht nur immunzytochemisch, sondern auch biochemisch anhand von Oberflächenbiotinylierungsexperimenten untersucht. In drei unabhängigen Experimenten konnte insgesamt kein signifikanter Effekt beobachtet

werden. Dies widerlegt jedoch nicht notwendigerweise die immunzytochemischen Daten. Das Streudiagramm in Abbildung 18 veranschaulicht, dass die einzelnen auf die Kir3.1/3.2-Gesamtmenge normalisierten Messwerte in jeder Gruppe teilweise sehr stark voneinander abweichen. Bei drei Messwerten insgesamt fallen starke Schwankungen sehr ins Gewicht. Zum Vergleich kann angeführt werden, dass auch bei den immunzytochemischen Daten teilweise eine große Schwankungsbreite vorlag, diese jedoch aufgrund der hohen Zahl an Messwerten relativiert wurde. Daher ist es notwendig, weitere Oberflächenbiotinylierungsexperimente durchzuführen, um eine statistisch abgesicherte Aussage treffen zu können.

Zudem wurden immunzytochemisch gezielt Zellen untersucht, die nachweislich mit Kir3.1/3.2 und EGFP-MUPP-Fusionsproteinen co-transfiziert waren. Bei Oberflächenbiotinylierungen werden die Lysate einer großen Zellpopulation analysiert. Hier stellt letztlich das *Western Blot*-Ergebnis den Mittelwert vieler Variablen dar. Die Proteinsynthese und Transfektionseffizienz kann von Zelle zu Zelle schwanken. Auch aus diesem Grund müssen weitere Experimente durchgeführt werden, die eine genauere statistische Auswertung ermöglichen.

Neben der Kir3.1/3.2-Oberflächenlokalisierung wurde auch die Oberflächenlokalisierung von NCAM in Abhängigkeit von der Co-Expression dominant-negativer MUPP1-Konstrukte untersucht. Auch hier gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Das deutet darauf hin, dass die NCAM-Oberflächenexpression nicht von MUPP1 abhängig ist. Die auf die NCAM-Gesamtmenge normalisierten Messwerte schwanken bei der mit EGFP-PDZ 10 und 13 transfizierten Gruppe relativ stark, jedoch nicht in dem Maße, wie die Messwerte der Analyse der Oberflächenexpression von Kir3.1/3.2. Für NCAM gilt deshalb wie für Kir3.1/3.2, dass zusätzliche Versuche eine genauere statistische Auswertung erlauben würden.

5.3 Der Effekt der Co-Expression von MUPP1 und NCAM auf das Proteinniveau von NCAM

Bei Co-Transfektionsexperimenten in HEK-Zellen konnte ich beobachten, dass die Co-Expression von MUPP1 und NCAM im Vergleich zur Co-Expression von NCAM und EGFP in einer höheren NCAM-Proteinmenge im Lysat resultiert. Dieser Effekt war sowohl mit NCAM140 als auch NCAM 180 reproduzierbar und statistisch signifikant. Im

Folgendes wurde getestet, welchen Effekt EGFP-Fusionsproteine einzelner PDZ-Domänen auf die NCAM-Menge haben. Dabei zeigte sich, dass die Co-Expression von NCAM und EGFP-PDZ 10 im Vergleich zur Co-Expression von NCAM und EGFP eine signifikante Verringerung der NCAM-Proteinmenge im Lysat zur Folge hatte. Es ist denkbar, dass NCAM durch die Interaktion mit MUPP1 stabilisiert wird und so dem Abbau durch proteolytische Mechanismen entgeht. Dass MUPP1 neuronale Membranproteine auf diese Weise stabilisieren kann, zeigt, das Beispiel des GABA_B-Rezeptors: seine Stabilität wird durch die Bindung an MUPP1 erhöht (Balasubramanian et al., 2007). Durch Blockierung der Interaktion kommt es zu einem raschen Abbau des Rezeptors. Analog führt im Falle der vorliegenden Arbeit die Co-Expression von EGFP-PDZ 10, die die Bindung von NCAM an endogenes MUPP1 unterbinden sollte, zu einer reduzierten NCAM-Menge. Diese könnte auf einen raschen Abbau zurückgeführt werden. Möglicherweise beeinflusst aber MUPP1 auch die Stabilität der NCAM-mRNA. Zwar ist bislang nicht bekannt, ob PDZ-Proteine in der Lage sind, direkt mit mRNA zu interagieren, dennoch kann dies, wie auch eine Interaktion mit RNA-bindenden Proteinen, für MUPP1 nicht ausgeschlossen werden. Um zu klären, ob MUPP1 das NCAM-mRNA-Niveau beeinflusst, müssen quantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt werden.

Nicht unerwähnt bleiben soll die Beobachtung, dass die dominant-negativen EGFP-MUPP-Konstrukte in CHO-Zellen einen anderen Effekt auf die NCAM-Menge haben, als in HEK-Zellen. In CHO-Zellen konnte nur bei Co-Expression von EGFP-PDZ 13 und NCAM eine erhöhte NCAM-Menge im Lysat gezeigt werden. Der entscheidende Unterschied zu den Co-Expressionsexperimenten mit HEK-Zellen ist jedoch, dass die CHO-Zellen zusätzlich mit Kir3.1/3.2 co-transfiziert waren. Der Unterschied zwischen CHO- und HEK-Zellen könnte auf die Anwesenheit von Kir3.1/3.2 in CHO-Zellen zurückzuführen sein. Vielleicht beeinflusst die Bindung von Kir3.1/3.2 an MUPP1 die Affinität des PDZ-Domänen-enthaltenden Proteins für NCAM. Durch die Inhibition der MUPP1-Kir3.1/3.2-Wechselwirkung könnte mehr NCAM an MUPP1 binden, und auf diese Weise stabilisiert werden.

Es wäre interessant, zu untersuchen, ob die NCAM-Proteinmenge in Zellen, die endogen NCAM exprimieren, durch den Einsatz von MUPP1-siRNA reduziert werden könnte. Man könnte erwarten, dass z.B. die Reduktion der MUPP1-Menge in neuronalen Zellen auch eine Verringerung der NCAM-Menge nach sich zieht. Auf diese Weise könnte auch geklärt werden, ob der in HEK-Zellen beobachtete Effekt möglicherweise auf die Überexpression von MUPP1 und NCAM zurückzuführen ist.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss beachtet werden, dass es sich bei HEK- und CHO-Zellen um heterologe Expressionssysteme handelt. Im Gegensatz zu hippocampalen Neuronen exprimieren HEK-Zellen kein endogenes NCAM und Kir3.1/3.2. CHO-Zellen exprimieren kein endogenes Kir3.1/3.2, und die Expression von NCAM140 ist abhängig von der Zahl der Passagen, die diese Zellen durchlaufen haben. Darüber hinaus ist nicht gewährleistet, dass weitere Liganden von MUPP1, die eventuell an der Oberflächenlokalisierung von Kir3.1/3.2 mitwirken oder die Stabilisierung von NCAM mitbeeinflussen, in verschiedenen Systemen in gleichen Mengen exprimiert oder überhaupt exprimiert werden.

5.4 Zusammenfassende Überlegungen und Ausblick

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse erlauben Spekulationen über die Beteiligung des multiple-PDZ-Domänen enthaltenden Proteins MUPP1 an der NCAM-abhängigen Regulation der Oberflächenlokalisierung neuronaler Kir3.1/3.2-Kanäle.

Es ist schon seit langem bekannt, dass die Zahl NCAM180-positiver Synapsen im Hippocampus nach Induktion der Langzeitpotenzierung stark ansteigt (Schuster et al., 1998). Man geht davon aus, dass diese Erhöhung der Zahl NCAM180-positiver Synapsen mit einer Verstärkung der synaptischen Übertragung einhergeht.

Die Beobachtungen von Delling et al. führen zu der Vermutung, dass eine Zunahme der Expression von NCAM zu einer Abnahme der Oberflächenexpression inhibitorischer Kir3.1/3.2-Kaliumkanäle führt (Delling et al. 2002). Dies wiederum verringert die Amplituden langsamer, postsynaptischer Potentiale, die von einer Reihe von Neurotransmittern hervorgerufen werden. Eine Konsequenz verringerter Aktivität neuronaler Kir3.1/3.2-Kanäle ist eine erhöhte Sensibilität von Nervenzellen gegenüber synaptischen Inputs, was besonders während der Neuritogenese und Ausbildung neuer Synapsen von Bedeutung sein könnte.

Die vorliegende Studie lieferte sehr starke Hinweise darauf, dass MUPP1 einen direkten Einfluss auf die Oberflächenexpression neuronaler Kir3.1/3.2-Kanäle und damit auch auf die Zahl aktiver Kanäle in der Membran ausübt. Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, dass PDZ-Domänen-Proteine an der Regulation der Erregbarkeit von Nervenzellen beteiligt sein können. Aufgrund seiner vielen unterschiedlichen Liganden könnte MUPP1 einen

Knotenpunkt bilden, an dem zahlreiche Signale aus unterschiedlichen Kaskaden zusammenlaufen und einen direkten Einfluss auf die synaptische Plastizität haben.

Neue Untersuchungen werden zeigen, wie die Rolle von MUPP1 bei der Regulation der Oberflächenlokalisierung von Kir3.1/3.2 im Detail aussieht, und welche Rolle der Interaktion von NCAM mit MUPP1 bei diesem Prozess im Einzelnen zukommt. Da die Aktivität von Kir 3.1/3.2-Kanälen unter anderem die Erregbarkeit der Zielneuronen serotonerger Fasern im limbischen System reguliert (Delling et al., 2002), würden solche Untersuchungen auch zu einem besseren Verständnis der zellulären Prozesse bei der Entstehung von Aggression und Ängstlichkeit beitragen.

6. Zusammenfassung

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM, ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, beeinflusst die Proliferation und Migration neuraler Zellen. Auch beim Neuritenwachstum, der Axonbündelung und der Ausbildung sowie der Plastizität von synaptischen Kontakten spielt NCAM eine wichtige Rolle. Die beiden Isoformen NCAM180 und NCAM140 (benannt nach ihren molekularen Massen von 180 bzw. 140 kDa) enthalten ein putatives PDZ-Bindemotiv an ihren C-Termini.

Das multiple PDZ-Domänen-enthaltende Protein MUPP1 zeichnet sich durch dreizehn spezielle Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die PDZ-Domänen, aus. Aus *Crosslinking*- und Co-Immunpräzipitations-Experimenten mit Gehirnhomogenat und transient transfizierten Zellen war bekannt, daß MUPP1 und NCAM180 assoziiert sind. Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Interaktion zwischen NCAM und MUPP1 biochemisch zu charakterisieren. Dazu sollte insbesondere geklärt werden, ob beide Proteine direkt aneinander binden. Ferner sollten ggf. die für die Interaktion verantwortlichen Domänen bzw. Motive in beiden Proteinen identifiziert werden. Schließlich sollten mögliche Funktionen der NCAM-MUPP-Interaktion untersucht werden.

Um die putative Bindung von MUPP1 an NCAM zu untersuchen, wurde zunächst MUPP1 in einzelne Abschnitte unterteilt, die jeweils eine PDZ-Domäne umfassten. Diese wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert. Die intrazellulären Domänen von NCAM140 (NCAM140 ID) bzw. NCAM180 (NCAM180 ID) wurden als His-Fusionsproteine exprimiert. Als Test auf direkte Interaktion wurden ELISA-Experimente durchgeführt. Anhand dieser Tests konnte die direkte Interaktion bestätigt und die zehnte PDZ-Domäne von MUPP1 als NCAM-bindender Teil des Moleküls identifiziert werden.

Des Weiteren konnte per ELISA ausgeschlossen werden, dass das C-terminale putative PDZ-Bindemotiv von NCAM an der Wechselwirkung mit MUPP1 beteiligt ist.

Unter Einsatz eines NCAM140 ID-Konstrukts, dessen N-terminales Drittel deletiert wurde, konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich des Proteins essentiell für die Interaktion ist. Durch die Deletion des N-Terminus wurde die Interaktion zwischen MUPP1 und NCAM140 ID unterbunden.

Wie seit längerem bekannt ist, reguliert NCAM die Oberflächenlokalisierung der neuronalen, einwärtsgerichteten, G-Protein-aktivierten Kaliumkanäle (Kir), bestehend aus zwei Kir3.1- und zwei Kir3.2-Untereinheiten, über einen bisher unbekanntem Mechanismus. Kir-Kanäle spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des

Ruhemembranpotentials, der Regulation des Aktionspotentials, der Rezeptor-abhängigen Kontrolle der zellulären Erregbarkeit und der K^+ -Homöostase. Wie frühere Untersuchungen gezeigt haben, interagieren Kir3.1 und Kir3.2 nicht direkt mit NCAM. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels ELISA gezeigt werden, dass die Kir3.2-Untereinheit direkt an die 13. PDZ-Domäne von MUPP1 bindet.

Hieraus ergab sich die Arbeitshypothese, dass MUPP1 die Verbindung zwischen NCAM und Kir3.2 herstellen könnte. Vorstellbar wäre, dass NCAM die Oberflächenlokalisierung der neuronalen Kir-Kanäle reduziert, indem es an MUPP1 bindet und dadurch gleichzeitig die Wechselwirkung zwischen MUPP1 und Kir3.2 beeinflusst. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurden Zelloberflächenbiotinylierungsexperimente mit transient transfizierten CHO-(*chinese hamster ovary*)-Zellen unternommen. Die Zellen wurden mit NCAM140, einem Kir3.1/3.2-Fusionskonstrukt und verschiedenen GFP-markierten MUPP1-Konstrukten, die jeweils eine einzige PDZ-Domäne umfassen, transfiziert. Durch Überexpression der zehnten PDZ-Domäne von MUPP1 sollte die Interaktion von NCAM mit endogenem MUPP1 unterbunden und dadurch die Menge von neuronalen Kir-Kanälen an der Zelloberfläche erhöht werden. Im Rahmen dieser Versuche konnte allerdings für keines der MUPP1-Konstrukte ein signifikanter Einfluss auf die Menge neuronaler Kir-Kanäle an der Zelloberfläche beobachtet werden.

Im zweiten Ansatz wurden Neurone aus dem Hippocampus von Mäusen präpariert und mit dem Kir3.1/3.2-Fusionskonstrukt und den bereits erwähnten MUPP1-Konstrukten transfiziert. Die Menge von Kir3.1/3.2 an der Zelloberfläche wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Blockierung der Interaktionen der ersten und zehnten PDZ-Domäne von MUPP1 die Menge an Kir3.1/3.2 an der Zelloberfläche signifikant erhöht. Dies spricht dafür, dass MUPP1 an der Regulation der Oberflächenlokalisierung von Kir-Kanälen in Neuronen beteiligt ist.

Bei Co-Expressionsexperimenten mit HEK-(*human embryonic kidney*)-Zellen wurde beobachtet, dass MUPP1 die in den Zellen exprimierte NCAM-Menge beeinflusst. Im Lysat von HEK-Zellen, die mit cDNA für GFP-MUPP1 und NCAM co-transfiziert wurden, konnte deutlich mehr NCAM nachgewiesen werden, als im Lysat von Zellen, die mit einem EGFP- und einem NCAM-Expressionskonstrukt co-transfiziert wurden. Darüber hinaus hat auch die Co Expression der zehnten PDZ-Domäne von MUPP1, die die NCAM-MUPP-Interaktion unterbinden sollte, eine Auswirkung auf die NCAM-Menge. In diesem Fall war ein signifikant verringerter NCAM-Level festzustellen.

Möglicherweise erhöht MUPP1 die Lebensdauer von NCAM-Molekülen oder die Stabilität der NCAM-mRNA.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind ein weiteres Beispiel dafür, dass PDZ-Domänen-Proteine nicht nur Organisatoren von makromolekularen Komplexen sind, sondern auch direkt in den Ablauf physiologischer Prozesse eingreifen und auf diese Weise u.a. an der Regulation der Erregbarkeit von Nervenzellen beteiligt sein können.

7. Literaturverzeichnis

Airaksinen, M. S. und Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 383-394.

Albach, C., Damoc, E., Denzinger, T. et al (2004). Identification of N glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 378:1129–1135.

Angata, K., Long, J. M., Bukalo, O., Lee, W., Dityatev, A., Wynshaw-Boris, A., Schachner, M., Fukuda, M., Marth, J. D. (2004). Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. *J. Biol. Chem.* 279, 32603–32613.

Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., Juliano, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*, 50: 197-263.

Ashcroft, F. M., Harrison, D. E., Ashcroft, S. J. (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312, 446-448.

Ashcroft, F. M. und Rorsman, P. (1989). Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 54, 87-143.

Ashman, L. K. (1999). The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31, 1037-1051.

Balasubramanian, S., Fam, S. R., Hall, R. A. (2007). GABA_B receptor association with the PDZ scaffold Mupp1 alters receptor stability and function. *J Biol Chem.* 9; 282(6):4162-71.

Banfic, H., Downes, C. P., Rittenhouse, S. E. (1998). Biphasic activation of PKB α /Akt in platelets. Evidence for stimulation both by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate, produced via a novel pathway, and by phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 11630-11637.

Banfic, H., Tang, X., Batty, I. H., Downes, C. P., Chen, C., Rittenhouse, S. E. (1998). A novel integrin-activated pathway forms PKB/Akt-stimulatory phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate via phosphatidylinositol-3-phosphate in platelets. *J. Biol. Chem.* 273, 13-16.

Barritt, D. S., Pearn, M. T., Zisch, A. H., Lee, S. S., Javier, R. T., Pasquale, E. B. Stallcup, W. B. (2000). The multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cytoplasmic ligand for the membrane-spanning proteoglycan NG2. *J. Cell. Biochem.* 79, 213-224.

- Bécamel, C., Figge, A., Poliak, S., Dumuis, A., Peles, E., Bockaert, J., Lübbert, H., Ullmer, C. (2001).** Interaction of Serotonin 5-Hydroxytryptamine type 2C receptors with PDZ 10 of the multi-PDZ domain protein MUPP1. *J. Biol. Chem.* 276, 12974-12982.
- Becker, C. G., Artola, A., Gerardy-Schahn, R., Becker, T., Welzl, H., Schachner, M. (1996).** The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.* 45, 143-152.
- Beggs, H. E., Baragona, S. C., Hemperly, J. J., Maness, P. F. (1997).** NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC- related tyrosine kinase p59(fyn). *J. Biol. Chem.* 272, 8310-8319.
- Beggs, H. E., Soriano, P., Maness, P. F. (1994).** NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J. Cell Biol.* 127, 825-833.
- Benarroch, E. E. (2007).** Rho GTPases: role in dendrite and axonal growth, mental retardation, and axonal regeneration. *Neurology* 68, 1315–1318.
- Bock, E., Edvardsen, K., Gibson, A., Linnemann, D., Lyles, J. M., Nybroe, O. (1987).** Characterization of soluble forms of NCAM. *FEBS Lett* 225:33–36.
- Bodrikov, V., Leshchyns'ka, I., Sytnyk, V., Overvoorde, J., den Hertog, J., Schachner, M. (2005).** RPTPalpha is essential for NCAM-mediated p59fyn activation and neurite elongation. *J Cell Biol.* 3; 168(1):127-39.
- Bowery, N. G., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J. P., Marshall, F., Raiteri, M., Bonner, T. I., Enna, S. J. (2002).** International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev.* 54(2):247-64.
- Brackenbury, R., Thiery, J. P., Rutishauser, U., Edelman, G. M. (1977).** Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding. *J. Biol. Chem.* 252, 6835-6840.
- Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C., Bredt, D. S. (1996).** Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* Mar 8; 84(5):757-67.
- Brône, B. und Eggermont, J. (2005).** PDZ proteins retain and regulate membrane transporters in polarized epithelial cell membranes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288(1):C20-9.
- Brümmendorf, T. und Rathjen, F. G. (1994).** Cell adhesion molecules. 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile.* 1, 951-1058.

- Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P. J., Nanoff, C., Strosberg, A. D., Jockers, R. (1999).** Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol.* 13(12):2025-38.
- Burroughs, C. L., Watanabe, M., Morse, D. E. (1991).** Distribution of the neural cell adhesion molecule (NCAM) during heart development. *J Mol Cell Cardiol* 23:1411–1422.
- Butt, A. M. und Kalsi, A. (2006).** Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med.* 10(1):33-44.
- Büttner, B., Kannicht, C., Reutter, W., Horstkorte, R. (2003).** The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 967-971.
- Büttner, B., Kannicht, C., Reutter, W., Horstkorte, R. (2005).** Novel cytosolic binding partners of the neural cell adhesion molecule: Mapping the binding domains of PLCc, LANP, TOAD-64, Syndapin, PP1 and PP2A. *Biochemistry* 44:6938–6947.
- Carson, W. und Caligiuri, M. (1996).** Natural killer cell subsets and development. *Methods* 9:327–343.
- Chan, K. W., Sui, J. L., Vivaudou, M., and Logothetis, D. E. (1996).** Control of channel activity through a unique amino acid residue of a G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 14193-14198.
- Chao, M. V. (2003).** Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci-* 4, 299–309.
- Chen, S., Mantei, N., Dong, L., Schachner, M. (1999).** Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J. Neurobiol.* 38:428-439.
- Chevesich, J., Kreuz, A. J., Montell, C. (1997).** Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex. *Neuron* 18, 95-105.
- Chou, P. Y. und Fasman, G. D. (1974).** Prediction of protein conformation. *Biochemistry.* Jan 15; 13(2):222-45.
- Chou, K. H., Ilyas, A. A., Evans, J. E. et al (1985).** Structure of a glycolipid reacting with monoclonal IgM in neuropathy and with HNK-1. *Biochem Biophys Res Commun* 128:383–388.

- Cohen, N. A., Brenman, J. E., Snyder, S. H., Brecht, D. S. (1996).** Binding of the inward rectifier K⁺ channel Kir 2.3 to PSD-95 is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Neuron* 17, 759-767.
- Cole, G. J. und Glaser, L. (1986).** A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell- substratum adhesion. *J. Cell Biol.* 102, 403-412.
- Cole, G. J., Loewy, A., Cross, N. V., Akeson, R., Glaser, L. (1986a).** Topographic localization of the heparin-binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J. Cell Biol.* 103, 1739-1744.
- Cole, G. J., Loewy, A., Glaser, L. (1986b).** Neuronal cell-cell adhesion depends on interactions of N-CAM with heparin-like molecules. *Nature* 320, 445-447.
- Coyne, C. B., Voelker, T., Pichla, S. L., Bergelson, J. M. (2004).** The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. *J Biol Chem.* 12; 279(46):48079-84.
- Cremer, H., Chazal, G., Goridis, C., Represa, A. (1997).** NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol.Cell Neurosci.* 8, 323-335.
- Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S. (1994).** Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367, 455-459.
- Crossin, K. L. und Krushel, L. A. (2000).** Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev. Dyn.* 218, 260-279.
- Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Murray, B. A., Prediger, E. A., Brackenbury, R., Edelman, G. M. (1987).** Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236, 799-806.
- Dakoji, S., Tomita, S., Karimzadegan, S., Nicoll, R. A., Brecht, D. S. (2003).** Interaction of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins with multiple membrane associated guanylate kinases. *Neuropharmacology.* 45(6):849-56.
- Dascal N. (1997).** Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell Signal* 9: 551–573.
- Delling, M., Wischmeyer, E., Dityatev, A., Sytnyk, V., Veh, R. W., Karschin, A., Schachner, M. (2002).** The neural cell adhesion molecule regulates cell-surface delivery of G-protein-activated inwardly rectifying potassium channels via lipid rafts. *J. Neurosci.* 22, 7154-7164.

- Doe, C. Q. (2001).** Cell polarity: the PARty expands. *Nat. Cell. Biol.* 3, E7-9.
- Doherty, P., Barton, C. H., Dickson, G., Seaton, P., Rowett, L. H., Moore, S. E., Gower HJ, Barton CH, Elsom VL, Thompson J, Moore SE, Dickson G et al (1988).** Alternative splicing generates a secreted form of N-CAM in muscle and brain. *Cell* 55:955–964.
- Doherty, P., Fazeli, M. S., Walsh, F. S. (1995).** The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J. Neurobiol.* 26, 437-446.
- Doherty, P., Fruns, M., Seaton, P., Dickson, G., Barton, C. H., Sears, T. A., Walsh, F. S. (1990).** A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth. *Nature* 343, 464-466.
- Doherty, P. und Walsh, F. S. (1992).** Cell adhesion molecules, second messengers and axonal growth. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 595-601.
- Dorries, U., Taylor, J., Xiao, Z., Lochter, A., Montag, D., Schachner, M. (1996).** Distinct effects of recombinant tenascin-C domains on neuronal cell adhesion, growth cone guidance, and neuronal polarity. *J. Neurosci. Res.* 43, 420-438.
- Dowler, S., Currie, R. A., Campbell, D. G., Deak, M., Kular, G., Downes, C. P., Alessi, D. R. (2000).** Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem. J.* 351, 19-31.
- Doyle, E., Nolan, P. M., Bell, R., Regan, C. M. (1992).** Hippocampal NCAM180 transiently increases sialylation during the acquisition and consolidation of a passive avoidance response in the adult rat. *J. Neurosci. Res.* 31, 513-523.
- Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., MacKinnon, R. (1996).** Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell.* 28; 85(7):1067-76.
- Eckhardt, M., Bukalo, O., Chazal, G., Wang, L., Goridis, C., Schachner, M., Gerardy-Schahn, R., Cremer, H., Dityatev, A. (2000).** Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 20, 5234-5244.
- Engel, J. (1991).** Domains in proteins and proteoglycans of the extracellular matrix with functions in assembly and cellular activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 13, 147-151.
- Erbe, D. V., Watson, S. R., Presta, L. G., Wolitzky, B. A., Foxall, C., Brandley, B. K. Lasky, L. A. (1993).** P- and E-selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. *J Cell Biol,* 120: 1227-35.

- Ernkvist, M., Luna Persson, N., Audebert, S., Lecine, P., Sinha, I., Liu, M., Schlueter, M., Horowitz, A., Aase, K., Weide, T., Borg, J. P., Majumdar, A., Holmgren, L. (2008).** The Amot/Patj/Syx signalling complex spatially controls RhoA GTPase activity in migrating endothelial cells. *Blood*. Sep 29.
- Farag, S. S. und Caligiuri, M. A. (2006).** Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 20:123–137.
- Fidzianska, A. und Kaminska, A. (1995).** Neural cell adhesion molecule (N-CAM) as a marker of muscle tissue alternations: review of the literature and own observations. *Folia Neuropathol* 33:125–128.
- Fields, R. D. und Itoh, K. (1996).** Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 19, 473-480.
- Filiz, S., Dalcik, H., Yardimoglu, M., Gonca, S., Ceylan, S. (2002).** Localization of neural cell adhesion molecule (N-CAM) immunoreactivity in adult rat tissues. *Biotech Histochem* 77:127–135.
- Firestein, B. L., Brenman, J. E., Aoki, C., Sanchez-Perez, A. M., El-Husseini, A. E., Brecht, D. S. (1999).** Cypin: a cytosolic regulator of PSD-95 postsynaptic targeting. *Neuron* 24, 659-672.
- Fone, K. C. F., Austin, R. H., Topham, I. A., Kennett, G. A., Punhani, T. (1998).** Effect of chronic m-CPP on locomotion, hypophagia, plasma corticosterone and 5-HT_{2C} receptor levels in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 123, 1707-1715.
- Foxall, C., Watson, S. R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L. A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D. Brandley, B. K. (1992).** The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis_x oligosaccharide. *J Cell Biol*, 117: 895-902.
- Furuse, M., Sasaki, H., Tsukita, S. (1999).** Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol.* 147, 891-903.
- Galvez, T., Parmentier, M. L., Joly, C., Malitschek, B., Kaupmann, K., Kuhn, R., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B., Pin, J. P. (1999).** Mutagenesis and modeling of the GABAB receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. *J Biol Chem.* 7; 274(19):13362-9.
- Gardoni, F., Mauceri, D., Fiorentini, C., Bellone, C., Missale, C., Cattabeni, F., Di Luca, M. (2003).** CaMKII-dependent phosphorylation regulates SAP97/NR2A interaction. *J Biol Chem.* 7; 278(45):44745-52.

- Gower, H. J., und Walsh, F. S. (1989).** Neuronal process outgrowth of human sensory neurons on monolayers of cells transfected with cDNAs for five human N-CAM isoforms. *J. Cell Biol.* 109, 789-798.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977).** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* Jul; 36(1):59-74.
- Griffon, N., Jeanneteau, F., Prieur, F., Diaz, J., Sokoloff, P. (2003).** CLIC6, a member of the intracellular chloride channel family, interacts with dopamine D₂-like receptors. *Mol. Brain Res.* 117, 47-57.
- Grumet, M., Flaccus, A., Margolis, R. U. (1993).** Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: interactions with neurons and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 120:815–824.
- Guillaume, J. L., Daulat, A. M., Maurice, P., Levoye, A., Migaud, M., Brydon, L., Malpaux, B., Borg-Capra, C., Jockers, R. (2008).** The PDZ protein mupp1 promotes Gi coupling and signaling of the Mtl melatonin receptor. *J Biol Chem.* 13; 283(24):16762-71.
- Hall, R. A., Premont, R. T., Chow, C. W., Blitzer, J. T., Pitcher, J. A., Claing, A., Stoffel, R. H., Barak, L. S., Shenolikar, S., Weinman, E. J., Grinstein, S., Lefkowitz, R. J. (1998).** The β_2 -adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* 392, 626-630.
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Tsukita, S. (2001).** Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with Claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 277, 455-461.
- Hansen, O. C., Nybroe, O., Bock, E. (1985).** Cell-free synthesis of the D2-cell adhesion molecule: evidence for three primary translation products. *J Neurochem* 44: 712-717.
- Harris, B. Z. und Lim, W. A. (2001).** Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci.* Sep; 114(Pt 18):3219-31.
- He, H. T., Finne, J., Goridis, C. (1987).** Biosynthesis, membrane association, and release of N-CAM-120, a phosphatidylinositol linked form of the neural cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 105:2489–2500.
- Heiland, P. C., Griffith, L. S., Lange, R., Schachner, M., Hertlein, B., Traub, O. et al (1998).** Tyrosine and serine phosphorylation of the neural cell adhesion molecule L1 is implicated in its oligomannosidic glycan dependent association with NCAM and neurite outgrowth. *Eur J Cell Biol* 75:97–106.

- Hille, B. (1992).** Ionic channels of excitable membranes, second edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Hillier, B. J., Christopherson, K. S., Prehoda, K. E., Bretz, D. S., Lim, W. A. (1999).** Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* Apr 30; 284(5415):812-5.
- Hoffman, S., Sorkin, B. C., White, P. C., Brackenbury, R., Mailhammer, R., Rutishauser, U., Cunningham, B. A., Edelman, G. M. (1982).** Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J. Biol. Chem.* 257, 7720-7729.
- Hsueh, Y. P., Kim, E., Sheng, M. (1997).** Disulfide-linked head-to-head multimerization in the mechanism of ion channel clustering by PSD-95. *Neuron* 18(5):803-14.
- Hubschmann, M. V., Skladchikova, G., Bock, E., Berezin, V. (2005).** Neural cell adhesion molecule function is regulated by metalloproteinase-mediated ectodomain release. *J Neurosci Res* 80:826–837.
- Inanobe, A., Yoshimoto, Y., Horio, Y., Morishige, K. I., Hibino, H., Matsumoto, S., Tokunaga, Y., Maeda, T., Hata, Y., Takai, Y., Kurachi, Y. (1999).** Characterization of G-protein-gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J. Neurosci.* 19, 1006-1017.
- Isomoto, S., Kondo, C., Kurachi, Y. (1997).** Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn. J. Physiol* 47, 11-39.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., Tsukita, S. (2001).** Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J. Cell Biol.* 154, 491-497.
- Iwase, T., Jung, C. G., Bae, H., Zhang, M., Soliven, B. (2005).** Glial cell line-derived neurotrophic factor-induced signaling in Schwann cells. *J Neurochem.* 94(6):1488-99.
- Jeansonne, B., Lu, Q., Goodenough, D. A., Chen, Y. H. (2003).** Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 49, 13-21.
- Jelacic, T. M., Kennedy, M. E., Wickman, K., Clapham, D. E. (2000).** Functional and biochemical evidence for G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels composed of GIRK2 and GIRK3. *J. Biol. Chem.* 275, 36211-36216.
- Jemth, P. und Gianni, S. (2007).** PDZ domains: folding and binding. *Biochemistry.* 2007 Jul 31;46(30):8701-8.

- Johnson, C. P., Fujimoto, I., Rutishauser, U., Leckband, D. E. (2005).** Direct evidence that NCAM polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J. Biol. Chem.* 280, 137–145.
- Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., Craig, D. A., Durkin, M. M., Dai, M., Yao, W. J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L. Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J. A., Morse, K., Laz, T., Smith, K. E., Nagarathnam, D., Noble, S. A., Branchek, T. A., Gerald, C. (1998).** GABA_(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_(B)R1 and GABA_(B)R2. *Nature.* 396(6712):674-9.
- Jorgensen, O. S. (1995).** Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodeling. *Neurochem. Res.* 20, 533-547.
- Juliano, R. L. (2002).** Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42: 283-323.
- Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., Schachner, M. (1990a).** Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J. Cell Biol.* 110, 209-218.
- Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., Schachner, M. (1990b).** The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol.* 110, 193-208.
- Kalus, I., Bormann, U., M'Zoughi, M., Schachner, M., Kleene, R. (2006).** Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth. *J Neurochem* 98:78–88.
- Karschin, C. und Karschin, A. (1997).** Ontogeny of Gene Expression of Kir Channel Subunits in the Rat. *Mol. Cell Neurosci.* 10, 131-148.
- Katz, B. (1949).** Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Archs. Sci. physiol.*, 3, 285–299.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A., Bettler, B. (1998).** GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature.* 17; 396(6712):683-7.
- Keilhauer, G., Faissner, A., Schachner, M. (1985).** Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and NCAM antibodies. *Nature* 316, 728-730.

- Kennedy, M. E., Nemec, J., Corey, S., Wickman, K., Clapham, D. E. (1999).** GIRK4 confers appropriate processing and cell surface localization to G- protein-gated potassium channels. *J. Biol. Chem.* 274, 2571-2582.
- Kim, E., Sheng, M. (2004).** PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci.* 5(10):771-81.
- Kimber, W. A., Trinkle-Mulcahy, L., Cheung, P. C. F., Deak, M., Marsden, L. J., Kieloch, A., Watt, S., Javier, R. T., Gray, A., Downes, C. P., Lucocq, J. M., Alessi, D. R. (2002).** Evidence that the tandem-pleckstrin-homology-domain-containing protein TAPP1 interacts with Ptd(3,4)P₂ and the multi-PDZ-domain-containing protein MUPP1 *in vivo*. *Biochem. J.*, 361, 525-536.
- Klebe, R. J., Ruddle, F. H., (1969).** Neuroblastoma: Cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J. Cell Biol.* 43: 69A.
- Kofuji, P., Davidson, N., Lester, H. A. (1995).** Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels are activated by G beta gamma subunits and function as heteromultimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 6542-6546.
- Kolkova, K., Novitskaya, V., Pedersen, N., Berezin, V., Bock, E. (2000a).** Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* 20, 2238-2246.
- Kolkova, K., Pedersen, N., Berezin, V., Bock, E. (2000b).** Identification of an amino acid sequence motif in the cytoplasmic domain of the NCAM-140 kDa isoform essential for its neuritogenic activity. *J. Neurochem.* 75, 1274-1282.
- Kolkova, K. (2008).** Biosynthesis of NCAM. *Neurochem Res.* Jul 4.
- Kornblihtt, A. R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K., Baralle, F. E. (1985).** Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J.* 4, 1755-1759.
- Kozlov, G., Gehring, K., Ekiel, I. (2000).** Solution structure of the PDZ2 domain from human phosphatase hPTP1E and its interactions with C-terminal peptides from the Fas receptor. *Biochemistry.* 14;39(10):2572-80.
- Krapivinsky, G., Gordon, E. A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L., Clapham, D. E. (1995).** The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+) -channel proteins. *Nature* 374, 135-141.

- Krapivinsky, G., Medina, I., Krapivinsky, L., Gapon, S., Clapham, D. E. (2004).** SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron*. 19; 43(4):563-74.
- Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H. et al (1984).** Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature* 311:153–155.
- Krushel, L. A., Cunningham, B. A., Edelman, G. M., Crossin, K. L. (1999).** NF-kappaB activity is induced by neural cell adhesion molecule binding to neurons and astrocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 2432-2439.
- Kumar, R. und Shieh, B.-H. (2001).** The second PDZ domain of INAD is a type I domain involved in binding to eye protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 276, 24971-24977.
- Lanaspa, M. A., Andres-Hernando, A., Rivard, C. J., Dai, Y., Berl, T. (2008).** Hypertonic stress increases claudin-4 expression and tight junction integrity in association with MUPP1 in IMCD3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 7.
- Lasky, L. A. (1995).** Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem*, 64, 113-39.
- Ledda, F., Paratcha, G., Sandoval-Guzmán, T., Ibáñez, C. F. (2007).** GDNF and GFRalpha1 promote formation of neuronal synapses by ligand-induced cell adhesion. *Nat Neurosci*. 10(3):293-300.
- Lee, S. S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L., Javier, R. T. (2000).** Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both Adenovirus E4-ORF1 and high-risk Papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.*, 74, 9680-9693.
- Lemmon, M. A. und Ferguson, K. M. (2000).** Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.* 350, 1-18.
- Leshchyn'ska, I., Sytnyk, V., Morrow, J. S., Schachner, M. (2003).** Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKCbeta2 via beta1 spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Cell Biol* 161:625–639.
- Leslie, N. R., Biondi, R. M., Alessi, D. R. (2001).** Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases. *Chem. Rev.* 101, 2365-2380.
- Linnemann, D., Gaardsvoll, H., Olsen, M., Bock, E. (1993).** Expression of NCAM mRNA and polypeptides in aging rat brain. *Int J Dev Neurosci* 11:71-81.

- Little, E. B., Crossin, K. L., Krushel, L. A., Edelman, G. M., Cunningham, B. A. (2001).** A short segment within the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is essential for N-CAM-induced NF-kappa B activity in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98, 2238-2243.
- Loers, G., Chen, S., Grumet, M., Schachner, M. (2005).** Signal transduction pathways implicated in neural recognition molecule L1 triggered neuroprotection and neuritogenesis. *J. Neurochem.* 92:1463-1476.
- Lopatin, A. N., Makhina, E. N., Nichols, C. G. (1994).** Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372: 366–369.
- Lu, Z. (2004).** Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu Rev Physiol* 66: 103–129.
- Lucki, U., Ward, H. R., Frazer, A. (1989).** Effect of 1-(m-chlorophenyl)piperazine and 1-(m-trifluoromethylphenyl)piperazine on locomotor activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249, 155-164.
- Lunn, M. L., Nassirpour, R., Arrabit, C., Tan, J., McLeod, I., Arias, C. M., Sawchenko, P. E., Yates, J. R. 3rd, Slesinger, P. A. (2007).** A unique sorting nexin regulates trafficking of potassium channels via a PDZ domain interaction. *Nat Neurosci.* 10(10):1249-59.
- Lüscher, C., Xia, H., Beattie, E. C., Carroll, R. C., von Zastrow, M., Malenka, R. C., Nicoll, R. A. (1999).** Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* 24, 649–658.
- Lüscher, C., Jan, L. Y., Stoffel, M., Malenka, R. C., Nicoll, R.A. (1997).** G-protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic, but not presynaptic, transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19, 687-695.
- Lyles, J. M., Linnemann, D., Bock, E. (1984).** Biosynthesis of the D2-cell adhesion molecule: post-translational modifications, intracellular transport, and developmental changes. *J Cell Biol* 99: 2082-2091.
- Ma, D., Zerangue, N., Raab-Graham, K., Fried, S. R., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (2002).** Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron* 33, 715–729.
- Mancini, A., Koch, A., Stefan, M., Niemann, H., Tamura, T. (2000).** The direct association of the multiple PDZ domain containing proteins (MUPP-1) with the human c-Kit C-terminus is regulated by tyrosine kinase activity. *FEBS letters*, 482, 54-58.

- Mao, J., Wang, X., Chen, F., Wang, R., Rojas, A., Shi, Y., Piao, H., Jiang, C. (2004).** Molecular basis for the inhibition of G protein-coupled inward rectifier K⁺ channels by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1087–1092.
- Margeta-Mitrović, M., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (2000).** A trafficking checkpoint controls GABA_B receptor heterodimerization. *Neuron*. 27(1):97-106.
- Mark, M. D. und Herlitze, S. (2000).** G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 267, 5830-5836.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., Dejana, E. (1998).** Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* 142, 117-127.
- Matsuda, H., Saigusa, A., Irisawa, H. (1987).** Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature* 325: 156–159.
- Medina, E., Lemmers, C., Lane-Guermonprez, L., Le Bivic, A. (2002).** Role of the crumbs complex in the regulation of junction formation in *Drosophila* and mammalian epithelial cells. *Biol. Cell.* 94, 305-313.
- Milev, P., Maurel, P., Haring, M., Margolis, R. K., Margolis, R. U. (1996).** TAG-1/axonin-1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase- ζ/β , and N-CAM. *J Biol Chem* 271:15716–15723.
- Millan, M. J., Girardon, S., Bervoets, K. (1997).** 8-OH-DPAT-induced spontaneous tail-flicks in the rat are facilitated by the selective serotonin (5-HT)_{2C} agonist, RO 60-0175: blockade of its actions by the novel 5-HT_{2C} receptor antagonist SB 206,553. *Neuropharmacology* 36, 743-745.
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G., Kiss, J. Z. (1996).** PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 17, 413-422.
- Murphy, D. L., Lesch, K. P., Aulakh, C. S., Pigott, T. A. (1991).** Serotonin-selective arylpiperazines with neuroendocrine, behavioral, temperature, and cardiovascular effects in humans. *Pharmacol. Rev.* 43, 527-552.
- Myszka, D. G. (1998).** Survey of the 1998 optical biosensor literature. *J Mol Recognit.* Nov-Dec; 12(6):390-408.
- Myszka, D. G. (1999).** Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit.* Sep-Oct; 12(5):279-84.

- Neely, J. D., Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O. P., Froehner, S. C., Agre, P., Adams, M. E. (2001).** Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 20; 98(24):14108-13.
- Nichols, C. G. und Lopatin, A. N. (1997).** Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol* 59, 171-191.
- Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K., Schachner, M. (2002).** Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J Cell Biol*. Apr 29; 157(3):521-32.
- Nourry, C., Grant, S. G. N., Borg, J. P. (2003).** PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE* 179, RE7.
- Ohno, S. (2001).** Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13, 641-648.
- Olsen, O., Liu, H., Wade, J. B., Merot, J., Welling, P. A. (2001).** Basolateral membrane expression of the Kir 2.3 channel is coordinated by PDZ interaction with Lin-7/CASK complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, 183-195.
- Ono, K., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., Rutishauser, U. (1994).** N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13, 595-609.
- Opal, P., Garcia, J. J., Propst, F., Matilla, A., Orr, H. T., Zoghbi, H. Y. (2003).** Mapmodulin/leucine-rich acidic nuclear protein binds the light chain of microtubule-associated protein 1B and modulates neuritogenesis. *J Biol Chem* 278:34691–34699.
- Paratcha, G., Ledda, F., Ibanez, C. F. (2003).** The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 113, 867-879.
- Paratcha, G., Ibáñez, C. F., Ledda, F. (2006).** GDNF is a chemoattractant factor for neuronal precursor cells in the rostral migratory stream. *Mol Cell Neurosci.* 31(3):505-14.
- Parker, L. L.; Backstrom, J. R, Sanders-Bush, E., Shieh, B.-H. (2003).** Agonist-induced phosphorylation of the Serotonin 5-HT_{2C} receptor regulates its interaction with multiple PDZ Protein 1. *J. Biol. Chem.* 278, 21576-21583.
- Persohn, E., Pollerberg, G. E., Schachner, M. (1989).** Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes. *J. Comp. Neurol.* 288, 92-100.

- Pesesse, X., Dewaste, V., De Smedt, F., Laffargue, M., Giuriato, S., Moreau, C., Payraastre, B., Erneux, C. (2001).** The src homology 2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 is recruited to the epidermal growth factor (EGF) receptor and dephosphorylates phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in EGF-stimulated cos-7 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 28348-28355.
- Penzes, P., Johnson, R. C., Sattler, R., Zhang, X., Huganir, R. L., Kambampati, V., Mains, R. E., Eipper, B. A. (2001).** The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron.* 29(1):229-42.
- Poliak, S., Matlis, S., Ullmer, C., Scherer, S. S., Peles, E. (2002).** Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *J. Cell Biol.*, 159, Number 2, 361-371.
- Pollerberg, E. G., Sadoul, R., Goridis, C., Schachner, M. (1985).** Selective expression of the 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM during development. *J. Cell Biol.* 101, 1921-1929.
- Pollerberg, E. G., Burridge, K., Krebs, S., Goodman, S., Schachner, M. (1987).** The 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tiss Res* 250:227–236.
- Probstmeier, R., Kuhn, K., Schachner, M. (1989).** Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix. *J. Neurochem.* 53, 1794-1801.
- Puck, T. T. et al. (1958).** Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* 108: 945-956.
- Regan, C. M. und Fox, G. B. (1995).** Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging. *Neurochem. Res.* 20, 593-598.
- Robbins, M. J., Calver, A. R., Filippov, A. K., Hirst, W. D., Russell, R. B., Wood, M. D., Nasir, S., Couve, A., Brown, D. A., Moss, S. J., Pangalos, M. N. (2001).** GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. *J Neurosci.* 15; 21(20):8043-52.
- Rosen, C. L., Lisanti, M. P., Salzer, J. L. (1992).** Expression of unique sets of GPI-linked proteins by different primary neurons in vitro. *J. Cell Biol.* 117, 617-627.
- Rosen, S. D. und Bertozi, C. R. (1994).** The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol*, 6, 663-73.

- Rothbard, J. B., Brackenbury, R., Cunningham, B. A., Edelman, G. M. (1982).** Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J. Biol. Chem.* 257, 11064-11069.
- Ruoslahti, E. und Pierschbacher, M. D. (1987).** New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238, 491-497.
- Ruoslahti, E. und Öbrink, B. (1996).** Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res*, 227, 1-11.
- Ruppersberg, J. P. und Fakler, B. (1996).** Complexity of the regulation of Kir2.1 K⁺ channels. *Neuropharmacology* 35, 887-893.
- Ruppersberg, J. P. (2000).** Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. *Pflugers Arch.* 441, 1-11.
- Rutishauser, U. (1990).** Neural cell adhesion molecule as a regulator of cell-cell interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 265, 179-183.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001).** *Molecular Cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schachner, M. (1991).** Cell surface recognition and neuron-glia interactions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 633, 105-112.
- Schachner, M. und Martini, R. (1995).** Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci.* 18, 183-191.
- Schlosshauer, B. (1989).** Purification of neuronal cell surface proteins and generation of epitope-specific monoclonal antibodies against cell adhesion molecules. *J. Neurochem.* 52:82-92.
- Schmid, R. S., Graff, R. D., Schaller, M. D., Chen, S., Schachner, M., Hemperly, J. J., Maness, P. F. (1999).** NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J. Neurobiol.* 38, 542-558.
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M. A., Ball, H. L., Bradon, N., Bosque, P. J. et al (2001).** Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* 314:1209-1225.
- Schuster, T., Krug, M., Hassan, H., Schachner, M. (1998).** Increase in proportion of hippocampal spine synapses expressing neural cell adhesion molecule NCAM180 following long-term potentiation. *J. Neurobiol.* 37, 359-372.
- Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D. H., Hirokawa, N. (2000).** Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science.* Jun 9; 288(5472):1796-802.

- Setou, M., Seog, D. H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M., Hirokawa, N. (2002).** Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature*. 2;417(6884):83-7.
- Shawn Xu, X.-Z., Choudhury, A., Li, X., Montell, C. (1998).** Coordination of an array of signaling proteins through homo- and heteromeric interactions between PDZ domains and target proteins. *J. Cell Biol.* 142, 545-555.
- Sheng, M. und Sala, C. (2001).** PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1-29.
- Shi, S. H., Hayashi, Y., Petralia, R. S., Zaman, S. H., Wenthold, R. J., Svoboda, K., Malinow, R. (1999).** Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284, 1811–1816.
- Signorini, S., Liao, Y. J., Duncan, S. A., Jan, L. Y., Stoffel, M. (1997).** Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 923-927.
- Sitek, B., Poschmann, G., Schmidtke, K., Ullmer, C., Maskri, L., Andriske, M., Stichel, C. C., Zhu, X.-R., Lübbert, H. (2003).** Expression of MUPP1 protein in mouse brain. *Brain Research* 970, 178-187.
- Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M., Cantley, L. C. (1997).** Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*. 3;275(5296):73-7.
- Sontheimer, H., Kettenmann, H., Schachner, M., Trotter, J (1990).** The Neural Cell Adhesion Molecule (N-CAM) Modulates K⁺ Channels in Cultured Glial Precursor Cells. *Eur. J. Neurosci.* 3, 230-236.
- Sporns, O., Edelman, G. M., Crossin, K. L. (1995).** The neural cell adhesion molecule (NCAM) inhibits proliferation in primary cultures of rat astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 542-546.
- Springer, T. A. (1994).** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76, 301-14.
- Stallcup, W. B. (2002).** The NG2 proteoglycan: Past insights and future prospects. *J. Neurocytol.* 31, 423-35.
- Stevens, E. B., Woodward, R., Ho, I. H., Murrell-Lagnado, R. (1997).** Identification of regions that regulate the expression and activity of G protein-gated inward rectifier K⁺ channels in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol* 503 (Pt 3), 547-562.

- Stiffler, M. A., Chen, J. R., Grantcharova, V. P., Lei, Y., Fuchs, D., Allen, J. E., Zaslavskaja, L. A., MacBeath, G. (2007).** PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science*. 20;317(5836):364-9.
- Stork, O., Welzl, H., Cremer, H., Schachner, M. (1997).** Increased intermale aggression and neuroendocrine response in mice deficient for the neural cell adhesion molecule (NCAM). *Eur. J. Neurosci.* 9, 1117-1125.
- Stork, O., Welzl, H., Wotjak, C. T., Hoyer, D., Delling, M., Cremer, H., Schachner, M. (1999).** Anxiety and increased 5-HT_{1A} receptor response in NCAM null mutant mice. *J. Neurobiol.* 40, 343-355.
- Storms, S. D., Kim, A. C., Tran, B. H., Cole, G. J., Murray, B. A. (1996a).** NCAM-mediated adhesion of transfected cells to agrin. *Cell Adhes Commun* 3:497–509.
- Storms, S. D., Anvekar, V. M., Adams, L. D., Murray, B. A. (1996b).** Heterophilic NCAM-mediated cell adhesion to proteoglycans from chick embryonic brain membranes. *Exp Cell Res* 223:385–394.
- Storms, S. D. und Rutishauser, U. (1998).** A role for polysialic acid in neural cell adhesion molecule heterophilic binding to proteoglycans. *J Biol Chem* 273:27124–27129.
- Sugihara-Mizuno, Y., Adachi, M., Kobayashi, Y., Hamazaki, Y., Nishimura, M., Imai, T., Furuse, M., Tsukita, S. (2007).** Molecular characterization of angiomin/JEAP family proteins: interaction with MUPP1/Patj and their endogenous properties. *Genes Cells.* 12(4):473-86.
- Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., Nikonenko, A. G., Schachner, M. (2006).** NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex. *J Cell Biol* 174:1071–1085.
- Takeichi, M. (1995).** Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 7: 6 19-27.
- Tecott, L. H., Sun, L. M., Akana, S. F., Strack, A. M., Lowenstein, D. H., Dallmann, M. F., Julius, D. (1995).** Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2C} serotonin receptors. *Nature* 374, 542-546.
- Thomas, U., Kim, E., Kuhlendahl, S., Koh, Y. H., Gundelfinger, E. D., Sheng, M., Garner, C. C., Budnik, V. (1997).** Synaptic clustering of the cell adhesion molecule fasciclin II by discs-large and its role in the regulation of presynaptic structure. *Neuron* 19, 787-799.

- Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D., Thompson, C., Goridis, C., Rutishauser, U., Magnuson, T. (1993).** Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 11, 1163-1174.
- Tomko, R. P., Xu, R., Philipson, L. (1997).** HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1; 94(7):3352-6.
- Troyanovsky, B., Levchenko, T. M., Ånsson, G., Matvijenko, O. Holmgren, L. (2001).** Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J. Cell Biol.* 152, 1247–1254.
- Tsukita, S. und Furuse, M. (2000).** Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J. Cell Biol.* 149, 13-16.
- Ullmer, C., Schmuck, K., Figge, A., Lübbert, H. (1998).** Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Letters* 424, 63-68.
- Vandenberg, C. A. (1987).** Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2560–2564.
- Van der Kaay, J., Beck, M., Gray, A., Downes, C. P. (1999).** Distinct phosphatidylinositol-3-kinase lipid products accumulate upon oxidative and osmotic stress and lead to different cellular responses. *J. Biol. Chem.* 274, 35963-35968.
- Vanhaesebroeck, B. und Alessi, D.R. (2000).** The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346, 561-576.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J., Waterfield, M. D. (2001).** Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 535-602.
- van Huizen, R., Miller, K., Chen, D.-M., Li, Y., Lai, Z.-C., Raab, R. W., Stark, W. S., Shortridge, R. D., Li, M. (1998).** Two distantly positioned PDZ domains mediate multivalent INAD-phospholipase C interactions essential for G protein-coupled signaling. *EMBO J.* 17, 2285-2297.
- Walsh, F. S., Parekh, R. B., Moore, S. E. et al (1989).** Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Development* 105:803–811.
- Wang, W., Hebert, S. C., Giebisch, G. (1997).** Renal K⁺ channels: structure and function. *Annu. Rev. Physiol* 59, 413-436.
- Weinhold, B., Seidenfaden, R., Röckle, I., Mühlhoff, M., Schertzinger, F., Conzelmann, S., Marth, J. D., Gerardy-Schahn, R., Hildebrandt, H. (2005).** Genetic

ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 280, 42971–42977.

White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M., Marshall, F. H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature.* 1998; 396(6712):679-82.

Wickman, K. und Clapham, D. E. (1995). Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev.* 75, 865-885.

Williams, E. J., Furness, J., Walsh, F. S., Doherty, P. (1994a). Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 13, 583-594.

Williams, E. J., Mittal, B., Walsh, F. S., Doherty, P. (1995). FGF inhibits neurite outgrowth over monolayers of astrocytes and fibroblasts expressing transfected cell adhesion molecules. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 11), 3523-3530.

Williams, E. J., Walsh, F. S., Doherty, P. (1994b). The production of arachidonic acid can account for calcium channel activation in the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by NCAM, N-cadherin, and L1. *J. Neurochem.* 62, 1231-1234.

Wischmeyer, E., Doring, F., Spauschus, A., Thomzig, A., Veh, R., Karschin, A. (1997). Subunit interactions in the assembly of neuronal Kir3.0 inwardly rectifying K⁺ channels. *Mol. Cell. Neurosci.* 9, 194-206.

Wodarz, A. (2002). Establishing cell polarity in development. *Nat. Cell. Biol.* 4, E39-44.

Xiao, Z. C., Taylor, J., Montag, D., Rougon, G., Schachner, M. (1996). Distinct effects of recombinant tenascin-R domains in neuronal cell functions and identification of the domain interacting with the neuronal recognition molecule F3/11. *Eur. J. Neurosci.* 8, 766-782.

Yamada, M., Inanobe, A., Kurachi, Y. (1998). G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol. Rev.* 50, 723-760.

Yoo, D., Flagg, T. P., Olsen, O., Raghuram, V., Foskett, J. K., Welling, P. A. (2004). Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem.* 20; 279(8):6863-73.

Zimmermann, P., Meerschaert, K., Reekmans, G., Leenaerts, I., Small, J. V., Vandekerckhove, J., David, G., Gettemans, J. (2002). PIP₂-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol. Cell* 9, 1215-1225.

8. Anhang

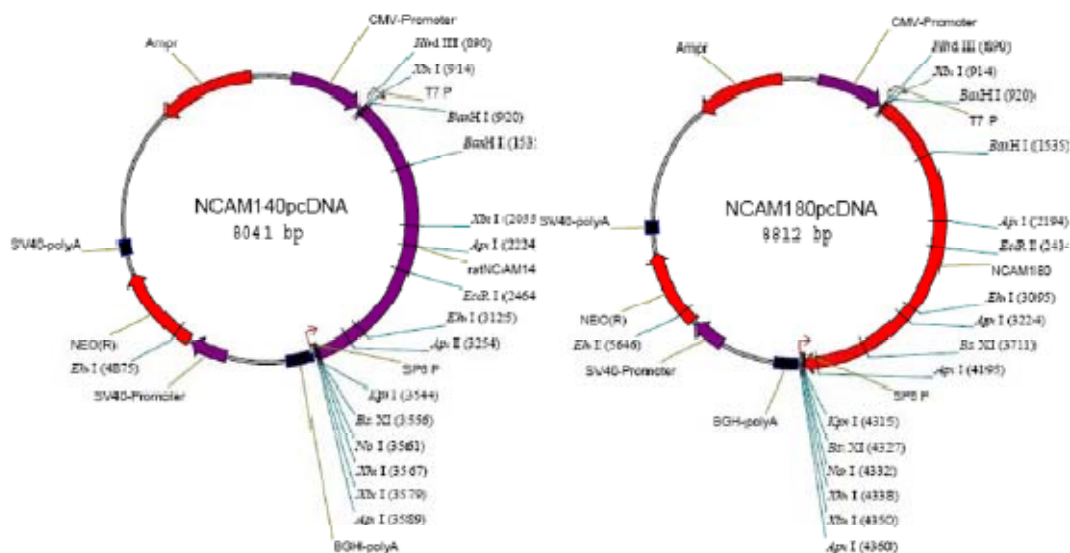
8.1 Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Amplifikation von
MUPP-1-up	catcggatccgaattcctacctgtgacgaactt	MUPP-1
MUPP-1-dn	gatggatcctcgagctatggtctccacatgct	MUPP-1
MUPP-2-up	agtaggatccgaattcttgtgattgccaggggat	MUPP-2
MUPP1-2-dn	aaaggatcctcgagctacacatcaaactgtctcac	MUPP-2
MUPP-3-dn	catactcgagetgacaacagtggaaacc	MUPP-3
MUPP-4-up	acgcgaattcggtttccactgttgcag	MUPP-4
MUPP3-4 up	caggggatccgaattctgatgattgccagagg	MUPP3-4 und -3
MUPP3-4-dn	tttggatcctcgagctacgccagcatgggatcctc	MUPP3-4 und -4
MUPP5-6-up	caagggatccgaattctggcgatgtctgatgtg	MUPP5-6 und -5
MUPP5-6-dn	tttggatcctcgagctagtctctgccagtgtatga	MUPP5-6 und -6
MUPP5-dn	catggatcctcgagttatcagagccaagtgcgc	MUPP-5
MUPP6-up	cagtggatccgaattccaagtagcctaagcacct	MUPP-6
MUPP7-9-up	aagggatccgaattccatactggcagagac	MUPP7-9
MUPP7-9-dn	attggatcctcgagctagactgctggtgtggagga	MUPP7-9
MUPP10-13-up	aggggatccgaattctcagccttctgaagacg	MUPP10-13
MUPP10-13-dn	attggatcctcgagtcaagagagaaccatgagggt	MUPP10-13
MUPP-1-up-Kozak	atcgaattcgagccaccatgctacctgtgacgaactt	MUPP-1 in EGFP-N1
MUPP-1-dn-BamHI	gatggatcctatggtctccacatgct	MUPP-1 in EGFP-N1
MUPP-3-up-Kozak	actgaattcgtgccaccatgatgaatgccagagg	MUPP-3 in EGFP-N1
MUPP-3-dn-BamHI	ataggatcctgacaacagtggaaacc	MUPP-3 in EGFP-N1
MUPP-4-up-Kozak	gtcgaattcatgccaccatgcggttccactgttgcac	MUPP-4 in EGFP-N1
MUPP-10-up-Kozak	attgaattcatgccaccatgccatcatcccaggctg	MUPP-10 in EGFP-N1
MUPP-10-dn-BamHI	ataggatcctcacagacatcctctct	MUPP-10 in EGFP-N1
MUPP-13-up-Kozak	agagaattctagccaccatgccggatgatttaggcct	MUPP-13 in EGFP-N1
MUPP-13-dn-BamHI-no stop	tacggatccgaagagagaaccatgagggt	MUPP-13 in EGFP-N1
NCAM140 ICD Δ 1-44	agcgggatccgagctaaagaaccattgta	NCAM140 ICD Δ N-Terminus
rrsNCAM IC BamHI-dn	tttggatcctcatgcttctctcattctc	NCAM140 ICD Δ N-Terminus

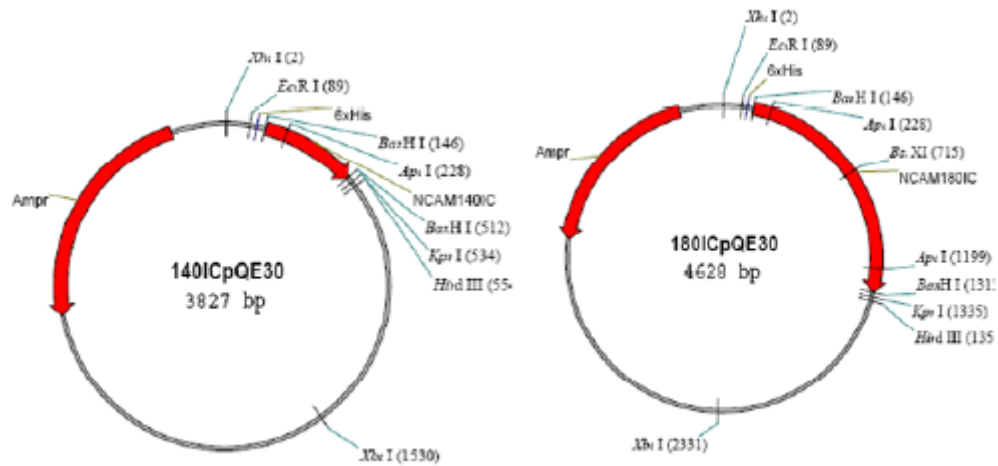
NCAM-inner	catgtgcatcgctgttaacctgtgcggcgaagcgggg cccggaaagcacacagagcccaacgagac	NCAM140 ICD Δ middle
NCAM-outer	atggacatcacctgctacttctgaacaagtgtggcct gctcatgtgcatcgctgttaacctgt	NCAM140 ICD Δ middle
NCAM ICD-up-KpnI	gataggtaccgacatcacctgctacttctctg	NCAM140 ICD Δ middle
NCAM IC HindIII-dn	tcgtaagctttcatgctttgctctcattctc	NCAM140 ICD Δ middle
NCAM ICD-up	gataggatccgacatcacctgctacttctctg	NCAM140 ICD Δ C- Terminus
NCAM140 ICD Δ 76- 120	gataggatcctcatgtggctcgttgggctc	NCAM140 ICD Δ C- Terminus
pGEX seq-up	gggctggcaagccacgtttggtg	Sequenzierung
pQE-30 seq-up	cggataacaatttcacacag	Sequenzierung
EGFP-C1 fwd	gaagcgcgatcacatggtc	Sequenzierung
EGFP-C1 rev	aaccattataagctgcaataaac	Sequenzierung
EGFP-N1 fwd	gaggtctatataagcagagc	Sequenzierung
EGFP-N1 rev	cgtcgccgtccagctcgaccag	Sequenzierung

8.2 Plasmide

8.2.1 NCAM140 und NCAM180 im eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3



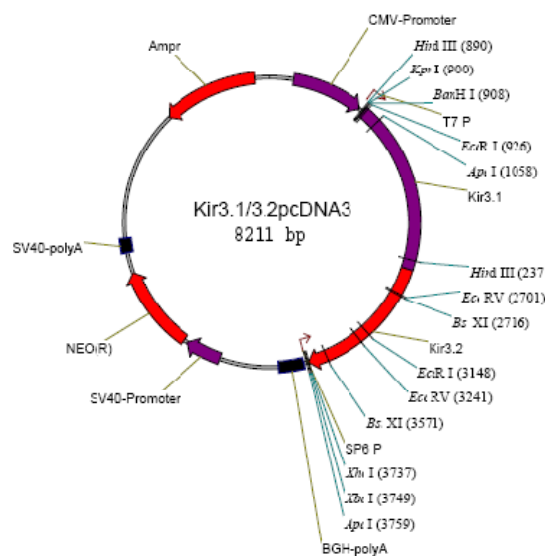
8.2.2 NCAM140 ID und NCAM180ID im prokaryotischen Expressionsvektor pQE30



NCAM180 ID Δ ESKA ist bis auf das Fehlen der letzten vier C-terminalen Aminosäuren identisch mit NCAM180 ID. Das Konstrukt wurde von A. Dityatev zur Verfügung gestellt.

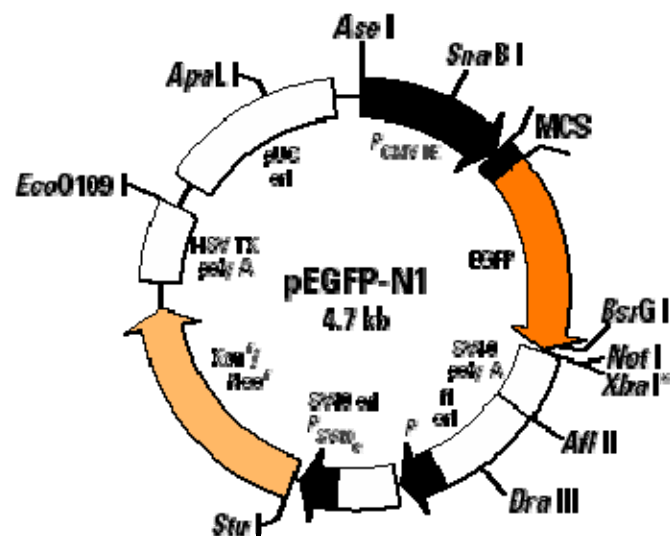
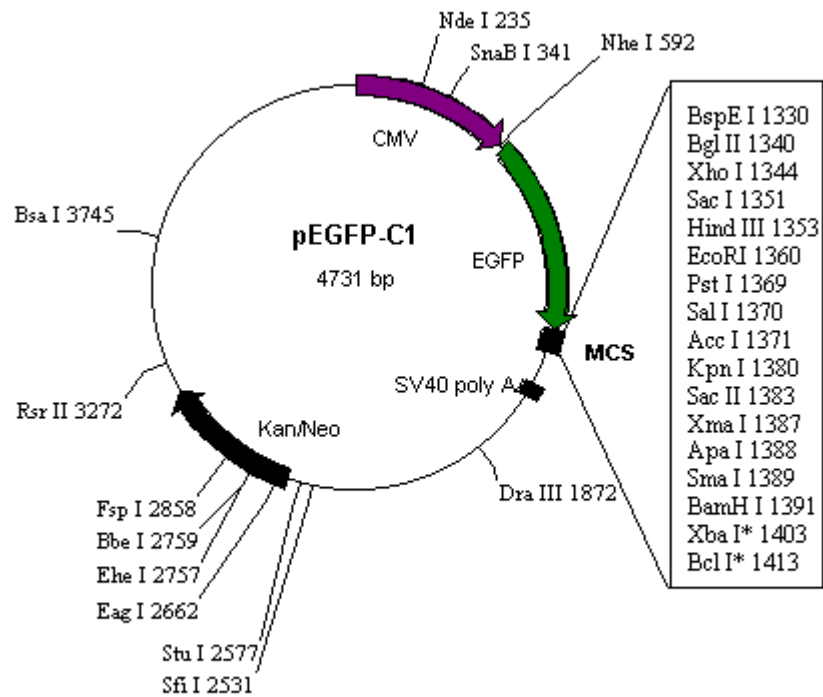
NCAM140 ID Δ N ist durch die Deletion der 44 N-terminalen Aminosäuren von NCAM140 ID in pQE30 hergestellt worden.

8.2.3 Kir3.1/3.2 im eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3

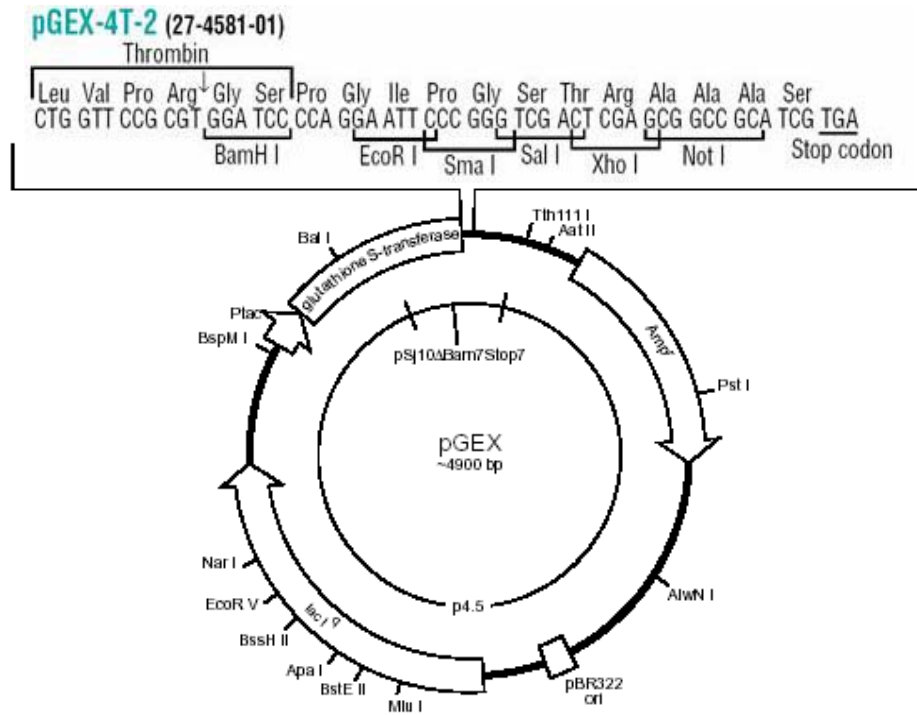


Ein Kir3.1/3.2-Konstrukt mit dem FLAG-Epitop (DYKDDDDK) zwischen den Aminosäuren 114 und 115 von Kir3.1 wurde von Dr. Clapham (Boston) zur Verfügung gestellt (Kennedy et al., 1999).

8.2.4. pEGFP-C1 und N1(Clontech)

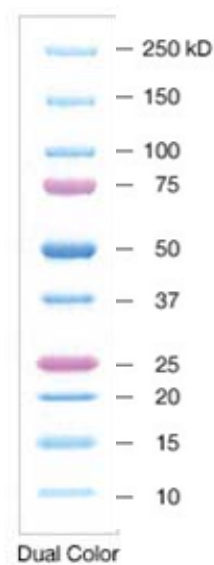


8.2.5 pGEX-4T-2 (Amersham Pharmacia)

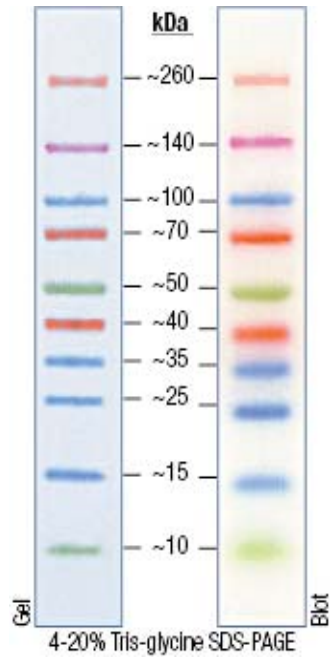


8.3 Proteinmarker

Bei SDS-PAGE wurde der Proteinmarker *Precision Plus Protein Dual Color* der Firma Bio-Rad eingesetzt.



Ebenso kam der Proteinmarker *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* der Firma Fermentas zum Einsatz.



8.4 Abkürzungsverzeichnis

8-OH-DPAT	8-Hydroxydipropylaminotetralin
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AP	Aktionspotential
apCAM	<i>Aplysia</i> cell adhesion molecule
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
C2	Proteinkinase C konservierte Region 2
Ca ²⁺	Calcium
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAR1	Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor 1
CASK	Calcium/Calmodulin-abhängige Serinproteinkinase
Cdc	cell division cycle
cDNA	complementary DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHO	Chinese hamster ovary
CIPP	channel-interacting PDZ domain protein
CLIC6	chloride intracellular channel 6
Crk1	Cdc2-related kinase 1
Dlg	discs large
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribnukleotidtriphosphat
Dvl	Dishevelled
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E _K	Kaliumgleichgewichtspotential
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär-Signal-aktivierte Kinase
EZM	extrazelluläre Matrix

FAK	Fokal-Adhäsions-Kinase
FasII	Fasciclin II
FCS	fötales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor, Fibroblastenwachstumsfaktor
Fz	Frizzled
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GDP	Guanosindiphosphat
GFL	GDNF-Liganden Familie
GFR α	GDNF-Rezeptor-Familie α
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GRIP	glutamate receptor interacting protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
hDlg	human discs large
HEK	human embryonic kidney
HNK-1	human natural killer 1
HPV	humaner high-risk Papillomavirus
HT- _{2A-C}	Hydroxytryptamin- _{2A-C}
ID	intrazelluläre Domäne
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
INAD	inactivation-no-after potential D
INADL	INAD-like protein
JAM	junktionales Adhäsionsmolekül
JEAP	junction-enriched and –associated protein
K ⁺	Kalium
kb	Kilobasen
K _D	Dissoziationskonstante

kDa	Kilodalton
KIF17	Kinesin superfamily protein 17
Kir	K ⁺ inwardly rectifying channel
l	Liter
L27	LIN- <u>2</u> , - <u>7</u>
LANP	leucine-rich acidic nuclear protein
LB	Luria-Bertani
LIN	abnormal cell line age
M	Molar
m	Milli
MAGI-1	membrane-associated guanylate kinase inverted 1
MAP	Mitogen-aktivierte Protein-
MALS	mammalian lin-seven protein
MASCOT	MAGI-1 associated coiled-coil tight junction protein
Mg ²⁺	Magnesium
μ	Mikro
min	Minute
Mint1	munc-18 interacting 1
mRNA	messenger ribonucleic acid
MT ₁	Melatoninrezeptor Typ 1
MUPP1	multiple PDZ-domain-containing-protein 1
n	Nano
N2A	Neuro-2A-Zellen
NCAM	neural cell adhesion molecule
NFκB	nuclear factor kappa B
NHERF	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
NR2A	NMDA-Rezeptor 2A
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
p38 MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38
Pals 1	protein associated with Lin-7
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PC12	pheochromocytoma 12
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	P SD-95/ D lg/ Z O-1
PFAM	Protein Families
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PH	Pleckstrin homology
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PSA	polysialic acid, Polysialinsäure
PSD	postsynaptische Dichte
PtdIns-4,5-P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Rap	Ras proximate
Ras	rat sarcoma
RhoA	Ras-homolog gene family A
RMP	Ruhemembranpotential
RPM	rounds per minute
RPTP α	Rezeptorproteintyrosinphosphatase α
RT	Raumtemperatur
SAP-97	synapse-associated protein 97
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	Src homology 3
SNX27	sorting nexin 27
s.o.	siehe oben
SSTR2b	Somatostatinrezeptor 2b
SynGAP	synaptisches GAP
Syx	Synectin-binding RhoA exchange factor
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAG-1	Transient axonal glycoprotein 1
TAPP	tandem-Pleckstrin-homology-domain containing protein
TARP	transmembrane AMPA receptor regulatory protein
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TrkB	tyrosine receptor kinase B
TRP	transient receptor potential

V	Volt
x g	9,81 m/s ²
ZO-1	Zonula occludens-1

Danksagung

Bei Frau Professor Melitta Schachner bedanke ich mich für die fachkundige Betreuung und dass ich in ihrer Arbeitsgruppe an einem sehr interessanten Thema arbeiten durfte.

Herrn Professor Wiese danke ich für die Begutachtung dieser Dissertation und für das Verständnis dafür, dass es am Ende einer Doktorarbeit mit den Terminen manchmal noch ziemlich knapp werden kann.

Bei Dr. Thomas Tilling möchte ich mich für die nette und unkomplizierte Betreuung und die vielen guten Ratschläge sowie anregenden Fachdiskussionen bedanken.

Überaus dankbar bin ich auch Dr. Vladimir Sytnyk und Dr. Irina Leshchyn'ska für die Präparation und Transfektion hippocampaler Neurone und die vielen hilfreichen Ratschläge in diesem Zusammenhang.

Herrn Achim Dahmann danke ich für die Beantwortung zahlloser Fragen, vor allem im Umgang mit Rechnungen, Lieferscheinen und vielen, vielen Mahnungen.

Unendlich dankbar bin ich Mounir „Mounsen Monus Tunuslu“ M'Zoughi für die wirklich unvergessliche Zeit am ZMNH und aus aktuellem Anlass für die lebenswichtige Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Ein dreifaches HAAAAALDIR auf unsere Freundschaft, die mir sehr, sehr viel bedeutet. Ich hätte da noch eine Frage: „Are you the Wooldor?“

Ich danke meiner „großen Schwester“ Sandra Nickel, dass sie in unserer gemeinsamen Zeit am ZMNH immer gut auf Ihren „kleinen Bruder“ aufgepasst hat. Ob Australien, Amerika oder Burkina Faso, ich werde dich auf jeden Fall besuchen.

Ich möchte auch Nina Stemmer für ihre Freundschaft, Hilfsbereitschaft und die nette Zeit danken.

Mein Dank gilt auch Ingo Meier, der wirklich für jeden Spass zu haben war. Auf das wir noch lange zusammen die Freuden Mittelherdes genießen können, du Sepp!

Recht herzlich danke ich auch meinen Kollegen aus E.32, Carina Figge, meiner Lieblingsnachbarin Janinne Schmid und Isabel Köhlitz für die witzige und lockere Stimmung im Labor. Wir waren und bleiben das beste Labor, wo gibt.

Ich möchte mich bei allen meinen Kollegen aus dem ZMNH für die nette Zusammenarbeit in den letzten Jahren bedanken.

Professor Dr. Edelsen alias Stephan Kaizik danke ich dafür, dass er mit mir die Höhen und Tiefen des Studiums und zahllose Tiefkühlpizzen geteilt hat. Ohne ihn wäre ich wohl nie am ZMNH gelandet.

Ich bedanke mich auch bei meiner Schwester Martina, meinem Schwager Ivo und Sandra Albrecht für die Unterstützung und das sie mir gerade in der anstrengenden letzten Phase meiner Arbeit immer Mut gemacht haben.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium und das Einschlagen einer wissenschaftlichen Laufbahn erst ermöglicht haben und die in jeder Hinsicht immer für mich da waren.