

Aus dem Institut für Humangenetik
des Zentrums für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. Andreas Gal

**Regulation der dendritischen Verzweigung durch das
postsynaptische Protein Densin-180**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Sandra Köcke
aus Elmshorn

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 06.07.2009
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: der Vorsitzende	PD Dr. H.-J. Kreienkamp
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter	PD Dr. M. Kneussel
Prüfungsausschuss: 3. Gutachterin	PD Dr. E. Mohr

Abkürzungen

1	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	1
2	Einleitung	3
3	Material und Methoden.....	14
3.1	Material	14
3.1.1	Chemikalien	14
3.1.2	Bakterien und Zelllinien.....	14
3.1.3	Vektoren.....	14
3.1.4	Oligonukleotide.....	15
3.1.5	Antikörper	15
3.2	Molekularbiologische Methoden	16
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	16
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	17
3.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	17
3.2.4	Restriktionsverdau von DNA.....	18
3.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	18
3.2.6	Präparation chemisch kompetenter Bakterien.....	18
3.2.7	Transformation kompetenter Bakterien nach der KCM-Methode.....	19
3.2.8	Präparation von Plasmid-DNA	19
3.2.8.1	Mini-Präparation	19
3.2.8.2	Midi-Präparation	20
3.2.9	DNA-Sequenzierung.....	20
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	20
3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	20
3.3.2	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	21
3.3.3	Western-Blot-Analysen.....	21
3.3.4	Expression und Reinigung von Fusionsproteinen.....	22
3.3.5	Kopplung von GKAP-Peptiden an NHS-Sepharose.....	23
3.3.6	Affinitätspräzipitationen aus transfizierten HEK293-Zellen (GKAP- <i>Pulldown</i>)	24
3.3.7	<i>Pulldown</i> -Experimente mit gereinigten Fusionsproteinen.....	255

3.4	Zellbiologische Arbeitstechniken	25
3.4.1	Kultivierung von HEK293-Zellen.....	25
3.4.2	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen.....	26
3.4.2.1	Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Methode.....	26
3.4.2.2	Transfektion mittels <i>Fugene 6</i> (Roche).....	26
3.4.3	Kultivierung primärer Hippokampus-Neurone	26
3.4.4	Transfektion primärer Hippokampus-Neurone	28
3.4.5	Immuncytochemie primärer Hippokampusneurone.....	28
3.4.6	Mikroskopische Arbeitstechniken.....	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Identifikation von Interaktionspartnern der LRR-Region des postsynaptischen Proteins Densin-180.....	30
4.1.1	Verifizierung der Interaktion der LRR-Region von Densin-180 mit β -Spectrin durch Kopräzipitationen aus HEK293-Zellen.....	31
4.1.1.1	Charakterisierung der Interaktion zwischen Densin-180 und β -Spectrin	32
4.1.2	Nachweis der direkten Interaktion zwischen Densin-180 und MACF durch <i>Pulldown</i> -Experimente	33
4.1.2.1	Charakterisierung und Eingrenzung der Interaktion zwischen Densin-180 und MACF	35
4.1.2.2	Auswirkung verschiedener Calciumkonzentrationen auf diese Interaktion	36
4.2	Überexpressionsversuche in primären kultivierten Hippokampusneuronen der Ratte	41
4.2.1	Überexpression von Densin-180 und MACF in primär kultivierten Hippokampusneuronen.....	41
4.2.2	Lokalisation von Densin-180 und MACF in primären kultivierten Hippokampusneuronen	43
4.2.3	Quantitative Analysen der dendritischen Verzweigungen und Endpunkte.....	44
4.3	Versuche im Rahmen der Erstellung eines Antikörpers gegen MACF	46
4.3.1	Anwendung des neuen Antikörpers in transfizierten HEK293-Zellen	47
4.3.2	Anwendung des neuen Antikörpers in Neuronen	48

5	Diskussion	50
5.1	Charakterisierung der Interaktion zwischen Densin-180 und β -Spectrin ..	50
5.2	Charakterisierung der Interaktion zwischen Densin-180 und MACF.....	52
5.3	Analyse der Funktion von Densin-180 und MACF in kultivierten Hippokampusneuronen	58
6	Zusammenfassung.....	63
7	Literaturverzeichnis.....	64
8	Anhang	75
8.1	Liste der verwendeten Konstrukte	75
8.2	Liste der verwendeten Primer	75
8.3	Firmenverzeichnis.....	76
9	Danksagung.....	78
10	Lebenslauf.....	79
11	Eidesstattliche Versicherung.....	80

Abkürzungen

BPAG1	<i>bullous pemphigoid antigen 1</i>
CA	<i>cornu ammonis</i>
CaMKII	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CH	<i>calponin homology</i>
Cy3	Cyanin3
DMEM	Kulturmedium für Zellen (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>
Gas 2	<i>Growth arrest-specific 2</i>
GKAP	<i>guanylate kinase associated protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HBSS	gepufferte Salzlösung (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HEK293	<i>human embryonal kidney cells strain 293</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktosid
IRSp53	<i>insulin receptor substrate of 53 kDa</i>
KCM-Puffer	Kalium-Calcium-Magnesium-Puffer
LAP	<i>leucine rich repeat and PDZ</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MACF	<i>microtubule actin crosslinking factor</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	<i>PDS-95/Dlg/ZO-1</i>
PH-Domäne	<i>pleckstrin homology domain</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)
PSD	postsynaptische Dichte
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS-T	Tris gepufferte Kochsalzlösung + Tween 20
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

In glutamatergen Synapsen bildet die Familie der Shank-Proteine eine Gruppe von Gerüstproteinen, die über eine Vielzahl von Interaktionspartnern die verschiedenen Glutamatrezeptoren mit dem Aktincytoskelett und Signalmolekülen vernetzen. Sie übernehmen damit eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der postsynaptischen Strukturen während der funktionellen Reifung der dendritischen Dornen. Shank 1 und Shank 3 interagieren mit der C-terminalen Region von Densin-180. Dieses Protein gehört zur Familie der LAP (*leucine rich repeat and PDZ*)-Proteine und wurde ebenfalls als Bestandteil der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen identifiziert. Das 180-kD-Protein besitzt am N-Terminus eine LRR (*leucine rich repeat*)-Domäne, flankiert von zwei cysteinreichen Domänen. Des Weiteren enthält es im zentralen Bereich eine mucinähnliche Domäne und einen hydrophoben Bereich sowie eine PDZ (*PDS-95/Dlg/ZO-1*)-Domäne am C-Terminus. Densin-180 ist in postsynaptischen Strukturen angereichert und wird außerhalb des Gehirns auch in den Podozyten der Niere exprimiert.

Eine Überexpression von Densin-180 in primären Hippokampusneuronen führt zu einer stark erhöhten Zahl von dendritischen Ausläufern und Verzweigungen. Die Koexpression von Shank und Densin-180 reduziert den Verzweigungsgrad und führt zu einer Anreicherung der Proteine in postsynaptischen Strukturen. Da die N-terminale LRR-Region von Densin-180 alleine die Induktion dendritischer Verzweigungen bewirkt, könnten Interaktionspartner dieser Region für die Verzweigung verantwortlich sein.

Im Folgenden sollten Proteine, welche an die oben erwähnte LRR-Domäne des Densin-180 binden, identifiziert und ihre Rolle hinsichtlich der Regulation der neuronalen Morphologie charakterisiert werden. Ausgehend von einem Hefe-2-Hybrid-*screen* wurden bereits mehrere Cytoskelettproteine als Kandidaten gefunden. Durch eine Deletionsanalyse sollte die interagierende Domäne dieser Proteine ermittelt werden. Nach Verifikation dieser Interaktion in biochemischen Tests bleibt die Frage zu beantworten, welche Bedeutung der Interaktion in Hinblick auf die neuronale

Morphologie in kultivierten Neuronen aus dem Hippokampus der Ratte zugemessen werden kann.

2 Einleitung

Menschliches Erleben und Verhalten ist ohne Gedächtnis und Lernfähigkeit nicht vorstellbar. Der Mensch wäre ohne Gedächtnis beispielsweise nicht in der Lage, neue Bewegungsabläufe zu erlernen, Namen oder Gesichter zu erinnern und sich seiner eigenen Identität bewusst zu sein. Gedächtnis ist dabei jene Funktion, die es ermöglicht, in der Vergangenheit Erfahrenes zu speichern, um es zu einem späteren Zeitpunkt für Erleben und Verhalten nutzbar zu machen (Pöppel et al. 1994). Daneben gestattet die Fähigkeit zu lernen dem Menschen Anpassung und Flexibilität. Das limbische System nimmt in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle ein. Es ermöglicht dem menschlichen Gehirn, die komplexen kognitiven Leistungen wie Gedächtnis und Lernfähigkeit zu vollbringen. Auch das emotionale Erleben wird aus neurophysiologischer Sicht dem limbischen System zugeschrieben. Dieses ist ein funktionell zusammengehöriges System aus Hippokampus, Gyrus cinguli, Gyrus parahippocampalis, Corpus amygdaloideum und Corpus mamillare. Innerhalb des limbischen Systems wird der Hippokampus als wichtigster Organisator der Gedächtnisfunktion angesehen. Insbesondere für episodische Inhalte des Gedächtnisses ist der Hippokampus das neuroanatomische Korrelat und nimmt für diese spezielle Gedächtnisleistung eine Schlüsselrolle ein (Rugg 1998, Wallenstein et al. 1998). Der Hippokampus mit seinen aufgezeigten Funktionen zählt als Teil des Gehirns zum zentralen Nervensystem. Das zentrale Nervensystem ist in seiner funktionalen Organisation von den Erfahrungen des Menschen abhängig und bleibt lebenslang veränderbar (Jenkins et al. 1990, Kaas 1991). Das menschliche Gehirn als Teil des zentralen Nervensystems ist aus 10^{10} - 10^{11} Neuronen aufgebaut, die über etwa 10^{15} synaptische Kontakte miteinander verbunden sind (Gundelfinger und tom Dieck 2000). Erst diese ausgeprägte Vernetzung der einzelnen Zellen ermöglicht hoch komplexe Prozesse wie Lernen oder Gedächtnisbildung.



Abb. 1: Hippokampus (nach Duvernoy 1998)

Die Abbildung 1 stellt ein menschliches Präparat des Hippokampus aus intraventrikulärer Sicht dar. Das Temporalhorn wurde eröffnet und der Plexus choroideus entfernt. Der Hippokampus stellt sich als sichelförmig gekrümmter, seepferdchenähnlicher Längswulst am Boden des Temporalhorns des Seitenventrikels dar (Braus und Brassens 2004). (schwarzer Balken = 6,5mm)

Morphologisch weisen Neurone eine Unterteilung in drei wesentliche Abschnitte auf: Zentraler Bestandteil ist der Zellkörper. Von diesem gehen ein oder mehrere Dendriten aus, um Reize aus der Umgebung aufzunehmen. Schließlich komplettiert das Axon, welches Signale an andere Zellen weiterleitet, das Neuron. Alle Nervenzellen besitzen die Fähigkeit, elektrische Erregungen weiterzuleiten. Diese so genannten Aktionspotentiale können entlang der Axone über weite Strecken fortgeleitet werden.

Sie dienen an den Synapsen als Signal, Neurotransmitter freizusetzen, um die Erregung an nachfolgende Zellen weiterzugeben. Die Einheit einer Synapse wird dabei aus dem synaptischen Spalt, den anliegenden präsynaptischen Strukturen (synaptisches Endköpfchen mit der präsynaptischen Membran) sowie den postsynaptischen Strukturen (postsynaptische Membran mit Rezeptoren für Neurotransmitter und postsynaptische Dichte) gebildet. Die Synapsen stellen einerseits Kontaktstellen zwischen Nervenzellen untereinander, andererseits zwischen Nervenzellen und Effektorzellen dar. Synaptische Kontakte unterliegen Modifikationen, welche vom Informationsgehalt der Umwelt, insbesondere im Rahmen von Lernprozessen, ausgehen. Die Gegebenheit der potentiell ständig möglichen Modifikationen wird als synaptische Plastizität bezeichnet.

Die Signalübermittlung zwischen Neuronen findet in der Mehrzahl der Fälle auf chemischem Wege über den synaptischen Spalt hinweg statt. Als Neurotransmitter fungieren die Aminosäuren Glutamat, γ -amino-Buttersäure (GABA) und Glycin sowie die Aminderivate Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Serotonin und Acetylcholin. Nach deren Freisetzung aus der präsynaptischen Membran diffundieren sie zur postsynaptischen Membran und aktivieren dort spezifische Rezeptoren. Diese Bindung führt u.a. zu einer Öffnung von Ionenkanälen mit daraus resultierenden Ionenströmen. Je nach deren Durchlässigkeit für spezifische Ionen erfolgt eine Depolarisation oder eine Hyperpolarisation der Membran. Im ersten Fall wird von einer erregenden (exzitatorischen) Synapse gesprochen, im zweiten Fall von einer hemmenden (inhibitorischen). Im Gehirn von Säugern dominiert Glutamat als Neurotransmitter exzitatorischer Synapsen, welche den Ausgangspunkt dieser Arbeit bilden. Synapsen mit Glutamat-Rezeptoren befinden sich meist auf kleinen, von den Dendriten ausgehenden Vorwölbungen, die als dendritische Dornen (*spines*) bezeichnet werden.

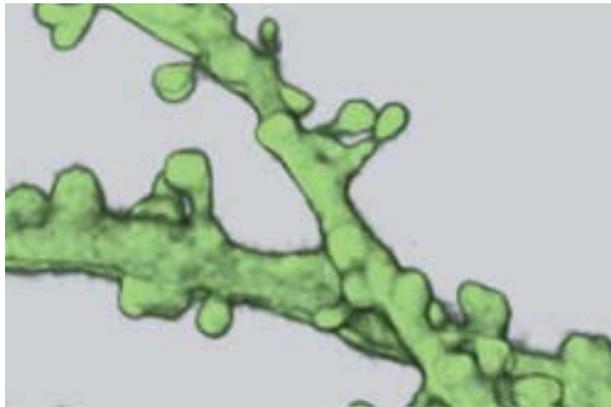


Abb. 2: Dendritische Dornen

Dargestellt sind dendritische Abschnitte eines Neurons aus der CA (*cornu ammonis*)-1-Region des Hippokampus mit den charakteristischen Ausstülpungen der Dendriten (*spines*) (Yuste und Bonhoeffer 2004).

In einem in der Literatur gängigen Modell gelten die Filopodien als Vorläufer der dendritischen Dornen (Hering und Sheng 2001). Die dendritischen Dornen variieren in Länge und Form und unterliegen einer ständigen Plastizität, wobei sich ihre Formveränderung sowohl in Sekunden als auch in längeren Zeiträumen von Stunden bis Tagen vollziehen kann (Hering und Sheng 2001, Dailey und Smith 1996).

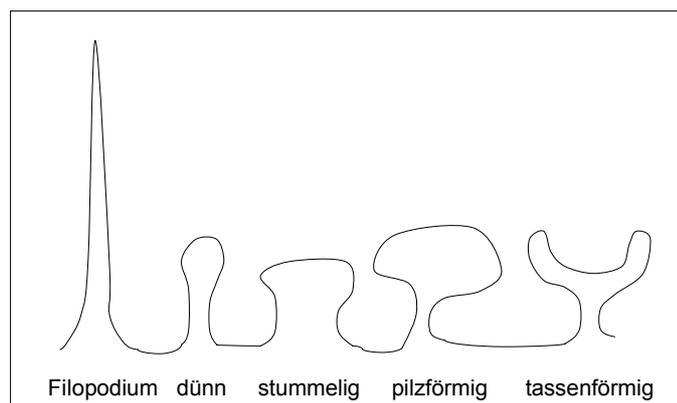


Abb. 3: Formen der dendritischen Dornen: Filopodium, dünn, stummelig, pilzförmig, tassenförmig (Hering und Sheng 2001)

Die Strukturveränderungen der dendritischen Dornen werden durch Umlagerungen des Aktincytoskeletts hervorgerufen. Proteine, die das Aktincytoskelett binden, sind somit für die Regulation der dendritischen Dornen und ihrer postsynaptischen Dichte mit verantwortlich (Matus 2000). Aktinfilamente besitzen einen Durchmesser von 7 nm und stellen neben den intermediären Filamenten und den Mikrotubuli eine Grundstruktur des Cytoskeletts. In den Aktinfilamenten bildet das Protein Aktin einen Doppelstrang aus, der eine Helix mit 13,5 Aktinmolekülen pro Windung bildet. Zur Bildung der Aktinfilamente (F-Aktin) wird ATP benötigt. In den dendritischen Dornen lassen sich darüber hinaus glattes endoplasmatisches Retikulum (Parnass et al. 2000, Spacek und Harris 1997) und Polyribosomen (Steward und Reeves 1988) nachweisen. Die Länge der dendritischen Dornen beträgt 0,5 – 2,0 μm , wobei speziell im Hippokampus (CA 3) auch Längen bis zu 6,0 μm zu finden sind (Harris und Kater 1994, Chicurel und Harris 1992). Reife Dendriten können sehr viele dendritische Dornen besitzen (1-10 *spines*/ μm), so dass diese sich überlappen und gegenseitig auf ihre äußere Form Einfluss nehmen (Sorra und Harris 2000). Am Kopf der dendritischen Dornen ist ein Bereich großer Proteindichte lokalisiert. Diese Struktur ist die so genannte postsynaptische Dichte (PSD) (Ziff 1997).

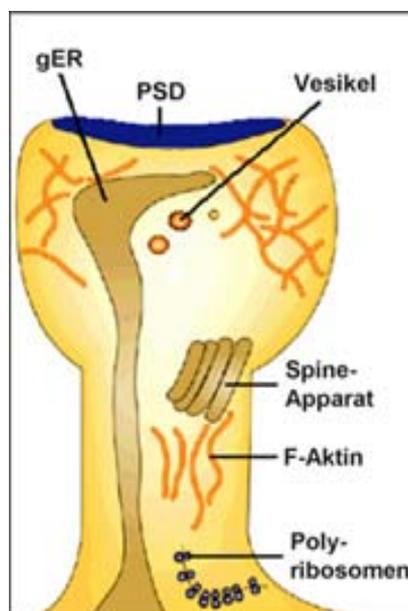


Abb. 4: Struktur eines dendritischen Dorns mit der postsynaptischen Dichte (PSD). Dargestellt sind die charakteristischen Strukturen wie die postsynaptische Dichte (PSD) an der Spitze sowie Ausläufer des glatten endoplasmatischen Retikulums (gER und *Spine-Apparat*), Bündel von filamentösem Aktin und Polyribosomen an der Basis des Dorns (Hering und Sheng 2001).

In der Elektronenmikroskopie dominiert die PSD als elektronendichte Struktur von ca. 30 nm Dicke und 300 nm Länge (Harris et al. 1992). Die PSD ist ebenfalls aktivitätsregulierten Veränderungen unterworfen, welche sowohl die Zusammenstellung der Proteine als auch deren Interaktionen betreffen (Sievevitz 1985; Sheng und Kim 2000). Eine isolierte PSD-Fraktion enthält eine Vielzahl verschiedener Makromoleküle. Insgesamt bilden ca. 100-400 verschiedene Proteine diese dynamische Struktur (Chen et al. 2005). Darunter finden sich insbesondere Membranrezeptoren, Gerüstproteine, Zelladhäsionsmoleküle und Cytoskelettproteine (Kennedy 1997, Kim und Huganir 1999). Schließlich beinhaltet die PSD Bestandteile von Signaltransduktionsketten.

Eine Reihe der in der PSD befindlichen Membranrezeptoren binden den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat. Zum einen bindet das Glutamat an bestimmte Subtypen der metabotropen Glutamatrezeptoren, darunter speziell die in der Gruppe 1 enthaltenen Rezeptoren mGluR1 α und mGluR5 (Naisbitt et al. 1999). Weiterhin existieren verschiedene ionotrope Rezeptoren, wobei der NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat) und der AMPA-Rezeptor (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isooxalol-Propionsäure) von besonderer Bedeutung sind. Diese Rezeptoren fungieren als ligandengesteuerte Ionenkanäle und sind aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut (Nakanishi und Masu 1994). Als übergeordneter Organisator der postsynaptischen Dichte kann die Familie der Shank-Proteine angesehen werden (Sheng und Kim 2000, Boeckers et al. 2002). Sie sind an der Reifung der dendritischen Dornen beteiligt (Sala et al. 2001). Die zur postsynaptischen Dichte gehörigen drei Mitglieder dieser Proteinfamilie, Shank 1-3, haben eine Größe von 180 bis 250 kD (Boeckers et al. 1999, Naisbitt et al. 1999, Zitzer et al. 1999), wobei durch alternatives Spleißen auch kürzere Isoformen entstehen können. Sie werden vorwiegend im Gehirn exprimiert, besonders in den Neuronen des Hippokampus, des Cortex und des Kleinhirns. Eine tragende Rolle kommt der Familie der Shank-Proteine in der Synaptogenese zu, wo diese Proteine eine äußerst frühe Komponente der postsynaptischen Spezialisierung darstellen (Boeckers et al. 1999, Petralia et al. 2005). Die Shank-Proteine interagieren mit einer Vielzahl von Proteinen und bilden so große Proteinkomplexe aus (Gundelfinger et al. 2006). Nach einem Modell von

Baron et al. (2006) können sie in Anwesenheit von Zink-Ionen eine Plattform erzeugen, die eine ideale Ausgangsposition für die Konstruktion des PSD-Komplexes darstellt. So bindet das Protein Homer, welches seinerseits dimerisiert und eine Interaktion mit Shank eingeht, an die metabotropen Glutamatrezeptoren (Brakeman et al. 1997). NMDA-Rezeptoren sind über das Protein PSD-95 (Cho et al. 1992), ein Vertreter der MAGUK (*Membrane Associated Guanylate Kinase*)-Proteine, an intrazelluläre Moleküle gebunden (Naisbitt et al. 1999), wobei die Interaktion auf Seiten des Proteins PSD-95 über die PDZ-Domäne vermittelt wird, welche an die Untereinheiten NR2A und NR2B des NMDA-Rezeptors bindet (Kornau et al. 1995). Der NMDA-Rezeptor wird somit in der postsynaptischen Membran verankert. PSD-95 wiederum bindet über eine GK (*guanylate kinase*)-Domäne an das cytoplasmatische Protein GKAP (*guanylate kinase associated protein*) (Kim 1997, Satoh et al. 1997, Takeuchi et al. 1997). Durch die Bindung von Proteinen der GKAP-Familie an Shank (Naisbitt et al. 1999, Tu et al. 1999) entsteht ein komplexes Netzwerk von interagierenden Proteinen, wobei über oben aufgezeigte Interaktionen eine Verbindung von NMDA- und metabotropen Glutamatrezeptoren über Shank resultiert (Sheng und Kim 2000). IRSp53 (*insulin receptor substrate of 53 kDa*) wiederum interagiert über seine SH3-Domäne mit Shank und kann gleichzeitig PSD-95 binden (Bockmann et al. 2002, Soltau et al. 2002). Das Enzym CaMKII (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) kommt in der Synapse gewöhnlich als Holoenzym aus 12 Untereinheiten vor (Kolodziej et al. 2000) und wird in Folge einer Erhöhung des Calciumspiegels zur postsynaptischen Membran transportiert (Shen und Meyer 1999), wo es mit dem NMDA-Rezeptoren einen Komplex bildet (Bayer et al. 2001). Die α -Untereinheit der CaMKII bindet darüber hinaus an Densin-180 (Walikonis et al. 2001), so dass darüber eine indirekte Interaktion mit dem Shank-Protein entsteht. Über Aktin-bindende Proteine wie beispielsweise Cortactin, Spectrin und Abpl wird Shank an das Cytoskelett gebunden (Du et al. 1998, Boeckers et al. 2001, Kessels et al. 2001, Qualmann et al. 2004). Alle genannten Moleküle haben das Potential, die Form der dendritischen Dornen und der PSD zu verändern (Maruoka et al. 2005), wobei in der nachfolgenden Arbeit das Protein Densin-180 und dessen Interaktionspartner im Vordergrund stehen werden. Die Shank-Proteine binden an den C-Terminus von Densin-180, wobei diese Interaktion

auf Seiten der Shank-Proteine über eine SH3 (*Src Homology 3 domain*)-Domäne und Teile einer prolinreichen Region vermittelt wird (Quitsch et al. 2005).

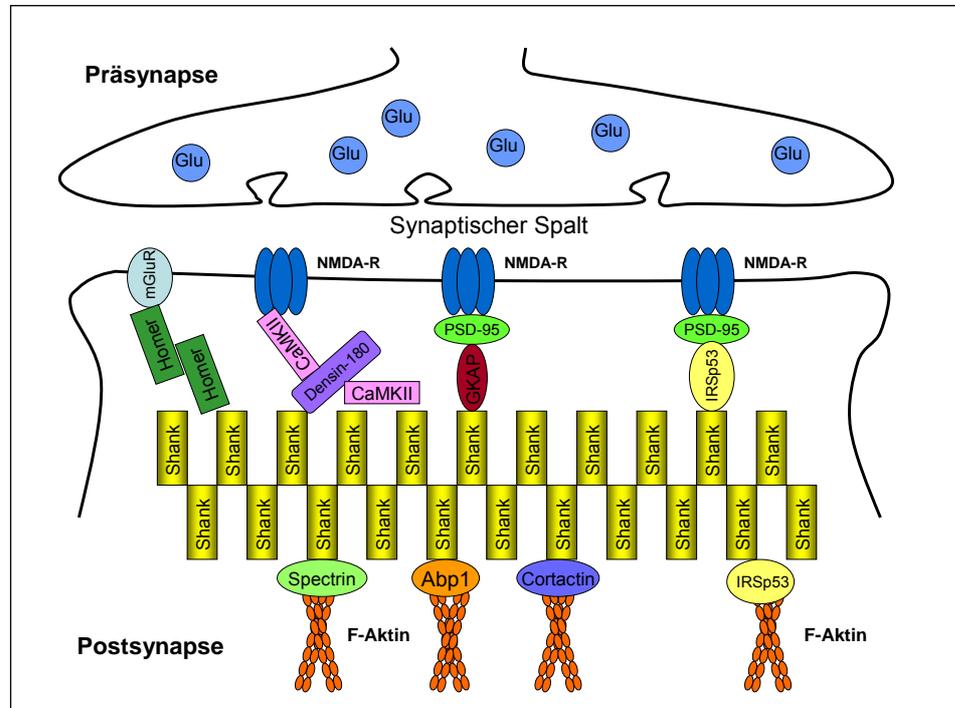


Abb. 5: Schematische Darstellung ausgewählter Proteinkomponenten in der postsynaptischen Dichte (PSD)

Die Abbildung 5 zeigt ausgewählte Proteinbestandteile der PSD, wobei dem Protein Shank bei der Vernetzung der einzelnen Komponenten eine bedeutende Funktion zukommt. Shank-Proteine bilden in Anwesenheit von Zink-Ionen eine Plattform aus, die einen idealen Ausgangspunkt für die Ausbildung des PSD-Komplexes darstellt. So bindet das Protein Homer, welches seinerseits dimerisiert und eine Interaktion mit Shank eingeht, an die metabotropen Glutamatrezeptoren. NMDA-Rezeptoren sind über die Proteine PSD-95 und GKAP an die Shank-Protein-Plattform gebunden. IRSp53 wiederum interagiert über seine SH3-Domäne mit Shank und kann gleichzeitig PSD-95 binden. Das Enzym CaMKII bindet nach Auto-phosphorylierung mit erhöhter Effizienz an Densin-180, welches seinerseits mit Shank interagiert. Auf diese Weise kommt es zur Ausbildung eines komplexen Proteinkomplexes. Über Aktin-bindende Proteine wie Cortactin, Spectrin und Abp1 wird Shank an das Cytoskelett gebunden.

Die dendritischen Dornen mit den aufgezeigten Proteinkomplexen sind äußerst dynamische Strukturen. Synaptische Kontakte können gelöst und neue Verbindungen geknüpft werden. Neuordnungen dieser Art sind schnelle Prozesse, die dem Lernen und der Gedächtnisformation zugrunde liegen (Boeckers 2006). Der dendritischen Morphologie und Plastizität kommt neben diesen Prozessen auch im Hinblick auf

intellektuelle Defizite eine besondere Bedeutung zu: So wird seit den 70er Jahren über einen engen Zusammenhang zwischen morphologischen Abnormalitäten von Dendriten, dendritischen Dornen und Synapsen einerseits und der mentalen Retardierung andererseits berichtet (Kaufmann und Moser 2000, Fiala et al. 2002). Des Weiteren sind Veränderungen der dendritischen Dornen in Zusammenhang mit speziellen Erkrankungen gebracht worden. Hierzu zählen die Epilepsie (Swann et al. 2000), das Down-Syndrom (Kaufmann und Moser 2000, Belichenko et al. 2004) sowie das fragile-X-Syndrom (Irwin et al. 2001). Die Gewinnung weiterer Erkenntnisse über PSD-Proteine und molekulare Mechanismen in der postsynaptischen Dichte ist in Folge dessen von bedeutender Relevanz.

Densin-180 (Apperson et al. 1996) gehört zur Familie der LAP-Proteine. Proteine mit LRR-Domänen haben grundsätzlich eine große Bandbreite an Funktionen, darunter Zelladhäsion und Signaltransduktion (Apperson et al. 1996). Die LAP-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Ausbildung der Zellpolarität und Formierung von Zellkontakten. Sie wurden in Epithelzellen nachgewiesen, wo sie an der Ausbildung von *Tight Junctions* oberhalb der basolateralen Membran beteiligt sind (Bilder und Perrimon 2000, Saito et al. 2001, Dillon et al. 2002). In Säugern werden insgesamt vier Mitglieder der LAP-Proteine exprimiert. So existieren neben Densin-180 in Säugern folgende drei weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie: Erbin, ein ErbB2-interagierendes Protein (Borg et al. 2000, Jaulin-Bastard et al. 2002), Lano (*LAP and no PDZ*) (Bryant und Huwe 2000) und hScrib (*human Scribble*) (Navarro et al. 2005). Andere Organismen besitzen weniger Vertreter der LAP-Proteine. So wird beispielsweise Scribble als einziges LAP-Protein in *Drosophila melanogaster* exprimiert. Dem Protein Scribble wird eine Funktion als Tumorsuppressor zugeschrieben (Bilder et al. 2000). LET-413, ein Erbin-Ortholog, ist ein weiterer Vertreter der Familie der LAP-Proteine in *Caenorhabditis elegans* (Legouis et al. 2000). Alle Proteine der LAP-Familie zeichnen sich durch ihre gemeinsame Domänenstruktur aus. So befinden sich am N-Terminus 16 leucinreiche Motive und am C-Terminus eine oder mehrere PDZ-Domänen (Bilder und Perrimon 2000), deren primäre Rolle in der Vermittlung von Proteininteraktionen liegt (Sheng und Sala 2001). Allein Lano besitzt am C-Terminus keine PDZ-Domäne. Das 180 kD große Protein Densin-180 zeichnet sich durch eine zusätzliche mucinähnliche Domäne im

mittleren Bereich aus. Densin-180, welches zunächst als neuronenspezifisches LAP-Protein galt (Apperson et al. 1996), wird auch in den Podozyten der Niere (Ahola et al. 2003) und im Hoden in der Zellmembran der Sertoli-Zellen exprimiert (Lassila et al. 2006). Es sind mehrere Interaktionspartner der C-terminalen Region von Densin-180 bekannt. Zum einen interagiert δ -Catenin mit der PDZ-Domäne von Densin-180 (Izawa et al. 2002). Ein weiterer Interaktionspartner ist das Protein MAGUIN-1, welches Densin-180 mit PSD-95 verbinden kann (Ohtakara et al. 2002). Auch die α -Untereinheit der Kinase CaMKII bindet an die PDZ-Domäne von Densin-180, wobei Densin-180 an spezifischen Stellen durch die CaMKII phosphoryliert werden kann (Strack et al. 2000, Walikonis et al. 2001). Densin-180 scheint in diesem Zusammenhang am Transport der CaMKII an die postsynaptische Membran beteiligt zu sein (Walikonis et al. 2001). α -Actinin, ein Aktin-assoziiertes Protein, bindet sowohl an die α -Untereinheit der CaMKII als auch an Densin-180. Neben diesen mit dem C-Terminus interagierenden Proteinen konnte, wie oben aufgezeigt, das Protein Shank als Interaktionspartner identifiziert werden (Quitsch et al. 2005).

Eine Überexpression von Shank 1 und auch Shank 3 führt in kultivierten Hippokampusneuronen zur Akkumulation von postsynaptischen Proteinen in der Synapse; die morphologische und funktionelle Reifung der dendritischen Dornen wird gefördert (Sala et al. 2001). Eine Überexpression von Densin-180 in primären Hippokampusneuronen führt dagegen zu einer stark erhöhten Zahl von dendritischen Ausläufern, die miteinander zu netzartigen Strukturen verschmelzen können, wobei die Ausbildung postsynaptischer Proteinkomplexe stark beeinträchtigt wird (Quitsch 2004). Die Koexpression von Shank und Densin-180 reduziert den Verzweigungsgrad und führt wiederum zu einer Anreicherung der Proteine in postsynaptischen Strukturen (Quitsch et al. 2005). Die Überexpression eines 470 Aminosäuren langen Proteinfragmentes, das nur die leucinreichen Wiederholungen (LRR) enthält, reicht aus, um die Induktion der beschriebenen Verzweigungen zu erreichen (Quitsch 2004). Ein ähnliches Ergebnis konnte kürzlich für die LRR-Region des Proteins Erbin erzielt werden (Arikkath et al. 2008). Da die LRR-Region des Densins allein diesen Effekt auslösen kann, steht dieser Bereich im Folgenden im Zentrum des Interesses. Die starken morphologischen Veränderungen, induziert durch Densin-180, lassen für dieses Protein und potentielle Interaktionspartner auf eine Funktion

bei der Regulation von Zelladhäsionsmolekülen und Cytoskelett in der Postsynapse schließen. Die Suche nach möglichen Interaktionspartnern der LRR-Region lässt genauere Erkenntnisse über den Mechanismus der durch Densin-180 induzierten dendritischen Verzweigungen und über die Rolle der Interaktionspartner im Hinblick auf die Regulation der neuronalen Morphologie erhoffen. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit neue Interaktionspartner von Densin-180 identifiziert und ihre Funktionen näher charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

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

3.1.2 Bakterien und Zelllinien

	Bezeichnung	Herkunft
Bakterienstämme	<i>E. coli</i> TOP 10F	Invitrogen
	<i>E. coli</i> BL 21	Stratagene
Zelllinien	HEK293	ATCC

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien

3.1.3 Vektoren

Verwendung	Bezeichnung	Herkunft
Subklonierung von PCR-Fragmenten	pCR®II-TOPO	Invitrogen
Proteinexpression: Bakterien	pGEX-4T-2	Amersham Biosciences
Proteinexpression: eukaryotische Zellen	pEGFP C1	Clontech
	pEGFP C3	Clontech

Tab. 2: Übersicht aller verwendeter Ausgangsvektoren

Die oben genannten Vektoren dienten in dieser Arbeit als Ausgangsvektoren sämtlicher neu klonierter Konstrukte. Im Anhang befindet sich diesbezüglich eine Liste aller neu hergestellten sowie der mir zur Verfügung gestellten Konstrukte.

3.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma bezogen. Eine Auflistung aller verwendeter Oligonukleotide ist dem Anhang zu entnehmen.

3.1.5 Antikörper

Primärantikörper	Western-Blot	Cytochemie	Hersteller
α GFP <i>mouse</i>	1: 5000	1:1000	Abcam
α GFP <i>rabbit</i>	1: 5000	1:1000	Abcam
α flag <i>mouse</i>	1:10.000	1:5000	Sigma
α flag <i>rabbit</i>		1: 100	Sigma
α SSTRip (PDZ) <i>rabbit</i>	1: 2000		BioGenes (i.A. der AG Kreienkamp)
α Beta-Spectrin <i>rabbit</i>	1: 100		1.Abcam 2.ABR Affinity Bio Reagents
α MAP2 <i>mouse</i>		1:1000	Sigma
α myc <i>mouse</i>		1:2500	Sigma
α MACF <i>rabbit</i>	1: 1000	1: 100	BioGenes (i.A. der AG Kreienkamp, siehe 4.3)

Tab. 3: Übersicht aller eingesetzter Primärantikörper

Die Tabelle gibt zudem Auskunft über die eingesetzten Verdünnungen und die Hersteller der Primärantikörper.

Sekundärantikörper	Western-Blot	Cytochemie	Hersteller
α mouse Ig, horse-radish peroxidase linked whole antibody	1:2000		Amersham Bio-Sciences

<i>arabbit</i> Ig, horse-radish peroxidase linked whole antibody	1:2000		Amersham Bio-Sciences
Cy3- <i>α</i> mouse-IgG		1:400	Dianova
Cy3- <i>α</i> arabbit-IgG		1:400	Dianova
Alexa-Fluor- <i>α</i> arabbit-IgG		1:400	Invitrogen

Tab. 4: Übersicht aller eingesetzter Sekundärantikörper

Die Tabelle gibt zudem Auskunft über die eingesetzten Verdünnungen und die Hersteller der Sekundärantikörper.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) angewandt. Für diese Reaktion wurden hitzestabile DNA-Polymerasen eingesetzt. Zum einen fand die *Taq* DNA-Polymerase (Promega), alternativ die *Turbo Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene) Verwendung. Des Weiteren wurden zwei Oligonukleotide (Primer) benötigt, welche zu je einem Abschnitt der zu amplifizierenden DNA komplementär waren. Ein Reaktionsansatz von 100 µl enthielt je 100 pmol je Primer, 10-1000 ng DNA-*Template*, 25 nmol je Desoxyribonukleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie 1 U Polymerase. Die Durchführung der Reaktion erfolgte im Biometra T Gradient. Das gewählte Programm startete mit einer initialen Denaturierung bei 94°C für die Dauer von 5 Min. Es folgten 30 wie folgt beschriebene Amplifikationszyklen:

Denaturierung bei 94°C für 45 Sek.

Annealing bei 50-65°C für 45 Sek.

Elongation bei 72°C für 45 Sek.

Die Denaturierung diente der Trennung der beiden *Template*-DNA-Stränge, woraufhin es bei der auf 56°C gesenkten Temperatur zur Hybridisierung der Primer an die

einzelsträngige *Template*-DNA kam. In der anschließenden Elongationsphase wurde der Primer durch die aktive Polymerase verlängert. Nach Durchlaufen der 30 Zyklen folgte die Phase der finalen Elongation bei 72°C für 10 Min. Die Proben wurden daraufhin auf 4°C abgekühlt.

Die für die Primer-Anlagerung erforderliche Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide und wurde jeweils nach folgender Formel abgeschätzt:

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

Die Schmelztemperatur (T_m) in °C errechnete sich somit aus der Summe aus dem Vierfachen der Anzahl (N) der Basen Guanin (G) und Cytosin (C) und dem Zweifachen der Anzahl (N) der Basen Adenin (A) und Thymin (T) des entsprechenden Oligonukleotids.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von PCR- oder Restriktionsfragmenten. Je nach Größe des DNA-Fragmentes wurden Agarosekonzentrationen von 1-2% (w/v) eingesetzt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (100 mM Tris/Acetat, 5 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), pH 8,0) aufgekocht, mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und nach kurzem Abkühlen in einen geeigneten Gelschlitten mit Probenkamm gegossen. Das Ethidiumbromid, ein Fluoreszenzfarbstoff, lässt die DNA bei Anregung mit UV-Licht sichtbar werden. Nach dem Aushärten des Gels wurden die Proben mit 1/5 ihres Volumens an Probenpuffer (30% (w/v) Glycerin, 40 mM Tris/HCl, 0,25% Bromphenolblau, pH 8,0) versetzt und bei 50-100 V ihrer Größe nach aufgetrennt. Als DNA-Molekulargewichtsmarker wurden *DNA/EcoRI+HindIII Marker* und *GeneRuler™ 100 bp DNA ladder* (Fermentas) ergänzend auf das Gel aufgetragen.

3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus den Agarose-Gelen wurde mittels des *QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit* (Qiagen) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem

Agarose-Gel ausgeschnitten und die DNA-Fragmente nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Die Sequenz-spezifische Spaltung der DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen durchgeführt. Für einen Restriktionsverdau wurde dem Ansatz mit der DNA 2-5 U Restriktionsenzym sowie 1/10 Volumen des entsprechenden 10fach konzentrierten Reaktionspuffers zugegeben. Nach einer Inkubation von mindestens einer Stunde bei 37°C wurde die DNA durch gelelektrophoretische Auftrennung analysiert. Die gewünschten Fragmente konnten anschließend für eine Ligation aus dem Gel isoliert und aufgereinigt werden (siehe 3.2.3).

3.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurden die durch Restriktion und Gelelektrophorese erhaltenen Insert- und Vektor-DNA-Fragmente in einem Verhältnis von 3:1 gemischt und mit 1 U T4 DNA-Ligase und einem geeigneten Reaktionspuffer (Roche) versetzt. Anschließend erfolgte die Ligation für eine Stunde bei Raumtemperatur; alternativ über Nacht in einem Wasserbad von 16°C.

3.2.6 Präparation chemisch kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien (*E. coli* TOP10F) erfolgte mittels des KCM (Kalium-Calcium-Magnesium)-Puffers. 5 ml LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) (10 g/l Bacto-Pepton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefe-Extrakt, pH 7,5) wurden dazu mit Tetrazyklin (15 µg/ml) versetzt und mit einer Kolonie TOP10F-Zellen angeimpft. Nachdem diese Vorkultur über Nacht bei 37°C geschüttelt wurde, wurde eine 500 ml Hauptkultur mit dieser Vorkultur angeimpft und schüttelnd bis zu einer OD (optische Dichte)₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Vorkühlung der Bakterienkultur für 2 Min. in Eiswasser. Nach Zentrifugation für 5 Min. bei 4°C mit 4000 g wurde das Bakterienpellet in 50 ml TSB resuspendiert und erneut für 10-15 Min. auf Eis gekühlt. Daraufhin wurden die Bakterien in Aliquots zu 0,5 ml in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten sodann bei -70°C gelagert werden.

3.2.7 Transformation kompetenter Bakterien nach der KCM-Methode

Ein Transformationsansatz aus 20 µl 5xKCM (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl₂), 7,5 µl eines Ligationsansatzes und 72,5 µl Wasser wurde mit 100 µl kompetente Zellen (siehe 3.2.6) gemischt und 20 Min. auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz für 5 Min. in einem Wasserbad von 37°C erwärmt und nachfolgend 800 µl LB-Medium zugegeben. Die Zellen wurden für ca. 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 17.900 g für 30 Sek. Das erhaltene Pellet wurde in 100 µl Restvolumen LB-Medium resuspendiert und auf LB-Selektionsplatten ausplattiert. Abschließend wurden diese Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.8 Präparation von Plasmid-DNA

3.2.8.1 Mini-Präparation

Zur Präparation kleinerer Mengen an Plasmid-DNA wurden die Reagenzien des *Qiagen Plasmid Purification Midi Kit* verwendet. Zunächst wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie transformierter Bakterien inokuliert und dem Ansatz 0,1% des entsprechenden Antibiotikums beigefügt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Je 1,5 ml einer solchen Kultur wurden am nächsten Tag für 30 Sek. bei Raumtemperatur und 17.900 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Bakterienpellet wurde in 120 µl P1-Puffer resuspendiert, mit 120 µl P2-Puffer versetzt, invertiert und 2-3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte durch Zugabe von 120 µl P3-Puffer, mehrmaliges Invertieren und eine Inkubation von 5 Min. die Präzipitation. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 15 Min. mit 17.900 g zentrifugiert und der erhaltene Überstand in je ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden die Proben mit 70% ihres Volumens an Isopropanol versetzt und erneut für 20 Min. und 17.900 g zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde abschließend zweimalig mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 70 µl Wasser aufgenommen.

3.2.8.2 Midi-Präparation

Zur Isolierung von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurde das *Nucleobond®PC 100* Kit (Macherey und Nagel) verwendet. Zunächst wurden dazu 100 ml LB-Medium mit einer Kolonie transformierter Bakterien inokuliert, entsprechendes Antibiotikum beigefügt und bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Die so entstandenen Hauptkulturen wurden am nächsten Tag bei 4°C und 5000 g zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die nachfolgenden Prozesse wurden nach den Protokollangaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde anschließend durch gelelektrophoretische Analyse und spektroskopische Messung bei 260 nm ermittelt.

3.2.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem *ABI Prism Big Dye Terminator Kit* und dem Sequenzierungsgerät *ABI Prism 377 DNA Sequenzer* (Perkin Elmer) durchgeführt. Diese Sequenzierung basiert auf der Didesoxy-Methode (Sanger et al. 1977), wobei die DNA-Sequenz nach einer PCR-artigen Terminationsreaktion mit dem zu sequenzierenden DNA-Fragment als *Template* anhand der Größe einzelner Terminationsprodukte und ihrer 3'-terminalen Fluoreszenzmarkierung ermittelt werden konnte.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE wandern SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld und werden durch einen Siebeffekt der Größe nach aufgetrennt. SDS führt zum einen zur Denaturierung der Proteine und damit zur Aufhebung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, zum anderen erzeugt es eine negative Ladung der Proteine, die sich zum Molekulargewicht des Proteins proportional verhält. Auf diese Weise wird eine Größendifferenzierung im Gel möglich. Es wurden mit Hilfe des *Mini-Protean III-Systems* (Biorad) diskontinuierliche Gele der Größe

8,0 cm x 7,3 cm x 0,075 cm gegossen, wobei das Sammelgel (Acrylamidkonzentration 3%, pH 6,8) ca. 1/5 der Gesamtgröße ausmachte. Das Trenngel wurde in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Proteine mit Acrylamidkonzentrationen von 8-12% hergestellt. Bei dem Versuch auch besonders große Proteine im Gel aufzutrennen, wurden die Konzentrationen weiter reduziert und schließlich mit einer Acrylamidkonzentration von 4% im Trenngel gearbeitet.

3.3.2 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Zur unspezifischen Anfärbung von Proteinbanden in Gelen wurden diese nach der Elektrophorese für 20 Min. in Coomassie-Färbelösung (25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,05% (w/v) Coomassie-R250) gefärbt und daraufhin in Entfärbelösung (10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Methanol) entfärbt.

3.3.3 Western-Blot-Analysen

Der Western-Blot ist ein elektrophoretischer Transfer von Proteinen und dient der Übertragung der durch SDS-PAGE aufgetrennten und negativ geladenen Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (PROTRAN BA 85, Schleicher & Schüll). Die Proteine können anschließend mittels Immundetektion spezifisch sichtbar gemacht werden. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden hierzu die Gele vorsichtig der Apparatur entnommen. Membranen und Whatman-Papier wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und zur Äquilibrierung in Blot-Puffer (20% (v/v) Methanol, 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,02% (w/v) SDS) gelegt. Anschließend wurden die Proteine mittels *Transblot-SD semi dry transfer cell* (Bio-Rad) nach Herstellerangaben übertragen. Alternativ erfolgte die Übertragung der Proteine per Nassverfahren mittels der *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). In diesem Fall erfolgte der Transfer im Regelfall bei 100 V für 1 Stunde. Bei besonders großen Proteinen wurde die Zeit unter Kühlung der Apparatur und reduzierter Voltzahl auf bis zu 8 Stunden ausgeweitet. Die Membran wurde anschließend für 1 Stunde mit Blockierlösung (5% fettarmes Magermilchpulver in TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 0,2% Tween-20, pH 7,9)) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert.

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen wurden die auf der Nitrozellulose-Membran immobilisierten Proteine mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper wurde hierzu im entsprechenden Verhältnis (siehe Tab. 3) in Blockierlösung verdünnt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Alternativ konnte dieser Schritt auch bei 4°C über Nacht stattfinden. Nachdem die Membran 3x10 Min. mit TBS-T gewaschen worden war, erfolgte eine Inkubation des HRP (*horse radish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörpers in TBS-T (Verdünnung siehe Tab. 4). Es folgten zunächst 3 Waschschritte à 10 Min. in TBS-T, anschließend die Immunfärbung mittels des ECL-Systems (*enhanced chemiluminescence*, Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers. Die erzeugte Chemilumineszenz wurde durch Exposition der Membran auf Röntgenfilmen (Cronex 5 *Medical X-Ray* Film, Agfa) dokumentiert.

Um eine erneute Detektion mit einem anderen Primärantikörper zu ermöglichen, wurde die Membran für 30 Min. bei 60°C mit *Stripping*-Puffer (100 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris, pH 6,7) inkubiert. Daraufhin erfolgte das zweimalige Waschen für 10 Min. in TBS-T und die erneute Blockierung in oben genannter Blockierlösung für 1 Stunde. Anschließend wurde wie beschrieben mit dem Primär- und Sekundärantikörper verfahren.

3.3.4 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen

Für die Expression von GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen wurden die kodierenden Sequenzbereiche in den Vektor pGex-4T-2 kloniert und in *E. coli* TOP10F transformiert. Nachdem 5 ml LB-Medium plus 100 μ g/ml Ampicillin mit einer Kolonie inokuliert wurden, folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler. Daraufhin wurden 200 ml LB-Medium (plus 100 μ g/ml Ampicillin) mit dieser Vorkultur inokuliert und bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C inkubiert. Die nachfolgende Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 200 μ l IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid, 20% (w/v) in H₂O). Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 37°C im Schüttler wurden die Zellen 15 Min. bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml gekühltem STE-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert

und erneut zentrifugiert (4000 rpm, 10 Min., 4°C). Das Pellet wurde erneut wie oben beschrieben in 10 ml STE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysozym (10 mg/ml) und den Protease-Inhibitoren Pepstatin A (1 µg/ml) und PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, 100 µM) wurde die Suspension zur Lyse zunächst 20 Min. auf Eis gestellt und anschließend über Nacht eingefroren. Nach Auftauen der Suspension am nächsten Morgen folgte die Zugabe von 2 ml 10% Triton X-100 in PBS und eine erneute Inkubation von 20 Min. auf Eis. Die nun folgende Zentrifugation (16.000 rpm, 4°C, 25 Min.) diente der Trennung von unlöslichen Bestandteilen, so dass der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt werden konnte. Parallel wurden je Ansatz 1 ml *Glutathion-Sepharose™ 4 Fast Flow* (Amersham Biosciences) mit STE-Puffer zweimal gewaschen und der zuvor erhaltene Überstand auf diese Glutathion-Sepharose gegeben. Es schloss sich die Inkubation für 1 Stunde bei 4°C auf dem Rotator an. Die Sepharose wurde daraufhin dreimal mit 10 ml kalten STE-Puffer gewaschen und dazwischen jeweils bei 500 g für 5 Min. zentrifugiert. Die gebundenen Proteine konnten nun zweimal mit 1,5 ml Elutionspuffer (10 mM Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) durch Inkubation bei 4°C eluiert werden. Die Quantität der so aufgereinigten Proteine wurde durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung im Vergleich mit BSA-Standards analysiert. Die zum Teil geringe Menge an aufgereinigtem Protein machte eine modifizierte Erprobung dieses Protokolls erforderlich. Als denkbar probate Variante schien etwa die Zellyse durch Ultraschallbehandlung, die jedoch keine Verbesserung hervorbrachte. Das beste Ergebnis gelang vielmehr mit oben aufgezeichnetem Verfahren, so dass nach diesem Protokoll mehrfach mit Parallelansätzen gearbeitet wurde, um eine ausreichende Proteinmenge zu erhalten.

3.3.5 Kopplung von GKAP-Peptiden an NHS-Sepharose

GKAP-Peptid (Genemed Synthesis Inc.), welches dem C-Terminus von GKAP/SAPAP aus der Ratte (AS-Sequenz IYIPEAQTRL, Acc. U67987) entspricht, wurde kovalent an *NHS-activated Sepharose™ 4 Fast Flow* (Amersham Biosciences) gekoppelt, um Affinitätspräzipitationen durchführen zu können. Es wurden 3 mg Peptid in 1 ml Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 7,8) gelöst; anschließend 1 ml NHS-aktivierte Sepharose zweimal mit 15 ml 1 mM HCl (kalt) ge-

waschen und das gelöste Peptid zugegeben. Es folgte die Inkubation auf dem Rotator bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Sepharose 1 Min. bei 4°C und 1000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Sepharose wurde zweimal in PBS (137 mM NaCl, 8,8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH₂PO₄) gewaschen und in PBS mit 20% Isopropanol gelagert.

3.3.6 Affinitätspräzipitationen aus transfizierten HEK293-Zellen (GKAP-Pulldown)

Um die im Hefe-2-Hybrid-*screen* gefundenen Interaktionen zu bestätigen, wurden Kopräzipitationen von Densin-180 und potentiellen Interaktionspartnern durchgeführt. Das Protein GKAP bindet mittels seines C-Terminus an die PDZ-Domäne der Shank-Proteine (Soltau et al. 2002), welche wiederum die Interaktion mit dem Protein Densin-180 (Quitsch 2004) eingehen. Die für den GKAP-*Pulldown* transfizierten HEK293 (*human embryonal kidney cells strain 293*)-Zellen wurden nach einem Tag geerntet. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend nach Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0,5% (w/v) Na-Deoxycholat, 5 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS) mit Protease-Inhibitoren (100 µM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Leupeptin) für 15 Min. auf Eis lysiert. Durch die anschließende Zentrifugation (15 Min., 20.000 g, 4°C) wurden die Zelltrümmer entfernt. Je Ansatz wurden 40 µl GKAP-Sepharose durch zweimaliges Waschen mit 1 ml RIPA (kalt) vorbereitet. Der GKAP-Sepharose wurde der Lysatüberstand zugegeben und für 2 Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (1 Min., 1000 g, 4°C) und fünfmalig mit je 1 ml RIPA-Puffer gewaschen. Der Überstand konnte anschließend verworfen werden. Dem GKAP-Sepharosepellet wurde je 50 µl 5x Laemmli zugefügt und die Proben für 5 Min. bei 94°C erhitzt. Daraufhin konnten diese bei -20°C gelagert werden. Die Analyse des Experiments wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe 3.3.1) und anschließendem Western-Blot (siehe 3.3.3) durchgeführt.

3.3.7 *Pulldown*-Experimente mit gereinigten Fusionsproteinen

Die *Pulldown*-Experimente mit gereinigten Fusionsproteinen dienen der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro*. Die gereinigten GST-Fusionsproteine (siehe 3.3.4) wurden hierzu nicht von der Glutathion-Sepharose eluiert. Ein Aliquot von 40 μ l der Sepharose mit gekoppeltem GST-Fusionsprotein wurde mit 1 ml IP-Puffer (50 mM Tris/HCl, 120 mM NaCl, 0,5% NP-40 (v/v), 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen.

Zuvor wurden je Ansatz eine 10 cm Zellkulturschale mit HEK293-Zellen mit dem LRR-PDZ-Konstrukt transfiziert und nach 1-2 Tagen geerntet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimalig mit 10 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend folgte die Lyse mittels 1 ml IP-Puffer pro 10 cm Zellkulturplatte. Der IP-Puffer enthielt die zugesetzten Protease-Inhibitoren Pepstatin A (1 μ g/ml), Leupeptin (10 μ g/ml), PMSF (100 μ M) und Trasylol (20 KiE/ml). Dieser Vorgang wurde mechanisch mittels eines Schabers und dreimaligen Auf- und Absaugens durch eine Spritze mit Kanüle unterstützt. Das Lysat wurde 20 Min. auf Eis gestellt und anschließend bei 20.000 g und 4°C für 15 Min. zentrifugiert. 800 μ l des Lysatüberstandes wurden zu der bereits gewaschenen Sepharose gegeben. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden bei 4°C auf dem Rotator. Anschließend wurden diese Ansätze 2 Min. bei 9000 rpm zentrifugiert und dreimalig mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen. Die Sepharose wurde in Laemmli-Probenpuffer aufgekocht und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert.

3.4 Zellbiologische Arbeitstechniken

3.4.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen embryonalen Nierenzellen HEK293 (ATCC) wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose*, Cambrex) mit 10% hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS, PAA Laboratories) und Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturschalen (Sarstedt) bei 37°C in einer 5%igen CO₂-

Atmosphäre. Zum Umsetzen wurden die Zellen einmal mit 10 ml Versene-Puffer (137 mM NaCl, 8,8 mM HPO₄, 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,4) gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin (0,25% in Versene-Puffer, Invitrogen) für 2 Min. im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 9 ml neuem Wachstumsmedium resuspendiert und 5 Min. bei 100 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in der gewünschten Menge Wachstumsmedium aufgenommen, vereinzelt und in gewünschter Konzentration auf neue Kulturschalen überführt, in denen insgesamt stets 10 ml Medium enthalten waren. Das Passagieren der Zellen erfolgte 2-3 Mal pro Woche.

3.4.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Vor der geplanten Transfektion wurden die Zellen frisch passagiert und für 1-2 Tage kultiviert. Die nun folgende Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte mit einer der beiden nachfolgend dargestellten Methoden:

3.4.2.1 Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Methode

Für eine 10 cm Zellkulturschale wurde ein Ansatz mit 10 µg des gewünschten Plasmids, 64 µl 2 M CaCl₂ und sterilem H₂O ergänzend auf 500 µl in einem sterilem Reaktionsgefäß vorbereitet. 500 µl HBSP-Puffer (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂PO₄, 12 mM Glucose, 50 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, pH 7,05)) wurde unter ständigem Einleiten von steriler Luft tropfenweise mit oben aufgezeigtem Ansatz vermischt. Nach einer Inkubation von 20 Min. bei Raumtemperatur wurden die gebildeten Calciumphosphat-Präzipitate tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 8 Stunden wurde das Medium gewechselt (Sambrook et al. 1989).

3.4.2.2 Transfektion mittels *Fugene 6* (Roche)

Alternativ erfolgte die Transfektion der HEK293-Zellen mittels *Fugene 6* (Roche) nach Angaben des Herstellers, womit sehr gute Ergebnisse erzielt werden konnten.

3.4.3 Kultivierung primärer Hippokampus-Neurone

Am Vortag der Präparation waren für diese verschiedene Vorbereitungen zu treffen. So wurden Deckgläschen (Ø 18 mm, Marienfeld) zur Sterilisation für ca. 4 Stunden

dreimal in Ethanol (100%), anschließend in sterilem Wasser gewaschen, in Glasschalen vereinzelt und für 8 Stunden bei 180°C im Trockenschrank getrocknet. Danach wurden die Deckgläschen in 12-Loch-Zellkulturplatten überführt und mit 1 ml Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml in 0,1 M Boratpuffer, pH 8,5, Sigma) für 3 Stunden beschichtet. Es folgte zweimaliges Waschen mit sterilem Wasser. Die so vorbereiteten Schalen konnten im Kühlschrank verwahrt werden.

Zur Kultivierung primärer Hippokampusneurone wurden 20 Tage alte Embryonen benötigt. Es wurde die Rasse *Rattus norvegicus*, Stamm Wistar aus der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verwandt. Zu diesem Zweck wurde eine trächtige Ratte (E20, Tag der Befruchtung E0) getötet und die Embryonen aus ihrem Körper präpariert. Anschließend wurden die Embryonen auf Eis gelegt und der Kopf vom Körper getrennt. Mit Hilfe eines Binokulars wurde die Präparation fortgesetzt. Die Haut wurde vom Schädel entfernt, anschließend das Gehirn herausgelöst. Vorsichtig wurden die beiden Hemisphären voneinander getrennt und die Meningen abgelöst. Der Hippokampus (siehe Abb.1) wurde nun frei präpariert und in 4,5 ml HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 10 mM HEPES, pH 7,3 aufgenommen, 0,25% (w/v) Trypsin hinzu gegeben und das gut verschlossene Behältnis in einem Wasserbad bei 37°C für 15 Min. geschwenkt. Daraufhin wurden die nun in ihrer Konsistenz bereits veränderten Hippokampi dreimal mit HBSS gewaschen. Es folgte die Triturierung, bei welcher die Neuronen durch Glaspipetten abnehmenden Durchmessers vereinzelt wurden. Hierzu wurden die Glaspipetten zuvor feuerpoliert, um eine Zerstörung der Zellen zu vermeiden. Mittels einer Neubauer-Zählkammer erfolgte die Quantifizierung der Zellen und durch Zugabe von Plattiermedium (MEM (Gibco BRL) mit 0,6% Glucose (w/v) und 10% (v/v) Pferdeserum (Sigma)) wurde eine Konzentration von 200.000 Zellen/ml erreicht. Die Zellsuspension wurde auf die wie oben beschrieben vorbereiteten 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät.

Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C in 5%iger CO_2 -Atmosphäre erfolgte ein Wechsel auf Neurobasal-Medium, welches 2% (v/v) B-27 Supplement, 0,5 mM L-Glutamin und einmalig 25 μM Glutamat (Sigma) enthielt (Brewer et al. 1993). Nach weiteren 2 Tagen wurde dem Medium 6 μM Ara C (Cytosin- β -D-Arabinofuranosid, Sigma) zugesetzt, um als Mitose-Hemmer ein Wachstum von

nicht-neuronalen Zellen zu vermeiden. Die Zellen wurden auf diese Art zunächst für 7 Tage kultiviert, dann transfiziert (siehe 3.4.4) und weitere 7 Tage in Kultur gehalten. Zweimal wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums ausgetauscht.

3.4.4 Transfektion primärer Hippokampus-Neurone

Am siebten Tag nach Präparation der Hippokampus-Neurone wurden diese mittels der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Dazu wurden 5 µg der gewünschten DNA auf 90 µl mit Wasser aufgefüllt und tropfenweise unter ständiger Einleitung steriler Luft mit 10 µl CaCl₂ (2,5 M) versetzt. Es folgte die Zugabe von 100 µl 2xBBS (280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 50 mM BES (N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure), pH 6,90-6,96). Anschließend wurde dieses Gemisch weitere 10 Sek. auf dem Vortexer vermengt. Nach einer Inkubation von 20 Min. bei Raumtemperatur wurden pro Loch 100 µl dieser Lösung auf die Zellkulturplatte gegeben und 2 Stunden bei 37°C und 5%igem CO₂-Gehalt im Inkubator verwahrt. Es folgte dreimaliges Waschen mit HBSS und die Zugabe von 1 ml neuem Neurobasal-Medium (mit 2% (v/v) B-27 Supplement (Gibco) und 0,5 mM L-Glutamin (Gibco)). Die Zellen wurden erneut für 7 Tage kultiviert.

3.4.5 Immuncytochemie primärer Hippokampusneurone

Die primären Hippokampusneurone wurden in Vorbereitung auf die Immuncytochemie für 10 Min. in 0,5 ml 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit je 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml 0,1% Triton X-100 in PBS für 2 Min. permeabilisiert. Es schlossen sich drei Waschschriffe mit je 1 ml PBS an. Durch einstündige Inkubation mit 2% Pferdeserum (Gibco) in PBS bei Raumtemperatur wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in PBS plus 2% Pferdeserum entsprechend verdünnt; die Inkubation erfolgte für 3 Stunden bei Raumtemperatur, alternativ bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung in PBS plus 2% Pferdeserum für 1 Stunde auf die Neuronen gegeben. Die Immuncytochemie der primären Hippokampusneurone erfolgte in einer dunklen Feuchtkammer. Nach dreimaligem

Waschen in PBS und abschließendem Waschen in Wasser konnten die Deckgläschen mit Hilfe eines Heiztisches auf Objektträger in Glyceringelantine eingebettet werden.

3.4.6 Mikroskopische Arbeitstechniken

Zur Auswertung der immuncytochemisch behandelten Präparate kam das Durchlicht- und Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss) mit einer CCD C4742-95-12NRB Digital Kamera (Hamamatsu) unter Verwendung der Software Openlab 2.2.5 (Improvision) zum Einsatz. Des Weiteren wurde zur präziseren Analyse und Dokumentation der Zellpräparate das konfokale Mikroskop DM IRBE von Leica verwendet. Die Bildbearbeitung und -auswertung erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop 6.0 (Adobe System Incorporated).

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation von Interaktionspartnern der LRR-Region des postsynaptischen Proteins Densin-180

Grundlegendes Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Verifizierung von Interaktionspartnern der LRR-Region des Proteins Densin-180. In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits der Nachweis erbracht werden, dass eine Überexpression von Densin-180 in primären Hippokampusneuronen zu einer stark erhöhten Zahl von dendritischen Ausläufern führt und die Induktion der beschriebenen Verzweigungen allein durch die Überexpression der LRR-Region zu erreichen ist. Diese Erkenntnisse bilden den Ausgangspunkt für die Identifikation potentieller Interaktionspartner dieser Region, welche damit im Zentrum weiterführender Überlegungen steht. Vorangehend wurde gezeigt, dass kleine G-Proteine der Ras-Familie (H-Ras, Rap und Ran) mit der LRR-Domäne des Densin-180 assoziieren können (Quitsch 2004). Durch *Pulldown*-Experimente konnte eine Interaktion mit Rap2b, H-Ras und Cdc42 detektiert werden, wobei es nur eine limitierte Evidenz für eine direkte Interaktion gab (Hermainski 2005). Mit dem Protein Cdc42 assoziiert ein Mitglied der Rho-Familie der kleinen G-Proteine mit Densin-180, wobei die G-Proteine dieser Familie hauptsächlich an der Organisation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt sind (Ridley 2001). Zur Identifikation direkter Interaktionspartner für die LRR-Region wurde ein Hefe-2-Hybrid-*screen* durchgeführt. Nach der Überprüfung der Spezifität der identifizierten Interaktionen mittels Kopräzipitationsexperimenten ließen sich β -Spectrin und MACF (*microtubule actin crosslinking factor*) als potentielle Interaktionskandidaten für die LRR-Region von Densin-180 ermitteln (Hermainski 2005).

Klon	Bezeichnung	Datenbankeinträge	Acc.	MW (kD)	AS
16	β -Spectrin	Muscle β -spectrin	NM_001024858.1	268	2111-2328
24	MACF	Microtubule actin cross-linking factor 1	NM_033044	608	5434-5938

Tab. 5: Übersicht über Klone mit einer positiven Reaktion im Hefe-2-Hybrid-screen und damit potentielle Interaktionspartner des Proteins Densin-180

4.1.1 Verifizierung der Interaktion der LRR-Region von Densin-180 mit β -Spectrin durch Kopräzitationen aus HEK293-Zellen

Zur Validierung einer potentiellen Interaktion wurde versucht, die LRR-Region des Densin-180 und β -Spectrin gemeinsam aus Zellen zu präzipitieren. Für das Densin-180 wurde ein Expressionskonstrukt, welches für die LRR-Region in Fusion mit einem PDZ-tag kodiert, verwendet. Im Falle des möglichen Interaktionspartners β -Spectrin wurde das aus dem Hefe-2-Hybrid-screen hervorgegangene cDNA-Fragment im EGFP (*Enhanced green fluorescent protein*)-Vektor eingesetzt. Die HEK293-Zellen wurden mit diesen Plasmiden kotransfiziert. Als Negativkontrolle dienten allein mit der β -Spectrin-cDNA transfizierte HEK293-Zellen, um bei der Präzipitation eine unspezifische Bindung an die Affinitätsmatrix ausschließen zu können. Nach der Lyse der Zellen mittels RIPA-Puffer wurde die LRR-Region mit Hilfe eines C-terminalen Peptids aus dem Protein GKAP, das kovalent an NHS-Sepharose gekoppelt war, präzipitiert. Dieses Peptid bindet an den PDZ-tag, der an die LRR-Region gekoppelt ist. Zur Auswertung wurde das Zelllysate (In) und das Präzipitat (P) mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Zum Nachweis des β -Spectrin-EGFP-Fusionsproteins kam ein monoklonaler GFP-Antikörper zum Einsatz. Aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kopräzitationen lässt sich für β -Spectrin ein schwach positives Signal ablesen (siehe Abb. 6).

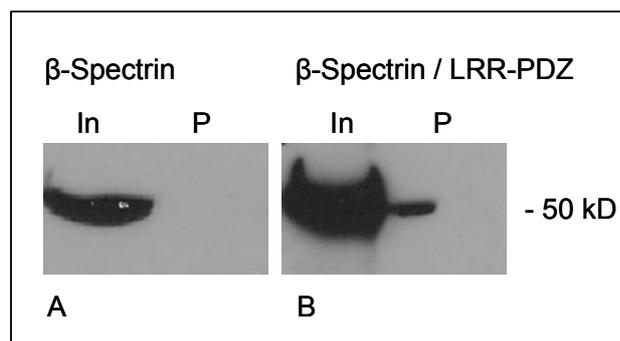


Abb. 6: Kopräzipitation von β-Spectrin und LRR-PDZ aus HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit den für β-Spectrin und LRR-PDZ kodierenden cDNAs kotransfiziert (B). Als Negativkontrolle wurden die HEK293-Zellen ausschließlich mit der für β-Spectrin kodierenden cDNA transfiziert (A). Nach Lyse der Zellen wurde die LRR-PDZ-Region des Densin-180 mit GKAP-Sepharose präzipitiert. Zur Auswertung dieses Kopräzipitationsexperiments wurden Proben des Zellysates (In) und des Präzipitats (P) mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Zum Nachweis des β-Spectrin-EGFP-Fusionsproteins kam ein monoklonaler GFP-Antikörper zum Einsatz.

Die Abb. 6 zeigt, dass sich für β-Spectrin die Spezifität der vermuteten Interaktion mit der LRR-Domäne des Densin-180 durch dieses Experiment bestätigen lässt.

4.1.1.1 Charakterisierung der Interaktion zwischen Densin-180 und β-Spectrin

Der potentielle Interaktionsbereich von β-Spectrin ist ein 219 Aminosäuren großes Fragment vom C-Terminus des Proteins. Dieses enthält eine 112 Aminosäuren große, komplette PH (*pleckstrin homology*)-Domäne sowie einen Bereich von 68 Aminosäuren vor und 39 Aminosäuren nach dieser Domäne. Die PH-Domäne wurde in den Vektor pEYFP (*Enhanced yellow fluorescent protein*) kloniert, um zu untersuchen, ob diese Domäne für die Interaktion verantwortlich ist. Dieses kleinere Fragment konnte jedoch nicht zur Expression gebracht werden, so dass im Rahmen dieser Arbeit innerhalb der oben genannten 219 Aminosäuren kein kleinerer Bereich, welcher für die Interaktion verantwortlich ist, eingegrenzt werden konnte. Um die Interaktion genauer zu charakterisieren, sollte unter anderem endogenes β-Spectrin, welches an Densin-180 bindet, nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde ein Antikörper gegen β-Spectrin erworben. Die Qualität dieses Antikörpers war allerdings nicht ausreichend, da selbst in getestetem Gehirnlisat der Maus kein Protein der entsprechenden Größe erkannt wurde. Auch der daraufhin von einem anderen

anderen Hersteller bezogene Antikörper brachte keine aussagekräftigeren Ergebnisse. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen Densin-180 und β -Spectrin erbracht. Ein Nachweis dieser Interaktion im Gehirngewebe konnte jedoch unter anderem in Ermangelung eines spezifischen Antikörpers nicht durchgeführt werden.

4.1.2 Nachweis der direkten Interaktion zwischen Densin-180 und MACF durch *Pulldown*-Experimente

Für MACF konnte zu diesem Zeitpunkt mit Kopräzipitationen kein entsprechend eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Auf Grund der calciumbindenden *EF-hands* war davon auszugehen, dass die Bindung an die LRR-Domäne calciumabhängig ist und sich somit das EDTA im RIPA-Puffer negativ auf die Interaktion auswirken könnte. Nach mehrmaligem Durchführen der Präzipitation und anschließender Lyse konnten allerdings auch mit Hilfe des weniger stringenten IP-Puffers keine eindeutigen Ergebnisse gewonnen werden, so dass im Folgenden Versuche mit GST-Fusionsproteinen durchgeführt wurden, um Gewissheit über die Rolle des Proteins MACF bezüglich einer potentiellen Interaktion mit Densin-180 zu erlangen.

Zunächst wurde der für den C-Terminus (CT) von MACF (MACF₅₄₃₄₋₅₉₃₈) kodierende Bereich der cDNA in den Vektor pGex-4T-2 kloniert. Das von diesem Vektor kodierte Protein wird im Folgenden als GST-MACF-CT bezeichnet und beinhaltet Anteile einer Spectrin-Domäne, zwei *EF-hands* sowie C-terminal abschließend eine Gas 2 (*Growth arrest-specific 2*)-Domäne. Der C-Terminus von MACF wurde so als GST-Fusionsprotein ebenso GST alleine (kodiert vom leeren pGex-4T-2-Vektor) in *E. coli*-Zellen exprimiert und nach der Reinigung an der Gluthation-Sepharose belassen. Es wurden HEK293-Zellen mit dem LRR-PDZ-Konstrukt (Anteil von Densin) transfiziert, später lysiert und ein *Pulldown* mittels GST und GST-MACF-CT durchgeführt. Eine SDS-PAGE und anschließender Western-Blot dienten der Analyse, wobei ein Anti-SSTRip-PDZ-Antikörper die PDZ-Domäne der LRR-Region detektierte.

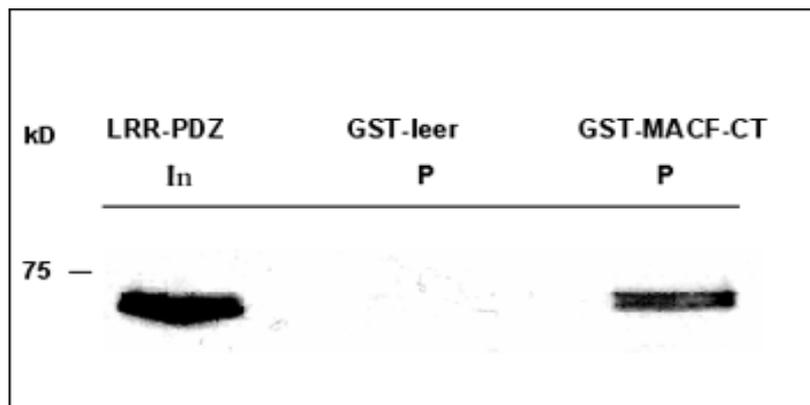


Abb. 7: Pulldown mittels GST-Fusionsproteinen

HEK293-Zellen wurden mit der für LRR-PDZ kodierenden cDNA transfiziert, lysiert und anschließend mittels GST (leer) und GST-MACF-CT präzipitiert. Zur Auswertung der Kopräzipitationsexperimente wurden Proben des Zelllysates (In) und des Präzipitats (P) mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Der LRR-PDZ-Anteil wurde durch einen α SSTRip-PDZ-Antikörper detektiert.

Dieser Versuch zeigt deutlich, dass der C-Terminus des Proteins MACF an die LRR-Region des Densin-180 bindet. Der sichere Nachweis für diesen neuen Interaktionspartner des Densin-180 wurde demgemäß im Rahmen dieser Arbeit mit oben beschriebenem Versuchsaufbau erstmalig erbracht.

MACF ist mit einem Molekulargewicht von 608 kD ein sehr großes Protein mit sowohl Aktin- wie auch Mikrotubuli-bindenden Domänen. Der C-Terminus bestehend aus zwei *EF-hands* und einer Gas 2-Domäne interagiert mit den Mikrotubuli und nimmt somit eine stabilisierende Funktion ein (Leung et al. 1999). Der N-Terminus besitzt eine Aktin-bindende Domäne (*ABD*) bestehend aus zwei CH (calponin-homology)-Domänen. Zentral finden sich 23 Spectrinwiederholungen (Sun et al. 2000). Aus den beschriebenen Ergebnissen lässt sich die Interaktion zwischen MACF und Densin-180 auf die im C-terminalen Bereich befindlichen Domänen begrenzen. Im Folgenden soll diese Interaktion genauer charakterisiert und weiter eingegrenzt werden.

4.1.2.1 Charakterisierung und Eingrenzung der Interaktion zwischen Densin-180 und MACF

Zwecks genauerer Charakterisierung der Interaktion zwischen Densin-180 und MACF wurden zunächst neue Deletionskonstrukte des MACF erstellt. Diesbezüglich wurden die für die Gas 2-Domäne kodierenden Bereiche der cDNA allein bzw. die für die beiden *EF-hands* kodierende cDNA in den pGex-4T-2-Vektor kloniert.

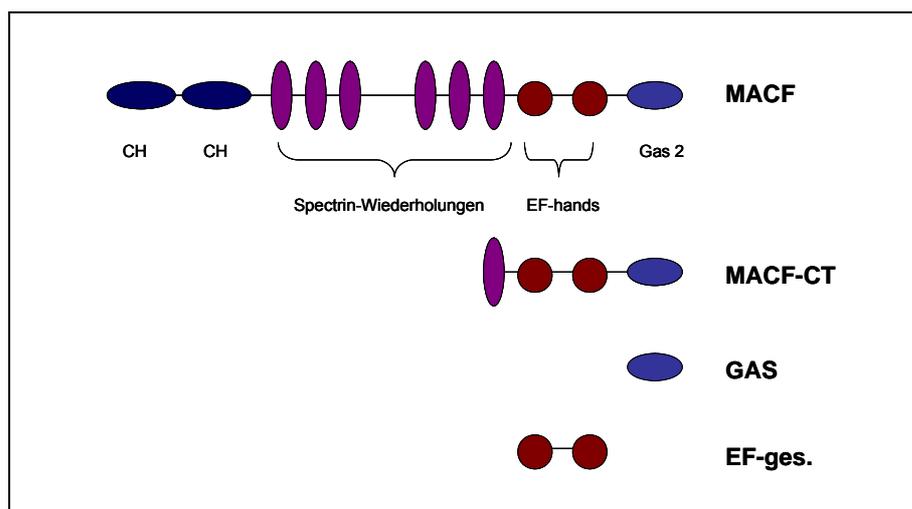


Abb. 8: Übersicht über die MACF-Domänenstruktur

Die Abbildung 8 zeigt eine vereinfachte Übersicht der Domänenstruktur des Proteins MACF (erste Zeile). Der für die Interaktion verantwortliche Bereich besteht aus dem C-Terminus, welcher eine Spectrin-Domäne, zwei *EF-hands* und die Gas 2-Domäne enthält. Es wurden zwei Deletionskonstrukte erstellt, welche zur Expression einzelner Domänen (die Gas 2-Domäne bzw. nur die beiden *EF-hands*) führen.

Zur Identifikation der interagierenden Domäne wurden die für die Gas 2-Domäne bzw. die beiden *EF-hands* kodierende cDNA in den Vektor pGex-4T-2 kloniert (siehe Abb.8). Es entstanden somit nach Expression in *E. coli*-Zellen die GST-Fusionsproteine GST-MACF-EF (MACF₅₅₉₀₋₅₆₅₄) und GST-MACF-GAS (MACF₅₆₆₅₋₅₇₄₃). Diese wurden nach Reinigung an der Gluthation-Sepharose belassen. HEK293-Zellen wurden mit dem bereits bekannten LRR-PDZ-Konstrukt transfiziert und nach ein bis zwei Tagen lysiert. Nach der Durchführung des *Pulldown*-Experimentes wurden die gebundenen Proteine im Western-Blot analysiert. Um die

Bindung der LRR-Region des Densin-180 zu visualisieren, wurde ein Anti-SSTRip-PDZ-Antikörper, der an den PDZ-*tag* des LRR-Fusionsproteins bindet, eingesetzt.

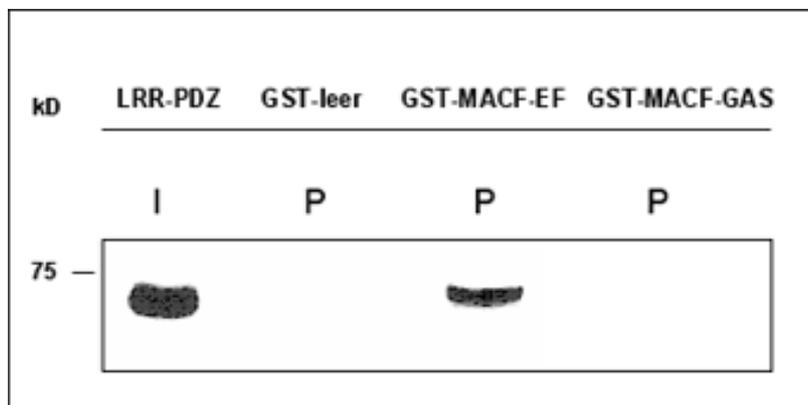


Abb. 9: Pull-down-Experimente zur Interaktion von MACF-Deletionskonstrukten mit der LRR-Region von Densin-180

HEK293-Zellen wurden mit der für LRR-PDZ kodierenden cDNA transfiziert und anschließend mittels GST (leer), GST-MACF-EF und GST-MACF-GAS präzipitiert. Zur Auswertung der Kopräzipitationsexperimente wurden Proben des Zellysates (I) und des Präzipitats (P) mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Der LRR-PDZ-Anteil wurde durch einen α SSTRip-PDZ-Antikörper detektiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die EF-*hands* eine Bindung mit der LRR-Region des Densin-180 eingehen. Auch für die Gas 2-Domäne konnte in wenigen Fällen eine Bindung nachgewiesen werden. Diese war aber nicht ausreichend reproduzierbar. In insgesamt drei von sechs Bindungsexperimenten zeigte sich ein schwach positives Signal für Gas 2. Es könnte also eine zusätzliche Bindung über die Gas 2-Domäne eine Rolle spielen, den sicheren Interaktionspartner bilden dessen ungeachtet die zwei EF-*hands*.

4.1.2.2 Auswirkung verschiedener Calciumkonzentrationen auf diese Interaktion

Nach der nunmehr bestätigten Interaktion zwischen den Proteinen Densin-180 und MACF, welche über die EF-*hands* vermittelt wird, stellte sich die Frage nach einer möglichen Einflussnahme von verschiedenen Calciumkonzentrationen auf besagte Interaktion. Da EF-*hands* als calciumbindende Motive potentiell zu Konformationsänderungen führen können, wurde im Folgenden der Einfluss von Calcium auf die Proteininteraktion genauer untersucht. Zunächst wurde unter 4.1.2 beschriebenes

Pulldown-Experiment unter Verwendung verschiedener Puffer durchgeführt. Zum einen kam der EDTA-haltige RIPA-Puffer zur Anwendung. Zum Vergleich fand der EDTA-freie IP-Puffer Verwendung. Der C-Terminus von MACF wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli*-Zellen exprimiert und nach der Reinigung an der Gluthation-Sepharose belassen. Es wurden HEK293-Zellen mit dem LRR-PDZ-Konstrukt (Anteil von Densin) transfiziert, später lysiert und ein *Pulldown* mittels GST-MACF-CT durchgeführt. Eine SDS-PAGE und anschließender Western-Blot dienten der Analyse, wobei ein Anti-SSTRip-PDZ-Antikörper die PDZ-Domäne der LRR-Region detektierte.

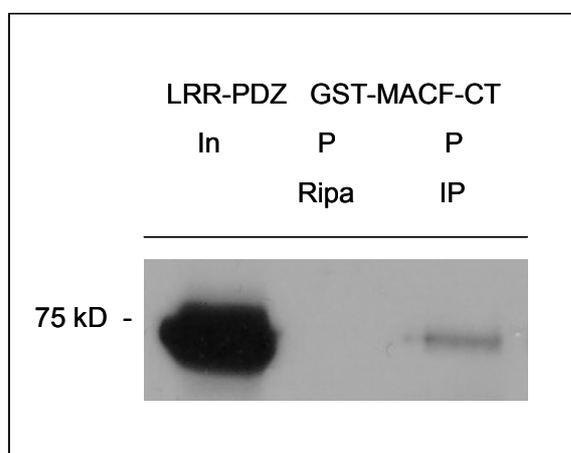


Abb. 10: *Pulldown*-Experimente zur Interaktion von GST-MACF-Fusionsproteinen mit der LRR-Region von Densin-180 unter Verwendung des EDTA-haltigen Ripa-Puffers und des EDTA-freien IP-Puffers

LRR-PDZ wurde in HEK-Zellen exprimiert und anschließend mittels GST-MACF-CT präzipitiert, wobei gegenüberstellend der EDTA-haltige Ripa-Puffer (zweite Spur) und der EDTA-freie IP-Puffer (dritte Spur) Anwendung fanden. Zur Auswertung der Ko-präzipitationsexperimente wurden Proben des Zelllysates (In) und des Präzipitats (P) mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Der LRR-PDZ-Anteil wurde durch einen α SSTRip-PDZ-Antikörper detektiert.

Unter Benutzung von EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-haltigem RIPA-Puffer konnte die Bindung nicht nachgewiesen werden. Unter Verwendung des EDTA-freien IP-Puffers jedoch konnte die Interaktion nachgewiesen werden, so dass eine Calciumabhängigkeit der Interaktion hiermit belegt ist. Bei EDTA handelt es sich um einen Komplexbildner, der Calcium komplexieren kann. Auch Detergenz-Effekte

könnten zu beschriebenen Ergebnis geführt haben. Nachdem im Rahmen dieser Arbeit die Calciumabhängigkeit der neu bestätigten Interaktion verdeutlicht werden konnte, sollte im Folgenden die Interaktion unter Verwendung verschiedener Calciumkonzentrationen weiter differenziert werden. Um möglichen Effekte durch Calciumzugaben zu untersuchen, wurden dem Versuchsansatz während der Inkubation Konzentrationen von 0-500 μM CaCl_2 zugesetzt. Der C-Terminus von MACF wurde dazu erneut als GST-Fusionsprotein ebenso wie der leere pGex-4T-2-Vektor in *E. coli*-Zellen exprimiert und nach der Reinigung an der Gluthation-Sepharose belassen. Es wurden HEK293-Zellen mit dem LRR-PDZ-Konstrukt (Anteil von Densin) transfiziert, später lysiert und ein *Pulldown* mittels GST-leer (leerer pGex-4T-2-Vektor) und GST-MACF-CT durchgeführt. Es kam bei nun folgenden Experimenten stets der IP-Puffer zur Anwendung. Eine SDS-PAGE und anschließender Western-Blot dienten der Analyse, wobei ein Anti-SSTRip-PDZ-Antikörper die PDZ-Domäne der LRR-Region detektierte.

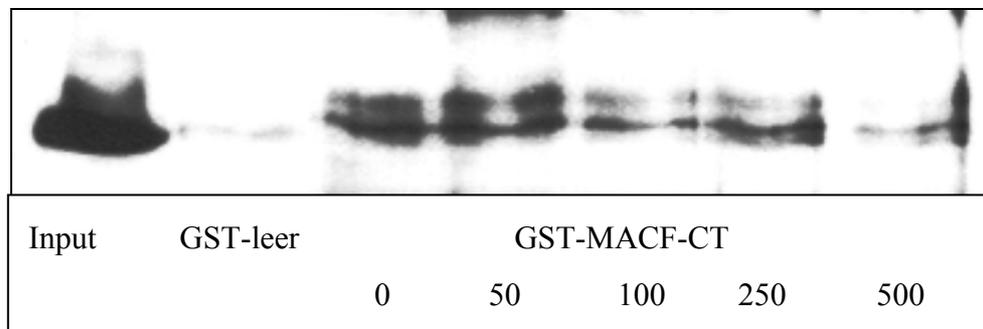


Abb. 11: *Pulldown*-Experimente zur Interaktion von MACF und der LRR-Region von Densin-180 bei verschiedenen Calciumkonzentrationen

HEK293-Zellen wurden mit dem LRR-PDZ-Konstrukt transfiziert, lysiert und anschließend mittels GST-MACF-CT präzipitiert. Um einen möglichen calciumabhängigen Effekt zu untersuchen, wurde dem jeweiligen Versuchsansatz während der Inkubation Konzentrationen von 0, 50, 100, 250 und 500 μM CaCl_2 zugesetzt. Als Negativkontrolle wurde das Zelllysat mit GST-leer präzipitiert. Der LRR-PDZ-Anteil wurde durch einen $\alpha\text{SSTRip-PDZ}$ -Antikörper detektiert.

Das oben beschriebene Experiment wurde dreifach durchgeführt, wobei die abgebildete Bindungstendenz stets reproduzierbar war. Bei einer Calcium-konzentration von

50 μM scheint die Bindung stärker als ohne Zugabe von Calcium. Bei steigenden Calciumkonzentrationen bis zu 500 μM ist die Bindungsstärke tendenziell abnehmend. Zur quantitativen Analyse dieser Beobachtung wurde die Intensität der Proteinbanden im Western-Blot mit dem Programm ImageJ densitometrisch vermessen und die erhobenen Daten graphisch dargestellt.

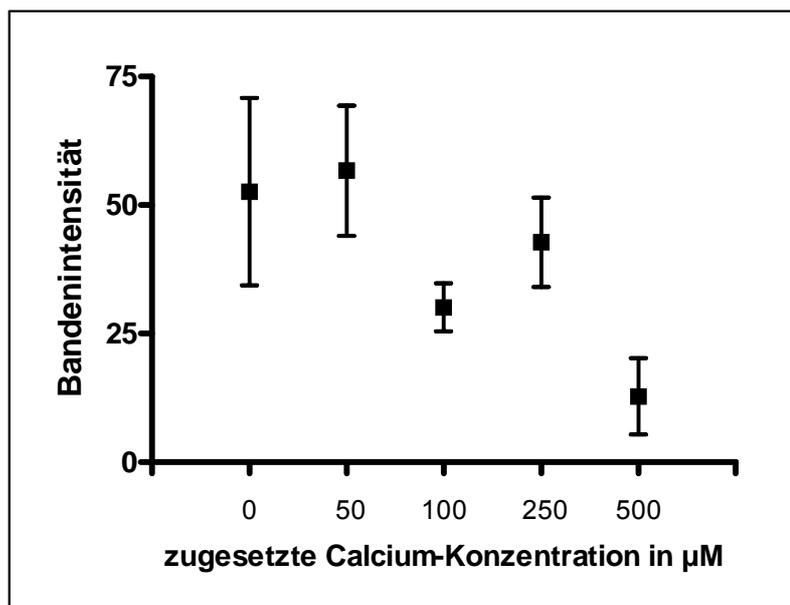


Abb. 12: Quantitative Darstellung der Bandenintensität aus Western-Blots der *Pulldown*-Experimente zur Interaktion von MACF und Densin-180 bei verschiedenen Calciumkonzentrationen

Zur quantitativen Erfassung oben aufgezeigter Beobachtung wurde die Intensität der Proteinbanden in Western-Blots mit dem Programm ImageJ densitometrisch vermessen und die Daten graphisch dargestellt.

Die Graphik zeigt die tendenziell im Western-Blot dargestellte Entwicklung der Bandenintensität unter Zugabe variierender Calciumkonzentrationen. Zur weiteren Veranschaulichung wurden im Folgenden die Quotienten aus Bandenintensität bei Zugabe von bestimmten Calciumkonzentrationen und der Bandenintensität bei fehlender Calciumzugabe berechnet und graphisch dargestellt. Aus den relativen Entwicklungen der Bandenintensitäten wurde die Signifikanz bestimmt.

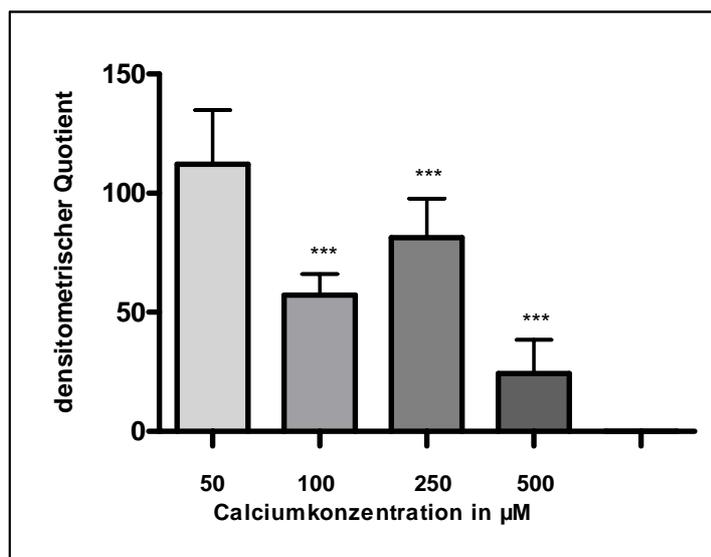


Abb. 13: Quantitative Darstellung der densitometrischen Quotienten aus Bandenintensitäten der Western-Blots der *Pull-down*-Experimente zur Interaktion von MACF und Densin-180 bei verschiedenen Calciumkonzentrationen

Nach der quantitativen Erfassung der Bandenintensitäten (siehe Abb. 12) wurden die Quotienten aus Bandenintensität bei Zugabe von bestimmten Calciumkonzentrationen und der Bandenintensität bei fehlender Calciumzugabe berechnet und graphisch dargestellt. *** $p < 0,05$.

Mit einem p-Wert von $p = 0,3076$ ist die Zunahme der Bandenintensität bei Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Calciumchlorid gegenüber einer fehlenden Zugabe nicht signifikant. Die Tendenz der Zunahme der Bandenintensität zeigte sich jedoch in allen drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die Abnahme der Bandenintensitäten jedoch zeigte sich ab der Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Calciumchlorid mit einem p-Wert $< 0,05$ signifikant.

4.2 Überexpressionsversuche in primären kultivierten Hippokampusneuronen der Ratte

4.2.1 Überexpression von Densin-180 und MACF in primär kultivierten Hippokampusneuronen

Das 180 kD große Protein Densin-180 stellt einen Vertreter der postsynaptischen Dichte dar und könnte Einfluss auf die Ausbildung von Synapsen haben. Nach eindeutiger Belegung der Interaktion von Densin-180 und MACF sollte im weiteren Verlauf die Lokalisation der Proteine in primär kultivierten Hippokampusneuronen untersucht werden. Die gezeigte Interaktion gibt Hinweise auf eine mögliche Kolo-kalisation der beiden Proteine in den Neuronen, so dass dieser Fragestellung im weiteren Verlauf nachgegangen wurde. Darüber hinaus war bereits in vorangegangenen Arbeiten eine durch Densin-180 induzierte Veränderung der Neuronenmorphologie beschrieben worden, so dass die neu belegte Interaktion mit dem Protein MACF auch diesbezüglich Einfluss nehmen könnte.

Zunächst wird im Folgenden die Auswirkung einer Überexpression von Densin-180 in primären kultivierten Hippokampusneuronen dargestellt. Zu diesem Zwecke wurden Hippokampusneurone der Ratte präpariert und eine Woche in Kultur gehalten. Sodann erfolgte die Transfektion mit der für Densin-180 kodierenden cDNA in dem Vektor pEGFP. Nach Kultivierung für eine weitere Woche folgte die Fixierung und Immuncytochemie mit dem polyklonalen Antikörper Anti-EGFP. Dieser Antikörper sowie die grüne Fluoreszenz des EGFP wurden durch den Alexa488 gekoppelten Anti-*rabbit*-IgG-Sekundärantikörper verstärkt.

Zur Untersuchung der Auswirkung einer Überexpression von MACF auf die neuro-nale Morphologie wurden entsprechend kultivierte Neurone nach einer Woche mit einem Gesamtkonstrukt des MACF transfiziert. Dieses Konstrukt beinhaltet zusätzlich einen *flag-tag*, der später durch den Anti-*flag-mouse*-Antikörper detektiert wurde. Nach Kultivierung für eine weitere Woche folgte die Fixierung und Immun-cytochemie mit oben genanntem Primärantikörper. Als Sekundärantikörper fand ein Cy3 (Cyanin3) -gekoppelter Anti-*mouse*-IgG-Antikörper seinen Einsatz.

Ergänzend wurden zum Vergleich kultivierte Neurone mit dem Leervektor pEYFP transfiziert, welcher die Neurone vollständig ausfüllt. Dieser wurde später ebenfalls durch den polyklonalen Antikörper Anti-EGFP detektiert und durch den Alexa488 gekoppelten Anti-*rabbit*-IgG-Sekundärantikörper verstärkt. Es folgte in jedem Fall eine Analyse und Dokumentation der Ergebnisse durch Fluoreszenzmikroskopie.

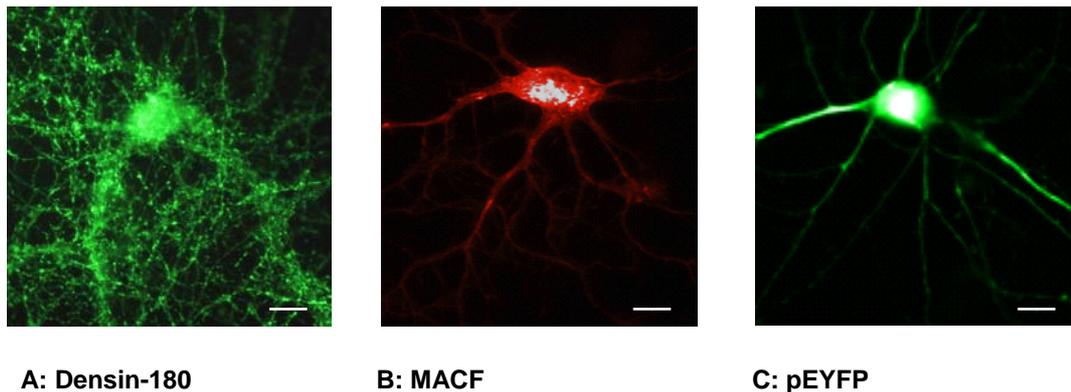


Abb. 14: Überexpression von Densin-180 (A), MACF (B) und dem Leervektor pEYFP (C) in primären kultivierten Hippokampusneuronen

Hippokampusneurone der Ratte wurden präpariert und eine Woche in Kultur gehalten. Es folgte die Transfektion mit der für Densin-180 kodierenden cDNA in dem Vektor pEGFP (A), der für MACF kodierenden cDNA in einem *flag-tag*-haltigem Vektor (B) sowie zum Vergleich mit dem Leervektor pEYFP. Nach Kultivierung für eine weitere Woche wurden die Neurone fixiert und im Falle (A) und (C) mit dem polyklonalen Anti-EGFP Antikörper gefärbt. Dieser Antikörper wurde durch den Alexa488 gekoppelten Anti-*rabbit*-IgG-Sekundärantikörper verstärkt. Im Falle (B) kam ein Anti-*flag-mouse*-Antikörper zum Einsatz, welcher durch den Cy3 (Cyanin3)-gekoppelten Anti-*mouse*-IgG-Antikörper verstärkt wurde. Es folgte eine Analyse und Dokumentation der Ergebnisse durch Fluoreszenzmikroskopie. Der weiße Balken entspricht 20 μm .

Die Überexpression von Densin-180 führt zu einer eindrucksvollen Ausbildung von hochgradig verzweigten dendritischen Ausläufern. Diese Verzweigungen führen wiederum zur Bildung von netzartigen Strukturen.

4.2.2 Lokalisation von Densin-180 und MACF in primären kultivierten Hippokampusneuronen

Zur Klärung der Frage, ob die Proteine MACF und Densin-180 kolokalisieren, wurde eine Kotransfektion durchgeführt. Erneut wurden präparierte Hippokampusneurone der Ratte kultiviert und am siebten Tag transfiziert. Nach erneuter einwöchiger Kultivierung folgte am Tag 14 die Fixierung und Färbung mit Antikörpern. Es kamen die schon beschriebenen Primär- und Sekundärantikörper (siehe 4.2.1) zum Einsatz. Anschließend wurden die fixierten Neurone mittels eines konfokalen Mikroskops untersucht, um Aussagen über die Lokalisation der Proteine treffen zu können.

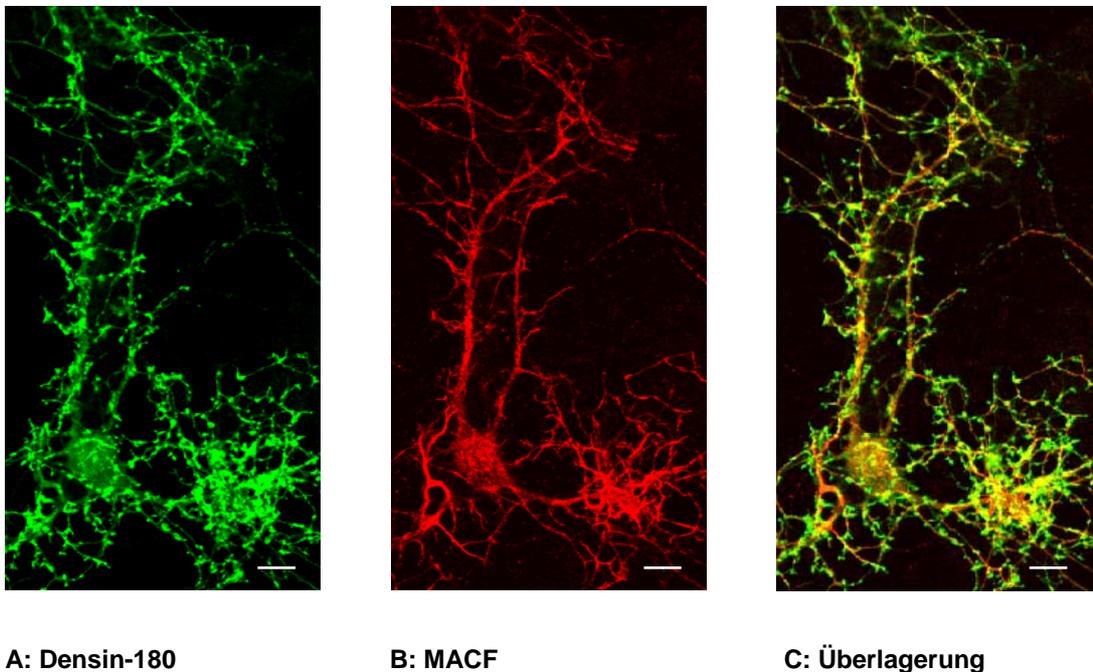


Abb. 15: Koexpression von Densin-180 und MACF in primär kultivierten Hippokampusneuronen

Sieben Tage nach der Präparation wurden primäre Hippokampusneurone mit Densin-180 (in pEGFP) und MACF (Gesamtkonstrukt mit *flag-tag*) kotransfiziert. Nach weiteren sieben Tagen wurden die Neurone fixiert und die exprimierten Proteine mittels Immuncytochemie nachgewiesen. Densin-180 wurde dabei mit dem polyklonalen Anti-EGFP-Antikörper / Alexa-gekoppeltem Anti-*rabbit* IgG gefärbt. MACF wurde mit dem Anti-*flag*-Antikörper / Cy3-gekoppeltem Anti-*mouse* IgG nachgewiesen. Die Lokalisation der Proteine wurde mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops analysiert. Ganz rechts ist die Überlagerung beider Färbungen dargestellt. Der weiße Balken entspricht 20 μm .

Auch die Kotransfektion der Proteine MACF und Densin-180 führt zu einer deutlichen Veränderung in der Neuronenmorphologie. Die transfizierten Neurone weisen eine stark erhöhte Zahl an dendritischen Ausläufern gegenüber ausschließlich mit dem Leervektor pEYFP transfizierten Neurone aus. Dabei befindet sich das Protein Densin-180 gehäuft punktförmig als Ansammlung an dendritischen Verzweigungen (siehe Abb. 15A). Das Protein MACF zeichnet sich dagegen durch eine feingliedrige, ebenfalls bis in die Peripherie der dendritischen Verzweigungen reichende, Verteilung aus (siehe Abb. 15B). In der Überlagerung (siehe Abb. 15C) erkennt man an der Gelbfärbung die Kolokalisation der Proteine MACF und Densin-180. Diese Abbildung stützt die Annahme der Interaktion der beiden Proteine. In der Abbildung 15C wird sehr deutlich, dass die beiden Proteine partiell kolokalisiert sind.

4.2.3 Quantitative Analysen der dendritischen Verzweigungen und Endpunkte

Um die Auswirkung einer zusätzlichen Transfektion von MACF auf die durch Densin-180 induzierten morphologischen Veränderungen zu überprüfen, wurde im Folgenden eine quantitative Auswertung durchgeführt. Hierfür wurden Neurone nach sieben Tagen in Kultur mit einem vollständigen Densin-180-Konstrukt im Vektor pEGFP-C1 und dem Gesamtkonstrukt MACF kotransfiziert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die ausschließlich mit dem Densin-180-Konstrukt transfiziert wurden. Als Parameter wurden die Zahl der dendritischen Verzweigungspunkte sowie die Endpunkte bestimmt. Um die Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden Neurone aus fünf unabhängigen Präparationen transfiziert. Die Densin-EGFP-Autofluoreszenz wurde mit Hilfe des polyklonalen EGFP-Antikörpers und des Alexa488 gekoppelten anti-*rabbit*-IgG verstärkt; MACF wurde mit dem *aflag*-Antikörper und dem Cy3 gekoppelten anti-*mouse*-IgG detektiert. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops erstellt. Zur Quantifizierung wurde ein Bereich von 175x175 μm aufgenommen, wobei der Zellkörper des Neurons in der Bildmitte plaziert wurde. Alle Verzweigungs- und Endpunkte wurden manuell mit Hilfe von Adobe Photoshop 6.0 markiert und ausgezählt. Zur Kontrolle der statistischen Signifikanz der Daten wurde ein T-Test durchgeführt. Mit einem p-Wert $< 0,0001$ ergab sich für beide Auszählungen ein signifikant verändertes Er-

gebnis. Insgesamt wurden sowohl für mit Densin-EGFP transfizierte als auch für mit MACF und Densin-EGFP kotransfizierte Neurone jeweils 30 Zellen ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in der Abbildung 16 dargestellt.

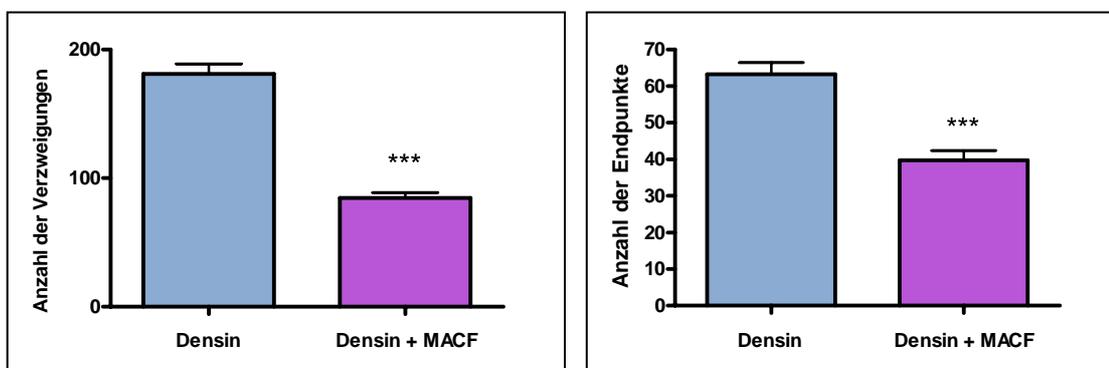


Abb. 16: Quantitative Analyse der dendritischen Verzweigungen und Endpunkte in primär kultivierten Hippokampusneuronen

Bei der Auswertung wurden für die Expression von Densin (blau) $n=30$, für die Koexpression von Densin und MACF (violett) $n=30$ Zellen berücksichtigt. *** $p < 0,0001$.

Neurone, welche Densin-180 überexprimieren, zeigen eine sehr hohe Anzahl dendritischer Verzweigungen (\bar{O} 181,1). Die durch eine Überexpression von Densin-180 gebildeten dendritischen Verzweigungen scheinen häufig wieder miteinander zu verschmelzen; es resultiert die Ausbildung gitterartiger Strukturen (siehe Abb. 14A). Wird Densin-180 hingegen gleichzeitig mit MACF transfiziert, reduziert sich die Anzahl der Verzweigungen deutlich auf \bar{O} 84,5. Dieser Wert entspricht einer Reduktion auf lediglich 46,7% der ursprünglichen, durch Densin-180 induzierten, Verzweigungen. Die zweite Analyse, die Auszählung der dendritischen Endpunkte, führte zu einem tendenziell gleichen Ergebnis, wobei die Auswirkungen nicht ganz so stark ausfielen wie bei den Verzweigungen. Bei den für Densin-180 ermittelten \bar{O} 63,2 Endpunkten führt eine gleichzeitige Transfektion von Densin-180 und MACF ebenfalls zu einer Reduktion. Die Abnahme der Endpunkte auf \bar{O} 39,7 entspricht so 62,8% des Ausgangswertes.

4.3 Versuche im Rahmen der Erstellung eines Antikörpers gegen MACF

Um genauere Erkenntnisse über die Funktion von MACF zu gewinnen, wurde es erforderlich, einen Antikörper gegen MACF zu erstellen. Zu diesem Zweck fand das Protein GST-MACF-CT (siehe 4.1.2) als Antigen Verwendung.

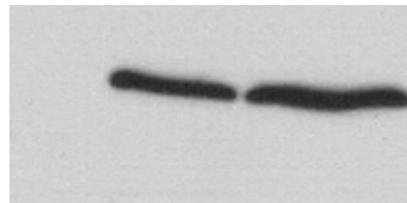
Für die Herstellung eines polyklonalen Antiserums wurde somit zunächst MACF-CT als GST-Fusionsprotein in *E. coli* Zellen exprimiert und aufgereinigt. Aufgrund der stets sehr geringen Menge an aufgereinigtem Protein wurde diese Expression und Aufreinigung mehrfach in Parallelansätzen durchgeführt, um eine ausreichende Proteinmenge zu gewinnen. Das aufgereinigte Fusionsprotein wurde gegen PBS dialysiert und zur Immunisierung von zwei Kaninchen an die Firma BioGenes versandt. Beiden Tieren wurde am Tag 0 eine Serumprobe (Präimmunserum) entnommen und anschließend die Immunisierung am Tag 0 durchgeführt. Es folgten *Booster*-Injektionen an den Tagen 7, 14 und 28. Am Tag 28 wurden je Tier 20 ml Antiserum entnommen. Zur potentiellen Verbesserung der Antiserumqualität wurde eine erneute *Booster*-Injektion am Tag 56 durchgeführt, woraufhin am Tag 63 erneut 20 ml Antiserum je Kaninchen entnommen wurden. Diese erneute Injektion und Antiserumgewinnung erbrachte allerdings keine weiteren Vorteile, so dass im Folgenden immer mit den Antiseren vom Tag 28 gearbeitet wurde. Die beiden Tiere (8375, 8376) wurden nach dem Tag 63 getötet und kein weiteres Antiserum entnommen. Um die Spezifität zu testen, wurden HEK293-Zellen mit einem Expressionsvektor für den C-Terminus des MACF in Fusion mit EYFP transfiziert und das Zelllysate im SDS-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle diente Zelllysate von untransfizierten HEK293-Zellen. Als Antikörper wurde das Antiserum von Tag 28 des einen Tieres verwendet. Als Negativkontrolle wurde das Präimmunserum von Tag 0 eingesetzt. Im Western-Blot erkennt der erstellte MACF-Antikörper in den transfizierten HEK293-Zellen ein Protein bei ca. 53 kD, was der erwarteten Größe des exprimierten Fusionsproteins entspricht. In untransfizierten HEK293-Zellen fehlt dieses Signal.

Tier 3876

Präimmunserum



Antiserum



- 50 kD -

Abb. 17: Analyse von GST-MACF-CT Antikörper-Seren

Lysat von HEK293-Zellen, die mit MACF-CT in pEYFP transfiziert wurden (zwei Banden) und Lysat von untransfizierten HEK293-Zellen wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert.

4.3.1 Anwendung des neuen Antikörpers in transfizierten HEK293-Zellen

Nach Herstellung des Antikörpers gegen MACF sollte nun versucht werden, auch das in HEK293-Zellen überexprimierte Protein MACF mit Hilfe des neuen Antikörpers zu detektieren. Auf Grund der Größe von 608 kD war es ausgesprochen schwierig, das Protein im SDS-Gel laufen zu lassen und es im Western-Blot zu detektieren. Es wurden daher verschiedene Elemente des Versuches variiert. Nachfolgend beschriebenes Verfahren führte zum besten und erfolgreichen Ergebnis: HEK293-Zellen wurden mit dem Gesamtkonstrukt MACF transfiziert, anschließend lysiert und ein SDS-Gel gegossen, dessen Trenngel eine Acrylamidkonzentration von 4% besaß. Es wurde in die erste Spur der Marker *Hi-Mark* gegeben, welcher seine größte Proteinmarkerbande bei 460 kD besitzt. In die zwei folgenden Kammern wurde jeweils Zelllysat der mit MACF transfizierten HEK293-Zellen pipettiert. Das Gel wurde so lange laufen gelassen bis ausschließlich die 460 kD-Bande am unteren Ende des Gels zu sehen war. Anschließend wurden die Proteine mittels Nass-Blot auf die Membran übertragen. Der Blot erfolgte zunächst 4 h bei 100 V, anschließend wurde die Voltzahl über Nacht für 16 h auf 15 V reduziert und die gesamte Apparatur gekühlt. Am nächsten Tag erfolgte der Blotvorgang erneut bei 100 V für 3 h. Nach Blocken der Membran wurde der neu erstellte Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt und anschließend durch einen *Anti-rabbit*-Antikörper gekoppelt an *horseradish peroxidase* (HRP) nachgewiesen. Die erhaltene Qualität

der Ergebnisse entspricht auf Grund der extremen Verhältnisse nicht dem in dieser Arbeit üblichen Standard. Es werden aber zwei Banden, welche deutlich größer als 460 kD sind, erkennbar. Zur Verifizierung, dass es sich bei diesen Banden tatsächlich um das transfizierte Protein MACF handelt, wurden oben genannte Membranen mit einem Anti-*flag*-Antikörper, welcher den *flag-tag* des transfizierten Protein MACF detektiert, inkubiert. Die folgende Abbildung 17 zeigt, dass die Banden übereinstimmen und damit der Nachweis erbracht wurde, dass es sich bei dem mittels des neu hergestellten Antikörpers visualisierten Protein um MACF handelt.

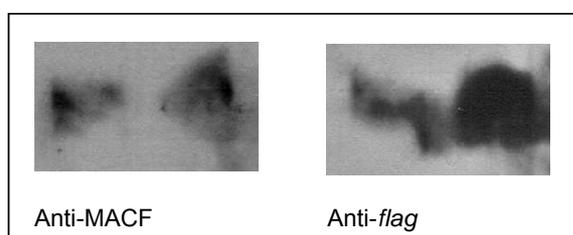


Abb. 18: HEK293-Zellen wurden mit dem Gesamtkonstrukt MACF transfiziert, das Zelllysate jeweils doppelt aufgetragen

Links: Anti-MACF (neu erstellter Antikörper)

Rechts: Anti-*flag* (Kontrolle)

4.3.2 Anwendung des neuen Antikörpers in Neuronen

Nachdem der Antikörper das überexprimierte MACF in HEK293-Zellen erkennen konnte, war es nun das Ziel, endogenes MACF in Neuronen nachzuweisen. Hierzu wurden Hippokampusneurone 9 Tage in Kultur gehalten und anschließend fixiert. Der neu erstellte Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt und im ersten Experiment mit der GST-Matrix gesättigt. Dieser Teil diente der Kontrolle, da die GST-Matrix keinen Angriffspunkt für den neu erstellten Antikörper bieten sollte, so dass dieser in den Hippokampusneuronen spezifisch an das endogene MACF binden kann. Im zweiten Teil des Experimentes fand eine Kompetition mit entsprechend passendem Antigen statt. Der Antikörper wurde mit der GST-MACF-CT-Matrix gesättigt, so dass vornehmlich unspezifische Bindungssignale erhalten

wurden. In jedem Fall wurde der Erstantikörper mit dem Cy3-arabbit-Sekundärantikörper gefärbt.

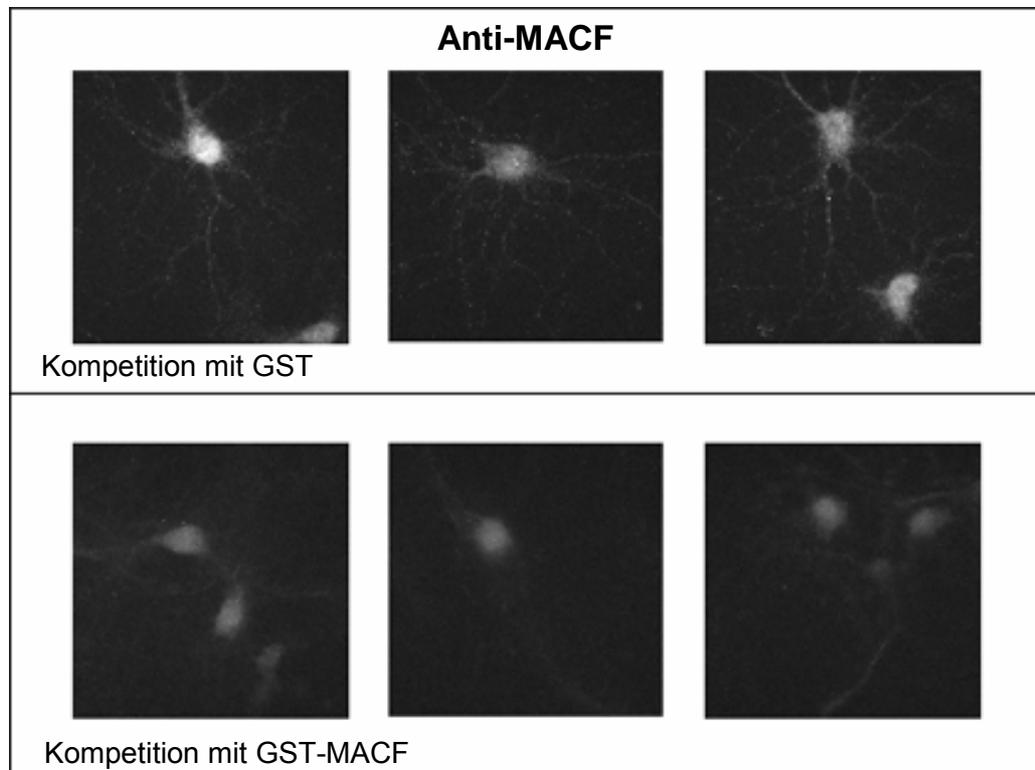


Abb. 19: Test des α MACF-Antikörpers:

oben: Anti-MACF 1:1000+GST

unten: Anti-MACF 1:1000+GST-MACF-CT

Kultivierte Hippokampusneurone wurden 9 Tage in Kultur gehalten und anschließend fixiert. Der neu erstellte Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt und im ersten Fall mit der GST-Matrix als Kontrolle inkubiert. Im zweiten Fall wurde der Antikörper mit der GST-MACF-CT-Matrix gesättigt, so dass hier ausschließlich unspezifische, nicht dem Antikörper zuzuschreibende Signale erhalten wurden.

Die Abbildung 19 zeigt, dass der neu erstellte Antikörper MACF spezifisch in primär kultivierten Neuronen erkennt. Das 608 kD große Protein ist sowohl im Zellkörper als auch in den dendritischen Verzweigungen lokalisiert, wo es zum Teil zu punktförmigen Anreicherungen kommt.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionen der LRR-Region des Proteins Densin-180 mit anderen Proteinen. Da bereits allein die LRR-Region von Densin-180 zu einer stark erhöhten Zahl von dendritischen Verzweigungen führt, könnten potentielle Interaktionspartner Einfluss auf die Neuronenmorphologie und dabei insbesondere auf die Ausbildung von dendritischen Verzweigungen nehmen. Die Identifizierung dieser Protein-Protein-Interaktion könnte somit Aufschlüsse über die synaptische Plastizität erbringen und somit Rückschlüsse auf komplexe Prozesse wie Lernen und Gedächtnisbildung ermöglichen.

5.1 Charakterisierung der Interaktion zwischen Densin-180 und β -Spectrin

Im Rahmen eines vorausgegangenen Hefe-2-Hybrid-*screens* wurde zum einen β -Spectrin als möglicher Interaktionspartner von Densin-180 identifiziert. Durch Kopräzipitationsexperimente konnte dieses Protein in dieser Arbeit als möglicher neuer Interaktionspartner von Densin-180 bestätigt werden (siehe 4.1.1). β -Spectrin ist ein Mitglied der Spectrin-Superfamilie, zählt zu den Cytoskelett-Proteinen und ist ubiquitär in Eukaryonten exprimiert (Ursitti et al. 2001). β -Spectrin bildet Heterodimere, welche aus nicht-identischen α - und β -Untereinheiten aufgebaut sind (Beck und Nelson 1996). Diese Untereinheiten assoziieren Seite an Seite in antiparalleler Anordnung zu einem 10 nm langen, flexiblen Dimer. Die Dimere wiederum lagern sich zu Tetrameren beziehungsweise *in vivo* zu Oligomeren zusammen (Winkelmann und Forget 1993). Die α -Untereinheit beinhaltet eine Bindungsstelle für Calmodulin, welches im Gehirn stark angereichert ist und mit dem NMDA-Rezeptor assoziiert (Riederer et al. 1986). Die β -Untereinheit bietet in phosphorylierter Form eine Bindungsstelle für *brain syndein*/Ankyrin und somit eine Verbindung zu Membranproteinen. Die Spectrine sind in diverse zelluläre Funktionen involviert. Sie reichen von der Aufrechterhaltung der Zellstruktur in Erythrozyten bis hin zur post-

synaptischen Differenzierung im Nervensystem (Beck und Nelson 1996). Humanes nicht-erythrozytäres β -Spectrin ist mit β -Spectrin I Σ 2 in Muskelgewebe und Gehirn koexprimiert, wobei eine unterschiedliche zelluläre Verteilung und eine entwicklungsabhängige Expression angenommen wird (Winkelmann und Forget 1993). Die Funktion und Wirkungsweise der nicht-erythrozytären Spectrine ist derzeit noch nicht abschließend untersucht.

Bei dem für die neu belegte Interaktion relevanten Interaktionsbereich innerhalb des Proteins β -Spectrin handelt es sich um ein 219 Aminosäuren großes Fragment. Dieses enthält eine 112 Aminosäuren große, komplette PH-Domäne sowie einen Bereich von 68 Aminosäuren vor und 39 Aminosäuren nach dieser Domäne. Es ist daher zu vermuten, dass als einzig vollständige Domäne die PH-Domäne für die Interaktion verantwortlich ist. PH-Domänen spielen in der Bindung von Proteinen an Membranlipide eine große Rolle. In der Literatur finden sich aber auch verschiedene Protein-Protein-Interaktionen, welche durch PH-Domänen vermittelt werden (Yamamoto et al. 1999). Beispielhaft können an dieser Stelle Interaktionen mit den $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen ($G\beta\gamma$) sowie mit der Proteinkinase C, ebenfalls durch PH-Domänen vermittelt, angeführt werden (Touhara et al. 1994, Yao et al. 1994).

Wie die erythrozytären Spectrine binden auch die nicht-erythrozytären Spectrine über verschiedene Ankyrin-Spezies an Membranionenkanäle und -pumpen. Die extrem hohe Konzentration von β -Spectrin I Σ 2 innerhalb der PSD und in einzelnen cytoplasmatischen Kompartimenten lässt vermuten, dass dieses Spectrin eine zentrale Rolle in der Organisation der topographischen Anordnung von Rezeptoren und cytoplasmatischen Proteinkomplexen einnimmt (Malchiodi-Albedi et al. 1993). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Interaktion zwischen β -Spectrin und Densin-180 leider nicht *in vivo* bestätigt werden. Da Spectrine an Aktinfilamente binden (BurrIDGE et al. 1982), lässt die potentielle Interaktion jedoch eine weitere Verbindung des NMDA-Rezeptors indirekt über Densin-180 zum Cytoskelett vermuten.

5.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen Densin-180 und MACF

Weiterhin wurde durch einen Hefe-2-Hybrid-*screen* MACF als möglicher Interaktionspartner von Densin-180 identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Interaktion durch einen *Pulldown* mittels GST-Fusionsproteinen erstmalig bestätigt werden (siehe 4.1.2). MACF, auch ACF7 (*actin crosslinking family 7*) genannt, ist mit einer Größe von 608 kD ein außerordentlich großes Protein mit sowohl Aktin- wie auch Mikrotubuli-bindenden Domänen (Sun et al. 2000, Lin et al. 2005). Das Protein MACF zählt zur Familie der Plakine (Leung et al. 1999), einer Proteinfamilie, der eine essentielle Bedeutung im Hinblick auf die Ausbildung der Gewebearchitektur zugeschrieben wird. Plakine verbinden die Filamente des Cytoskeletts miteinander und heften diese an membranassoziierte Komplexe an Zellverbindungen (Ruhrberg und Watt 1997). Für diese Familie wurde ebenfalls der Begriff der Cytoskelett-Linkerproteine geprägt. Zur Übersicht dient die folgende Abbildung mit der allgemeinen Domänenarchitektur der Plakine (siehe Abb. 21, erste Zeile), welche die CH (*calponin-homology domain*)-Domänen und die Plakindomäne am N-Terminus, eine zentrale *coiled-coil rod*-Domäne und ein C-terminales Ende, bestehend aus mehreren Plakin- und Spectrinwiederholungen sowie zwei EF-hands und einer Gas 2-Domäne beinhaltet (Jefferson et al. 2004). Ergänzend folgen schematische Darstellungen der spezifischen Domänenstruktur der einzelnen Plakine MACF, BPAG 1a, Desmoplakin und Envoplakin.

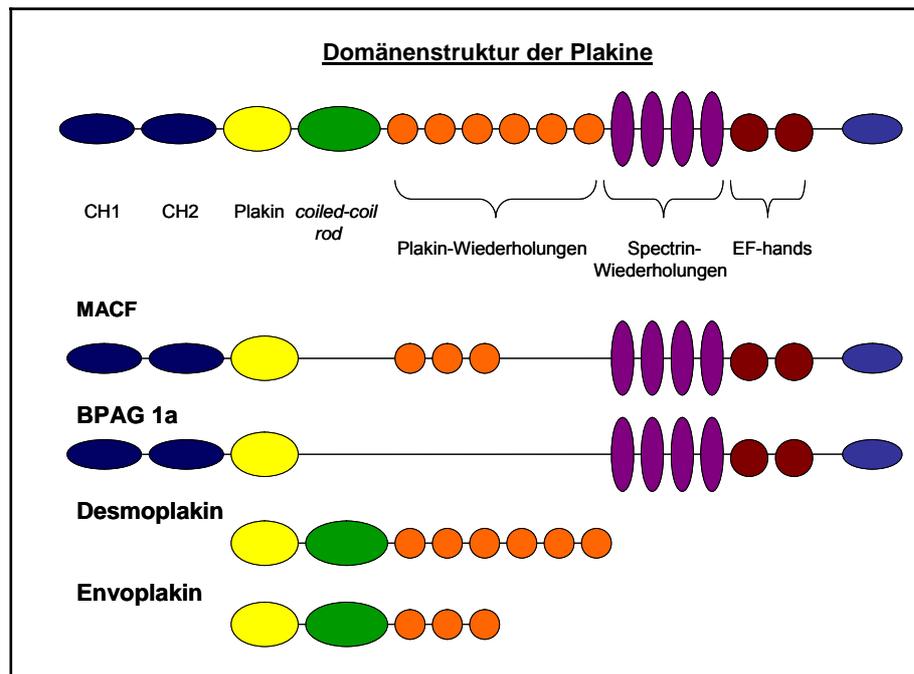


Abb.21: Domänenstruktur der Plakine

Die Abbildung 21 gibt eine Übersicht über die allgemeine Domänenarchitektur der Plakine mit den CH-Domänen und der Plakindomäne am N-Terminus, einer zentralen *coiled-coil rod*-Domäne und einem C-terminalen Ende, bestehend aus mehreren Plakin- und Spectrinwiederholungen sowie zwei EF-hands und einer Gas 2-Domäne (siehe erste Zeile) (Jefferson et al. 2004). Ergänzend folgen schematische Darstellungen der spezifischen Domänenstruktur der einzelnen Plakine MACF, BPAG 1a, Desmoplakin und Envoplakin.

Es existieren enge Parallelen zwischen den Strukturen der Zelladhäsion im Falle der Säuger und der Invertebraten. So wurden Plakinhomologe in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* auf der Suche nach Mutationen, die Defekte in der Zelladhäsion und -morphologie verursachen, gefunden. Das *D. melanogaster* Plakinhomolog *kakapo* wurde so identifiziert (Jefferson et al. 2004). In Embryonen mit Mutationen innerhalb des *kakapo*-Gens fanden sich Auffälligkeiten im zentralen Nervensystem mit in bestimmten Anteilen signifikant geringeren Größen der Dendriten (Prokop et al. 1998). Für das Plakin MACF existieren vier bekannte Isoformen (MACF1-4) (Gong et al. 2001). Der C-Terminus, bestehend aus zwei EF-hands und einer Gas 2-Domäne, interagiert mit den Mikrotubuli und stabilisiert diese somit (Leung et al. 1999). Der N-Terminus von MACF besitzt eine Aktin-

bindende Domäne (ABD), bestehend aus CH-Domänen, sowie einer Plakindomäne. Zentral finden sich 23 Spectrinwiederholungen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei der Charakterisierung der genannten Interaktion die beiden *EF-hands* als für die Interaktion mit Densin-180 entscheidende Proteinbereiche identifiziert werden (siehe 4.1.2.1). Die *EF-hand* ist ein calciumbindendes Motif, welches eine essentielle Rolle in zellulären Signalwegen spielt. Dieses Motif wurde ursprünglich in dem Protein Parvalbumin entdeckt. Es wurde *EF-hand* benannt, da die beteiligten Helices in Parvalbumin als E und F bezeichnet wurden und die räumliche Anordnung an eine Hand mit ausgestreckten Daumen und Zeigefinger erinnert. Damit entsteht das für die *EF-hand* charakteristische *Helix-Loop-Helix*-Motif, wobei bei der Vorstellung einer Hand mit ausgestrecktem Daumen (*F-Helix*) und Zeigefinger (*E-Helix*) das Calciumion genau in der Beuge (*Loop*) zwischen den beiden Fingern sitzt.

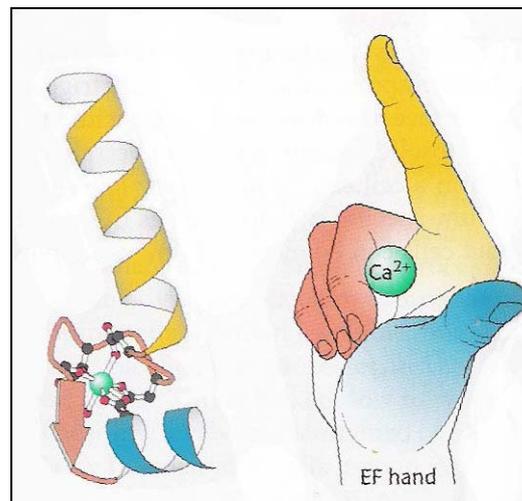


Abb. 22: EF-hand

Die *EF-hand*, aufgebaut aus einer *Helix-Loop-Helix*-Struktur, ist bei vielen calciumbindenden Proteinen die Bindungsstelle für Calcium. Die Abbildung stellt die charakteristische *Helix-Loop-Helix*-Struktur der *EF-hand* mit dem gebundenen Calciumion schematisch dar: *E-Helix* (gelb), *F-Helix* (blau), Calciumion (grün). Das Calciumion ist dabei von sechs Sauerstoffatomen des Proteins und einem Sauerstoffatom gebundenen Wassers umgeben (nach Berg et al. 2002).

Da eine Bindung von Calcium an die *EF-hands* potentiell zu Konformationsänderungen führt und damit die Bildung einer neuen Protein-Interaktionsfläche auslösen kann (Gifford et al. 2007), wurde im Rahmen dieser Arbeit die Calciumabhängigkeit der neu bestätigten Interaktion untersucht. Grundsätzlich bilden Proteine mit *EF-hands* eine große Familie mit weit divergierenden Funktionen. *EF-hands* treten häufig in Paaren auf, so dass viele Proteine zwei, vier oder sechs *EF-hands* besitzen (Gifford et al. 2007). Es finden sich mehrere Beispiele für calciumabhängige Proteininteraktionen, welche über *EF-hands* vermittelt werden. So besitzt Calmodulin vier *EF-hands* und damit Bindungsstellen für Calcium. Steigt der Calciumspiegel an, wird Calmodulin durch Bindung von Calciumionen aktiviert und kann wiederum eine Reihe von Enzymen aktivieren. Ein Ziel des aktiven Calcium-Calmodulin-Komplex ist beispielsweise die CaMK (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase*). Darüber hinaus finden sich in der Literatur weitere Beispiele für calciumabhängige Interaktionen. So bindet das Protein ALG-2 (*apoptosis-linked gene 2*), zugehörig zur Familie der PEF (*penta-EF-hand*)-Proteine, calciumabhängig die Proteine Alix (*ALG-2-interacting protein 1*), Annexin VII, Annexin XI und TSG101 (Satoh et al. 2002, Katoh et al. 2005).

In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsanalyse zeigte sich bei Zugabe von Calcium in Höhe von 50 μM CaCl_2 eine im Western-Blot quantitativ sichtbar verstärkte Bindung gegenüber keiner Zugabe von Calcium. Nach Zugabe von Calcium ab einer Höhe von 100 μM CaCl_2 zeigte sich eine signifikante Abnahme der Bindungsintensität (siehe 4.1.2.2). Unter Benutzung von EDTA, welches Calcium komplexiert, konnte die Bindung nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anwesenheit von Calcium für die Bindung essentiell ist. Eine geringe Zugabe von Calcium erhöht sogar die Bindungsaffinität. Bei deutlich über physiologischen Calciumkonzentrationen liegenden Werten nimmt die Bindungsaffinität dagegen wieder ab. Bei der oben genannten, in der Literatur beschriebenen, calciumabhängigen Proteininteraktion zwischen ALG-2 und TSG101 war eine Calciumkonzentration von mindestens 10 μM Ca^{2+} notwendig, um die Bindung nachzuweisen (Katoh et al. 2005). Dieses Ergebnis scheint mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen durchaus vereinbar, da die Bindung von Densin-180 und MACF nicht unter der Abwesenheit von Calcium

nachweisbar ist und eine Calciumkonzentration von 50 μ M die Bindungsaffinität optimiert. Im Ergebnis wird die Bindung zwischen Densin-180 und MACF somit über *EF-hands* vermittelt. Diese calciumbindenden Domänen führen nachweislich zu einer calciumabhängigen Bindungsaffinität.

Neben MACF existieren fünf weitere Mitglieder der Plakinfamilie: Desmoplakin, Plectin, *bullous pemphigoid antigen 1* (BPAG1), Envoplakin und Periplakin (Green et al. 1992, Ruhrberg und Watt 1997, Ruhrberg et al. 1997). BPAG1e wurde im Falle der dermatologischen Erkrankung bullöses Pemphigoid als Angriffspunkt der gebildeten Autoantikörper identifiziert (Minoshima et al. 1991). In Mäusen konnte das entsprechende Gen (*dystonin/BPAG1n*) in Zusammenhang mit der muskulären Dystonie gebracht werden. Mutationen in dem entsprechenden Gen schwächten die mechanische Integrität der Epithelien, wodurch die muskuläre Dystonie mit starker neuronaler Degeneration resultierte (Brown et al. 1995, Guo et al. 1995, Leung et al. 2001).

Das Vorhandensein von Spectrinwiederholungen bei den Proteinen MACF und BPAG1 führte zum Namen der Spectraplakine, einer Untergruppe der Plakine (Jefferson et al. 2004), welche Eigenschaften der Spectrine und der Plakine vereint (Röper et al. 2002). MACF zeichnet sich besonders an seinem N-Terminus durch eine starke Homologie zum N-Terminus von BPAG1 aus (Sonnenberg und Liem 2007). Das Plakin BPAG1 interagiert mit Erbin (Favre et al. 2001), einem LAP-Protein (siehe Einleitung), welches wiederum mit ErbB2, einem von vier Säuger EGF-Rezeptoren, interagiert. Hier lassen sich enge Parallelen zwischen der Proteininteraktion BPAG1-Erbin und MACF-Densin-180 ziehen: Bei der im Rahmen dieser Arbeit belegten Interaktion zwischen MACF und Densin-180 handelt es sich wie im erstgenannten Fall um eine Interaktion zwischen einem Spectraplakin auf der einen und einem Protein der LAP-Familie auf der anderen Seite, wobei diese Interaktionen jedoch über divergierende Domänen vermittelt werden. Die sich durch ihre enorme Größe auszeichnenden Plakine könnten über derartige Interaktionen einen Teil ihrer Funktionen erfüllen, deren Komplexität zurzeit noch nicht vollständig verstanden wird.

Durch die Identifizierung der Interaktion zwischen MACF und Densin-180 existiert nunmehr Kenntnis über eine indirekte Verbindung von MACF an Glutamat-rezeptoren in der Zellmembran. MACF verbindet darüber hinaus Densin-180 und damit Shank als auch NMDA-Rezeptoren mit dem Cytoskelett.

Die durch den NMDA-Rezeptor regulierten Mechanismen tragen zur Gedächtnisbildung und synaptischen Plastizität bei (Meighan et al. 2006). So führt eine Aktivierung des NMDA-Rezeptors beispielsweise zu einer Modifizierung der Aktin-filamentorganisation (Halpain et al. 1998). Um jedoch Aktinfilamente regulieren zu können und damit eine Basis für die synaptische Plastizität zu schaffen, müssten Mediatoren eine Bindung zu den Aktinfilamenten aufbauen. MACF kann im Rahmen der Interaktion und seiner Fähigkeit, Aktin zu binden, als wichtiges, regulatorisches Protein der morphologischen Umgestaltung der Synapsen angesehen werden und ist darüber hinaus involviert in die Regulation der neuronalen Morphologie.

Weiterhin ist MACF ein Protein, welches in der postsynaptischen Dichte ange-reichert ist (Peng et al. 2004). Es bindet als postsynaptisches Protein direkt an Mikro-tubuli. In der Literatur findet sich ein weiteres postsynaptisches Protein, welches Mikrotubuli bindet. CRIPT bindet die dritte PDZ-Domäne von PSD-95 über seinen C-Terminus (Niethammer et al. 1998) sowie direkt an Mikrotubuli (Passafaro et al. 1999). Es findet so eine Verbindung des NMDA-Rezeptors über PSD-95 an Mikro-tubuli, vermittelt über CRIPT, statt. Es stellt sich jedoch die Frage nach der Be-deutung einer derartigen Interaktion, da Mikrotubuli kaum in dendritischen *spines* zu finden sind (Harris und Kater 1994), wo jedoch die Mehrheit der exzitatorischen Synapsen lokalisiert sind und sich postsynaptische Proteine wie PSD-95 und CRIPT häufen. Ähnlich verhält es sich im Falle der in dieser Arbeit neu bestätigten Inter-aktion zwischen Densin-180 und MACF. Über MACF findet eine indirekte An-bindung des NMDA-Rezeptors an Mikrotubuli in einem Neuron statt. Die Bedeutung der Mikrotubuli-bindenden Proteine, welche in der Postsynapse lokalisiert sind, bleibt jedoch in Zukunft zu klären.

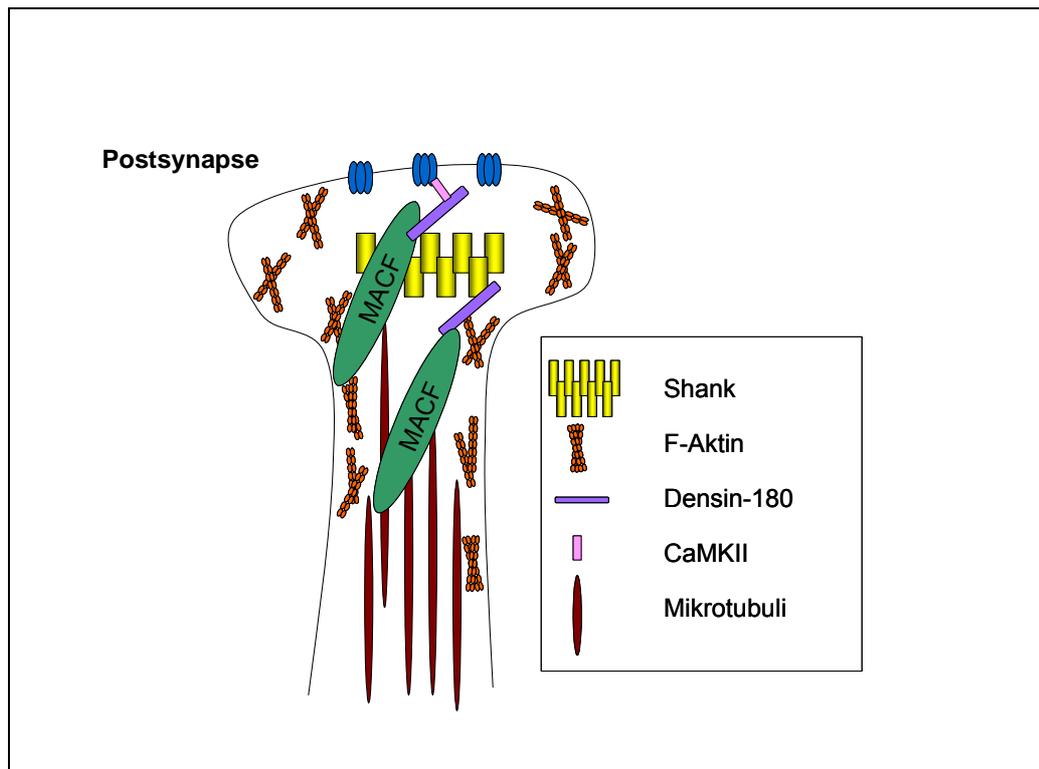


Abb. 23: Modell ausgewählter postsynaptischer Proteine und deren Bindungspartner

MACF verbindet Densin-180 und damit Shank als auch NMDA-Rezeptoren mit dem Cytoskelett. Darüber hinaus ist MACF ein Protein, welches in der postsynaptischen Dichte angereichert ist (Peng et al. 2004) und direkt an Mikrotubuli bindet.

5.3 Analyse der Funktion von Densin-180 und MACF in kultivierten Hippokampusneuronen

Nach dem Nachweis einer Interaktion von Densin-180 mit MACF stellte sich die Frage nach der näheren Bedeutung von MACF im zentralen Nervensystem. Die Überexpression von Proteinen in kultivierten Neuronen lässt in der Regel Rückschlüsse auf deren Funktionen zu, so dass dies im Rahmen dieser Arbeit sowohl für Densin-180 und MACF als auch für die Koexpression beider Proteine untersucht wurde. Wie schon in vorangegangenen Arbeiten gezeigt, führt die Überexpression von Densin-180 in kultivierten primären Hippokampusneuronen zu einer stark erhöhten Zahl dendritischer Ausläufer mit einer hohen Zahl an dendritischen Ver-

zweigungspunkten (siehe 4.2.1, Quitsch 2004). Die Ausläufer scheinen miteinander zu verschmelzen und bilden netzartige Strukturen aus. Die Überexpression von MACF wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig durchgeführt. Eine Koexpression von Densin-180 und MACF führt zu einer gegenüber der alleinigen Expression von Densin-180 um 53,3% reduzierten Anzahl von dendritischen Ausläufern (siehe 4.2.3). Es stellte sich an dieser Stelle die Frage nach der Bedeutung dieser eindrucksvollen Auswirkungen induziert durch die Überexpression oben genannter Proteine. Für die Expression anderer Proteine konnte bereits ein Effekt auf die dendritische Verzweigung gezeigt werden. So erhöhen das Protein GAP-43 und der C-Terminus von Paralemin, zwei neuronale Proteine, welche Einfluss auf die Cytoskelettorganisation nehmen, die Anzahl der Filopodien und der dendritischen und axonalen Verzweigungen (Gauthier-Campbell et al. 2004). Des Weiteren spielen beispielsweise die GTPasen der Rho-Familie eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Dendritenmorphologie (Cline 2001, Redmond und Ghosh 2001).

Dendritisches Wachstum ist ein sehr dynamischer Prozess, wobei die dendritische Verzweigung über einen Aktin- und Mikrotubuli-abhängigen Mechanismus zu verlaufen scheint (Jan und Jan 2003). Die Funktionen von Aktin und Mikrotubuli müssen für die dendritische Morphogenese koordiniert werden (Jan und Jan 2003). Das Plakin MACF ist mit seinen Eigenschaften eines der Proteine, welche die dendritische Morphologie koordinieren können.

In der frühen neuronalen Entwicklung gehen neue dendritische Verzweigungen von Lamellopodien und kurzen Neuriten aus. Ebenso bilden die Filopodien entscheidende Vorstufen in der Entwicklung neuer Neuriten (Dent et al. 2007). Die extensive Entwicklung neuer Verzweigungen endet mit einer selektiven Stabilisierung einer limitierten Anzahl dendritischer Verzweigungen (Gauthier-Campbell et al. 2004). Dies scheint in Hinblick auf die Proteine Densin-180, welches zu einer enormen Steigerung der Verzweigungen führt, und MACF, welches in einer Koexpression eine vermutlich regulierende Funktion einnimmt, sehr bedeutungsvoll. MACF könnte an der Stabilisierung von neu gebildeten Verzweigungen mitwirken und dabei eine notwendige, regulierende Aufgabe übernehmen. Diese These wird

durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten, quantitativen Analyse der dendritischen Verzweigungen nach Überexpression von Densin-180 und MACF gestützt. So führt eine Koexpression von Densin-180 und MACF zu einer gegenüber der alleinigen Expression von Densin-180 um 53,3% reduzierten Anzahl von dendritischen Ausläufern (siehe 4.2.3). Dies deutet darauf hin, dass Densin-180 und MACF für die Ausbildung der dendritischen Verzweigungen verantwortlich sind, wobei MACF die Verzweigungen in der Anzahl reguliert und damit in einem funktional optimalen Rahmen hält. In Mausembryonen wird MACF quantitativ in hohem Maße im Nervensystem exprimiert. MACF-Knockout-Mäuse *-/-* sterben früh in der embryonalen Entwicklung (Kodama et al. 2003). Studien belegten das Sterben der MACF1 *-/-* Embryonen in der Gastrulationsphase während der Formation der Keimblätter (Chen et al. 2006). Es findet sich in den Embryonen eine Neuralplatte, hingegen kein Nachweis eines Primitivstreifens oder des Mesoderms. Diese Strukturen bilden sich unter der Abwesenheit von MACF offensichtlich nicht aus. Diese Erkenntnisse belegen die Bedeutung der Expression von MACF in pränatalen Entwicklungsphasen. In adulten Mäusen wurde die Lokalisation der MACF-Expression im zentralen Nervensystem untersucht. Es fand sich eine Expression in den Körner- und Purkinjezellen des Kleinhirns, weiterhin im Hippokampus und dem cerebralen Cortex (Bernier et al. 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte endogenes MACF in primär kultivierten Hippokampusneuronen mittels eines neu erstellten Antikörpers visualisiert werden (siehe 4.3.2). Die hier beobachtete starke Expression in hippocampalen Neuronen deckt sich somit mit den in der Literatur veröffentlichten Expressionsstudien.

Eine besondere Bedeutung kommt MACF nicht nur im zentralen Nervensystem, sondern auch in anderen Geweben zu. MACF wird in Mausembryonen ubiquitär exprimiert. Die höchste Expression außerhalb des Nervensystems erfolgt in der Skelettmuskulatur sowie im Myokard (Leung et al. 1999). Weitere Analysen zeigten eine verstärkte MACF-Expression in TypII-Alveolen der Lunge kurz vor dem Zeitpunkt der Geburt (Bernier et al. 2000).

Neben der Rolle des MACF in der embryonalen Entwicklung wird auch die Bedeutung von Mutationen des MACF-Gens in Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern diskutiert. So wurde in einer Studie in aus Neuroblastomen abge-

leiteten Zelllinien eine komplexe unbalancierte Translokation gefunden, wobei ein Bruchpunkt auf dem Chromosom 1 innerhalb des 29. Introns des MACF1-Gens liegt. Es resultiert eine Deletion im Chromosom 1 (1p36) (Schleiermacher et al. 2005). Dieser chromosomale Bereich ist möglicherweise Ort eines oder mehrerer Neuroblastom-Tumorsuppressorgene (White et al. 2005). Weitere Studien sollen zeigen, ob diese Unterbrechung eine ursächliche beziehungsweise prognostisch bedeutsame Rolle in der Entwicklung von Neuroblastomen spielt. Die Haploinsuffizienz im Sinne einer Expression eines Allels, welches zur Aufrechterhaltung der Funktion nicht ausreichend ist, beziehungsweise die Synthese eines defekten Proteins, welches möglicherweise eine potentiell dominant-negative Rolle einnehmen kann, stellen erste Erklärungsansätze dar (Schleiermacher et al. 2005). In Hinblick auf die oben aufgezeigten Expressionsstudien in Neuronen könnte ein defektes MACF somit als fehlender Differenzierungsfaktor des sympathischen Nervengewebes angesehen werden und im Sinne einer fehlenden Regulation mit unkontrollierter Reifung des Nervensystems eine Rolle in der Entstehung des malignen Tumors spielen.

Des Weiteren ergab sich in einer genetischen Analyse von Mammakarzinomen und kolorektalen Tumoren für MACF eine Mutationsrate von 12% im Falle der Mammakarzinome (Sjöblom et al. 2006). Diese Feststellung ist ein weiteres Indiz für eine mögliche Rolle von MACF in der Entstehung von neoplastischen Erkrankungen; die tatsächliche Bedeutung bleibt aber zu verifizieren.

Auch bei Erkrankungen aus dem psychiatrischen Formenkreis wird die Rolle von MACF diskutiert. Die Ätiologie der Schizophrenie ist letztlich ungeklärt, man geht von einem multifaktoriell bedingten Geschehen aus. Studiendaten aus der neuropathologischen und pharmakologischen Forschung legen dieser Erkrankung eine Synapsenfehlfunktion zugrunde (Harrison und Weinberger 2004). Im Rahmen einer Studie, welche nach Proteininteraktionen des Proteins DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia 1*) suchte, wurde das Protein MACF als potentieller Interaktionspartner identifiziert (Camargo et al. 2007). Es bleibt hier weiter zu untersuchen, welche Bedeutung MACF tatsächlich zukommt.

Zusammenfassend deuten oben aufgezeigte Analysen auf eine einflussreiche Rolle des Proteins MACF auch außerhalb des zentralen Nervensystems hin. Legt man die Ergebnisse der Überexpressionsstudie dieser Arbeit zugrunde, scheint es nachvollziehbar, MACF als Differenzierungsfaktor und essentiell für die Ausbildung eines regulären Nervensystems anzusehen. Seine wichtige Rolle in der Regulation von neuronalen Verzweigungsprozessen unterstreicht die Bedeutung im zentralen Nervensystem. Oben dargelegte Erkenntnisse weisen indes auf eine ebenfalls umfassende Rolle in vielen Geweben hin. Mutationen in dem entsprechenden Gen könnten somit eine Rolle in der Entstehung neoplastischer Erkrankungen spielen. Ob das für MACF kodierende Gen als Tumorsuppressorgen wirken kann, bleibt zurzeit unklar. Gleichwohl ist die Einflussnahme des Proteins auf das neuronale Wachstum belegt, so dass das Protein MACF sicher auch in Zukunft Gegenstand der Forschung sein wird.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine β -Spectrin und MACF als neue Interaktionspartner der LRR-Region des postsynaptischen Proteins Densin-180 bestätigt. Das für die Interaktion zwischen β -Spectrin und Densin-180 relevante Proteinareal konnte innerhalb des Proteins β -Spectrin auf ein 219 Aminosäuren großes Fragment mit einer vollständigen PH-Domäne eingegrenzt werden. Die Charakterisierung der Interaktion zwischen dem 608 kD großen Plakin MACF und dem LAP-Protein Densin-180 zeigte, dass die beiden EF-hands die Proteininteraktion auf Seiten des Plakins vermitteln. Ferner konnte eine Calciumabhängigkeit für die bestätigte Interaktion mit einer optimalen Bindungsaffinität bei Zugabe von geringen Calciumkonzentrationen gezeigt werden. Um die Funktion von Densin-180 und MACF in Neuronen zu analysieren, wurden Überexpressionsstudien in primär kultivierten Hippokampusneuronen der Ratte durchgeführt. Die Überexpression von Densin-180 führt zu einem extremen Anstieg dendritischer Verzweigungen mit Ausbildung netzartiger Strukturen. In der Koexpression beider Proteine erbrachte MACF eine Reduktion der durch Densin-180 induzierten Verzweigungen. Nach Herstellung eines Antikörpers gegen MACF konnte endogenes MACF erstmalig in kultivierten Hippokampusneuronen nachgewiesen werden.

Die synaptische Plastizität stellt die Basis für komplexe Lernprozesse und Gedächtnisbildung dar und erfordert Proteine, welche für die Regulation und Ausbildung neuer synaptischer Kontakte verantwortlich sind. Mit MACF wurde ein in die Regulation der dendritischen Morphologie eingreifendes Protein als neuer Bindungspartner des postsynaptischen Proteins Densin-180 identifiziert. Das Verhalten von MACF in kultivierten Hippokampusneuronen sowie die Fähigkeit, Aktin, Mikrotubuli und über andere Proteine an den NMDA-Rezeptor zu binden legen somit den Schluss nahe, dass MACF zusammen mit seinen Bindungspartnern in der postsynaptischen Dichte eine maßgeblich regulatorische Aufgabe übernimmt.

7 Literaturverzeichnis

- Ahola H, Heikkilä E, Åström E, Inagaki M, Izawa I, Pavenstädt H, Kerjaschki D, Holthöfer H (2003)** A Novel Protein, Densin, Expressed by Glomerular Podocytes. *J Am Soc Nephrol* 14: 1731-1737
- Apperson ML, Moon IS, Kennedy MB (1996)** Characterization of Densin-180, a New Brain-Specific Synaptic Protein of the O-Sialoglycoprotein Family. *J Neurosci* 16 (21): 6839-6852
- Arikkath J, Israely I, Tao Y, Mei L, Reichardt LF (2008)** Erbin Controls Dendritic Morphogenesis by Regulating Localization of δ -Catenin. *J Neurosci* 28 (28): 7047-7056
- Baron MK, Boeckers TM, Vaida B, Faham S, Gingery M, Sawaya MR, Salyer D, Gundelfinger ED, Bowie JU (2006)** An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science* 311: 531-535
- Bayer KU, De Koninck P, Leonard AS, Hell JW, Schulman H (2001)** Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* 411 (6839): 801-805
- Beck KA, Nelson WJ (1996)** The spectrin-based membrane skeleton as a membrane protein-sorting machine. *Am J Physiol* 270: 1263-1270
- Belichenko PV, Masliah E, Kleschevnikov AM, Villar AJ, Epstein CJ, Salehi A, Mobley WC (2004)** Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Comp Neurol* 480 (3): 281-298
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002)** *Biochemistry*, fifth edition, Freeman and Co, New York
- Bernier G, Pool M, Kilcup M, Alfoldi J, De Repentigny Y, Kothary R (2000)** Acf7 (MACF) is an actin and microtubule linker protein whose expression predominates in neural, muscle, and lung development. *Dev Dyn* 219 (2): 216-225
- Bilder D, Perrimon N (2000)** Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403 (6770): 676-680
- Bilder D, Li M, Perrimon N (2000)** Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289 (5476): 113-116
- Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Böckers TM (2002)** ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53. *J Neurochem* 83: 1013-1017

- Boeckers TM, Kreutz MR, Winter C, Zuschratter W, Smalla KH, Sanmarti-Vila L, Wex H, Langnaese K, Bockmann J, Garner CC, Gundelfinger ED (1999)** Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density. *J Neurosci* 19 (15): 6506-6518
- Boeckers TM, Mameza MG, Kreutz MR, Bockmann J, Weise C, Buck F, Richter D, Gundelfinger ED, Kreienkamp HJ (2001)** Synaptic Scaffolding Proteins in Rat Brain. *J Biol Chem* 276 (43): 40104-40112
- Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED (2002)** ProSAP/Shank proteins – a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem* 81 (5): 903-910
- Boeckers TM (2006)** The postsynaptic density. *Cell Tissue Res* 326 (2): 409-422
- Borg JP, Marchetto S, Le Bivic A, Ollendorff V, Jaulin-Bastard F, Saito H, Fournier E, Adélaïde J, Margolis B, Birnbaum D (2000)** ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nat Cell Biol* 2: 407-414
- Braus DF, Brassens S (2004)** Hippokampus-Amygdala-Formation: Zentrale Schnittstelle zwischen Emotion, Kognition und Verhalten. In: Lipinski CG, Braus DF: Hippokampus – klinisch relevante Schlüsselfunktionen, Hippokampus-Verlag, Bad Honnef
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993)** Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35 (5): 567-576
- Brown A, Bernier G, Mathieu M, Rossant J, Kthary R (1995)** The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of Bullous Pemphigoid Antigen 1. *Nature Genet* 10: 301-306
- Bryant PJ, Huwe A (2000)** LAP proteins : what's up with epithelia? *Nat Cell Biol* 2 (8): E141-143
- Burridge K, Kelly T, Mangeat P (1982)** Nonerythrocyte Spectrins: Actin-membrane Attachment Proteins Occuring in Many Cell Types. *J Cell Biol* 95: 478-486
- Camargo LM, Collura V, Rain JC, Mizuguchi K, Hermjakob H, Kerrien S, Bonnert TP, Whiting PJ, Brandon NJ (2007)** Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12: 74-86

- Chen X, Vinade L, Leapman RD, Petersen JD, Nakagawa T, Phillips TM, Sheng M, Reese TS (2005)** Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (32): 11551-11556
- Chen HJ, Lin CM, Lin CS, Perez-Olle R, Leung CL, Liem RKH (2006)** The role of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) in the Wnt signaling pathway. *Genes Dev* 20 (14): 1933-1945
- Chicurel ME, Harris KM (1992)** Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 325: 169-182
- Cho KO, Hunt CA, Kennedy MB (1992)** The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9 (5): 929-942
- Cline HT (2001)** Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 11: 118-126
- Dailey ME, Smith SJ (1996)** The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16 (9): 2983-2994
- Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, Philippar U, Barzik M, Rubinson DA, Gupton S, Van Veen JE, Furman C, Zhang J, Alberts AS, Mori S, Gertler FB (2007)** Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat Cell Biol* 9 (12): 1347-1359
- Dillon C, Creer A, Kerr K, Kumin A, Dickson C (2002)** Basolateral targeting of ERBB2 is dependent on a novel bipartite juxtamembrane sorting signal but independent of the C-terminal ERBIN-binding domain. *Mol Cell Biol* 22 (18): 6553-6563
- Du Y, Weed SA, Xiong WC, Marshall TD, Parsons JT (1998)** Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol Cell Biol* 18 (10): 5838-5851
- Duvernoy HM (1998)** *The Human Hippocampus – Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM (2002)** Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Rev* 39: 29-54
- Gauthier-Campbell C, Brecht DS, Murphy TH, El-Husseini AED (2004)** Regulation of Dendritic Branching and Filopodia Formation in Hippocampal Neurons by Specific Acylated Protein Motifs. *Mol Biol Cell* 15 (5): 2205-2217

- Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ (2007)** Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J* 405: 199-221
- Gong TW, Besirli CG, Lomax MI (2001)** MACF1 gene structure: a hybrid of plectin and dystrophin. *Mamm Genome* 12: 852-861
- Green KJ, Stappenbeck TS, Parry DA, Virata ML (1992)** Structure of desmoplakin and its association with intermediate filaments. *J Dermatol* 19: 765-769
- Gundelfinger ED, tom Dieck S (2000)** Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain. *Naturwissenschaften* 87(12):512-523
- Gundelfinger ED, Boeckers TM, Baron M, Bowie JU (2006)** A role for zinc in synapse assembly? *Trends Biochem Sci* 31 (7): 366-373
- Guo LF, Degenstein L, Dowling J, Yu, QC, Wollmann R, Perman B, Fuchs E (1995)** Gene targeting of BPAG1 abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell* 81: 233-243
- Halpain S, Hipolito A, Saffer L (1998)** Regulation of F-Actin Stability in Dendritic Spines by Glutamate Receptors and Calcineurin. *J Neurosci* 18 (23): 9835-9844
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B (1992)** Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12: 2685-2705
- Harris KM, Kater SB (1994)** Dendritic spines: cellular specialisations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17: 341-371
- Harrison PJ, Weinberger DR (2004)** Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 20: 40-68
- Hering H, Sheng M (2001)** Dendritic Spines: Structure, Dynamics and Regulation. *Nat Rev Neurosci* 2 (12): 880-888
- Hermainski J (2005)** Identifizierung von neuen Interaktionspartnern des postsynaptischen Proteins Densin-180. Diplomarbeit Freie Universität Berlin
- Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP, Kooy F, Willems PJ, Cras P, Kozlowski PB, Swain RA, Weiler IJ, Greenough WT (2001)** Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and

- visual cotices of patients with fragile-X-syndrome: a quantitative examination. *Am J Med Genet* 15: 161-167
- Izawa I, Nishizawa M, Othakara K, Inagaki M (2002)** Densin-180 Interacts with δ -Catenin/Neural Plakophilin-related Armadillo Repeat Protein at Synapses. *J Biol Chem* 277 (7): 5345-5350
- Jaulin-Bastard F, Arsanto JP, Le Bivic A, Navarro C, Vély F, Saito H, Marchetto S, Hatzfeld M, Santoni MJ, Birnbaum D, Borg JP (2002)** Interaction between Erbin and a Catenin-related Protein in Epithelial Cells. *J Biol Chem* 277 (4): 2869-2875
- Jefferson JJ, Leung CL, Liem RKH (2004)** Plakins: Goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 542-553
- Jenkins WM, Merzenich MM, Ochs MT, Allard T, Guic-Robles E (1990)** Functional reorganization of primary somatosensory cortex in adult owl monkeys after behaviorally controlled tactile stimulation. *J Neurophysiol* 63: 82-102
- Kaas JH (1991)** Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annu Rev Neurosci* 14: 137-167
- Katoh K, Suzuki H, Terasawa Y, Mizuno T, Yasuda J, Shibata H, Maki M (2005)** The penta-EF-hand protein ALG-2 interacts directly with the ESCRT-I component TSG101, and Ca^{2+} -dependently co-localizes to aberrant endosomes with dominant-negative AAA ATPase SKD1/Vps4B. *Biochem J* 391: 677-685
- Kaufmann WE, Moser HW (2000)** Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* 10: 981-991
- Kennedy MB (1997)** The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci* 20: 264-268
- Kessels MM, Engquist-Goldstein ÅEY, Drubin DG, Qualmann B (2001)** Mammalian Abp1, a Signal-responsive F-Actin-binding Protein, Links the Actin Cytoskeleton to Endocytosis Via the GTPase Dynamin. *J Cell Biol* 153 (2): 351-366
- Kim SK (1997)** Polarized signaling basolateral receptor localization in epithelial cells by PDZ-containing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9: 853-859
- Kim JH, Huganir RL (1999)** Organization and regulation of proteins at synapses. *Curr Opin Cell Biol* 11: 248-254
- Kodama A, Karakesisoglou I, Wong E, Vaezi A, Fuchs E (2003)** ACF7: An essential integrator of microtubule dynamics. *Cell* 115 (3): 343-354

- Kolodziej SJ, Hudmon A, Waxham MN, Stoops JK (2000)** Three-dimensional Reconstructions of Calcium/Calmodulin-dependent (CaM) Kinase II α and Truncated CaM Kinase II α Reveal a Unique Organization for Its Structural Core and Functional Domains. *J Biol Chem* 275 (19): 14354-14359
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995)** Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269: 1737-1740
- Lassila M, Juhila J, Heikkilä E, Holthöfer H (2006)** Densin is a Novel Cell Membrane Protein of Sertoli Cells in the Testis. *Mol Reprod Dev* 74 (5): 641-645
- Legouis R, Gansmuller A, Sookhareea S, Boshier JM, Baillie DL, Labouesse M (2000)** LET-413 is a basolateral protein required for the assembly of adherens junctions in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol* 2: 415-422
- Leung CL, Sun D, Zheng M, Knowles DR, Liem RKH (1999)** Microtubule Actin Cross-linking Factor (MACF): A Hybrid of Dystonin and Dystrophin that Can Interact with the Actin and Microtubule Cytoskeletons. *J Cell Biol* 147 (6): 1275-1286
- Leung CL, Zheng M, Prater SM, Liem RKH (2001)** The BPAG1 locus: alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol* 154 (4): 691-697
- Lin CM, Chen HJ, Leung CL, Parry DAD, Liem RKH (2005)** Microtubule actin crosslinking factor 1b: a novel plakin that localizes to the Golgi complex. *J Cell Sci* 118: 3727-3738
- Lipinski CG, Braus DF (2004)** Hippokampus – klinisch relevante Schlüssel-funktionen. Hippokampus Verlag, Bad Honnef
- Malchiodi-Albedi F, Ceccarini M, Winkelmann JC, Morrow JS, Petrucci TC (1993)** The 270kD splice variant of erythrocyte β -spectrin (β 1 Σ 2) segregates in vivo and in vitro to specific domains of cerebellar neurons. *J Cell Sci* 106: 67-78
- Maruoka H, Konno D, Hori K, Sobue K (2005)** Collaboration of PSD_Zip 70 with its binding partner, SPAR, in dendritic spine maturity. *J Neurosci* 25: 1421-1430
- Matus A (2000)** Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290: 754-758
- Meighan SE, Meighan PC, Choudhury P, Davis CJ, Olson ML, Zornes PA, Wright JW, Harding JW (2006)** Effects of extracellular matrix-degrading

- proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity. *J Neurochem* 96: 1227-1241
- Minoshima S, Amagai M, Kudoh J, Fukuyama R, Hashimoto T, Nishikawa T, Shimizu N (1991)** Localization of the human gene for 230-kDal bullous pemphigoid autoantigen (BPAG1) to chromosome 6pter-q15. *Cytogenet Cell Genet* 57: 30-32
- Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M (1999)** Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23 (3): 569-582
- Nakanishi S, Masu M (1994)** Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 319-348
- Navarro C, Nola S, Audebert S, Santoni MJ, Arsanto JP, Ginestier C, Marchetto S, Jacquemier J, Isnardon D, Le Bivic A, Birnbaum D, Borg JP (2005)** Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* 24: 4330-4339
- Niethammer M, Valtschanoff JG, Kapoor TM, Allison DW, Weinberg RJ, Craig AM, Sheng M (1998)** CRIPT, a Novel Postsynaptic Protein that Binds to the Third PDZ Domain of PSD-95/SAP90. *Neuron* 20(4): 693-707
- Ohtakara K, Nishizawa M, Izawa I, Hata Y, Matsushima S, Taki W, Inada H, Takai Y, Inagaki M (2002)** Densin-180, a synaptic protein, links to PSD-95 through its direct interaction with MAGUIN-1. *Genes to Cell* 7(11): 1149-1160
- Parnass Z, Tashiro A, Yuste R (2000)** Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus* 10: 561-568
- Passafaro M, Sala C, Niethammer M, Sheng M (1999)** Microtubule binding by CRIPT and its potential role in the synaptic clustering of PSD-95. *Nat Neurosci* 2(12): 1063-1069
- Peng J, Kim MJ, Cheng D, Duong DM, Gygi SP, Sheng M (2004)** Semiquantitative Proteomic Analysis of Rat Forebrain Postsynaptic Density Fractions by Mass Spectrometry. *J Biol Chem* 279(20): 21003-21011
- Petralia RS, Sans N, Wang YX, Wenthold RJ (2005)** Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 29: 436-452
- Pöppel E, Bullinger M, Härtel U (1994)** *Medizinische Psychologie und Soziologie*, Chapman & Hall, Weinheim

- Prokop A, Uhler J, Roote J, Bate M (1998)** The *kakapo* Mutation Affects Terminal Arborization and Central Dendritic Sprouting of *Drosophila* Motorneurons. *J Cell Biol* 143(5): 1283-1294
- Qualmann B, Boeckers TM, Jeromin M, Gundelfinger ED, Kessels MM (2004)** Linkage of the Actin Cytoskeleton to the Postsynaptic Density via Direct Interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank Family. *J Neurosci* 24 (10): 2481-2495
- Quitsch A (2004)** Die Funktion postsynaptischer Proteinkomplexe in der neuronalen Morphogenese von Säugern. Dissertation Universität Hamburg
- Quitsch A, Berhörster K, Liew CW, Richter D, Kreienkamp HJ (2005)** Postsynaptic Shank Antagonizes Dendrite Branching Induced by the Leucine-Rich Repeat Protein Densin-180. *J Neurosci* 25 (2): 479-487
- Redmond L, Ghosh A (2001)** The role of Notch and Rho GTPase signaling in the control of dendritic development. *Curr Opin Neurobiol* 11: 111-117
- Ridley AJ (2001)** Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114: 2713-2722
- Riederer BM, Zagon IS, Goodman SR (1986)** Brain Spectrin(240/235) and Brain Spectrin(240/235E): Two Distinct Spectrin Subtypes with Different Locations within Mammalian Neural Cells. *J Cell Biol* 102: 2088-2097
- Röper K, Gregory SL, Brown NH (2002)** The 'Spectraplakins': cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families. *J Cell Sci* 115: 4215-4225
- Rugg MD (1998)** Memories are made of this. *Science* 281: 1151-1152
- Ruhrberg C, Hajibagheri MA, Parry DA, Watt FM (1997)** Periplakin, a novel component of cornified envelopes and desmosomes that belongs to the plakin family and forms complexes with envoplakine. *J Cell Biol* 139: 1835-1849
- Ruhrberg C, Watt FM (1997)** The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr Opin Genet Dev* 7: 392-397
- Saito H, Santoni MJ, Arsanto JP, Jaulin-Bastard F, Le Bivic A, Marchetto S, Audebert S, Isnardon D, Adelaide J, Birnbaum D, Borg JP (2001)** Lano, a novel LAP protein directly connected to MAGUK proteins in epithelial cells. *J Biol Chem* 276 (34): 32051-32055
- Sala C, Piech V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M (2001)** Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* 31 (1): 115-130
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning – A Laboratorial Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Satoh K, Yanai H, Senda T, Kohu K, Nakamura T (1997)** DAP-1, a novel protein that interacts with the guanylate kinase-like domains of hDLG and PSD-95. *Genes Cells* 2: 415-424
- Satoh H, Shibata H, Nakano Y, Kitaura Y, Maki M (2002)** ALG-2 interacts with the amino-terminal domain of annexin XI in a Ca^{2+} -dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 1166-1172
- Schleiermacher G, Bourdeaut F, Combaret V, Picron G, Raynal V, Aurias A, Ribeiro A, Janoueix-Lerosey I, Delattre O (2005)** Stepwise occurrence of a complex unbalanced translocation in neuroblastoma leading to insertion of a telomere sequence and late chromosome 17q gain. *Oncogene* 24 (20): 3377-3384
- Shen K, Meyer T (1999)** Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science* 284 (5411): 162-166
- Sheng M, Kim E (2000)** The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci* 113: 1851-1856
- Sheng M, Sala C (2001)** PDZ Domains and the Organization of Supramolecular Complexes. *Annu Rev Neurosci* 24: 1-29
- Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE (2006)** The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314: 268-274
- Soltau M, Richter D, Kreienkamp HJ (2002)** The insulin receptor substrate IRSp53 links postsynaptic shank1 to the small G-protein CDC42. *Mol Cell Neurosci* 21: 575-583
- Soltau M (2003)** Untersuchung zur Funktion des humanen Proteins Shank1 in der Synaptogenese von Säugern. Dissertation Universität Hamburg
- Sonnenberg A, Liem RKH (2007)** Plakins in development and disease. *Exp Cell Res* 313 (10): 2189-2203
- Sorra KE, Harris KM (2000)** Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10: 501-511

- Spacek J, Harris KM (1997)** Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci* 17: 190-203
- Steward O, Reeves TM (1988)** Protein-synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site. *J Neurosci* 8: 176-184
- Strack S, Robinson AJ, Bass MA, Colbran RJ (2000)** Association of calcium/calmodulin-dependent kinase II with developmentally regulated splice variants of the postsynaptic density protein densin-180. *J Biol Chem* 275 (33): 25061-25064
- Sun D, Leung CL, Liem RKH (2000)** Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *J Cell Sci* 114: 161-172
- Swann JW, Al-Noori S, Jiang M, Lee CL (2000)** Spine loss and other dendritic abnormalities in epilepsy. *Hippocampus* 10: 617-625
- Takeuchi M, Hata Y, Hirao K, Toyoda A, Irie M, Takai Y (1997)** SAPAPs a family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. *J Biol Chem* 272: 11943-11951
- Touhara K, Inglese J, Pitcher JA, Shaw G, Lefkowitz RJ (1994)** Binding of G protein $\beta\gamma$ -subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 269: 10217-10220
- Tu JC, Xiao B, Nasibitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakkeman P, Donan A, Aakalu VK, Lanahan AA, Sheng M, Worley PF (1999)** Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23 (3): 583-592
- Walikonis RS, Oguni A, Khorosheva EN, Jeng CJ, Asuncion FJ, Kenndy MB (2001)** Densin-180 forms a ternary complex with the (alpha)-subunit of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and (alpha)-actinin. *J Neurosci* 21 (2): 423-433
- Wallenstein GV, Eichenbaum H, Hasselmo ME (1998)** The hippocampus as an associator of discontinuous events. *Trends Neurosci* 21: 317-323
- White PS, Thompson PM, Gotoh T, Okawa ER, Igarashi J, Kok M, Winter C, Gregory SG, Hogarty MD, Maris JM, Brodeur GM (2005)** Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* 24(16): 2684-2694
- Winkelman JC, Forget BG (1993)** Erythroid and Nonerythroid Spectrins. *Blood* 81 (12): 3173-3185

- Yao L, Kawakami Y, Kawakami T (1994)** The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C. Proc Natl Acad Sci USA 91: 9175-9179
- Yuste R, Bonhoeffer T (2004)** Genesis of dendritic spines insights from ultrastructural and imaging studies. Nat Rev Neurosci 5(1): 24-34
- Ziff EB (1997)** Enlightening the Postsynaptic Density. Neuron 19: 1163-1174
- Zitzer H, Hönck HH, Bächner D, Richter D, Kreienkamp HJ (1999)** Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. J Biol Chem 274 (46): 32997-33001

8 Anhang

8.1 Liste der verwendeten Konstrukte

EYFP

Densin in EGFP

PCI-MACF

8.2 Liste der verwendeten Primer

Primer	Schnittstelle	Sequenz
Bsec for	Xho I	TTCTCGAGGTGCAGATGGAAGGCTACC
BSpes rev	EcoR I	TTGAATTCGGACTCGTTGATGGCGGTG
MACF for1	Hind III	TTAAGCTTCGAGTGATGGATTTCTTCCGG
MACF for 1A	EcoR I	TTGAATTCTACGAGTGATGGATTTCTTCCG
MACF for 2	Hind III	TTAAGCTTGAGATGACTGCTGTGGCTGAC
MACF for 3	EcoR I	TTGAATTCTAGATAAAATCGAAGATGAGGTTAC
MACF rev 1	Sal I	TTGTCGACGGATGCTAAAATGCCATCGATAAAC
MACF rev 2	Sal I	TTGTCGACGTTGGGATGAAGAGCAGCCAC
MACF rev 3	Sal I	TTGTCGACTAACCTCGTGCTCGGCAGGG
VPH for	Xho I	TTCTCGAGGAGAGAACGTCCCCGGGGAAG
VPH rev	EcoR I	TTGAATTCGTAGCCTTCCATCTGCACACTC

8.3 Firmenverzeichnis

Firma	Ort, Land
Abcam	Cambridge, England
ABR Affinity Bio Reagents	Golden, Colorado, USA
Agfa	Köln, Deutschland
Amersham Biosciences	Little Chalfont, England
ATCC	Rockville, Maryland, USA
BioGenes	Berlin, Deutschland
Bio-Rad Laboratories	Richmond, Kalifornien, USA
Biotec-Fischer GmbH	Reiskirchen, Deutschland
Clontech	Mountain View, Kalifornien, USA
Dianova	Hamburg, Deutschland
Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Gibco BRL	Gaithersburg, Maryland, USA
Hamamatsu	Shizuoka, Japan
Improvision	Coventry, England
Invitrogen	Gaithersburg, Maryland, USA
Leica	Wetzlar, Deutschland
Macherey und Nagel	Düren, Deutschland
PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Perkin Elmer	Waltham, Massachusetts, USA
Qiagen	Chatsworth, Kalifornien, USA
Roche	Mannheim, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Schleicher & Schüll	Dassel, Deutschland

Sigma	St. Louis, Missouri, USA
Stratagene	La Jolla, Kalifornien, USA
Zeiss	Göttingen, Deutschland

9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Hans-Jürgen Kreienkamp für die intensive Betreuung dieser Arbeit, seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung in allen wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Gal für das rege Interesse an meiner Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Humangenetik.

Herrn Hans-Hinrich Hönck danke ich an dieser Stelle für die nette und geduldige Einarbeitung im Labor sowie seine permanente Hilfsbereitschaft bei allen labortechnischen Fragen.

Für die nette und freundschaftliche Atmosphäre im Labor danke ich insbesondere Katrin Falley, Gwen Kollmorgen und Kerstin Berhörster.

Ein sehr herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern, meiner Schwester Kristin und meinem Freund Dennis Beyrle, die alle auf ihre Weise und mit viel Geduld zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: **Sandra Köcke**

Geburtsdatum: 01.09.1981

Geburtsort: Elmshorn

Schulbildung

1988 - 1992

Timm-Kröger-Grundschule, Elmshorn

1992 - 2001

Elsa-Brändström-Gymnasium, Elmshorn

Hochschulstudium

2001 - 2008

Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

23. Juni 2008

Approbation als Ärztin

Famulaturen

Februar 2004

Frauenklinik der Diakonissenanstalt Flensburg

April 2005

Herz- und Gefäßzentrum Hamburg Prof. Dr. med. Mathey Prof. Dr. med. Schofer und Partner

Juli 2006

Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

August 2006

Neurologisches Zentrum Rosenhügel, Wien

Praktisches Jahr

Februar - März 2007

Chirurgie: Mbeya Referral Hospital, Tanzania

April - Juni 2007

Chirurgie: Zentrum für Operative Medizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Juni 2007 - Oktober 2007

Neurologie: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Oktober 2007 - Januar 2008

Innere Medizin: Krankenhaus Alten Eichen, Hamburg

Stipendium

Februar 2005 - Dezember 2006

Stipendiatin der Richard-Winter-Stiftung

Dissertation

2005 - 2008

Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf: „Regulation der dendritischen Verzweigung durch das postsynaptische Protein Densin-180“

Berufstätigkeit

Seit 1. Juli 2008

Assistenzärztin in der Klinik für Neurologie, Klinikum Itzehoe, Schleswig-Holstein

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere außer die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Sandra Köcke