

Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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