

Identifizierung und Charakterisierung von
neuronalen Interaktionspartnern der Syndapine,
Modulatorproteinen an der Schnittstelle von Aktin-
Cytoskelett und Endocytose

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

Genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Regina Dahlhaus,
geb. am 21. September 1975 in Wuppertal, NRW

Gutachter:
Prof. Dr. E. D. Gundelfinger
PD Dr. H. J. Kreienkamp
PD Dr. O. Stork

Eingereicht am 27. September 2005
Verteidigt am 02. Februar 2006

Danksagung

Diese Arbeit entstand während der Jahre 2001 bis 2005 am Leibniz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg in der Abteilung von Prof. Eckart Gundelfinger. Für das gute Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft möchte ich meinen Kollegen danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Britta Qualmann und Herrn Dr. Michael Kessels für ihre Anregungen zu manch interessantem Projekt, für vielerlei größere und kleinere Herausforderungen und vor allem für ihre immerwährende Diskussionsbereitschaft.

Prof. Eckart Gundelfinger möchte ich für die gewährte Unterstützung, sein Interesse an der Arbeit und die konstruktive Kritik danken.

Dr. Karl-Heinz Smalla möchte ich für die geduldige Einführung in die biochemische Präparation von PSDs und Nuklei und seinen humorvollen Blick auf die tägliche Arbeit danken.

Dr. Reiner Pielot möchte ich für seine Ausdauer bei der Zählung widerspenstiger Rechner und Drucker danken.

Ein herzliches Dankschön gilt Kathi Hartung für ihren engagierten Einsatz für das ganze Labor.

Danken möchte ich auch Dr. Wilko Altrock für seine kleinen, aber hilfreichen Tips und Tricks bei der täglichen Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Freundin Ulrike Scheuermann und meinen Eltern für ihr stets offenes Ohr und ihre Unterstützung in schwierigen Situationen.

Zusammenfassung

Von zentraler Bedeutung für die kognitiven Leistungen des Gehirns ist die korrekte Funktion der Signalübertragung an der chemischen Synapse. Hierzu dienen die präsynaptische Cytromatrix der aktiven Zone (CAZ) und die postsynaptische Dichte (PSD), proteindichte Strukturen, welche nicht nur die morphologische Integrität der Synapse bestimmen, sondern auch verschiedene Prozesse und Strukturen wie Signalkaskaden oder die clathrinvermittelte Endocytose und das Aktin-Cytoskelett verknüpfen und damit zur Plastizität der Synapse beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit galt es, neue Bindungspartner einer Protein-Familie zu ermitteln, welche an der Schnittstelle von Endocytose und Aktin-Cytoskelett identifiziert worden war, der Syndapine. Die Verifizierung und funktionelle Charakterisierung der Interaktion potentieller Bindungspartner sollte zu einer Erweiterung und Vertiefung unseres Verständnisses synaptischer Prozesse beitragen.

Mit Hilfe des Hefe-zwei-Hybrid-Systems konnten eine Reihe putativer Interaktionspartner identifiziert werden. So ist das Protein EHD3 ein gehirntypischer Vertreter der Familie der EHD-Proteine, welche für die Rezyklierung von Membranproteinen von Bedeutung sind. Durch Copräzipitationsprüfungen und Colokalisationsstudien konnte demonstriert werden, daß es sich bei den Angehörigen dieser Protein-Familie um differenzielle Interaktionspartner der NPF-Motive der Syndapin-Isoformen I und II handelt. Damit sind Syndapine in die verschiedenen Schritte der Membrantransportprozesse involviert und können sowohl in der Endocytose als auch in der Rezyklierung von beispielsweise AMPA-Rezeptoren fungieren. Ein weiterer Interaktionspartner ist Rhotekin 2. Rhotekine sind in der Signalübertragung durch G-Proteine und Rho-GTPasen von Bedeutung. Copräzipitationsprüfungen ergaben, daß ein C-terminales PxxP-Motiv mit der SH3-Domäne der Syndapine interagiert und daß die Interaktion direkt ist. In Solubilisationsanalysen konnte Rhotekin 2 als integrales Membranprotein charakterisiert werden, doch zeigten Lokalisationsstudien in hippocampalen Neuronen, daß Rhotekin 2 außerdem in den Zellkern translozieren kann. Damit könnte Rhotekin 2 als eine reversible Membranverknüpfung für Syndapine dienen. Das neue Protein Synbape schließlich interagiert ebenfalls über ein C-terminales PxxP-Motiv direkt mit der SH3-Domäne der Syndapine. Es ist exklusiv in Gehirn und Testis exprimiert und zeigt in endogenen Copräzipitationen, in *in-vivo*-Proteinkomplex-Rekonstruktionen und in Colokalisationsanalysen eine Interaktion mit Syndapin. Syndapin und Synbape modulierten in Überexpressionsexperimenten außerdem die Morphologie dendritischer Dornfortsätze in synergistischer Weise. Stimulationsexperimente zeigten ferner eine aktivitätsabhängige Translokation des endogenen Proteins in den Nukleus, wo es speziell in Nukleoli nachgewiesen werden konnte. Zusammengefasst legen die Daten für Synbape eine Rolle als Signal in der synaptischen Transmission nahe und deuten auf eine Funktion der Interaktion von Synbape und Syndapin in der Dornenmorphologie und damit auch in der Plastizität von Synapsen hin.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	7
1.1 Molekulare Mechanismen der Signaltransduktion an der chemischen Synapse	7
1.1.1 Die präsynaptische Seite	8
1.1.2 Die postsynaptische Seite	11
1.2 Besonderheiten Dendritischer Dornfortsätze	14
1.3 Zielstellung	18
2 Material und Methoden	
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Vektoren	19
2.1.3 Antikörper	20
2.1.4 Kits, Lösungen und Reagenzien	21
2.1.5 Nährmedien für Bakterien und Hefen	21
2.1.6 Einzeller und Säuger	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten	23
2.2.1.1 Polymerasekettenreaktionen (PCR)	23
2.2.1.2 DNS – Restriktionen	23
2.2.1.3 Gelelektrophorese von DNS	24
2.2.1.4 Elution von DNS aus Agarosegelen	24
2.2.1.5 Klonierung von DNS-Fragmenten	24
2.2.1.6 Elektro- und Hitzeschockkompetente Zellen	25
2.2.1.7 Transformation von Bakterien	26
2.2.1.8 Präparationen von DNS - Plasmiden aus Bakterien	26
2.2.1.9 Analyse der DNS-Sequenzen	27
2.2.1.10 Das Hefe-zwei-Hybrid-System	28
2.2.1.10.1 Transformation von Hefezellen	28
2.2.1.10.2 Konjugation von Hefen	29
2.2.1.10.3 Präparation von Plasmiden aus Hefezellen	30

2.2.1.10.4	Interaktionsanalysen in Hefen	30
2.2.2	Biochemische Methoden	31
2.2.2.1	Präparation von Glutathion-S-Transferase (GST) – Fusionsproteinen	31
2.2.2.2	Präparation von Fusionsproteinen mit Histidin (His) – Markierung	31
2.2.2.3	Proteinfärbungen und -bestimmungen	32
2.2.2.4	Gelelektrophorese von Proteinen	33
2.2.2.5	Western-Blot-Analysen	33
2.2.2.6	Copräzipitationsprüfungen	34
2.2.2.7	Co-Immunopräzipitationen	35
2.2.2.8	Herstellung polyklonaler Antiseren	36
2.2.2.9	Antikörpergewinnung durch Affinitätsreinigung der polyklonalen Antiseren	36
2.2.2.10	Herstellung von Gewebehomogenaten und - cytosolen	38
2.2.2.11	Fraktionierung von Gehirngewebe	38
2.2.2.12	Kernpräparationen aus Neuronen	39
2.2.2.13	Analyse der Membranaffinität von Proteinen	40
2.2.3	Zellkultur	41
2.2.3.1	Kultivierung der HEK- und COS-7-Zellen	41
2.2.3.2	Transfektion der HEK-Zellen und Lysatherstellung	41
2.2.3.3	Transfektion und Immunfärbung der COS-7- Zellen	42
2.2.3.4	Primärkulturen	43
2.2.3.5	Transfektion der Neurone	43
2.2.3.6	Fixierung und Färbung der Neurone	44
2.2.3.7	Stimulations- und Inhibitionsexperimente	44
2.2.4	Histologie	45
2.2.4.1	Immunologische Färbung von Gehirnschnitten	45
2.2.5	Statistische Erhebungen	45
2.2.5.1	Kern-Colokalisationsstudie	45
2.2.5.2	Analyse von Veränderungen neuronaler Dornfortsätze	46
2.2.5.2.1	Definition und Vermessung der Dornfortsätze	46
2.2.5.2.2	Experimenteller Aufbau	46
2.2.5.2.3	Auswertung der Vermessungsdaten	47
2.2.5.3	Kernlokalisationsanalyse	48
2.2.5.4	Analyse der Leptomycin B -Effekte	48

3	Ergebnisse	49
3.1	Die Hefe-zwei-Hybrid Screen: Auf der Suche nach neuen, potentiellen Interaktionspartnern für Syndapin	49
3.2	Syndapine und die EHD-Proteinfamilie	53
3.2.1	Struktur und Domänen von EHD 3	53
3.2.2	Charakterisierung der Interaktion	54
3.3	MBF 1 – das Rhotekin 2 der Maus	58
3.3.1	Proteinstrukturen und Interaktionsdomänen	58
3.3.2	Ein C-terminales PxxP-Motiv von Rhotekin 2 vermittelt die Interaktion zur SH3-Domäne Syndapins	60
3.3.3	Charakterisierung des α Rhotekin 2 - Antikörpers	63
3.3.4	Subzelluläre Verteilung	66
3.3.5	Rhotekin 2 ist ein integrales Membranprotein	69
3.3.6	Hinweise auf die <i>in-vivo</i> -Relevanz der Interaktion	70
3.3.7	Rhotekin 2 kann in den Zellkern translozieren	73
3.4	Syndapin und Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs)	74
3.4.1	Die Mikrotubuli-assoziierten Proteine 1a und 2	74
3.4.1.1	Belege für eine Interaktion	74
3.4.1.2	Hinweise auf die Bedeutung der Interaktion <i>in-vivo</i>	75
3.4.2	MAP 1s: Ein neues, murines Mikrotubuli-assoziiertes Protein	77
3.4.2.1	Interaktionsdomänen und Struktur des murinen Proteins MAP 1s	77
3.4.2.2	MAP 1s interagiert mit der SH3-Domäne Syndapins	78
3.4.2.3	MAP 1s-Fusionsproteine reichern endogenes Syndapin I an	79
3.5	Synbape – ein unbekanntes Protein mit 2 Kernlokalisationsignalen	80
3.5.1	Struktur und Motive des neuen Proteins Synbape	80
3.5.2	Synbape interagiert mit der SH3-Domäne Syndapins über ein C-terminales PxxP-Motiv	83
3.5.3	Die Interaktion von Syndapin und Synbape ist direkt	85
3.5.4	Ein polyklonaler Antikörper gegen Synbape	86
3.5.5	Auch unter <i>in-vivo</i> Bedingungen können Syndapin und Synbape interagieren	88
3.5.6	Synbape, Syndapin I und dendritische Dornfortsätze	96
3.5.6.1	Synbape und Syndapin I beeinflussen unter Überexpression die Morphologie dendritischer Dornfortsätze	96

3.5.6.2	Veränderte Dornen können synaptisch integriert sein	105
3.5.7	Synbape und der Zellkern	107
3.5.7.1	Synbape kann im Zellkern von Neuronen nachgewiesen werden	107
3.5.7.2	Synbape transloziert zwischen Zellkern und Soma	112
3.5.7.3	Die Kernlokalisierung Synbapes kann durch Stimulation oder Inhibition von synaptischer Aktivität beeinflusst werden	114
3.5.7.4	Synbape tritt in Nucleoli auf	115
4	Diskussion	
4.1	Welche Bedeutung hat die Interaktion von Syndapinen und EHD-Proteinen?	118
4.2	Rhotekin 2 – eine Verknüpfung von Syndapinen und Membranen?	120
4.3	Welche Bedeutung kommt einer Verbindung von Syndapinen mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen zu?	124
4.4	Synbape – ein Signal zwischen Syndapinen und Nukleus?	125
5	Literaturverzeichnis	132
6	Abbildungsverzeichnis	146
7	Abkürzungsverzeichnis	149
8	Anhang	152
8.1	Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Konstrukte	152
8.2	Tabelle 2: Alignment der Rhotekine	159
	Lebenslauf und wissenschaftliche Publikationen	166

1 Einleitung

1.1 Molekulare Mechanismen der Signaltransduktion an der chemischen Synapse

Ein zentrales Merkmal des Menschen ist seine Fähigkeit, seine Umwelt in seinem Sinne zu manipulieren, eine Fähigkeit, die untrennbar mit den kognitiven und integrativen Leistungen seines Gehirns verbunden ist. Es erschließt ihm etwa durch die Entwicklung von Sprache und Schrift ein einzigartiges Kommunikationsfeld, aber ebenso verleiht es ihm auch die Fähigkeit, hochkomplexe Bewegungsabläufe wie z.B. beim Tanzen oder in der Kampfkunst zu erlernen, lebenslang. Von elementarer Bedeutung im Hinblick auf diese enorme neuronale Plastizität in der Informationsverarbeitung ist hierbei die chemische Synapse an der Schnittstelle zwischen Nervenzellen. Bereits bei den Nesseltieren (*Cnidaria*) sind solche Zell-Zell-Kontakte zu beobachten, Medusen etwa weisen neben elektrischen Synapsen bidirektionale, chemische Synapsen auf, und schon bei den Plattwürmern (*Planaria*) finden sich nicht nur synaptische Boutons und dendritische Dornen, sondern auch Transmittersubstanzen, welche ebenfalls im menschlichen Gehirn auftreten. Moderne Modelle für Lernen und Gedächtnis, wie die langfristige Verstärkung (LTP) oder Depression (LTD), basieren auf der Regulation und der funktionellen Veränderung jener synaptischen Signaltransmission.

Im Gegensatz zu elektrischen Synapsen, bei denen mehrere Zellen durch sogenannte *gap junctions* über Tunnelproteine (Connexine z.B.) vernetzt und somit elektrisch synchronisiert werden, ist eine chemische Synapse asymmetrisch gegliedert, sie wird aus einer präsynaptische Nervenendigung, dem synaptischen Spalt und der Postsynapse der nachfolgenden Nervenzelle gebildet. Dadurch ermöglicht sie eine gerichtete Signalübertragung. Das elektronenmikroskopische Bild einer exzitatorischen Nervenendigung läßt auf der präsynaptischen Seite dicht gepackte Vesikel erkennen, die einen Botenstoff, bei Wirbeltieren in der Regel Glutamat, enthalten, der in Folge eines Aktionspotentials in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird. Auf der postsynaptischen Seite ist hingegen eine elektronendichte Struktur lokalisiert, die sogenannte postsynaptische Dichte (PSD). Durch Diffusion gelangen die Botenmoleküle durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran, wo sie durch Rezeptoren perzeptiert werden, welche sodann in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration des umgebenden Milieus eine Depolarisation oder Hyperpolarisation der postsynaptischen Nervenzelle auslösen, indem sie entweder direkt eine integrierte Kanalpore (ionotrope Rezeptoren) öffnen oder dies indirekt durch Aktivierung eines *second-messenger*-Systems (metabotrope Rezeptoren) bewirken. Der übrige Transmitterstoff kann durch enzymatischen Abbau, Gliazellen oder/und Membrankanäle aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Adhäsionsmoleküle wie Neuroligin und neuronales Zelladhäsionsmolekül (N-CAM) vernetzen die prä- und postsynaptische Membran miteinander und verleihen dem synaptischen Kontakt so morphologische Stabilität.

1.1.1 Die präsynaptische Seite

Um die korrekte Funktion der Synapse auch bei schnell aufeinanderfolgenden Signalen zu gewährleisten, ist eine präzise und effiziente Regulation der Vorgänge sowohl an der Prä- als auch an der Postsynapse erforderlich. Auf der präsynaptischen Seite steht dabei die kalziumabhängige Verschmelzung von synaptischen Vesikeln mit der Membran und die Transmitterausschüttung unter Aufrechterhaltung der morphologischen Integrität im Vordergrund. Zu Grunde liegt diesen Prozessen der sogenannte Vesikelzyklus (Abbildung 1) (z.B. Gundelfinger *et al.*, 2003), welcher die Translokation synaptischer Vesikel zwischen mehreren, ultrastrukturell und funktionell abgrenzbaren Pools beschreibt: In dem Reservepool sind die Vesikel über Mikrofilamente fixiert und können nur durch starke synaptische Stimulierung aktiviert werden. Zwischen dem Reservepool und der aktiven Zone der präsynaptischen Membran erstreckt sich der von feinen Filamenten durchzogene proximale Pool und schließlich bilden die an die Membran angelagerten und unter ATP-Verbrauch gereiften Vesikel den Pool fusionskompetenter Vesikel. Auf das Eintreffen eines Aktionspotentials hin fusionieren sie in Folge des Kalziumeinstroms mit der Membran der aktiven Zone und entleeren sodann die in ihnen enthaltenen Transmitter durch Exocytose in den synaptischen Spalt. Hiernach können sie durch Vesikel des proximalen Pools schnell ersetzt werden.

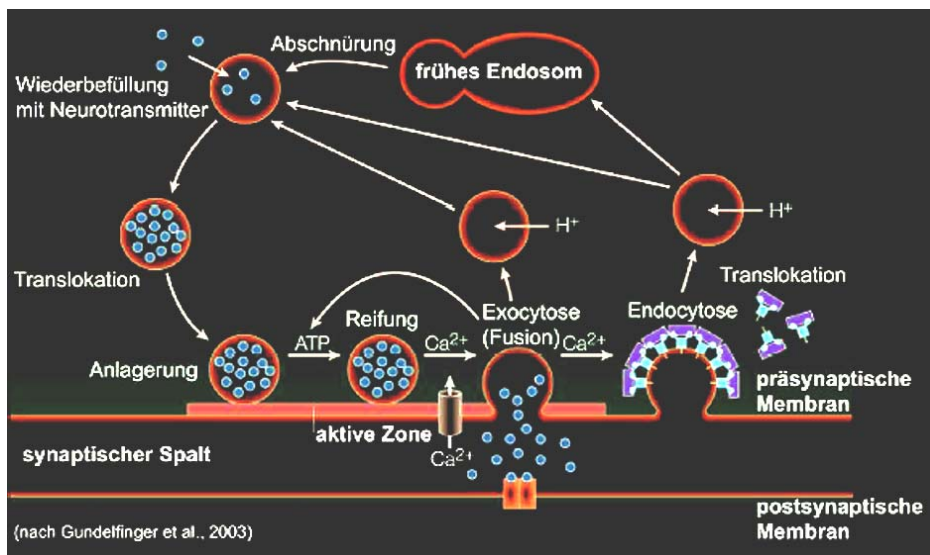


Abbildung 1: Der Vesikelzyklus. Die Abbildung stellt den sogenannten synaptischen Vesikelzyklus schematisch dar. Er beschreibt die Stadien, welche die Vesikel auf der präsynaptischen Seite durchlaufen: In Abhängigkeit von dem auf ein Aktionspotential hin erfolgenden Ca^{2+} -Einstrom findet eine Verschmelzung der fusionskompetenten, synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran der aktiven Zone statt und die Neurotransmitter werden in den synaptischen Spalt entlassen. Hiernach kann das Vesikel auf unterschiedlichen Wegen zurückgewonnen werden. Nach seiner Wiederbefüllung mit Transmitter und einer Anlagerung an die aktive Zone erlangt das synaptische Vesikel durch Reifung erneut Fusionskompetenz, so daß der Zyklus erneut beginnen kann. (Verändert nach Gundelfinger *et al.* (2003)).

Die Entfernung der Vesikel von bzw. die Rückgewinnung von Vesikelproteinen und -lipiden aus der präsynaptischen Membran kann nun auf verschiedene Weisen erfolgen. Wenn durch die Fusion das Vesikel vollständig in der präsynaptischen Membran aufgeht, verläuft die Rückgewinnung der Vesikelmembran und -proteine über die kompensatorische, clathrinvermittelte Endocytose, verschmilzt das synaptische Vesikel jedoch nicht vollständig mit der präsynaptischen Membran, so kann die Rückgewinnung auch nach dem sogenannten "*Kiss and Run*" Modell durchgeführt werden (Palfrey & Artalejo, 1998; Ales *et al.*, 1999; Chan & Smith, 2001). Dabei entlassen die synaptischen Vesikel die Transmitter durch eine kurzzeitig geöffnete Pore in den synaptischen Spalt, während die Struktur des Vesikels erhalten bleibt und es im Bereich der aktiven Zone innerhalb weniger hundert Millisekunden bis zu wenigen Sekunden wieder in den Vesikelzyklus aufgenommen werden kann (Chen & Scheller, 2001; Gundelfinger *et al.*, 2003). Eine noch schnellere Reaktivierung des Vesikels kann nach dem "*Kiss and Stay*" Modell dadurch erreicht werden, daß das synaptische Vesikel mit der präsynaptischen Membran assoziiert verbleibt, während es an Ort und Stelle wieder mit Transmittern befüllt wird (Sudhof, 2000; Tabares *et al.*, 2001). Auf molekularer Ebene sind diese beiden Mechanismen jedoch weitgehend unverstanden (Gundelfinger *et al.*, 2003).

Im Gegensatz dazu dauert die kompensatorische Endocytose länger, einige Sekunden bis Minuten werden diskutiert (z.B. Jockusch *et al.*, 2005), und erfolgt lateral von der aktiven Zone (Sudhof, 1995). Dazu binden zunächst tetramere Adaptorproteinkomplexe (AP2) über Interaktionen mit Membranphospholipiden, dem integralen Membranprotein Synaptotagmin, sowie weiteren Cargoproteinen (Zhang *et al.*, 1994; Gaidarov & Keen, 1999; Jarousse & Kelly, 2001) an die synaptische Membran und rekrutieren Clathrin-Triskelien an diese, welche sodann unter Mitwirkung von AP180 ein dreidimensional gewölbtes Netz formen und damit die Vesikelhülle bilden. AP180 bindet sowohl an Clathrin als auch an AP2 und scheint so die Größe des gebildeten Vesikels zu regulieren (Slepnev & de Camilli, 2000). Für die anschließende Abschnürung des Vesikels ist die große GTPase Dynamin von essentieller Bedeutung. Ihre Blockierung verursacht Invaginationen mit verlängerten Hälsen, ohne daß es zu einer Trennung von der präsynaptischen Membran kommt (einen Überblick gibt: Hinshaw, 2000). Andererseits aber ist sie allein nicht ausreichend, um jene Abschnürung zu bewerkstelligen, hierzu ist ein Ensemble weiterer Moleküle der endocytotischen Maschinerie erforderlich, darunter Proteine wie z. B. Endophilin, für welches auch eine Rolle in der Membraninvagination vorgeschlagen wurde (eine Zusammenfassung bietet: Song & Zinsmaier, 2003), oder F-Aktin und wahrscheinlich auch Lipidkinasen. Dynamin selbst kommt dabei möglicherweise eine positiv-regulative Wirkung zu (Ringstad *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1999; Gundelfinger *et al.*, 2003).

Mehrere Modelle gibt es über die Funktionen, die F-Aktin bei der kompensatorischen Endocytose erfüllen könnte. Zum einen könnte F-Aktin demnach an der Lokalisation der vesikelbildenden Moleküle an der Membran und an der Formung des Vesikels selbst beteiligt sein. Zum anderen könnte F-Aktin auch ein Gerüst für die endocytotische Maschinerie bilden, sowie die Kraft generieren, um das

endocytotische Vesikel von der präsynaptischen Membran abzulösen und es schließlich abzutransportieren (eine umfassende Darstellung gibt Qualmann *et al.*, 2000).

Präsynaptische Nervenendigungen stellen besonders hohe Anforderungen an Schnelligkeit und Effizienz von Membrantransportprozessen; hierzu könnte eine Vernetzung von Aktin-Cytoskelett und endocytotischer Maschinerie dienen. Ermöglicht werden könnte jene Verbindung unter anderem durch Mitglieder der Syndapin-Familie (Qualmann *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1999; Qualmann & Kelly, 2000; Kessels & Qualmann, 2002a; DaCosta *et al.*, 2003; Kessels & Qualmann, 2004), welche sich durch eine C-terminale SH3-Domäne, der zwei bis drei NPF-Motive vorausgehen können, sowie eine *coiled-coil* Region in der Mitte auszeichnen. Dabei erreichen sie ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa. In Säugetieren sind bisher drei Isoformen beschrieben, Syndapin I (Sdp I) ist vorherrschend im Gehirn, während Syndapin II (Sdp II), das in einer langen Variante mit drei NPF-Motiven und einer kurzen mit nur zwei NPF-Motiven auftreten kann, ubiquitär expremiert ist, und schließlich Syndapin III (Sdp III), das als Besonderheit über keine NPF-Motive verfügt, und muskelspezifisch ist (Abbildung 2). Über ihre SH3-Domäne können Syndapine einerseits mit unterschiedlichen Komponenten der Vesikelmaschinerie interagieren, so z.B. mit Synapsin, das an der Verankerung von Vesikeln im Reservepool beteiligt ist, der für die Vesikelabschnürung essentiellen GTPase Dynamin und dem in die Entmantelung involvierten Synaptojanin, andererseits aber auch durch ihre Interaktion mit dem Aktivator der Aktinpolymerisationsmaschinerie N-WASP Einfluß auf das Aktin-Cytoskelett nehmen (Qualmann *et al.*, 1999; Qualmann & Kelly, 2000; Kessels & Qualmann, 2002a; 2002b; 2004). Vier verschiedene Szenarien beschreiben den

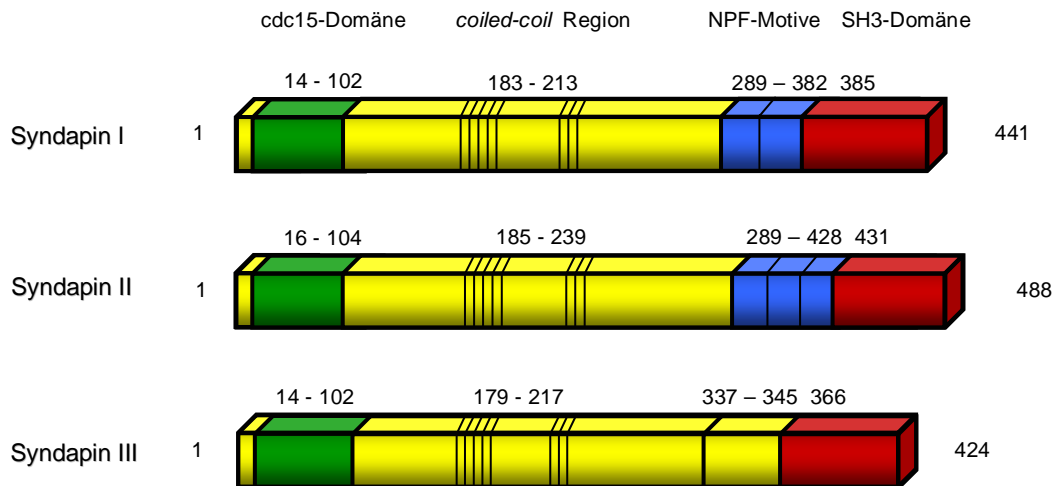


Abbildung 2: Die Syndapin-Familie. Gezeigt sind schematische Skizzen der Domänenstruktur der Säugetier-Syndapine I – III. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäuresequenz in Ratten (*Rattus norvegicus*) und geben die Lokalisation der Motive an. Den Syndapinen gemeinsam ist eine N-terminale cdc15-Domäne (grün), wobei es sich um bisher weitgehend uncharakterisierte Struktur handelt, die jedoch z.B. in Hefen mit der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts in Verbindung gebracht wird. Im mittleren Bereich der Proteine findet sich darüber hinaus eine *coiled-coil* Region (straffiert), während C-terminal eine SH3-Domäne (rot) lokalisiert ist, die diverse Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann. In der Anzahl der NPF-Motive (blau) unterscheiden sich die Syndapine demgegenüber deutlich, während Syndapin I und II 2 oder 3 dieser Motive aufweisen, fehlen sie in Syndapin III ganz.

möglichen molekularen Charakter einer Verbindung von Membrancytoskelett und Membrantransport durch Syndapine: Im einfachsten Fall könnte Syndapin über die SH3-Domäne mit einem der beschriebenen Partner, etwa N-WASP, interagieren und über ein zusätzliches Interaktionsmotiv ein weiteres Molekül binden. Ein Beispiel hierfür wäre die Bindung von EH-Domänen-Proteinen über die NPF-Motive (Braun *et al.*, 2005). Die Bindung eines solchen Moleküls könnte aber auch einen Wechsel der Interaktionspartner an der SH3-Domäne, z.B. von N-WASP zu Dynamin, induzieren, wofür insbesondere Kinasen in Betracht kämen. Ferner vermögen Syndapine Homo- und Heterodimere zu formen (Kessels & Qualmann, 2004), wodurch unterschiedliche, durch die Interaktionspartner der SH3-Domäne vermittelte Prozesse, wie z.B. Vesikelabschnürung und Aktivierung des Aktin-Cytoskeletts, ebenfalls miteinander vernetzt werden könnten. Letztlich könnte diese Dimerisierung auch indirekt über ein bisher unbekanntes Protein erfolgen.

Im Anschluß an die Vesikelabschnürung und die Entfernung des Vesikels von der Membran findet eine rapide Entmantelung statt. Essentiell hierfür ist die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat durch die Polyphosphoinositidphosphatase Synaptojanin (Cremona *et al.*, 1999). Hiernach kann das Vesikel entweder über eine Passage durch frühe Endosomen oder direkt wieder mit Transmittern befüllt und in den Reservepool aufgenommen bzw. an die aktive Zone überführt werden. Damit ist das endocytotische Vesikel wieder für die Signaltransmission verfügbar.

1.1.2 Die postsynaptische Seite

Auf der postsynaptischen Seite steht die transmitterabhängige Signalinziierung im Vordergrund. Diese ist räumlich an der postsynaptischen Membran gegenüber der aktiven Zone der präsynaptischen Seite in der postsynaptischen Dichte, einer molekularen Matrix von 30-50 nm Dicke aus verschiedenen funktionellen Proteinensembeln, organisiert. In ihr sind Rezeptoren akkumuliert und durch Gerüstproteine sowohl mit dem Cytoskelett als auch mit intrazellulären Signalkaskaden verknüpft. Ihre jeweilige Zusammensetzung unterliegt einerseits aktivitätsabhängigen Veränderungen und beeinflusst andererseits entscheidend die Funktion der Synapse (Ehlers, 2003).

Zu den Rezeptoren gehören iono- und metabotrope Glutamatrezeptoren, erstere variieren in ihrer Ionenselektivität und ihrer Antwort auf Glutamat, daher werden sie anhand exogener Agonisten als α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionat (AMPA) Rezeptoren, Kainatrezeptoren und N-Methyl-d-Aspartat (NMDA) Rezeptoren klassifiziert. Während AMPA-Rezeptoren hauptsächlich für Natriumionen durchgängig sind und augenblicklich auf Glutamat ansprechen, reagieren NMDA-Rezeptoren erst nach einer partiellen Depolarisierung, z.B. durch eine vorrausgegangene Aktivierung der AMPA-Rezeptoren, und lassen dabei Kalziumionen passieren, die Depolarisation wird somit weiter verstärkt. Darüber

hinaus können durch die Kalziumionen interne Signalkaskaden angesteuert werden. Die Anteile der Rezeptoren in der postsynaptischen Plasmamembran, durch Diffusion und/oder Exo- bzw. Endocytose reguliert, und das Zusammenspiel der verschiedenen ionotropen Glutamaterezeptorklassen wird dabei als ein wichtiger Induktionsmechanismus für synaptische Plastizität angesehen (Malenka & Nicoll, 1993; Carroll *et al.*, 1999; Luscher *et al.*, 1999; Ehlers, 2000; Lin & Scheller, 2000; Triller & Choquet, 2005).

Das Gerüst der PSD bilden zunächst membranassoziierte Guanylatkinasen (MAGuKs) wie SAP102 (Synapsen-assoziiertes Protein, 102 kDa) oder PSD-95/SAP 90 (PSD-Protein, 95 kDa / Synapsen-assoziiertes Protein, 90 kDa) und Chapsyn-110/PSD-93 (PSD-Protein, 93 kDa). Sie sind zum einen in der Lage, direkt oder indirekt an den cytoplasmatischen Teil von Glutamaterezeptoren zu binden und können zum anderen aber auch mit Signalproteinen wie SynGAP (synaptisches Ras GTPase-aktivierendes Protein) und nNOS (neuronale Stickoxid-Synthase) oder Zelladhensionsmolekülen wie Neuroligin interagieren (z. B. Chen *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Boeckers *et al.*, 2002; Garner *et al.*, 2002). Über weitere Wechselwirkungen können MAGuKs darüber hinaus auch auf das Aktin-Cytoskelett einwirken und es reorganisieren oder eine Verbindung zum Mikrotubulsystem herstellen (Passafaro *et al.*, 1999; Pak *et al.*, 2001). Auf diese Weise sind sie nicht nur in der Lage, Rezeptoren an der PSD zu akkumulieren (El-Husseini *et al.*, 2000a; 2000b), sondern können auch eine Vernetzung zwischen Rezeptoren, dem Cytoskelett und Signalwegen schaffen.

Daran schließen sich die Multidomänenproteine der ProSAP/Shank Familie an (z. B. Boeckers *et al.*, 2002; Kreienkamp, 2002). Zu ihren gemeinsamen Domänen gehören eine Reihe von Ankyrinwiederholungen am N-Terminus der Proteine, denen eine SH3- und PDZ (PSD-95/DLG/ZO-1)-Domäne sowie mehrere prolinreiche Strukturen und eine SAM (*sterile alpha motif*) Domäne am C-Terminus folgen. Diese Domänenvielzahl ermöglicht ihnen eine Reihe von Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen. So entsteht über die Bindung von α -Fodrin an die Ankyrinrepeatsequenzen eine Verknüpfung zum Aktin-Cytoskelett. Die indirekte Vernetzung mit PSD-95 hingegen verbindet die ProSAP/Shank-Proteine zum einen mit NMDA-Rezeptoren und zum anderen mit Zelladhensionsmolekülen und schließlich bewerkstelligt die SAM-Domäne die zum Aufbau des Gerüsts wichtige Oligomerisierung dieser Proteine. Darüber hinaus vermitteln ihre verschiedenen prolinreichen Sequenzen sowohl eine Bindung von Dynamin 2, was auf eine Rolle in endocytotischen Prozessen hinweist, als auch von Cortactin und Abp1 (Aktin-bindendes Protein 1), wodurch unterschiedliche Verknüpfungsmöglichkeiten mit dem Aktin-Cytoskelett der Zelle entstehen (Qualmann *et al.*, 2004, eine Übersicht gibt Böeckers *et al.*, 2002).

Damit erweist sich die PSD als eine komplexe, hochorganisierte Struktur. Doch darf sie nicht als statisch angesehen werden, denn um den Anforderungen von Adaptation, Wachstum und Plastizität gerecht werden zu können, ist die Reorganisation dieser Strukturen erforderlich. In Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität werden z.B. Glutamaterezeptoren des AMPA-Typs, aber auch des NMDA-Typs, durch Clathrin-vermittelte Endocytose aus der Plasmamembran entfernt oder durch Exocytose eingefügt (z.B. Carroll *et al.*, 2001; Hedge, 2004; Nong *et al.*, 2004). Durch

Ubiquitylierung des cytoplasmatischen Teils des Rezeptors wird dieser über eine Interaktion mit Adapterproteinen des Clathrin-bemantelten Vesikels diesem zugeführt und anschließend internalisiert (Colledge *et al.*, 2003; Patrick *et al.*, 2003). Hieran schließen sich zwei mögliche Wege an: Entweder wird das an dem Rezeptor aus dem frühen Endosom in das Cytosol ragende Ubiquitin durch spezifische Proteasen abgebaut und der Rezeptor somit über eine Passage durch das endosomale Rezyklierungskompartiment (ERC, *endosomal recycling compartment*) -z. B. in Folge von Langzeitpotenzierung- der Membran erneut zugeführt (Park *et al.*, 2004) oder das Endosom wird durch Fusion mit weiteren Endosomen in ein Lysosom umgeformt. In letzterem Fall erfolgt eine proteolytische Degradation des Rezeptors.

Weitgehend unverstanden ist bisher jedoch die Funktion der verschiedenen Proteine der PSD bei solchen Membrantransportvorgängen. Die Interaktion von Dynamin 2, welches spezifisch an der PSD lokalisiert, mit verschiedenen Angehörigen der ProSAP/Shank Familie (Okamoto *et al.*, 2001) deutet auf eine mögliche Rolle der Gerüstproteine in der Endocytose von Glutamatrezeptoren hin. Ein weiterer Hinweis darauf ergibt sich aus einer Verknüpfung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) mit den Gerüstproteinen ProSAP/Shank (Ehlers, 2003) und PSD-95 (Colledge *et al.*, 2003; Bingol & Schuman, 2004). Auch die kürzlich gefundene Interaktion von Syndapin und ProSAP/Shank (unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe) spricht für eine Verbindung von Gerüstproteinen und rezeptorvermittelter Endocytose. Doch bleiben weitere Einzelheiten der Endocytose von Rezeptoren an der PSD offen.

Eine weitere Funktion, welche durch die Proteine der PSD gewährleistet werden muß, ist die Initiierung von Signalkaskaden zur Regulation der Proteinsynthese, ein Prozess, der zur Generierung von Gedächtnis essentiell ist. Zwei Wege stehen hierzu offen: Zum Einen können durch Aktivierung der Translationsmaschinerie bereits existierende mRNAs für eine kurzfristige, lokale Proteinsynthese genutzt werden (z.B. Klann *et al.*, 2004), während zum Anderen durch die Regulation von Transkriptionsfaktoren wie CREB (zyklisches-Adenosin-5-Monophosphat (cAMP-) responsiv Element bindendes Protein) oder das kalziumsensitive DREAM (*downstream regulatory element antagonistic modulator*) (z.B. Deisseroth *et al.*, 2003) die Synthese neuer mRNAs und damit die Grundlage von Langzeitgedächtnis beeinflußt werden kann (einen Überblick gibt: Blitzer *et al.*, 2005). Hierzu stehen verschiedene Signalwege offen. Das Kalziumsensorprotein Calmodulin z.B. kann zum Einen in den Zellkern translozieren und dort indirekt die Aktivierung von CREB veranlassen und zum Anderen über nNOS und weitere Proteine die Ras-MAPKinase-CREB-Signalkaskade aktivieren (Fang *et al.*, 2000). Dies letztere ist für langfristige Veränderungen erforderlich (West *et al.*, 2002). Ein anderer prominenter Aktivator dieser Signalkaskade ist SynGAP (Chen *et al.*, 1998). Interessanterweise zeigen dissoziierte Neuronen von SynGAP-*knockout*-Mäusen eine Verlängerung der dendritische Dornfortsätze (Vazquez *et al.*, 2004), ein Umstand, der die enge Verknüpfung von Struktur und Funktion, aber auch die feine Balance der hochkomplexen Prozesse an der Postsynapse demonstriert.

1.2 Besonderheiten Dendritischer Dornfortsätze

Die Neuronen des Zentralnervensystems der Säugetiere (*Mammalia*) zeichnen sich durch besondere morphologische Spezialisierungen aus, die dendritischen Dornfortsätze. In reifen Neuronen erreichen sie eine Länge von etwa $2\ \mu\text{m}$ und sie formen den Raum, in dem die postsynaptischen Ereignisse stattfinden, daher werden sie hauptsächlich als Empfänger und Integrator exzitatorischer Signale angesehen (Cajal, 1888, 1891; Gray, 1959; Harris & Kater, 1994). Obgleich eine Vielzahl von weiteren Funktionen für dendritische Dornfortsätze beschrieben ist (Shepherd, 1996), ist hierbei vor allem die Kompartimentierung hoher Kalziumkonzentrationen in Folge exzitatorischer Signale wesentlich, um Spezifität zu erhalten oder/und andere neuronale Bereiche zu schützen (Wickens, 1988; Muller & Connor, 1991; Koch & Zador, 1993; Yuste & Denk, 1995; Yuste *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 2001). Es können jedoch auch Synapsen ohne die Ausbildung von Dornfortsätzen geformt werden, wie etwa im Rückenmark oder an den meisten GABAergen Interneuronen. In der Evolution treten dendritische Dornen bereits vereinzelt bei den Plattwürmern (*Planaria*), den einfachsten gehirnbesitzenden Organismen, auf und kommen bei weiter entwickelten Invertebraten (z.B. *Apis mellifera*, *Insecta*) genauso vor wie bei den Vertebraten von den Fischen (*Pisces*) bis zu den Vögeln (*Aves*).

Typischerweise erreichen dendritische Dornfortsätze in reifen Neuronen eine Dichte von 1-10 Stück je μm Dendrit (Sorra & Harris, 2000), wobei die Dichte zum Ende des Dendrits abnimmt. Dabei treten die

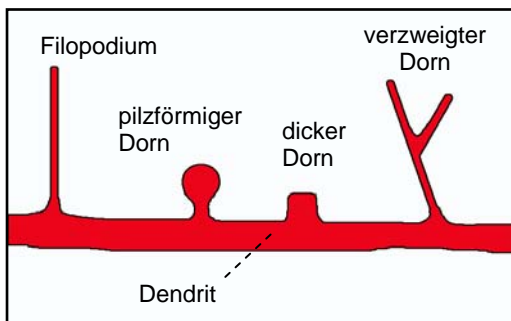


Abbildung 3: Skizze verschiedener Dornfortsatztypen. Gezeigt wird ein Filopodium, das während der Reifung durch synaptische Transmission einen dem des pilzförmigen Dornfortsatzes vergleichbaren Kopf entwickeln und dann als dünner Dorn (engl. *filopodia-like spine*) klassifiziert werden kann, ein pilzförmiger Dorn (engl. *mushroom spine*), welcher sich durch eine deutlich ausgeprägte Differenzierung von Kopf und Hals auszeichnet, sodann ein kleiner, dicker Dornfortsatz (engl. *stubby spine*) und ein verzweigter Dorn (engl. *branched spine*), der je nach Ausprägung auch als tassenförmig (engl. *cup shaped spine*) beschrieben wird. Durch die Plastizität der Dornfortsätze treten *in vivo* neben diesen Grundtypen Übergänge auf, welche in der Literatur unterschiedlich klassifiziert werden.

zuweilen werden bis zu 9 Klassen differenziert (Fiala & Harris, 1999), die gängigsten morphologischen Gruppierungen jedoch sind Filopodia, kleine und dicke Dornfortsätze, pilzförmige und verzweigte (tassenförmige) Dornfortsätze (Abbildung 3) (Peters & Kaiserman-Abramof, 1970; Chang *et al.*, 1984; Harris *et al.*, 1992; Pak *et al.*, 2001).

Doch nicht nur die Variation der Formen ist beträchtlich, ebenso variiert die Größe von weniger als $0,01\ \mu\text{m}^3$ bis zu $0,8\ \mu\text{m}^3$ und ein einziger Dendrit kann alle Typen der Dornfortsätze aufweisen, am häufigsten allerdings sind einfache, unverzweigte Formen (Harris, & Kater, 1994; Harris, 1999). In zeitlicher Hinsicht sind die dendritischen Dornen ebenfalls hochflexibel, so haben *Live-Imaging* Studien gezeigt, daß sich Dornfortsätze innerhalb weniger Sekunden bis Minuten in Größe und Form

gänzlich ändern können, im Verlauf von 10 Minuten z.B. kann sich ein Dornfortsatz völlig zusammenziehen. Besonders ausgeprägt ist diese Dynamik während der Entwicklung der Neurone, in einem Zeitraum von mehreren Stunden verändern ca. 50% der zu einem Zeitpunkt vorhandenen Dornen ihre Form (Fiala *et al.*, 1998; Parnass *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu sind solche Kategoriewechsel in reifen Neuronen seltener, die Synapsen stabiler. Die Basis für die Organisation und Reorganisation der Dornenmorphologie bildet das dynamische Aktin-Cytoskelett; Aktin ist besonders angereichert in Dornen, auch in solchen maturaer Neurone (Matus, 2000). Über eine Aktivierung des Arp2/3-Komplexes kann Aktin *de novo* zu longitudinalen Filamenten polymerisiert werden (Mullins & Welch, 2002), während die Aktivierung von Cofilin zu der Depolymerisation von filamentösem Aktin (F-Aktin) am Minusende beiträgt (Bamburg, 1999). Damit ermöglicht die Regulation von Polymerisation und Depolymerisation durch mit der Aktin-Maschinerie verknüpfte Signalkaskaden verschiedenste morphologisch-strukturelle Veränderungen.

Dendritische Dornen sind semi-autonom, sie verfügen über F-Aktin-Bündel und häufig auch über eine PSD, welche 10-15% des Kopfes einnehmen kann, sowie über eigene Organellen. Zu letzteren gehören zumeist Polyribosomen, deren Vorkommen auf eine Proteinsynthese in jenen Kompartimenten hindeutet (Steward & Schuman, 2001) oder ein sogenannter *Spine-Apparatus*, der aus Membranmagazinen des glatten Endoplasmatischen Reticulums (gER) besteht, dessen Funktion jedoch noch unbekannt ist, der möglicherweise aber als Lager oder Schaltstelle für Membranproteine fungieren könnte (Hering & Sheng, 2001). In manchen Dornfortsätzen findet sich daneben auch ein gER, das bis an die PSD heranreichen kann und zur Bereitstellung von Kalzium dient (Svoboda & Mainen, 1999, Sabatini *et al.*, 2001). Außerdem treten im Kopf des Dornfortsatzes häufig endosomale, bemantelte Vesikel (engl. *coated vesicles*, EV, Abbildung 4) auf.

Drei-dimensionale Rekonstruktionen der postsynaptischen

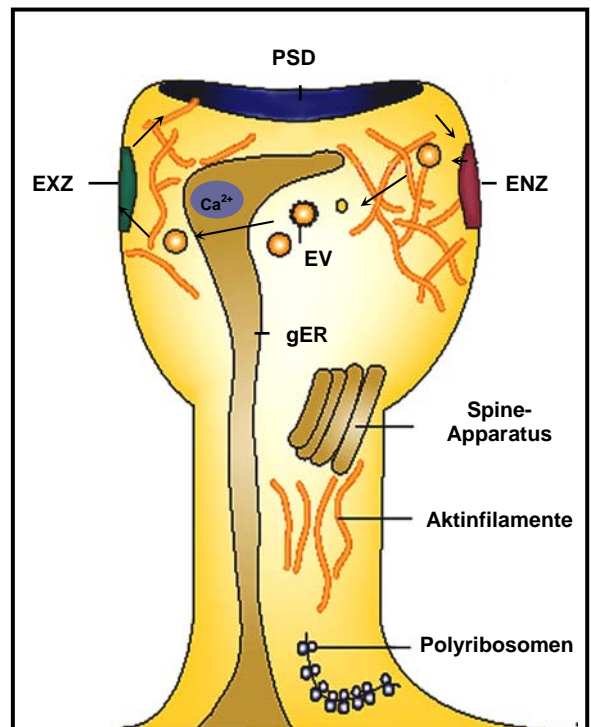


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines dendritischen Dornfortsatzes. Beispielhaft gezeigt ist ein reifer, pilzförmiger Dorn mit möglichen Organellen und Proteinstrukturen, wie der PSD und Aktinfilamenten. Dabei bedeutet ENZ endocytotische Zone und EXZ steht für exocytotische Zone, weitere Abkürzungen sind im Text erläutert. Die Pfeile verdeutlichen das Modell zum Proteinverkehr in Dornen: An der EXZ werden mittels endosomaler Vesikel Rezeptoren in die Membran eingefügt und anschließend in die PSD integriert, während an der ENZ Rezeptoren und andere Membranproteine über clathrinvermittelte Endocytose zurückgewonnen werden können. Beide Vorgänge beinhalten einen Proteintransport entlang der Membran. Cytosolische Proteine hingegen werden direkt in die PSD eingesetzt bzw. aus ihr entfernt. (verändert nach Hering und Sheng, 2001)

Membran haben gezeigt, daß jene endosomalen Vesikel vorwiegend in der Nähe der Membran vorkommen, aber auch mit ihr verbunden sein können (Spacek, J. & Harris, 1997; Sheng & Lee, 2001; Toni *et al.*, 2001; Cooney *et al.*, 2002). Ihre Lokalisation deckt sich jedoch nicht mit der der PSD, sondern ist von ihr einige hundert Nanometer separiert, wie Abbildung 4 zeigt (Blanpied *et al.*, 2002). Jene endocytotischen Zonen (ENZ) ent- und bestehen ebenso wie die PSD unabhängig von synaptischer Aktivität (Blanpied & Ehlers, 2004). Da die Organisation und Dynamik des Aktin-Cytoskeletts in der Bildung der endosomalen Vesikel eine Rolle spielt (vergleiche Abschnitt 1.1.1), Aktin aber auch an die Gerüstproteine der PSD bindet (vergleiche Abschnitt 1.1.2), wird eine Verbindung zwischen PSD und ENZ durch das Aktin-Cytoskelett möglich (Gaidarov *et al.*, 1996; Schafer, 2002; Gundelfinger *et al.*, 2003).

Auf der anderen Seite können Rezeptoren in perisynaptischen Regionen via endosomaler Vesikel in die Membran eingefügt werden oder/und durch laterale Diffusion zwischen synaptischen und extrasynaptischen Zonen translozieren (Choquet & Triller, 2003; Triller & Choquet, 2005). Die Anzahl der so in die PSD integrierten Rezeptoren definiert die Transmissionsstärke der synaptischen Verbindung, so daß die Kontrolle des Rezeptortransports eine wesentliche Funktion der Dornfortsätze darstellt (Moss & Smart, 2001; Carroll & Zukin, 2002; Malinow & Malenka, 2002; Wenthold *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist der Proteinumsatz an der PSD aktivitätsabhängig (Ehlers, 2003), Langzeitdepression (LTD) etwa verursacht einen Nettorückgang der Rezeptorenanzahl in der PSD, d.h. durch Verschiebung des Gleichgewichts aus Endo- und Exocytose von Rezeptoren kann die Transmissionsstärke der betreffenden Synapse verändert werden. Aus diesen Gründen ist das Verständnis des Verhältnisses von PSD und Vesikelzyklus für das Verständnis von Entwicklung, Funktion und Plastizität dendritischer Dornfortsätze essentiell.

Mitochondrien und Mikrotubuli hingegen kommen in dendritischen Dornfortsätzen nur selten vor (Chicurel & Harris, 1992). Dabei ist allerdings umstritten, ob Dornen tatsächlich Mikrotubuli enthalten können oder ob es sich dabei um ein Artefakt der Paraformaldehydfixierung handelt (Kaech, 1997), doch deuten verschiedene Interaktionsstudien (Passafaro & Sheng, 1999; Seidenbecher *et al.*, 2004) auf Mikrotubuli im Zusammenhang mit der PSD (vergl. 1.1.2) hin und ihr Auftreten im Schaftansatz dendritischer Dornfortsätze ist unstrittig.

Nicht alle Dornfortsätze enthalten jedoch auch alle oder überhaupt Organellen, kleine Dornfortsätze können ebenso (noch) nicht funktionell sein und daher nicht über die betreffenden Strukturen verfügen. Insgesamt haben große dendritische Dornfortsätze proportionell größere PSDs und eine höhere Diversität an Organellen: Ihre Form spiegelt ihre Fähigkeit zu erhöhter synaptischer Transmission wieder (El-Husseini *et al.*, 2000 a; Sorra & Harris, 2000; Hering & Sheng, 2001; Yuste & Bonhoeffer, 2001; Murthy *et al.*, 2001). Auch können die PSDs solcher Dornfortsätze z.B. in Folge von LTP Induktionen segmentiert sein, worauf eine Duplikation des betreffenden Dornfortsatzes folgen kann (Toni *et al.*, 1999; 2001).

In *vivo* können Dornfortsätze aus dendritischen Filopodia, welche während der ersten postnatalen Woche das sich entwickelnde Gehirn dominieren, entstehen.

Während früher Stadien der Synaptogenese verändern sich Filopodia mittels ihres Aktin-Cytoskeletts besonders rapide (Matus, 2000), ihre durchschnittliche Lebenszeit beträgt dann nur wenige Minuten (Lendvai *et al.*, 2000; Parnass *et al.*, 2000) und sie können in Folge afferenter Innervation ein oder zwei Synapsen ausbilden, welche zu einer Stabilisierung des synaptischen Kontakts und zu einer Reifung der Dornfortsätze durch synaptische Aktivität überleiten kann (Marrs *et al.*, 2001; Okabe *et al.*, 2001). Auch geht eine solche Innervation mit einer höheren Dichte dendritischer Dornfortsätze einher (Kossel *et al.*, 1997; Fiala *et al.*, 1998). Daneben aber können Dornfortsätze, wie z.B. bei der "Reeler" und "Weaver" Maus (Mausstämme mit Motorfehlfunktionen auf Grund von Fehlplatzierungen cerebellarer Neurone), auch ohne afferente Fasern gebildet werden (Sotelo, 1990), was auf eine genetische Anlage hindeutet.

Im Verlauf der weiteren Entwicklung nimmt die Dichte der Filopodia und der kleinen, dicken Dornfortsätze ab, bis schließlich pilzförmige Dornfortsätze das adulte Gehirn dominieren (Fiala *et al.*, 1998). Daher gelten Filopodia als Vorläufer der dendritischen Dornen, aus welchen sich durch die Ausbildung von synaptischen Kontakten zu afferenten Fasern reife (pilzförmige) Dornfortsätze entwickeln (Harris, 1999; Marrs *et al.*, 2001; Okabe *et al.*, 2001). Allerdings ist auch die Umkehrung möglich, reife Dornfortsätze können sich zu Filopodien umformen (Parnass *et al.*, 2000), eine eindrucksvolle Demonstration der fortwährenden Plastizität dendritischer Dornen. Auf molekularer Ebene wird die Reifung der Dornfortsätze, ihr Wachstum sowie die Effektivität ihrer Synapse vorwiegend durch Gerüstproteine reguliert (El-Husseini *et al.*, 2000a; Pak *et al.*, 2001; Sala *et al.*, 2001; Penzes *et al.*, 2003). Sie sind verantwortlich für eine akkurate Position der PSD und sogar deren Bestandteile, insbesondere der Rezeptoren (Valtschanoff & Weinberg 2001), was für die Koordination der Postsynapse mit der Präsynapse und damit für die Signaltransmission von elementarer Bedeutung ist. Im Vergleich zu einem immaturren Neuron verfügt das adulte in Folge des Reifungsprozesses über weniger synaptische Kontakte und kann während des Alterns bis zu 50% seiner Dornfortsätze verlieren (Rakic *et al.*, 1986; Feldman & Dowd, 1975; Scheibel *et al.*, 1975; Lund & Holbach, 1991). Die Reifung der Dornfortsätze ist jedoch kein globales Ereignis, sondern ein vom Typus des betreffenden Neurons abhängiger und aktiver Prozeß, der durch NMDA-Antagonisten unterbunden werden kann (Lau *et al.*, 1992; Lund & Holbach, 1999; Bock & Braun, 1999a, 1999b).

Auch Umwelteinflüsse spiegeln sich in der Morphologie und der Dichte der Dornfortsätze wieder, Unterernährung etwa kann genau wie Alkohol, Epilepsie und die Alzheimer Krankheit zu einer Abnahme der Dornendichte führen (Fiala *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu kann eine reichhaltige Umwelt ein Zunahme derselben bewirken (Globus *et al.*, 1973; Purpura, 1974; Scheibel *et al.*, 1975). Besonders rapide und ausgeprägte Veränderungen der Dornen zeigen sich jedoch bei Lernvorgängen, ein einziges solches Ereignis konnte in verschiedenen Regionen des Gehirns eines jungen Huhns nachgewiesen werden (Lowndes & Stewart, 1994; Moser *et al.*, 1997; O'Malley *et al.*, 1998). Insgesamt zeigt sich daran, daß dendritische Dornfortsätze nicht nur ein dynamisches und flexibles Sensorsystems sind, sondern auch hochempfindlich für endo- und exogene Veränderungen.

1.3 Zielstellung

Während in den vergangenen Jahren die Entdeckung neuer synaptischer Proteine und ihre anschließende Charakterisierung wesentlich zu dem Verständnis der Funktionsweise synaptischer Prozesse, wie z.B. dem Vesikelzyklus und der transmitterabhängigen Signalinitiierung an der PSD beigetragen und ihr Bild immer weiter vervollständigt hat, blieb in vielen Fällen die Verbindung zum Cytoskelett der Zelle zwar unbestritten, in ihrer Art jedoch oft hypothetisch. Mit der Identifikation der Syndapin-Familie an der Schnittstelle von Endocytose und Aktin-Cytoskelett (Qualmann *et al.*, 1999) eröffnete sich eine neue derartige Verknüpfungsmöglichkeit. Um in diesem Zusammenhang mehr über die Funktionsweise und Einbindung der Syndapine in synaptische Vorgänge zu erfahren, war das Ziel dieser Arbeit, zunächst mit Hilfe der Methode des Hefe-zwei-Hybrid-Systems weitere, potentielle Interaktionspartner von Syndapin zu ermitteln. Im Hinblick auf die besondere Bedeutung der Verknüpfung von Aktin-Cytoskelett und Endocytose in Neuronen, welche sowohl für eine effiziente Durchführung des Vesikelzyklus auf der präsynaptischen Seite als auch für Modifikationen der synaptischen Transmission auf der postsynaptischen Seite erforderlich ist, wurde hierbei eine gehirnspezifische cDNS-Bank eingesetzt. Dabei ermöglicht dieses System auch die Identifikation neuer, unbekannter Proteine, ohne daß hierzu nähere Informationen über Struktur und Eigenschaften jener Proteine erforderlich sind.

Da alle bis dahin bekannten Wechselwirkungen mit anderen Proteinen über die SH3-Domäne von Syndapin vermittelt werden, andererseits aber der N-Terminus mit der cdc-15 Domäne nicht nur eine funktionell unverstandene Domäne aufweist, sondern auch für die Erzeugung eines Filopodienphänotyps mitverantwortlich ist (Qualmann & Kelly 2000), wurden neben dem Gesamtprotein auch N-terminale Syndapin-Konstrukte in Screenen eingesetzt. Nach Erhalt und Validierung von Kandidaten im Hefe-System sollte mittels Copräzipitationsanalysen eine unabhängige Überprüfung der Interaktion bewerkstelligt werden. Im Anschluß daran galt es, die Interaktion ausgewählter, potentiellen Bindungspartner Syndapins mit weiteren unabhängigen Methoden zu verifizieren, um ihre Wahrhaftigkeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu demonstrieren. Hierzu sollten auch, soweit noch nicht anderweitig erfolgt, Expressionsanalysen, Zellfraktionierungen, Copräzipitationsprüfungen und Immunfluoreszfärbungen endogener Proteine durchgeführt werden. Daher sollte außerdem die Generierung spezifischer Antikörper für verschiedene Proteine unternommen werden. Die Primärcharakterisierung der neuen Syndapin-Interaktionspartner in Kombination mit Untersuchungen zu den Funktionen der neu identifizierten Syndapin-Proteinkomplexe sollte dann zu einem besseren Verständnis von Syndapinen an der Schnittstelle von Cytoskelett und Endocytose beitragen. Da ein effizientes Zusammenspiel dieser beiden zellbiologischen Prozesse von potentieller Bedeutung für die Funktion und Organisation der Synapsen ist, stehen durch derartige Untersuchungen zudem weitere Einblicke in die molekulare Funktionsweise von synaptischen Nervenendigungen zu erwarten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Kits und Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen: BD Biosciences Clontech, Biomol, Carl Roth, Fermentas, Invitrogen, Merck, MP Biomedicals, Qiagen, Roche/Boehringer und Sigma-Aldrich. Der Einsatz der Chemikalien erfolgte in der Qualität pro Analysis (p.a.), wobei für wässrige Lösungen Reinstwasser (Milli-Q® System, Millipore) verwendet wurde. Angaben zu speziellen Chemikalien und Lösungen befinden sich in der entsprechenden Methodenbeschreibung.

2.1.2 Vektoren

Zur Herstellung verschiedener Werkzeuge wurden eine Reihe von Vektoren benutzt, die im Folgenden aufgelistet sind, eine Übersicht der daraus generierten Konstrukte zeigt Tabelle 1 des Anhangs.

Vektor (Name)	Hersteller	Anmerkungen
pACT2	<i>BD Biosciences</i>	Matchmaker-two-Hybrid-System (cDNS-Bank)
pAS2-1	<i>BD Biosciences</i>	Matchmaker-two-Hybrid-System (DNS-bindende Domäne)
pCMV-Tag2b	<i>Stratagene</i>	Expressionsvektor für FLAG-Fusionsproteine in Mammaliazellen
pCMV-Tag3b	<i>Stratagene</i>	Expressionsvektor für myc-Fusionsproteine in Mammaliazellen
pCMV-Tag3c	<i>Stratagene</i>	Expressionsvektor für myc-Fusionsproteine in Mammaliazellen
pEGFP-c2	<i>BD Biosciences</i>	Expressionsvektor für GFP-Fusionsproteine in Mammaliazellen
pEGFP-cw3	<i>BD Biosciences</i>	Expressionsvektor für GFP-Fusionsproteine in Mammaliazellen
pET 32a	<i>Novagen</i>	Expressionsvektor für His/S/Trx-Fusionsproteine in Bakterien
pET 32b	<i>Novagen</i>	Expressionsvektor für His/S/Trx-Fusionsproteine in Bakterien
pET 32c	<i>Novagen</i>	Expressionsvektor für His/S/Trx-Fusionsproteine in Bakterien
pGBKT7	<i>BD Biosciences</i>	Matchmaker-two-Hybrid-System (DNS-bindende Domäne)
pGEX 4T2	<i>Amersham Biosciences / GE Healthcare</i>	Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine in Bakterien
pGEX 5x2	<i>Amersham Biosciences / GE Healthcare</i>	Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine in Bakterien
pdsRed1-N1	<i>BD Biosciences</i>	Expressionsvektor für RFP-Fusionsproteine in Mammaliazellen
pcDNS3.1/His [®]	<i>Invitrogen</i>	Expressionsvektor für Xpress-Fusionsproteine in Mammaliazellen
pCR ®Topo blunt Vektor	<i>Invitrogen</i>	TOPO-TA [®] -Klonierungs-Kit
pCR ®Topo TA Vektor	<i>Invitrogen</i>	TOPO-TA [®] -Klonierungs-Kit

2.1.3 Antikörper

Die Antikörper wurden in der nachfolgend angegebenen Verdünnung für Immunfluoreszenzen (IF; 2.2.3.3), Immunpräzipitationen (2.2.2.7) und Western-Blots (WB; 2.2.2.5) eingesetzt, wobei als Lösung entweder Blotto* oder PBS-T mit 5% (w/v) BSA und 0,025% (w/v) Natriumazid diente.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
<i>Primäre Antikörper</i>			
anti-beta-Tubulin	Maus, monoklonal	IF: 1:500	Sigma- Aldrich
anti-EH	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:30 WB: 1:750	Prof. B. Grant
anti-Fibrillarlin	Maus, monoklonal	IF: 1 : 500	Abcam
anti-FLAG (M2)	Maus, monoklonal	WB: 1:10000	Sigma- Aldrich
anti-GFP(B34)	Maus, monoklonal	WB: 1:25000	Babco
anti-His (27E8)	Maus, monoklonal	WB 1:1000	Cell Signaling
anti-HPAST	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:30 WB: 1:750	Prof. B. Grant
anti-MAP2	Maus, monoklonal	IF: 1:1000 WB: 1:5000	Sigma- Aldrich
anti-Rhotekin 2	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:250 WB: 1:5000	R. Dahlhaus
anti-Myc (9E10)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:5000	Santa-Cruz
anti-Piccolo	Meerschweinchen, polyklonal	IF: 1:500	Dr. W. Altrock
anti-ProSAP 2	Meerschweinchen, polyklonal	IF: 1:1000	Prof. T. Böckers
anti-Synaptophysin	Maus, monoklonal	IF: 1:1000	Sigma- Aldrich
anti-Synbape	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:500 WB 1:5000 ¹	R. Dahlhaus
anti-Syndapin I (2704)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:2000	Dr. B. Qualmann
anti-Syndapin I (BE6)	Meerschweinchen, polyklonal	IF: 1:150 WB: 2500	Dr. B. Qualmann
anti-Syndapin II (P339)	Meerschweinchen, polyklonal	IF: 1:50 WB: 1:500	Dr. B. Qualmann
anti-Ubiquitin	Maus, monoklonal	WB: unverdünnt	Zymed
anti-Xpress	Maus, monoklonal	IF: 1:5000	Invitrogen
<i>Sekundäre Antikörper</i>			
anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor™ 350- oder	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Molecular

568- gekoppelt			Probes
anti-Kaninchen, gekoppelt mit Peroxidase	Ziege, polyklonal	WB: 1:15000	Dianova
anti-Maus IgG, Alexa Fluor™ 350- oder 488- oder 568- gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Molecular Probes
anti-Maus, gekoppelt mit Peroxidase	Ziege, polyklonal	WB: 1:10000	Dianova
anti-Meerschweinchen IgG, Alexa Fluor™ 488- oder 568- gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Molecular Probes
anti-Meerschweinchen, FITC gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Dianova
anti-Meerschweinchen, gekoppelt mit Peroxidase	Ziege, polyklonal	WB: 1:4000	Dako
anti-Maus Cy5	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Molecular Probes
anti-Meerschweinchen Cy5	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Molecular Probes
<i>Normalseren</i>			
Kaninchen IgG, normal	Kaninchen		Santa Cruz
Meerschweinchen IgG, normal	Meerschweinchen		Santa Cruz
Maus IgG, normal	Maus		Santa Cruz

¹ : nur in Blotto*

2.1.4 Kits, Lösungen und Reagenzien

Alle benutzten Kits, Enzyme und Reagenzien wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt, in Ausnahmefällen befinden sich genaue Informationen hierzu in der jeweiligen Methodenbeschreibung.

Material	Herstellung
10xPBS	26,8 mM KCl; 1,369 M NaCl; 80,6 mM Na ₂ HPO ₄ ; 14,7 mM K ₂ HPO ₄ ; Verdünnung auf 1x PBS führt zu pH 7,4
Ampicilinstammlösung	50 mg/ml Ampicillin-Natriumsalz in H ₂ O; final 100 µg/ml
Kanamycinstammlösung	25 mg/ml Kanamycindisulfat in H ₂ O; final 25 µg/ml
PBS-T	1xPBS mit 0,05% (v/v) Tween-20
Plasmid Purification Kit (Mini-Präparation)	Qiagen
Plasmid Purification Kit (Midi-Präparation)	Qiagen
Proteaseinhibitortabletten	Roche, <i>complete protease inhibitor cocktail</i> ®
Proteaseinhibitortabletten, EDTA frei	Roche, <i>complete protease inhibitor cocktail</i> ®
Ultra Clean™ 15 DNS Purification-Kit	Mo Bio

2.1.5 Nährmedien für Bakterien und Hefen

Die Sterilisation der flüssigen Nährmedien erfolgte durch Autoklavieren bei 121°C für 15 Minuten, im Anschluß an das gänzliche Abkühlen wurde den Medien

ggf. das betreffende Antibiotikum hinzugesetzt. Agarmedien hingegen wurden vor der Antibiotika-Zugabe auf lediglich 50°C abgekühlt und sofort danach in Petrischalen ausgegossen. Die Medienzusätze wurden steril filtriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Medium	Bestandteile
2-YT Medium	31g 2-YT-Broth (Invitrogen) je 1l H ₂ O ¹
3-AT Lösung	1 M 3-Amino-1,2,4-triazol in H ₂ O; in -WAHL-Medium final 2,5-10 mM. ²
Hefeagarmedien	17,5g Select Agar (Invitrogen) je 1l Minimal-SD-Medium ^{1,2}
-L-Agar	0,69g Leu DO Supplement (Clontech) je 1l Minimal SD-Medium ¹
LB-Agar	15g Select Agar (Invitrogen) je 1l LB-Medium ¹
LB-Medium	20g LB-Broth Base (Invitrogen) je 1l H ₂ O ¹
Minimal-SD-Medium	20g Glucose, 1,7g Yeast-Nitrogen Base (Gibco), 5g (NH ₄) ₂ SO ₄ je 1 l H ₂ O ¹
SOC-Medium	20 g/l Peptone 140 (Gibco); 5g/l Hefeextrakt (Gibco), 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose ¹
-W-Agar	0,74g Trp DO Supplement (Clontech) je 1 l Minimal SD-Medium ¹
-WAHL Agar	0,60g Ade/His/Leu/Trp DO Supplement (Clontech) je 1l Minimal SD-Medium ¹
-WL-Agar	0,64g Leu/Trp DO Supplement (Clontech) je 1 l Minimal SD-Medium ¹
YPDA-Medium	YPD-Medium mit 30 mg/l Adenin-hemisulfat final, pH 7,0; Zugabe nach dem Autoklavieren ^{1,2}
YPD-Medium	50g YPD-Broth (Gibco) je 1 l H ₂ O ¹

¹ gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers

² gemäß des Handbuchs zum Hefe-zwei-Hybrid-System (Matchmaker von Clontech)

2.1.6 Einzeller und Säuger

Für die Präparation von Plasmiden fanden ausschließlich Bakterien des *E.coli*-Stamms XL1-Blue MRF' (Stratagene) mit dem Genotyp $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac } [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]$ Verwendung, während der Stamm BL21(DE3)pLysS (Stratagene) mit dem Genotyp $F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal l(DE3) [pLysS Camr]$ zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen genutzt wurde. Darüber hinaus wurde im Hefe-zwei-Hybrid-System zur Analyse von cDNS-Bibliotheken der Hefestamm AH109 (Clontech) mit dem Genotyp $MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4\Delta, gal80\Delta, LYS2 : : GAL1_{UAS}GAL1_{TATA-HIS3}, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA-ADE2}, ura3 : : MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA-lacZ}$ eingesetzt, die Bestätigung der Interaktion hingegen wurde durch Verpaarung mit dem Hefestamm Y187 mit dem Genotyp $MAT a, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4\Delta, met-, gal80\Delta, URA3 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA-lacZ}$ durchgeführt. Dabei sind *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1* Reportergene, während *trp1* und *leu2* als Transformationskennung dienen. Außerdem wurden Ratten (*Rattus norvegicus*) des Schoenwalder Wistar-Stammes (genaue Bezeichnung: Shoe:Wist(Shoe)) aus der Tierzucht des Instituts für Neurobiologie in Magdeburg herangezogen, um Primärkulturen, Gewebehomogenate und Gehirnzellfraktionen herzustellen.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten

Die für diese Arbeit verwendeten molekularbiologischen Standardmethoden wurden weitgehend entsprechend der Fachliteratur (z.B. Ausubel *et al.*, 1990; C. Mülhardt, 2003) durchgeführt. Aus diesem Grund werden solche Techniken nachfolgend nur kurz beschrieben, während veränderte Methoden an der entsprechenden Stelle hingegen ausführlich dargestellt sind.

2.2.1.1 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Desoxinukloside Triphosphat Set	Roche
Oligonukleotide (Primer)	Gibco <i>Life Technologies</i>
Q-Solution	Qiagen
Taq DNS Polymerase	Qiagen
Turbo Pfu DNS Polymerase	Stratagene

Zur Generierung neuer, spezieller DNS-Konstrukte wurde die Polymerasekettenreaktion benutzt, die es erlaubt, durch den Einsatz von etwa 15-18 Basenpaaren langen und zu den jeweiligen DNS-Strängen komplementären Primern auf der Basis einer Matrizen-DNS solche Fragmente in größerer Menge *de novo* zu synthetisieren. Um diese Fragmente im Folgenden in einen Vektor einführen zu können, wurden darüber hinaus Schnittstellen für die gewünschten Restriktionsenzyme an das 5'-Ende der Primer angefügt. Die verwendeten Primer, Schnittstellen und Vektoren können der Tabelle 1 des Anhangs entnommen werden. Der Reaktionsansatz von 25 µl und das Temperaturprofil wurden gemäß gängiger Protokolle gestaltet. Daneben wurde diese Methode ebenfalls angewandt, um mittels spezifischer Primer Klone einer bestimmten Sequenz auf der Basis von Hefe-DNS im Hefe-zwei-Hybrid-System zu identifizieren (vergl. 2.2.1.10.3) oder gezielt Basen durch entsprechende Primer in aufeinanderfolgenden PCR-Schritten zu substituieren.

2.2.1.2 DNS-Restriktionen

Restriktionsenzyme *New England Biolabs, Fermentas*

Die DNS-Restriktionen erfolgten entweder als analytischer Verdau in einem Ansatz von 10 µl zur Identifikation bestimmter Fragmente oder als präoperativer Verdau in einem Ansatz von 30-50 µl zur Gewinnung von DNS-Fragmenten und linearisierten Vektoren mit sogenannten "klebrigen" Enden zum Zwecke der

Klonierung. Dazu wurden die Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer in der durch den Hersteller empfohlenen Quantität und Kombination eingesetzt und sodann für 3-5h bei 37°C inkubiert. Einen Sonderfall stellt dabei das Enzym Apa 1 dar, das bei 37°C eine Halbwertszeit von lediglich 30 Minuten hat und aus diesem Grund entweder bei 25°C oder in entsprechend höherer Konzentration zum Einsatz kam.

2.2.1.3 Gelelektrophorese von DNS

50x TAE	0,05 M EDTA; 1 M Essigsäure; 2 M Tris-Base
DNS-Probenpuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 50 mM EDTA; 30% (v/v) Glycerin; 0,25% (w/v) Xylencyanol
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O
<i>Smart Ladder</i>	DNS Molekulargewichtsmarker von Eurogentec Bel. s.a.

Die Auftrennung von DNS-Molekülen erfolgte unter nichtdenaturierenden Bedingungen in eindimensionalen, 1-2 prozentigen (w/v) Agarosegelen mit 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer und 10 µl Ethidiumbromidstammlösung je 200 ml Agaroselösung. Dazu wurde die DNS-Lösung in 1x DNS-Probenpuffer aufgenommen, in die Geltaschen gegeben und eine Spannung von 80 V (*power supply* 1000/500, BioRad) an die Pufferkammer (*sub cell*, Bio Rad) mit dem Gelträger angelegt. Auf Grund des in den DNS-Strängen interkalierten Ethidiumbromids konnten diese durch Anregung von Fluoreszenz im UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem *Eagle-Eye* (Stratagene) bzw. *Gel Doc 2000* (BioRad) photographisch dokumentiert werden. Sollten die DNS-Banden für Klonierungen eingesetzt werden, wurden sie mit einem Skalpell ausgeschnitten und gemäß 2.2.1.5 weiterverarbeitet.

2.2.1.4 Elution von DNS aus Agarosegelen

Zum Zwecke der Rückgewinnung von DNS aus Agarosegelen wurden die ausgeschnittenen Gelstücke mittels des *Ultra Clean™ 15 DNS Purification-Kits* nach den Angaben des Herstellers Mo Bio prozessiert und abschließend in einer 10 mM Tris/HCl-Lösung, pH 7,5 aufgenommen.

2.2.1.5 Klonierung von DNS-Fragmenten

Alkalische Phosphatase (<i>calv intestine</i>)	Roche
T4 DNS Ligase	New England Biolabs, Fermentas
T3 oder T4 Polynukleotid Kinase	New England Biolabs

Um neue Expressionskonstrukte herzustellen, wurden die ausgewählten Vektoren zunächst mit Hilfe von Restriktionsenzymen linearisiert und durch Zugabe

von 2,5 U alkalischer Phosphatase für 1 Stunde bei 37°C dephosphoryliert, um durch Abspaltung der 5'-Phosphatreste eine Selbstligation des Vektors während der Ligation zu unterbinden. Die DNS-Fragmente wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt, jedoch nicht dephosphoryliert. Im Anschluß an die Aufreinigung der DNS über Agarosegelelektrophorese und -elution erfolgte die Ligation von Vektor und Fragment in einem Ansatzverhältnis von 1:3 durch die ATP-abhängige T4-DNS-Ligase (0,5-1 U) in insgesamt 10 µl 1x Ligationspuffer für 16 Stunden bei 16°C.

2.2.1.6 Elektro- und Hitzeschockkompetente Zellen

CaCl₂-Lösung: (für Hitzeschockkompetente Zellen)

60 mM	CaCl ₂	} steril filtriert oder autoklaviert
15 % (v/v)	Glycerol	
10 mM	PIPES pH 7	

Zur Vermehrung von DNS in Bakterien wurden transformationsbereite Zellen des *E.coli*-Stamms XL1-Blue MRF' (Tetrazyklinresistenz) hergestellt. Hierzu wurde aus einer einzelnen Kolonie eine Vorkultur von 50 bis 100 ml 2-YT-Medium / Tetrazyklin gestartet und über Nacht bei 37°C und 200 U/Min. inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde anschließend die Hauptkultur von 1-2 l des gleichen Mediums angesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,85 - 0,95 bei 200 U/Min. kultiviert. Nach Abkühlung der Zellen in einem Eisbad auf 4°C erfolgten das Ernten bei 2500xg und 4°C für 10 Minuten, sowie zwei Waschschriffe mit je 1-2 l eiskaltem Reinstwasser. Die Pelletierung hierzu wurde bei 3000xg und 4°C für 10 Minuten durchgeführt. Für einen dritten Waschschriff wurden 50 ml eiskaltes 10% Glycerin eingesetzt. Das durch eine zehninütige Zentrifugation bei 3000xg und 0°C erzeugte Pellet wurde schließlich in der gleichen Menge 10% Glycerin aufgenommen und die so erhaltene Bakteriensuspension in Aliquots zu je 75 µl geteilt. Diese wurden augenblicklich in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80°C bis zur Verwendung gelagert.

Für die Gewinnung von Fusionsproteinen aus Bakterien wurden hitzschockkompetente *E. coli* BL21(DE3)pLysS erzeugt. Dazu wurde auf die zuvor beschriebene Art aus einer Vorkultur von 50 ml LB-Medium durch eine 1:100 Verdünnung eine Hauptkultur von 500 ml hergestellt, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,375 bei 250 U/Min. und 37°C inkubiert und im Anschluß an ihre Abkühlung im Eisbad durch eine siebenminütige Zentrifugation bei 1600xg und 4°C ohne Bremsaktivierung geerntet. Danach wurde das Pellet zwei Waschschriffen, unterbrochen durch eine dreißigminütige Inkubierung im Eisbad, mit je 10 ml CaCl₂-Lösung unterzogen, die Pelletierung hierzu erfolgte bei 1100g und 4°C für 5 Minuten. Abschließend wurde das finale Pellet in 2 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen und in 250 µl Proben geteilt, welche auf die für elektroschockkompetente Zelle beschriebene Weise bis zu ihrer Verwendung eingelagert wurden.

2.2.1.7 Transformation von Bakterien

Elektrisches Gerät *Gene Pulser*, Bio-Rad
Elektroporationsküvetten Elektrodenabstand: 0,2 cm, Equibio

Die Einführung von DNS-Plasmiden in *E. coli* XL1-Blue MRF' Bakterien erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden 75 µl elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl DNS aus einem Ligationsansatz (vergl. 2.2.1.5) oder einer DNS-Präparation (vergl. 2.2.1.8 und 2.2.1.10.3) versetzt. Nach der Überführung des Ansatzes in eisgekühlte Elektroporationsküvetten erfolgte die Transformation der Bakterien durch einen elektrischen Puls von 2500 V, 200 Ω und 50 µF. Im Anschluß daran wurden die Zellen sofort in einem Milliliter auf 37°C vorgewärmten SOC-Medium aufgenommen und eine Stunde bei dieser Temperatur unter Schütteln bei 8000-10000 U/Min. weiterinkubiert. Danach wurden die Zellen durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 500xg geerntet und mit einem Rest SOC-Medium auf Agar-Platten, welche das erforderliche Antibiotikum enthielten, ausgestrichen. Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C über Nacht sind einzelne Kolonien auf der Platte verfügbar.

In *E. coli* BL21(DE3)pLysS wurden die gewünschten Plasmide durch Hitzeschock eingebracht. Zu diesem Zweck wurden die benötigten Aliquots der betreffenden Zellen auf Eis aufgetaut und dort für 5 Minuten mit einem µl der DNS inkubiert. Sodann erfolgte das Öffnen der Membranen durch einen Hitzeschock bei 42°C für 50 Sekunden. Nach dieser Transformation wurden die Zellen 2 Minuten auf Eis abgekühlt, bevor sie ebenfalls in einem ml SOC-Medium aufgenommen und auf die zuvor beschriebene Weise weiterprozessiert wurden.

2.2.1.8 Präparationen von DNS-Plasmiden aus Bakterien

P1 : 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 mg/ml RNase A; pH 8,0
P2 : 200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS
P3 : 3,0 M Kaliumacetat; pH 5,5

Die Gewinnung von geringen DNS-Mengen aus *E. coli* XL1-Blue MRF' Bakterien wurde durch alkalische Lyse (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) von Zellpellets bewerkstelligt. Dazu wurde eine Über-Nacht-Kultur (LB-Medium mit Antibiotikum, 37°C, 300 U/Min.) aus jeder gewünschten Kolonie angesetzt und sodann bei 3300g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 200 µl P1 resuspendiert, durch Zugabe von 200 µl P2 für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert und anschließend mittels 200 µl P3 neutralisiert. Die Vermischung der verschiedenen Puffer erfolgte dabei durch mehrfaches Invertieren der Reaktionsgefäße. Im Anschluß wurden die Proben für mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert, um die Präzipitation der denaturierenden Proteine zuzulassen. Ihre

Separation von der DNS-Lösung erfolgte nun durch eine Zentrifugation bei 14000xg und Raumtemperatur für 12 Minuten, danach wurde die DNS durch Vermischen der Lösung mit 350 µl Isopropanol ausgefällt und durch eine erneute Zentrifugation (14000xg, 15 Minuten, Raumtemperatur) pelletiert. Das Pellet wurde sodann mit einem ml 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 14000xg und Raumtemperatur für 3 Minuten zentrifugiert. Nach der Trocknung des DNS-Pellets erfolgte die Lösung der DNS in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Die Plasmide wurden bei – 20°C gelagert.

DNS von größerer Reinheit und höherer Konzentration, z.B. für den Einsatz in der Zellkultur, wurde unter Verwendung des entsprechenden Plasmid-Präparations-Kits (siehe auch 2.1.4) nach den Angaben des Herstellers angefertigt. Bei der Midi-Präparation wurde als einzige Abweichung hiervon anstelle einer Zentrifugation zur Trennung von DNS und präzipitierten Proteinen eine Papierfiltration (Schleicher & Schuell, Filterpapiersorte 595 1/2) durchgeführt. Die finale Aufnahme der so gewonnenen DNS erfolgte in autoklaviertem Reinstwasser.

2.2.1.9 Analyse der DNS-Sequenzen

Die Sequenzierung von DNS-Abschnitten erfolgte unter Verwendung des *ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer) mit 10 pmol Primer je 1 µg Plasmid an einem automatischen Sequenzierer des Typs *373 DNS Sequencer Stretch* der Firma Applied Biosystems. Die Durchführung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durch Frau K. Hartung und Frau K. Schumacher bewerkstelligt. Ab dem 28. 01. 2003 wurden alle Proben zur Sequenzierung an die Firma SEQLAB –Sequence Laboratories Göttingen GmbH übersandt.

Zwecks anschließender Identifikation unbekannter DNS-Fragmente aus den Hefe-zwei-Hybrid-Screenen sowie zur Charakterisierung von DNS- bzw. Proteinsequenzen im Hinblick auf mögliche enzymatische Schnittstellen, Lokalisationssignale, potentielle Bindungsmotive und Sekundärstrukturen wurden diese Programme mit Standardeinstellungen benutzt:

Programm	Funktion	Adresse im Internet
Allgemein	diverse	http://www.expasy.org/tools/
Clustalw	Alignment	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
Coils	Vorhersage helikaler Bereiche	http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html
Motif Scan	Protein-Bindungsmotive	http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN
NCBI Blast	DNS/Protein Suche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
NEBCutter	DNS-Schnittstellenanalyse	http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html
NN Predict	Proteinlokalisierung	http://www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html
NUCDISC	Identifikation von Kernlokalisierungssignalen	http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html (eine Zusammenfassung hierzu geben Hicks und Raikhel, 1995)
Peptidcutter	Protein Schnittstellen	http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/
PESTFind	Identifikation von PEST-	http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/

	Sequenzen	
PredictProtein	Proteinstrukturen	http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/
Prosite / Pfam	Motivanalyse für Proteine	http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/
ProtParam	Chemische Proteinparameter	http://www.expasy.org/tools/protparam.htm
PSORT II	Protein Lokalisation	http://psort.nibb.ac.jp/form2.html
Reverse- Complement	Reverse-komplementärer DNS-Strang	http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/rev_comp.html
SMART	Proteindomänen	http://smart.embl-heidelberg.de/
Translate	DNS → Protein	http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/rev_comp.html

2.2.1.10 Das Hefe-zwei-Hybrid-System

Das Hefe-zwei-Hybrid-System (MATCHMAKER *Two-Hybrid System 3* von Clontech; nach Fields & Song, 1989) wurde zur Ermittlung neuer, auch bisher unbekannter, potentieller Interaktionspartner eines als Köder eingesetzten Proteins (z.B. der N-Terminus von Syndapin I) angewandt. Es beruht auf der Teilung des Transkriptionsfaktors der GAL4-Reportergene in seine zwei funktionellen Untereinheiten: die DNS-bindende-Domäne und die Aktivator-domäne. Die Aktivator-domäne wird dabei auf DNS-Ebene mit der potentiellen Beute, einer Bibliothek aus Proteinen und Proteinteilen, fusioniert, während die DNS-bindende-Domäne mit dem Köderprotein kombiniert wird. Beide Plasmide werden dann zusammen in Hefezellen expremiert. Binden Köder und Beute aneinander, gelangen die beiden Domänen in hinreichende räumliche Nähe und können so die Transkription der nachfolgenden Reportergene aktivieren. Diese befähigen die Hefen einerseits zum Wachstum auf dem Mangelmedium –WAHL und beinhalten andererseits das *lac-Z*-Gen, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert, das die Hefezellen in die Lage versetzt, das farblose Substrat x-Gal in den blau erscheinenden Farbstoff 5-Brom-4-Chlorindigo umzuwandeln. Somit können im Hinblick auf die analysierte Protein-Protein-Interaktion positive Hefekolonien identifiziert und die betreffenden Proteine durch Präparation der DNS-Plasmide bestimmt werden. Köderproteine, die an sich in der Lage sind, die Reportergene zu aktivieren (sogenannte Selbstaktivierung), können generell nicht verwendet werden.

2.2.1.10.1 Transformation von Hefezellen

10x LiAc	1 M Lithium Acetat, pH 7,5 (autoklaviert)
10x TE-Puffer	0,1 M Tris-HCl; 10 mM EDTA, pH 7,5 (autoklaviert)
carrier-DNS	Clontech
Elektrisches Gerät	<i>Gene Pulser</i> , Bio Rad
Elektroporationsküvetten	0,2 cm Elektrodenabstand, Invitrogen
Ratte-cDNS-Bibliothek	<i>BD Biosciences</i> λ TriplEx™ (Gehirn)
PEG/TE/LiAc Lösung	8 ml PEG-Stammlösung; 1 ml 10x TE-Puffer; 1 ml 10x LiAc-Puffer

PEG-Stammlösung	50% (w/w) Polyethylenglycol 3350 (PEG) in Reinstwasser (steril filtriert)
TE/LiAc Puffer	1x TE-Puffer & 1x LiAc-Puffer im Verhältnis 1:1
-WAHL/3-AT Agar	-WAHL Selektionsagar mit final 2,5 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol (Sigma-Aldrich)

Um bestimmte Köder- oder Beuteplasmide in Hefezellen einzubringen, wurden diese chemisch nach einer verkürzten Variante des Lithium-Acetat-Verfahrens (Matchmaker *Two-Hybrid System 3* Handbuch, Transformationsprotokoll für kleine Ansätze, Clontech; Ito *et al.*, 1983; Schiestl und Gietz, 1989; Gietz *et al.*, 1992) transformiert. Dazu wurde aus 2 bis 3 Hefekolonien eine Vorkultur von 50 ml YPDA-Medium gestartet und über Nacht bei 30°C und 300 U/Min. inkubiert. Aus den durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 500xg und Raumtemperatur geernteten Hefezellen wurde sodann durch Resuspension der Hefen in 100 ml frischem YPDA-Medium die Hauptkultur angesetzt und für 3 Stunden unter den genannten Bedingungen weiterkultiviert. Nach erneutem Ernten der Zellen wurden diese je einmal mit 50 ml TE-Puffer und einmal mit 40 ml TE/LiAc-Puffer gewaschen. Die Zentrifugation nach der Resuspension in dem betreffenden Waschpuffer erfolgte wie zuvor beschrieben. Abschließend wurden die Hefezellen in 1,5 ml TE/LiAc-Puffer aufgenommen. Zur Transformation der Hefen wurden 2 µl Minipräparations-DNS mit 7,5 µl *carrier*-DNS, 50 µl transformationskompetenten Zellen sowie 300 µl PEG/TE/LiAc-Puffer vermischt und diese einem zwanzigminütigen Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Danach wurden sie 2 Minuten auf Eis inkubiert, geerntet, in sterilem Wasser resuspendiert, auf dem entsprechenden Selektionsagar ausgestrichen und für ein paar Tage bei 30°C weiterinkubiert, bis einzelne Kolonien deutlich hervor traten.

Sollte hingegen eine Bank (MATCHMAKER pACT-2 Rattengehirn, 3,5 Mio. unabhängige Klone, von Clontech) von Plasmiden in die Zellen eingeführt werden, um nach potentiellen Interaktionskandidaten zu suchen, so erfolgte im Anschluß an die chemische Transformation des Köder-Plasmids die Zweittransformation (Matchmaker *Two-Hybrid System 3* Handbuch, Sequentielle Transformation der Plasmid-Bank, Clontech) der Zellen mit der Bank-DNS elektrisch wie in Helmuth *et al.* (2001) dargelegt. Nach dem Ausstreichen der doppeltransformierten Hefen auf -WAHL Selektionsagar wurden die während einer Bebrütungsphase von 2-16 Tagen bei 30°C erschienenen Kolonien zur Vereinzelung auf Masterplatten aus -WAHL/3-AT Selektionsagar umgestrichen. Diese Prozedur wurde noch zwei Mal an dem jeweils 3. Kultivierungstag der Masterplatte wiederholt, bevor die verbliebenen Hefekolonien zum Animpfen von Plasmidpräparationskulturen (Abschnitt 2.2.1.10.3) eingesetzt wurden.

2.2.1.10.2 Konjugation von Hefen

2x YPDA/Kanamycin Medium	2x YPD-Medium mit 30 mg/l Adeninhemisulfat final, pH 7,0 und 15 mg/l Kanamycin; Zugabe nach dem Autoklavieren der YPD-Lösung
Maus-cDNS-Bibliothek	BD Biosciences λTriplEx™ (Gehirn), <i>pretransformed</i>

Zur Durchführung von Interaktionsanalysen in Hefen wurde dieses Paarungsverfahren (Matchmaker *Two-Hybrid System 3* Handbuch, Hefe Verpaarung, Clontech; Bendixen *et al.*, 1994; Finley & Brent, 1994) für unterschiedliche Hefestränge als alternative Methode zur Vereinigung von zwei Plasmiden in einer Zelle eingesetzt. Daneben wurde dieses Prinzip auch zur Durchführung eines Screens mit einer vortransformierten Bank (*Pretransformed MATCHMAKER Library*, Handbuch zum Screenen vortransformierter Banken, Clontech) angewandt. Bei beiden Verfahren wurde strikt nach den Protokoll-Vorgaben des Herstellers vorgegangen.

2.2.1.10.3 Präparation von Plasmiden aus Hefezellen

Glaskugeln	Sigma-Aldrich, G-8772
Lyse-Puffer	1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2% (v/v) Triton X-100; 1% (w/v) SDS
NaAc-Lösung	3 M Natriumacetat
RPC-Isoamylalkohol	Roti-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, Carl Roth

Die Präparation von Plasmiden aus Hefezellen wurde nach dem Protokoll von Hoffman und Winston (1987) durchgeführt. Dabei wird die Zellmembran der Hefen durch Vortexen in Lyse-Puffer über Scheren an den Glaskugeln aufgeschlossen und die DNS durch die gleichzeitige Anwesenheit von RPC-Isoamylalkohol extrahiert. Um die Effektivität des Aufschlusses zu verbessern, wurden die geernteten Hefen vor der Lyse zusätzlich über Nacht bei -20 oder -80°C eingefroren.

Zwei µl der so gewonnenen Plasmidlösung, welche unter Umständen bis zu 5 verschiedene DNS-Ringe aus der jeweiligen Ursprungs-Hefekolonie enthalten kann, wurden anschließend zur Herstellung identischer Klone in elektrokompetente *E. coli* transformiert und aus diesen neu präpariert (siehe auch Absatz 2.2.1.8). Durch Sequenzierung (Abschnitt 2.2.1.9) wurde daraus das kodierte Protein ermittelt. Alternativ erfolgte die Identifikation bereits bekannter Klone auch über eine PCR-Reaktion (vergl. Absatz 2.2.1.1) mit spezifischen Primern auf der Basis der Hefe-DNS.

2.2.1.10.4 Interaktionsanalysen in Hefen

Detektionslösung	100 ml Z-Puffer; 0,27 ml β-Mercaptoethanol; 1,67 ml X-Gal-Stammlösung
Filterpapier	Whatman No. 1
-WAHL/3-AT Agar	-WAHL Selektionsagar mit final 2,5 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol (Sigma-Aldrich)
X-Gal-Stammlösung	20 mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-d-Galactopyranosid) in N,N-Dimethylformamid (DMF) ® (lagerbar bei -20°)
Z-Puffer	0,75g KCl; 16,1g Na ₂ HPO ₄ ×7H ₂ O; 5,5g NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O; 0,246 mg MgSO ₄ ×7H ₂ O, pH 7,0

Als Nachweis einer Wechselwirkung zweier Proteine in Hefezellen wurden zum einen der Wachstumstest und zum anderen der sogenannte Blautest (auch β-

Galaktosidase-Essay oder Filtertest) eingesetzt (*Matchmaker Two-Hybrid System 3* Handbuch, β -Galaktosidase-Essay, Clontech). Für den Wachstumstest wurde ein Teil der frisch auf dem –LW-Selektiosagar gewachsenen Kolonien auf –WAHL/3-AT Selektionsagar umgeimpft und das Wachstum jener Zellen am 3. Tag der Bebrütung bei 30°C dokumentiert. Für den Blautest wurde ein anderer Teil der Hefen auf einen Streifen Filterpapier abgezogen und gemäß den Protokoll-Vorgaben des Herstellers weiter prozessiert. Eine ggf. auftretende Blaufärbung der Hefekolonien wurde nach einer Stunde, nach 3 Stunden und nach einer Nacht (ca. 12 Stunden) in den Kategorien (+) sehr schwacher Blauschimmer, + schwach hellblau, ++ blau, +++ dunkelblau und ++++ tief dunkelblau beurteilt. Als Negativkontrolle wurde dabei der leere Vektor pGBTK7 (DNS-bindende-Domäne) eingesetzt (siehe auch Absatz 2.2.1.10.2).

2.2.2 Biochemische Methoden

Ebenso wie die molekularbiologischen Standardmethoden wurden auch die für diese Studie eingesetzten biochemischen Standardmethoden gemäß den in der Fachliteratur aufgeführten Protokollen ausgeführt (z.B. *Current Protocols in Protein Science* (Coligan *et al.*, 2001) oder *Der Experimentator – Proteinbiochemie* (Rehm, 2002)).

2.2.2.1 Präparation von Glutathion-S-Transferase (GST) – Fusionsproteinen

Chromatographiesäulchen	Poly-Prep-Chromatographiesäulchen von Bio Rad
Elutions-Puffer	10 mM reduziertes Glutathion; 50 mM Tris-HCl Puffer, final pH 8,0
Glutathion Sepharose Matrix	Amersham Biosciences / GE Healthcare
Medium	2xYT- oder LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin

Das Verfahren zur Präparation von GST-Fusionsproteinen basiert auf den entsprechenden Vorgaben des Matrix-Herstellers Amersham Biosciences/GE Healthcare und wurde wie in Qualmann *et al.* (1999) und Qualmann *and* Kelly (2000) publiziert durchgeführt. Der Gehalt an Proteinen in der über Nacht gegen 2 l 1x PBS dialysierten Probe wurde nach der Bradford-Methode (Absatz 2.2.2.3) bestimmt und die rekombinanten Proteine bei -80°C eingelagert. Die während der gesamten Prozedur genommenen, analytischen Aliquots (uninduziert, induziert, Homogenat, Durchlauf, Wasch 1-3, Eluate 1-4, dialysiertes Fusionsprotein) wurden durch SDS-PAGE (Abschnitt 2.2.2.4) und Coomassie-Blau Färbung qualitativ ausgewertet.

2.2.2.2 Präparation von Fusionsproteinen mit Histidin (His) – Markierung

Chromatographiesäulchen	Poly-Prep-Chromatographiesäulchen von Bio Rad
Elutions-Puffer	Nickel-Bindungspuffer mit 250 mM Imidazol
Ni-NTA Matrix	Ni-NTA <i>His-Bind</i> [®] Resin für das pET System von Novagen

Medium	2x YT- oder LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin
Nickel-Bindungspuffer	300 mM NaCl; 50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Imidazol; 1x Proteaseinhibitor
Waschpuffer	Nickel-Bindungspuffer mit 20 mM Imidazol

Die Herstellung der His-Fusionsproteine (pET 32 – Markierung, 20 kDa) erfolgte nach dem im pET-System-Handbuch von Novagen erläuterten Verfahren zur Aufreinigung von Proteinen über die His-Markierung. Hierzu wurde eine 150 ml Vorkultur angesetzt und über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. 100 ml dieser Kultur wurden hiernach verwendet, um eine Hauptkultur von 1l zu starten, welche bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 0,5 mM IPTG induziert und sodann für 4 Stunden weiterkultiviert wurde. Zum Ernten der Zellen wurden diese im Eisbad für 5 Minuten abgekühlt und für 5 Minuten bei 5000xg und 4°C zentrifugiert. Durch Aufnahme des Pellets in 25 ml eiskaltem, 20 millimolarigem Tris-HCl, pH 8,0 und anschließender Zentrifugation unter den genannten Bedingungen wurden die Bakterienzellen gewaschen und als Pellet bei -80°C eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 25 ml eiskaltem Nickel-Bindungspuffer aufgenommen und durch Einsatz der French Press (Sim Amico) aufgeschlossen. Die Extraktion der Proteine erfolgte unter Zugabe von 2 mg DNase und 1% Triton X-100 (final) für 1 Stunde bei 4°C unter langsamen Rotieren. Nach der Fraktionstrennung bei 10000xg und 4°C für 30 Minuten wurde der Überstand mit 1,2 ml der 2x mit 4 ml Nickel-Bindungspuffer vorgewaschenen Matrix vereinigt, diese durch langsames Rotieren bei 4°C für 1 Stunde mit den Fusionsproteinen gekoppelt und 3 Waschschritten mit dem Waschpuffer unterzogen. Die Elution erfolgte mit 4x 0,5 ml Elutionspuffer. Nach der Umpufferung der Proteine durch PD-10 Entsalzungssäulen gemäß den Angaben des Herstellers (Amersham Biosciences/GE Healthcare) in 1x PBS-Puffer und abschließender Proteinbestimmung (Absatz 2.2.2.1 & 2.2.2.3) wurden die Proben bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.2.2.3 Proteinfärbungen und -bestimmungen

BSA	Bovines Serum-Albumin, Carl Roth
Cellophanfolie™	Carl Roth
Comassie-Blau Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie® Brilliant-Blue G-250; 5% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure in H ₂ O
Comassie-Blau Farblösung (Bradford)	100 mg Coomassie® Brilliant-Blue G-250; 50 ml 95% Ethanol; 100 ml 85% H ₃ PO ₄ auf 1 l aufgefüllt mit H ₂ O und gefiltert mit Whatman No. 1 Filterpapier
Entfärbelösung für Comassie-Blau	7% (v/v) Essigsäure; 5% (v/v) Methanol in H ₂ O
Trocknungslösung für AA-Gele	5% (v/v) Glycerin in H ₂ O; 50% (v/v) Methanol

Die Ermittlung des Proteingehaltes einer Probe wurde colorimetrisch nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) mit einer 3fachen BSA-Eichreihe durchgeführt.

Bei einer Wellenlänge von 600 nm fand die Extinktionsmessung im Mikrotiterplattenleser *Titertek Multiskan MCC/340* (Labysystems) statt. Zur Visualisierung von Proteinen in Acrylamidgelen wurden die Gele nach dem Verfahren von Laemmli (1970) einer Comassie-Blau-Färbung unterzogen und mittels Trocknungslösung und Fotopapierpresse zwischen Cellophanfolien konserviert. Eine eventuelle Dokumentation erfolgte vor dem Trocknungsprozeß durch Scannen der Gele unter Verwendung des Computerprogramms *quantity one* von Bio Rad.

2.2.2.4 Gelelektrophorese von Proteinen

10x Elektrophoresepuffer	1,92 M Glycin; 250 mM Tris-Base; 1% (w/v) SDS
4x Protein-Probenpuffer	1% (w/v) SDS; 40% (v/v) Glycerin; 20% (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,004% Bromphenolblau; 250 mM Tris-HCl, pH 6,8
4x Sammelgelpuffer	0,4% (w/v) SDS; 0,5 M Tris/HCl; pH 6,8
4x Trenngelpuffer	0,4% (w/v) SDS; 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
<i>Mighty Small</i> Gelsystem	Hoefer <i>Mighty Small System SE 250</i> von Amersham Biosciences / GE Healthcare in der Größe 10,0 x 8,0 x 0,075 cm
<i>Protein Ladder</i>	Protein Molekulargewichtsmarker von Fermentas
<i>Rainbow Marker</i> (Protein Molekulargewichtsmarker)	Amersham Biosciences / GE Healthcare
Rotiphorese 30	Acrylamid : N,N-Bisacrylamid = 37,5 : 1 (Carl Roth)
Sammelgel-Lösung für 13 Gele	7 ml 4x Puffer; 4,33 ml Rotiphorese 30; 6 ml 87%iges Glycerin; 8,5 ml H ₂ O; 37 μ l TEMED; 149 μ l 10%ige Ammoniumpersulfatlösung; 2,5 μ l Phenolrotlösung (2000x von Sigma-Aldrich)
Trenngel-Lösung für 13 Gele	15 ml 4x Puffer; 19 ml Rotiphorese 30; 4,4 ml 87%iges Glycerin; 21,6 ml H ₂ O; 40 μ l TEMED; 400 μ l 10%ige Ammoniumpersulfatlösung; 25 μ l Bromphenolblaulösung (2000x von Sigma-Aldrich)

Um Proteingemische anhand des Molekulargewichts aufzutrennen, wurde die eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen eingesetzt wie von Laemmli (1970) vorgestellt. Dazu wurden 9,5%ige Acrylamidtrenngele mit 4%igen Sammelgelen aus den oben angeführten Lösungen angefertigt. Die Proben wurden in 1x Protein-Probenpuffer aufgenommen, bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht und nach dem Abkühlen auf die Gele aufgetragen. Ihre Auftrennung erfolgte kontinuierlich in 1x Elektrophoresepuffer durch Anlegen einer Spannung von 500 V bei einer Stromstärke von 8 mA für das Sammelgel bzw. 8-12 mA für das Trenngel. Anschließend erfolgte entweder eine Proteinfärbung (Abschnitt 2.2.2.3) oder eine Western-Blot-Analyse der Proteine (Abschnitt 2.2.2.5).

2.2.2.5 Western-Blot-Analysen

Blotkammer	Hoefer TE 22 Mini Tank Transphor Unit-System, Amersham Biosciences/GE Healthcare
------------	--

Blotto	5% (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS-T
Blotto*	Blotto mit 1% (w/v) BSA
Chemielumineszenzfilme	<i>Hyperfilm-ECL</i> -Filme, Amersham Biosciences / GE Healthcare
ECL Lösung	Amersham Biosciences / GE Healthcare
Entwicklermaschine	<i>Curix 60</i> von Agfa
Nitrocellulosemembran	Protran BA-Nitrocellulose 0,25 µm Porengröße von Schleicher & Schuell
Ponceau-S-Färbelösung	0,5% (w/v) PonceauS®; 1% Essigsäure
Western-Blot-Puffer	192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,2% (w/v) SDS; 25 mM Tris, pH 8,3

Für Western-Blot-Analysen wurden die Proteine zunächst nach dem Verfahren von Towbin (Towbin *et al.*, 1979) bei 200 mA, 500 V und 4°C für 90 Minuten elektrophoretisch aus dem Gel (Abschnitt 2.2.2.4) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach Beendigung des Protein-Transfers wurde die Membran nach Wunsch entweder zuerst einer Ponceau-Färbung (Salinovitch & Montelaro, 1986) unterzogen oder es wurden die freien Proteinbindungsstellen der Membran direkt durch eine einstündige Inkubation in Blotto* abgesättigt. Die immunologische Detektion von Proteinbanden erfolgte durch spezifische primäre und sekundäre Antikörper (Abschnitt 2.1.3) für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Antikörperrückstände wurden durch dreimaliges Waschen der Membranen mit Blotto bzw. final mit PBS-T für je 10 Minuten bei Raumtemperatur entfernt. Schließlich diente die an den Zweitantikörper gekoppelte Merettichperoxidase zur Visualisierung von Proteinbanden mittels des ECL-Chemielumineszenz-System.

2.2.2.6 Copräzipitationsprüfungen

Elutionspuffer	10 mM reduziertes Glutathion; 50 mM Tris-HCl Puffer, final pH 8,0
Glutathion Sepharose Matrix	Amersham Biosciences / GE Healthcare
Hepes-Puffer für Copräzipitationsanalysen	10 mM HEPES; 1 mM EGTA; 0,1 mM MgCl ₂ ; 0,15 oder 0,3 M NaCl, 1% Triton-X 100; 1x Proteaseinhibitor ohne EDTA; pH 7,5
HEK-Zellysat oder	Abschnitt 2.2.3.2
Rattengehirncytosol oder	Abschnitt 2.2.2.10
His-Fusionsprotein	Abschnitt 2.2.2.2

Um Proteininteraktionen zu verifizieren und zu spezifizieren, wurde diese *in-vitro*-Methode der Co-Affinitätsreinigung eingesetzt wie in Qualmann and Kelly, 2000; Kessels *et al.*, 2001; Kessels and Qualmann, 2002; und Qualmann *et al.*, 2004 publiziert. Die Inkubation der an die mit 1xPBS gereinigte Matrix gekoppelten Fusionsproteine erfolgte über Nacht unter langsamen Rotieren bei 4°C mit:

250 µl HEK-Zell-Lysat in Hepes-Puffer / 150 mM NaCl mit überexprimierten GFP-Fusionsproteinen,

oder 1 mg Rattengehirncytosol in 500 µl Hepes-Puffer / 150 mM NaCl,

oder 30 µg gereinigtes His-Fusionsprotein in 500 µl Hepes-Puffer / 300 mM NaCl.

Die Analyse der Proben des Überstandes und der nach dreimaligem Waschen in Hepes-Puffer gewonnen Eluate erfolgte immunologisch (Absatz 2.2.2.4 und 2.2.2.5).

2.2.2.7 Co-Immunopräzipitationen

4x Protein-Probenpuffer für endogene CoIPs	1% (w/v) SDS; 40% (v/v) Glycerin; 0,004% Bromphenolblau; 250 mM Tris-HCl, pH 6,8
DMP-TEA-Puffer (endogene CoIPs)	20 mM Diemethyl-Pimelididat-Hydrochlorid frisch gelöst in TEA, pH 8,2
Ethanolamin-Lösung (endogene CoIPs)	20 mM Ethanolamin, pH 8,2
HEK-Zell-Lysat für heterologe CoIPs	Abschnitt 2.2.3.2
Hepes-Puffer für endogene CoIPs	10 mM HEPES; 1 mM EGTA; 0,1 mM MgCl ₂ ; 50 mM NaCl, 1% Triton-X 100; 1x Proteaseinhibitor ohne EDTA; pH 7,5
Hepes-Puffer für heterologe CoIPs	10 mM HEPES; 1 mM EGTA; 0,1 mM MgCl ₂ ; 0,1 M NaCl, 1% Triton-X 100; 1x Proteaseinhibitor ohne EDTA; pH 7,5
Matrix für endogene CoIPs	Protein-A-Agarose, Santa Cruz
Matrix für heterologe CoIPs	Protein-G-Sepharose, Santa Cruz
Normal-IgGs	Maus und Kaninchen von Santa Cruz
PBS-BSA-Lösung (heterologe CoIPs)	1x PBS mit 5% (w/v) BSA
PBS-T für endogene CoIPs	1x PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7,4
Rattengehirncytosol (endogene CoIPs)	Abschnitt 2.2.2.10
TEA-Puffer (endogene CoIPs)	0,2 M Triethanolamin, pH 8,2

Diese *in-vivo* Methode der Copräzipitationsprüfung (CoIP, z.B. Platt *et al.*, 1986; Doolittle *et al.*, 1991; Braun *et al.*, 2005) wurde angewandt, um Proteininteraktionen durch ein weiteres, unabhängiges Verfahren zu bestätigen. Soweit nichts anderes angegeben ist, wurden dabei alle Inkubationen bei 4°C und alle Zentrifugationen bei 14000g und 4°C durchgeführt. Als Kontrolle dienten gleichbehandelte Proben, die statt der Antikörper Normal-IgGs der entsprechenden Art enthielten.

Für heterologe CoIPs wurden je Probe 3 µg Antikörper (Maus α FLAG) bzw. 3 µg IgGs (Maus) für 5 Stunden unter langsamen Rotieren an die mit 3x mit 1xPBS vorgewaschene Protein-G-Sepharose-Matrix gekoppelt. Nach 2 Waschschrte mit 1x PBS und einem Waschschrte mit Hepes-Puffer erfolgte die Über-Nacht-Inkubation der Proben mit dem FLAG- und GFP-markierte Proteine enthaltenden HEK-Zell-Lysat. Hiernach wurde die Waschprozedur 3x mit Hepes-Puffer wiederholt, die Matrix mit 30 µl Protein-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und für 5 Minuten zentrifugiert. Die analytischen Proben des HEK-Zell-Lysats ("Lysat") und des nicht an die Matrix gebundenen Materials ("Überstand") sowie der Überstand der Elution ("Eluat") wurden gemäß Abschnitt 2.2.2.4 und 2.2.2.5 ausgewertet.

Für endogene CoIPs wurde ein Verfahren mit kovalenter Bindung des Antikörpers an die Matrix gewählt, um bei der Analyse durch SDS-PAGE und Western-Blot störende IgG-Banden zu vermeiden. Dazu wurden je Probe 40 bzw. 60 µl Protein-A-Agarose Matrix für die Vorreinigung des Rattengehirncytosols bzw. für die Co-Immunopräzipitation 3x mit einem ml 1x PBS-T-Puffer gewaschen, in der gleichen Menge selbigen Puffers aufgenommen und mit 15 µl des Antikörpers bzw. 7,5 µl des entsprechenden Antiserums in 500 µl 1x PBS-T-Puffer für eine Stunde langsam rotierend inkubiert. Anschließend wurden folgende Waschschrte und Inkubationen mit Zentrifugationen bei 500g und 4°C für maximal 30 Sekunden durchgeführt:

2 Waschungen mit 1x PBS-T-Puffer,
2 Waschungen mit TEA-Puffer,
Inkubation mit DMP-TEA-Puffer für 45 Min. bei RT,
1 Waschung mit TEA-Puffer,
Inkubation mit Ethanolamin-Lösung für 10 Min. bei RT,
1 Waschung mit Hepes-Puffer.

Die Vorreinigung von 2 mg Rattengehirncytosol pro Probe mittels 40 µl equilibrierter Matrix fand parallel hierzu durch Rotieren für 2 Stunden statt. Danach wurden das Cytosol nach Pelletierung der Matrix und die Matrix-gebundenen Antikörper vereinigt und wie bei der heterologen Co-Immunopräzipitation weiterprozessiert, die Elution der Proteine erfolgte allerdings bei 60°C und mit Protein-Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol.

2.2.2.8 Herstellung polyklonaler Antiseren

Zur Gewinnung von Antikörpern gegen Synbape (Ape) und Rhotekin 2 (RTKN 2) wurden zunächst GST-Fusionsproteine (Abschnitt 2.2.2.1) der aus dem Hefe-zwei-Hybrid-Screen hervorgegangenen Klone YB 320 (Ape lang), YB 327 (Ape kurz) und YB 336 (RTKN-2-Membranbindedomäne) als Antigene hergestellt und verschiedene Präimmunsereen mittels Western-Blot-Analysen (Abschnitt 2.2.2.5) auf das Erkennen von Rattengehirnproteinen hin getestet. Daraus wurden für die Immunisierung mit den GST-Fusionsproteinen jeweils zwei Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) und ein Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) Rhotekin 2 und Ape lang sowie zwei Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) und ein Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) für Ape kurz ausgewählt, die keine Hinweise auf bereits vorhandene Immunreaktivität in dem erwarteten Molekulargewichtsbereich zeigten. Die Immunisierung und Gewinnung von Rohseren erfolgte durch die Firma "Pineda Antikörper Service". Am 60., 90. und 120 Tag der Immunisierung wurden die Seren mittels Western-Blot-Analysen (Absatz 2.2.2.5) auf die Erkennung von überexprimierten GFP-Fusionsproteinen aus HEK-Zellen (Abschnitt 2.2.3.2) und endogenem Material aus Rattengehirncytosol (Abschnitt 2.2.2.10) hin überprüft und die Terminierung der mit Rhotekin 2 immunisierten Tiere am 90. Tag, der übrigen am 120. Tag veranlaßt.

2.2.2.9 Antikörpergewinnung durch Affinitätsreinigung der polyklonalen Antiseren

Antikörperstabilisator	Bitop
Centricon	Centricon-Zentrifugalfilter von Millipore
Chromatographiesäule 1	Poly-Prep-Chromatographiesäulchen von Bio Rad (eingesetzt für αRTKN 2)
Chromatographiesäule 2	FPLC-Anlage LKB von Pharmacia (eingesetzt für αSynbape)
Matrix-Gel	CNBr-aktivierte Sepharose 4 <i>fast flow</i> von Amersham Biosciences / GE

	Healthcare
PBS-T	1x PBS mit 0,1% (Vol.) Tween 20, pH 7,4
Puffer 1 (Kopplungspuffer)	0,1 M NaHCO ₃ ; 0,5 M NaCl; pH 8,3; steril filtriert mit 0,45 µm Porengröße und kalt gelagert
Puffer 2	1 mM HCl
Puffer 3	1 M Ethanolamin pH 8,0 *
Puffer 4	0,1 M Natriumacetat pH 4,0
Puffer 5	0,1 M Tris-HCl; 0,5 M NaCl; pH 8,0
Puffer 6	0,1 M Glycin, pH 2,6; frisch hergestellt
Puffer 7	50 mM Tris; 1 M NaCl; pH 8,0 *
Puffer 8	50 mM Glycin; 1 M NaCl; pH 3,5 *

* = zur Präparation der Matrix

Die Gewinnung spezifischer Antikörper gegen Synbape und Rhotekin 2 aus den entsprechenden Antiseren fand durch Affinitätsaufreinigung an einer antigenträgenden Matrix mit anschließender saurer Elution statt. Dazu wurden zunächst His-markierte Fusionsproteine von YB 336 und YB 320 gemäß Absatz 2.2.2.2 hergestellt und durch PD-10 Entsalzungssäulen nach den Angaben des Herstellers Amersham Biosciences / GE Healthcare in Kopplungspuffer umgepuffert. Die Präparation der Matrix durch Waschen und Quellen, sowie die anschließende Kopplung mit 1 mg der genannten, rekombinanten Proteine erfolgte ebenfalls nach den Empfehlungen des Herstellers, lediglich die Blockierung unbesetzter Proteinbindungsstellen der mit YB 336-His Fusionsproteinen gekoppelten Matrix wurde mit 1 M Tris-HCl-Lösung an Stelle von 1 M Ethanolaminlösung durchgeführt.

Nach quantitativer Überführung der antigenträgenden Matrix in eine Chromatographiesäule wurde diese mit 5 ml des zur Präzipitatabtrennung scharf abzentrifugierten, terminalen Antiserums von Rhotekin 2 für 4 Stunden bei 4°C unter langsamem Rotieren inkubiert. Alternativ hierzu wurde die gleiche Menge abzentrifugiertes α Synbape-Serum 1 : 10 in PBS-T verdünnt und mit 0,2 ml / Min. durch eine FPLC-Anlage auf die Matrix appliziert. Zur Entfernung von Antikörpern geringer Affinität wurden die Säulen sodann 3x alternierend mit 20 ml Puffer 4 und Puffer 5 gewaschen bzw. alternierend gewaschen bis zum Absinken des Proteinpeaks unter die Detektionsgrenze bei einer Flußrate von 2 ml / Min. für die FPLC-Anlage.

Hiernach erfolgte die Elution der Antikörper von der Matrix durch Zugabe von 2 ml Puffer 6 bzw. anhand des durch die FPLC-Anlage detektierten Peaks bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,2 ml / Min. Die eluierten Antikörper wurden anschließend sofort mit gesättigter Tris-Lösung, pH 8,0, anhand des Farbumschlags eines mit einem Tropfen benetzten Lackmuspapiers neutralisiert. Die Lagerung der Synbape-Antikörper (#12) fand bei -80°C oder mit 50% Glycerol bei -20°C statt, die Rhotekin-Antikörper (#13) hingegen wurden zuvor mittels Aufkonzentrierung im Centricon nach den Angaben des Herstellers in Antikörperstabilisator-Lösung überführt.

2.2.2.10 Herstellung von Gewebehomogenaten und -cytosolen

Hepes-Puffer für Gewebeaufschluß	10 mM HEPES; 1 mM EGTA; 0,1 mM MgCl ₂ ; 0,15 M NaCl, 1x Proteaseinhibitor ohne EDTA; pH 7,5
Potter	Braun
Ultratorrax	IKA® Werke
Ultrazentrifuge	Beckmann

Um die Gewebeverteilung verschiedener Proteine zu analysieren, wurden in Hepes-Puffer (Menge: ca. 10 ml je g Gewebe) Homogenate aus Herz, Niere, Leber, Testis, Muskel, Lunge, Milz und Gehirn adulter Ratten mittels 10-12 Doppelhüben des Potters bei 900 U/Min. unter Eiskühlung angefertigt, in 1x Probenpuffer solubilisiert und durch SDS-Gelelektrophorese (Absatz 2.2.2.4) mit anschließender Immundetektion auf einem Western-Blot (Abschnitt 2.2.2.5) analysiert.

Demgegenüber wurden zur Herstellung der Cytosole unterschiedliche Gewebe mit dem Ultratorrax in Hepes-Puffer (Menge: 2-3 ml je g Gewebe) für mehrmals 15-20 Sekunden bei 20000 U/Min. unter Eiskühlung homogenisiert. Die Separation von Zelldebris und unlöslichen Bestandteilen fand durch eine anschließende Zentrifugation bei 150000 g und 4°C für 45 Minuten statt. Die so erzeugten Überstände (Cytosole) dienten nicht nur zur Gewebeanalyse, sondern auch zu Copräzipitationsanalysen (Abschnitt 2.2.2.6) und zur Durchführung von endogenen Co-Immunopräzipitationen (Absatz 2.2.2.7).

2.2.2.11 Fraktionierung von Gehirngewebe

Potter	Braun
Saccharose-Stufengradient	0,85 / 1,0 / 1,2 M Saccharose jeweils in 5 mM Tris-HCl, pH 8,1
Sucrose-Puffer I	0,32 M Saccharose; 5 mM HEPES; 1x Proteaseinhibitor complete (Roche) mit EDTA, pH 7,4; frisch vorbereitet
Sucrose-Puffer II	0,32 M Saccharose, 5 mM Tris-HCl, pH 8,1
Sucrose-Puffer III	0,32 M Saccharose, 12 mM Tris-HCl, pH 8,1; 1% (v/v) Triton
Ultrazentrifuge	Beckmann

Dieses Verfahren zur subzellulären Fraktionierung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Karl Heinz Smalla weitestgehend nach den Angaben von Carlin *et al.* (1980) durchgeführt, um postsynaptische Dichten anzureichern und durch SDS-Gelelektrophorese (Absatz 2.2.2.4) mit nachfolgender Immundetektion auf einem Western-Blot (Abschnitt 2.2.2.5) auf das Vorkommen verschiedener Proteine hin zu untersuchen. Dazu wurden von 2 adulten Ratten Cortex und Hippocampus präpariert, in 25 ml Sucrose-Puffer I (final etwa 1 mg Hirn / ml) gegeben und mit dem Potter (Abschnitt 2.2.2.10) homogenisiert. Anschließend wurden Zellkerne und -trümmer durch eine Zentrifugation bei 1000 g und 4°C für 10 Minuten separiert. Das entstandene Pellet P1 wurde in 25 ml Sucrose-Puffer I aufgenommen, erneut

homogenisiert und pelletiert wie zuvor, während die S1-Überstände vereinigt und anschließend bei 12000 g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert wurden. Die resultierende Membranfraktion wurde zur weiteren Reinigung durch 6 Potterhübe bei 900 U/Min. und Eiskühlung wieder in 10 ml / g Sucrose-Puffer I aufgenommen und für 20 Minuten wie zuvor abzentrifugiert (→ P2). Die vereinigten S2-Überstände bildeten die Probe der Mikrosomen und löslichen Proteine.

Nun wurde die Membranfraktion P2 zur weiteren Fraktionierung in Sucrose-Puffer II aufgenommen, bei 85000 g und 4°C für 2 Stunden auf dem Stufengradienten zentrifugiert, so daß obenauf das Myelin, an der 0,85 / 1,0 M Sucrose Phasengrenze die leichten Membranen wie *Endoplasmatisches Reticulum* und *Golgi-Apparat*, und an der 1,0 / 1,2 M Sucrose Phasengrenze die Synaptosomen abgesammelt werden konnten. Hiernach erfolgte die Lyse der Synaptosomen mittels osmotischen Schocks, indem diese 1 : 5 in 1 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,1, aufgenommen und darin für 30 Minuten bei 0°C unter langsamen Rühren inkubiert wurden. Durch eine dreißigminütige Zentrifugation des Ansatzes bei 33000 g und 4°C wurde aus dem Überstand die Probe der synaptoplasmatischen Proteine gewonnen, während das Pellet P3 in 1,5 ml/g 5 mM Tris/HCl, pH 8,1, resuspendiert und wie zuvor beschrieben durch Zentrifugation auf einem Stufengradienten weiter aufgetrennt wurde. Diesmal wurde an der 1,0 / 1,2 M Saccharose-Interphase die Probe der synaptischen Membranen entnommen und mit jeweils 6 ml/g Sucrose-Puffer II und III für 15 Minuten bei 0°C unter Rühren inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des Ansatzes für 30 Minuten bei 33000 g und 4 °C. Das resultierende Pellet P4 wurde auf die gleiche Weise in Sucrose-Puffer II und III resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert; es entstand P5, das in ca. 1 ml destilliertem Wasser aufgenommen, für 30 Minuten bei 14000 g und 4°C zentrifugiert und schließlich in ca. 500 µl destilliertem Wasser aufgenommen wurde. Dies bildete die Probe der postsynaptischen Dichten.

2.2.2.12 Kernpräparationen aus Neuronen

Puffer 1	0,32 M Saccharose; 20 mM HEPES, pH 7,4; 2 mM MgCl ₂ ; 43 mM β-Mercaptoethanol; 1 Proteaseinhibitortablette mit EDTA je 50 ml Puffer
Puffer 2	0,32 M Saccharose; 20 mM HEPES, pH 7,4; 2 mM MgCl ₂ ; 1 Proteaseinhibitortablette mit EDTA je 50 ml Puffer
Puffer 3	2,4 M Saccharose; 2 mM MgCl ₂ ; 1 Proteaseinhibitortablette mit EDTA je 50 ml Puffer
Puffer 4	2,15 M Saccharose; 2 mM MgCl ₂ ; 1 Proteaseinhibitortablette mit EDTA je 50 ml Puffer
Potter	Braun
Ultrazentrifuge	Beckmann

Die Anreicherung neuronaler Kerne erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Karl Heinz Smalla nach einem Verfahren von Herrn Dr. Mathias Dreger (1999), um so das Auftreten von Syndapin I und Synbape in solchen Kernen mittels SDS-Gelelektrophorese (Absatz 2.2.2.4) mit anschließender Immundetektion auf

einem Western-Blot (Abschnitt 2.2.2.5) zu überprüfen. Hierzu wurden 4 Gehirne adulter Ratten in 35 ml Puffer 1 bei 750 U/Min. mit dem Potter homogenisiert wie unter Absatz 2.2.2.10 dargestellt und ein analytisches Aliquot entnommen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des Ansatzes bei 170 g und 4°C für 15 Minuten. Das resultierende Pellet wurde zur besseren Reinigung mittels 5 Doppelhüben mit dem Potter bei 750 U/Min. in 3 ml Puffer 1 resuspendiert und bei 370 g und 4°C erneut zentrifugiert. Während die beiden Überstände S0 vereinigt und eine analytische Probe entnommen wurden, wurde das Pellet P0 mittels einer Pipette in 1 ml Puffer 1 aufgenommen und die Suspension mit 3,188 ml Puffer 3 vermischt, bevor der Ansatz bei 70000 g und 4°C für 1 Stunde zentrifugiert wurde. Aus dem Überstand entstand die Probe S2, das Pellet hingegen wurde wie zuvor in 0,5 ml Puffer 1 resuspendiert, mit 3 ml Puffer 3 vermischt und auf 0,625 ml Puffer 4 für 1 Stunde bei 70000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die pelletierte Kernfraktion in 100 µl Puffer 2 aufgenommen und über Nacht bei 4°C unter langsamem Rotieren quellen gelassen. Hieran schloß sich eine fünfminütige Zentrifugation bei 500 g und 4°C an, der Überstand wurde erneut verworfen und das die somit gereinigte Kernfraktion enthaltende Pellet in Puffer 2 resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.13 Analyse der Membranaffinität von Proteinen

<u>Extraktionslösungen</u>	1% (w/v) Chaps; 1 M NaCl; 25 mM Tris/HCl pH 8,0
	1% (w/v) Chaps; 25 mM Tris/HCl pH 8,0
	1% (w/v) n-Octyl-β-d-glycopyranosidose; 25 mM Tris/HCl pH 8,0
	1% (w/v) SDS; 25 mM Tris/HCl pH 8,0
	1% (v/v) Triton; 25 mM Tris/HCl pH 8,0
	1 M NaCl; 25 mM Tris/HCl pH 8,0
	1 M Tris pH 8,0
	100 mM Na ₂ CO ₃ ; 25 mM Tris/HCl pH 11.5
	3 M KSCN; 25 mM Tris/HCl pH 8,0
	8 M Urea

Um das Vorliegen und den Charakter einer Membranbindung des Proteins Rhotekin 2 näher zu beleuchten, wurden ein Solubilisationstest mit verschiedenen Extraktionspuffern durchgeführt wie in tom Dieck *et al.* (1998) dargestellt. Dabei wird eine Solubilisierung der P2-Fraktion (vergleiche Abschnitt 2.2.2.11) durch unterschiedliche Extraktionslösungen (25 Minuten, 4°C) durchgeführt. Anschließend werden die unlöslichen Bestandteile durch eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 100000 g und 4°C pelletiert und die resultierenden Überstände (Ü3) und Pellets (P3) auf das Vorkommen des untersuchten Proteins hin mittels Western-Blot-Analysen (Abschnitt 2.2.2.5) überprüft. In Abweichung von den dortigen Mengenangaben wurden jedoch nur 100 µg Protein pro Extraktionslösung eingesetzt und 15 µl der Extraktionsprobe (Ü3) durch SDS-PAGE analysiert.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Kultivierung der HEK- und COS-7-Zellen

D-MEM 1 (Passagen)	<i>Dulbecco`s modified Eagle Medium</i> ; 10% fötales Kälberserum; 100 U/ml Penicillin G; 100 µg/ml Streptomycin; 2 mM L-Glutamin, alle Substanzen von Invitrogen / GIBCO® Cell Culture; 37°C
D-MEM 2 (Transfektion)	<i>Dulbecco`s modified Eagle Medium</i> ; 10% fötalem Kälberserum; 2 mM L-Glutamin, alle Substanzen von Invitrogen / GIBCO® Cell Culture; 37°C
Kulturflaschen	Nunclon™ Flaschen mit Filterkappe aus Polystyrol, steril
Mikrotiterplatten	Mikrotiterplatten mit 6 Feldern von Greiner bio-one
Poly-D-Lysin	0,1 g/l Poly-D-Lysin (MW>150.000, Sigma-Aldrich); 100 mM Boratpuffer, pH 8,5, steril filtriert
Trypsinlösung	Stammlösung (Gibco) 1:10 in HBSS (Gibco)

Die Linie humaner Nierenzellen 293, sogenannte HEK-Zellen (*human embryonic kidney cells*), die mit DNS-Fragmenten des humanen Adenovirus Typ 5 transformiert sind (Graham *et al.*, 1977), und die Linie der COS-7-Zellen (Fibroblastenzellen der Niere, Affe (*Cercopithecus aethiops*)), welche auf mit dem Simian Virus 40 transformierten CV-1 Zellen basiert (Gluzman, 1981) wurden unter Standardbedingungen bei 37°C in Heraeus-Inkubatoren mit 5% CO₂ angereicherter Atmosphärenluft gezüchtet und alle 3-4 Tage bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Hierzu wurden die HEK-Zellen durch einen Pipettierstrahl und die COS-7-Zellen durch fünfminütige Trypsinierung vollständig von dem Kulturflaschenboden abgelöst, bevor sie mit 10 ml frischem D-MEM 1 im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 15 in neue Kulturflaschen aufgeteilt wurden. In Vorbereitung auf eine Transfektion wurden die konfluenten HEK-Zellen einer Kulturflasche mit D-MEM 2 im Verhältnis 1 : 2 in zwei 6-Feld-Mikrotiterplatten ausgesät und für 24 Stunden unter den beschriebenen Bedingungen weiterkultiviert. Die COS-7-Zellen hingegen wurden zu diesem Zweck auf sterile und mit Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen im Verhältnis 1:15 ausgesät und ebenfalls auf die zuvor genannte Weise weiterkultiviert.

2.2.3.2 Transfektion der HEK-Zellen und Lysatherstellung

Polysterolröhrchen	Greiner Bio-One
Lipofectamin	Invitrogen
Optimem	GIBCO® Cell Culture
Plus-Reagenz	Invitrogen
D-MEM 2	<i>Dulbecco`s modified Eagle Medium</i> ; 10% (v/v) fötales Kälberserum; 2 mM L-Glutamin, alle Substanzen von Invitrogen / GIBCO® Cell Culture; 37°C
Natriumbutyratlösung	66 mM Natriumbutyrat in D-MEM 2, steril filtriert
Waschpuffer	1x PBS mit 0,5 mM MgCl ₂ und CaCl ₂
Hepes-Puffer für	10 mM HEPES; 1 mM EGTA; 0,1 mM MgCl ₂ ; 0,15 oder 0,3 M NaCl, 1%

Copräzipitationsanalysen	(v/v) Triton-X 100; 1x Proteaseinhibitor ohne EDTA; pH 7,5
Hepes-Puffer für heterologe CoIPs	10 mM HEPES; 1 mM EGTA; 0,1 mM MgCl ₂ ; 0,1 M NaCl, 1% (v/v) Triton-X 100; 1x Proteaseinhibitor ohne EDTA; pH 7,5

Als säugetiertypisches Expressionssystem für GFP- und FLAG-Konstrukte wurden in 6-Feld-Mikrotiterplatten kultivierte und 50-80% konfluente HEK-Zellen genutzt. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit Lipofectamin und Pus-Reagenz nach den Angaben des Herstellers. Zusätzlich wurde zur Anregung der Proteinsynthese der Zellen am 2. Tag der Kultivierung 6 mM Natriumbutyratlösung (final) zu jedem Ansatz hinzugegeben. Am 3. Tag wurden die Zellen mit 1 ml Waschpuffer gespült und mit 1,7 ml 1x PBS in Eppendorfgefäße überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1000 g und 4°C für 5 Minuten wurde das resultierende Pellet je nach Verwendungszweck in 265 µl Hepes-Puffer für Copräzipitationsanalysen (Abschnitt 2.2.2.6) oder solchem für heterologe CoIPs (Abschnitt 2.2.2.7) aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren mit kleiner Pipettenspitze sowie einer zwanzigminütigen Inkubation unter langsamem Rotieren bei 4°C lysiert. Um unlösliche Bestandteile und Zelldebris abzutrennen, wurde der Ansatz hiernach für 20 Minuten bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. 15 µl des entstandenen Überstandes bildeten die analytische Probe des Lysats zur weiteren Untersuchung durch SDS-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.2.4) und Western-Blot (Abschnitt 2.2.2.5). Das übrige Lysat wurde wie in den Abschnitten 2.2.2.6 und 2.2.2.7 dargestellt eingesetzt.

2.2.3.3 Transfektion und Immunfärbung der COS-7-Zellen

Blocklösung	10% (v/v) Pferdeserum und 2% (w/v) BSA gelöst in 1x PBS, Lagerung bei -20°C und Zugabe von 0,2 mg/ml Saponin vor Gebrauch
D-MEM 2	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> ; 10% (v/v) fötales Kälberserum; 2 mM L-Glutamin, alle Substanzen von Invitrogen / GIBCO® Cell Culture; 37 °C
Fixierlösung	4% (w/v)PFA gelöst in 1x PBS mit 0,5 mM MgCl ₂ und CaCl ₂ ; 37 °C
Mowiollösung	2,4g Mowiol 4-88 (Hoechst); 6g Glycerin; 6 ml H ₂ O; 12 ml 0,2 M Tris; pH 8,5
Quenchlösung	25 mM Glycin gelöst in 1x PBS mit 0,5 mM MgCl ₂ und CaCl ₂
Saponin-Stammlösung	10 mg/ml Saponin in 1x PBS, pH 7,5, Lagerung bei - 20 °C
Transfektionsreagenz	Polyfect von Invitrogen
Waschpuffer	1x PBS mit 0,5 mM MgCl ₂ und CaCl ₂ ; 37 °C

Die Transfektion der zu etwa 80% konfluenten COS-7-Zellen wurde mit Polyfect als Transfektionsreagenz nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach vierundzwanzigstündiger Bebrütung unter Standardbedingungen fand die Fixierung der Zellen statt wie in Kessels *et al.* (2001) und Qualmann *et al.* (2004) angegeben. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Hierzu standen ein *Axioplan 2 imaging* Mikroskop von Zeiss mit den Bandpassfiltern Zeiss Nr.20, Nr. 31 und Nr.44, sowie AHF F41-008 und AHF F31-000 und ein Leitz DM-RXE Fluoreszenzmikroskop von Leica mit den Filtern I3 und N2.1, ebenfalls von

Leica, zur Verfügung. Dokumentationsbilder wurden aus Gründen der Auflösung und Lichtstärke nur am Zeiss-Mikroskop bei dreiundsechzigfacher Vergrößerung mit der CCD Kamera *Spot RT* in Kombination mit der Software *Meta View*, beides von Visitron Systems, aufgenommen.

2.2.3.4 Primärkulturen

HBSS-Medium	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> , Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei (GIBCO® Cell Culture)
D-MEM 1	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> ; 10% (v/v) fötales Kälberserum; 100 U/ml Penicillin G; 100 µg/ml Streptomycin; 2 mM L-Glutamin, alle Substanzen von Invitrogen / GIBCO® Cell Culture; 37 °C
Mikrotiterplatten	Mikrotiterplatten mit 24 Feldern von Greiner bio-one
Neurobasal-Medium	Neurobasal (GIBCO® Cell Culture) mit 0,5 mM Glutamin; 1x B27 Supplement (GIBCO® Cell Culture); 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin; 37 °C
Poly-D-Lysin Beschichtungspuffer	100 mM Poly-D-Lysin; 100 mg/l Borsäure; pH 8,5; steril filtriert

Die Präparation und Kultivierung der Neurone wurde von Akvile Inciute nach dem Verfahren von Goslin und Banker (1991) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen aus Ratten-Hippocampi des Embryonlastadiums E 19 gewonnen und mit D-MEM 1 je nach Bedarf in hoher Dichte, d.s. etwa 50000 Zellen/cm², oder in niedriger Dichte, d.s. etwa 10000 Zellen/cm², auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen in 24-Feld-Mikrotiterplatten ausgesät. Ihre Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen bei 37°C in Heraeus-Inkubatoren in mit 5% CO₂ und 95% Feuchtigkeit angereicherter Atmosphärenluft. Nach 24 Stunden wurde das Kultivierungsmedium D-MEM 1 gegen Neurobasal-Medium ausgetauscht und die Zellen jede weitere Woche mit zusätzlich 100 µl Neurobasal-Medium versorgt.

2.2.3.5 Transfektion der Neurone

D-MEM 2	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> ; 10% (v/v) fötales Kälberserum; 2 mM L-Glutamin, alle Substanzen von Invitrogen / GIBCO® Cell Culture; 37 °C
Neurobasal-Medium	Neurobasal (GIBCO® Cell Culture) mit 0,5 mM Glutamin; 1x B27 Supplement (GIBCO® Cell Culture); 37 °C
Optimem	GIBCO® Cell Culture
Transfektionsreagenz	Lipofectamin 2000 von Invitrogen

Hierzu wurden Primärkulturen hoher Dichte am Tag 9 oder 10 ihrer Kultivierung benutzt. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin 2000 gemäß den Angaben des Herstellers. Nach 24 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen wurde das Medium gegen konditioniertes Medium ausgetauscht, worin die Zellen bis zu ihrer Fixierung am Tag 12 der *in-vitro*-Haltung weiterkultiviert wurden.

2.2.3.6 Fixierung und Färbung der Neurone

Blocklösung	10% (v/v) Pferdeserum und 2% (w/v) BSA gelöst in 1x PBS, Lagerung bei -20°C und Zugabe von 0,2 mg/ml Saponin vor Gebrauch
Fixierlösung	4% (w/v) PFA gelöst in 1x PBS mit 0,5 mM MgCl ₂ und CaCl ₂ ; 37 °C
Mowiollösung	2,4g Mowiol 4-88 (Hoechst); 6g Glycerin; 6 ml H ₂ O; 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5
Quenchlösung	25 mM Glycin gelöst in 1x PBS mit 0,5 mM MgCl ₂ und CaCl ₂
Saponin-Stammlösung	10 mg/ml Saponin in 1x PBS, pH 7,5, Lagerung bei -20 °C
Waschpuffer	1x PBS mit 0,5 mM MgCl ₂ und CaCl ₂ ; 37 °C

Die Fixierung der Zellen und ihre immunochemische Färbung erfolgten wie in Kessels *et al.* (2001), Qualmann *et al.* (2004) und Abschnitt 2.2.3.3 erläutert.

2.2.3.7 Stimulations- und Inhibitionsexperimente

APV-Inhibitionslösung	50% (v/v) Basislösung; 135 mM NaCl; 5 mM KCl; 20 mM HEPES, pH 7,5; 50 µM 2-Amino-5-phosphonovalerat
APV & CNQX - Inhibitionslösung	50% (v/v) Basislösung; 135 mM NaCl; 5 mM KCl; 20 mM HEPES, pH 7,5; 100 µM 6-Zyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; 50 µM 2-Amino-5-phosphonopentanoige Säure
Basislösung	30 mM MgCl ₂ ; 3 mM CaCl ₂ ; 500 mM Glucose
CNQX-Inhibitionslösung	50% (v/v) Basislösung; 135 mM NaCl; 5 mM KCl; 20 mM HEPES, pH 7,5; 100 µM 6-Zyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
Glutamatstimulationslösung mit APV	50% (v/v) Basislösung; 135 mM NaCl; 5 mM KCl; 20 mM HEPES, pH 7,5; 100 µM Glutamat; 10 nM Glycin; 50 µM 2-Amino-5-phosphonopentanoige Säure
Glutamatstimulationslösung mit CNQX	50% (v/v) Basislösung; 135 mM NaCl; 5 mM KCl; 20 mM HEPES, pH 7,5; 100 µM Glutamat; 10 nM Glycin; 100 µM 6-Zyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
Glutamat-Stimulationslösung	50% (v/v) Basislösung; 135 mM NaCl; 5 mM KCl; 20 mM HEPES, pH 7,5; 100 µM Glutamat
KCl-Stimulationslösung	50% (v/v) Basislösung; 50 mM NaCl; 90 mM KCl; 20 mM HEPES, pH 7,5
LMB-Inhibitionslösung	15 oder 50 ng Leptomycin B (Sigma–Aldrich) auf 500 µl Neurobasal-Medium (siehe auch Abschnitt 2.2.3.5)
Normallösung	50% (v/v) Basislösung; 135 mM NaCl; 5 mM KCl; 20 mM HEPES, pH 7,5

Diese Experimente wurden im Wesentlichen nach den in Qualmann *et al.* (2004) publizierten Angaben durchgeführt. Verwendet wurden hierzu adulte Neurone (20. oder 21. Tag der *in-vitro*-Kultivierung) niedriger Dichte (siehe auch Abschnitt 2.2.3.3), welche zuerst einmal mit der Normallösung gewaschen wurden und anschließend mit der Stimulationslösung bzw. Inhibitionslösung unter Standardbedingungen (Absatz 2.2.3.3) für 10 Minuten bzw. für 3 Minuten im Falle der KCl-Stimulationslösung inkubiert wurden. Die Zugabe des Leptomycins erfolgte direkt zu dem Kulturmedium. Hiernach wurden die Fixierung und Färbung umgehend durchgeführt wie in Absatz 2.2.3.6 dargelegt. Als Kontrolle dienten Ansätze, die in der entsprechenden Weise mit der Normallösung behandelt wurden.

2.2.4 Histologie

2.2.4.1 Immunologische Färbung von Gehirnschnitten

Fixier-Lösung	Methanol und 1x PBS im Verhältnis 1 : 1 mit 3% (v/v) H ₂ O ₂
PFA-Lösung	4% (w/v) Paraformaldehyd gelöst in 1x PBS; 4 °C
Vectashield-Medium	<i>Vectrashield Mounting Medium</i> [®] mit DAPI von <i>Vector Laboratories</i>

Von Frau Diplom-Psychologin Alexandra Heyden wurden eine Reihe von sagittalen Schnitten der Hirne adulter Wildtyp-Mäuse (*Mus musculus*) zur Verfügung gestellt, welche benutzt wurden, um durch spezifische Immunfärbungen unterschiedlicher Proteine deren Verteilung im Gehirn zu analysieren. Zur Herstellung der 14 – 20 µm dünnen Cryostatschnitte wurden die Mäuse mit 7% Chlorhydrat anästhesiert und intracardinal mit 1x PBS und nachfolgend mit PFA-Lösung perfundiert. Die Postfixierung erfolgte über Nacht bei 4°C in 30% Sucrose.

Die Cryostatschnitte wurden auf Objektträger aufgefroren, für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit der Fixierlösung inkubiert und nach 3 Waschschritten mit 1x PBS wie unter Absatz 2.2.3.3. dargestellt blockiert und immunologisch gefärbt. In Abweichung erfolgten die Applikation des primären Antikörpers über Nacht bei 4 °C, die Waschungen mit 1x PBS und die Einbettung in Vectashield[®] Medium.

2.2.5 Statistische Erhebungen

2.2.5.1 Kern-Colokalisationsstudie

Für Kern-Colokalisationsstudien wurde das GFP-Synbape-Konstrukt und als Kontrolle ein leerer GFP-Vektor wie in Abschnitt 2.2.3.5 erläutert in Primärkulturen eingebracht, die Proben nach Abschnitt 2.2.3.6 fixiert und mit αSyndapin-I-Antikörpern gefärbt. Alle transfizierten Neurone wurden anhand der Verteilung des Synbape- bzw. GFP-Konstrukts in folgende Kategorien eingegliedert:

Kategorie	Expressionszustand	Vorkommen
Gruppe 1	1	Kern und Cytosol
Gruppe 2	2	strahlender Kern
Gruppe 3	3	Akkumulate im Kern
Gruppe 4	4	strahlend helle Akkumulate

Parallel dazu wurde die Colokalisation von endogenem Syndapin mit dem GFP-Konstrukt auf einer Skala von 0–5 beurteilt. Werte ≥ 3 wurden dabei als positiv

und Werte < 3 als negativ eingestuft (Ja/Nein-Antwort). Bei einem Stichprobenumfang von $N = 46$ für das Synbape-Konstrukt und $N = 28$ für die Kontrolle aus 5 bzw. 3 unabhängigen Experimenten wurde die prozentuale Verteilung von ja/nein Antworten für jede Gruppe ermittelt und deren Korrelation mit dem Expressionszustandes anhand des Korrelationskoeffizienten c , welcher Werte von -1 (negative Korrelation) über 0 (keine Korrelation) bis 1 (positive Korrelation) annehmen kann, bestimmt.

2.2.5.2 Analyse von Veränderungen neuronaler Dornfortsätze

2.2.5.2.1 Definition und Vermessung der Dornfortsätze

Die Vermessung der Dornfortsätze erfolgte auf Graustufenbilder der dsRed1-N1-Fluoreszenz (siehe auch Abschnitt 2.2.3.3 & 2.2.5.2.2) mit *Adobe Photoshop* 7.0 in den Kategorien Filopodium, dicker Dorn, pilzförmiger Dorn und verzweigter Dorn (Abschnitt 1.2), wobei sich die verschiedenen Kategorien wie folgt definierten:

<u>Kategorie</u>	<u>Kriterien</u>
dicker Dorn	klein & dick, keine deutliche Differenzierung in Hals und Kopf
Filopodium	lang & dünn, keine deutliche Differenzierung in Hals und Kopf
pilzförmiger Dorn	Hals und Kopf (dieser meist verdickt) unterscheidbar
verzweigter Dorn	mindestens ein Verzweigungspunkt

2.2.5.2.2 Experimenteller Aufbau

Um eine mögliche Funktion von Synbape in der Morphologie neuronaler Dornfortsätze zu überprüfen, welche z.B. , wie in Absatz 1.1.1 dargestellt, durch eine syndapinvermittelte Beeinflussung des Aktin-Cytoskletts gegeben sein könnte, wurden Neurone mit folgenden Konstrukten gemäß Abschnitt 2.2.3.5 transfiziert:

- 1) GFP-Synbape-Konstrukt oder FLAG-Synbape-Konstrukt
- 2) GFP-Synbape-Konstrukt und Xpress-Syndapin-I-Konstrukt
- 3) GFP-Synbape-Konstrukt und Xpress-Syndapin-SH3-Domäne-Konstrukt

Darüber hinaus wurden die Zellen zur Visualisierung der dendritischen Dornen zusätzlich mit dsRed1-N1 gefüllt. Als Kontrolle dienten Zellen, die entweder nur mit dsRed1-N1 oder nur mit GFP gefüllt wurden. Nach der Fixierung und, sofern erforderlich, Färbung der Primärkulturen, wurde die Expression der Konstrukte dokumentiert und zur Auswertung wurden Graustufenbilder der

dsRed1-N1-Fluoreszenz der jeweiligen Neurone aufgenommen (siehe auch Abschnitt 2.2.3.3). Das nachfolgende Schema zeigt die Versuchsauswertung für die unterschiedlichen Experimente:

Experimente

	<u>FLAG-Synbape-Konstrukt</u>			<u>GFP-Synbape-Konstrukt</u>		
	unabhängige Experimente	Anzahl Zellen	Anzahl Dornen	unabhängige Experimente	Anzahl Zellen	Anzahl Dornen
1)	4	12	2508	3	12	1967
2)	-	-	-	2	14	2507
3)	-	-	-	4	16	4133

Kontrollen

	<u>dsRed1-N1</u>			<u>GFP</u>		
	unabhängige Experimente	Anzahl Zellen	Anzahl Dornen	unabhängige Experimente	Anzahl Zellen	Anzahl Dornen
1)	3	12	1663	3	6	1101
2)	3	18	3235	-	-	-
3)	3	16	3349	-	-	-

2.2.5.2.3 Auswertung der Vermessungsdaten

Nachfolgend wurde die prozentuale Verteilung der gemessenen Dornengrößen in den einzelnen Kategorien in Bezug auf die Gesamtzahl der Dornfortsätze bestimmt und die durchschnittliche Dornengröße jedes Neurons für alle Kategorien ermittelt. Um mögliche Effekte auf statistische Signifikanz hin zu überprüfen, wurde der zweiseitige Student'sche T-Test für Stichproben gleicher Varianz eingesetzt und das Konfidenzintervall über alle Neurone einer Vergleichsgruppe mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05\%$ berechnet, was einem Konfidenzniveau von 95% entspricht.

Daneben lagen Vergleichsdaten von Frau McS-Biologin Akvile Inciute mit dem Syndapin-I-SH3-Domänen- und dem Xpress-Syndapin-I-Konstrukt vor, die keinen signifikanten Einfluß der SH3-Domäne auf dendritische Dornfortsätze ergeben hatten, wohl aber für das Syndapin-I-Konstrukt signifikante Verlängerungen in der Dornengröße gezeigt hatten. Damit individuelle Meßunterschiede bei der Auswertung ausgeschlossen werden konnten, wurden die Versuche mit dem Xpress-Syndapin-I-Konstrukt erneut auf die gleiche Weise wie die übrigen Experimente ausgewertet und dabei Daten für 10 Neurone aus 3 unabhängigen Versuchen erhoben. Um nun ggf. vorhandene Unterschiede in den Auswirkungen der

verschiedenen Konstrukte festzustellen, wurden die Durchschnittsgröße und die durchschnittliche prozentuale Verteilung der Dornfortsätze in den einzelnen Kategorien für jedes Neuron um die entsprechenden Mittelwerte der jeweiligen Kontrollen bereinigt und die Differenzen aller Vergleichsgruppen auf die zuvor beschriebene Art auf statistische Signifikanz hin untersucht.

2.2.5.3 Kernlokalisationsanalyse

Um der Frage nach dem Einfluß von Stimulation und Inhibition primärer Neurone (Abschnitt 2.2.3.7) auf die Lokalisation von Synbape und Rhotekin 2 nachzugehen, wurden alle morphologisch integren, maximal aber 200 Neurone, von jeweils 6 Deckgläschen aus 3 unabhängigen Experimenten in den nachfolgenden Kategorien gezählt:

<u>Wertung</u>	<u>Fluoreszenzverteilung</u>
1	Fluoreszenz ist deutlich intensiver im Kern als im Soma
0	Fluoreszenz von Kern und Soma sind in etwa gleich
-1	Fluoreszenz ist deutlich intensiver im Soma als im Kern

Für die Behandlungskontrolle wurden 4 und für die Stimulationskontrolle 2 unabhängige Experimente auf die gleiche Weise ausgewertet. Durch Summierung aller Lokalisationswertungen einer Probe und anschließende Division durch die betreffende Anzahl der Neurone, wurde ein Lokalisationsindex bestimmt, der anzeigt, welche Verteilung des Proteins zwischen Zellkern und Soma zu erwarten ist. Wie zuvor (Abschnitt 2.2.5.2.3) wurden der zweiseitige Student'sche T-Test für Stichproben gleicher Varianz und das Konfidenzintervall zur Absicherung der Signifikanz von auftretenden Verteilungsunterschieden benutzt.

2.2.5.4 Analyse der Leptomycin B - Effekte

Hierzu wurden für jedes Experiment (Kontrolle, 15 bzw. 50 µg Leptomycin B je 500 µl Medium; Absatz 2.2.3.7) unter gleichen Beleuchtungsverhältnissen Bilder von 12 nacheinander mikroskopierten Neuronen aufgenommen und in Adobe Photoshop 7.0 die Immunfluoreszenz von Zellkern und Soma gemessen, sowie ihr prozentualer Anteil an der Gesamtimmunfluoreszenz der Zelle errechnet. Neben dem Mittelwert wurden zur Absicherung statistisch signifikanter Unterschiede auch hier der zweiseitige Student'sche T-Test für Stichproben gleicher Varianz eingesetzt und das Konfidenzintervall über alle Neurone einer Vergleichsgruppe mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05\%$ bestimmt, was einem Konfidenzniveau von 95% entspricht.

3. Ergebnisse

3.1 Die Hefe-zwei-Hybrid-Screene: Auf der Suche nach neuen, potentiellen Interaktionspartnern für Syndapin

Um mehr über die Rolle der Syndapin-Familie, insbesondere die der gehirnspezifischen Isoform Syndapin I, bei der Vernetzung der endocytotischen Maschinerie bzw. des Aktin-Cytoskeletts mit unterschiedlichen zellulären Strukturen und Vorgängen zu erfahren, aber auch um weitere Funktionen dieser Proteine im Zusammenhang mit synaptischen Prozessen zu entdecken, wurde in Gehirnbanken nach neuen Interaktionspartnern von Syndapin I gesucht. Die anschließende Charakterisierung dieser Bindungspartner und ihrer Interaktion mit Syndapinen sollte einerseits Aufschluß über die zu Grunde liegenden Mechanismen der Einbindung Syndapins in distinkte zelluläre Prozesse geben und andererseits zu einer Vervollständigung des Bildes der an synaptischen Vorgängen beteiligten Proteine beitragen. Da alle bisher beschriebenen Syndapin-Interaktionen durch die SH3-Domäne vermittelt sind, darüber hinaus jedoch mit den NPF-Motiven und der cdc15-Domäne weitere Interaktionsdomänen zur Verfügung stehen und der N-Terminus z.B. für die Induktion von Filopodien erforderlich ist, wurden neben dem Gesamtprotein auch N-terminale Proteinfragmente als Köder für die Screene verwendet. Um bisher gänzlich unbekannte Proteine nicht *per se* von den Analysen auszuschließen, wurde als Ansatz zur Ermittlung potentieller Interaktionspartner Syndapins das Hefe-zwei-Hybrid-System gewählt.

Unter Mitwirkung von Herrn A. Neumann, Frau W. Leibig, Frau A. Hafner, Frau P. Lange, Herrn V. Stein, Frau K. Atze, Frau Diplom-Chemikerin R. Pinyol i Agelet und Frau MS-Mikrobiologin R. Ahuja wurden so 10 Hefe-zwei-Hybrid-Screene mit zwei verschiedenen Gehirn-cDNS-Banken (Maus bzw. Ratte) durchgeführt, wobei die Bibliotheken etwa 2,9x durchsucht wurden (Abbildung 5). Ein kleiner prozentualer Anteil der gefundenen Kandidaten an den getesteten Klonen deutet auf eine hohe Stringenz des entsprechenden Screens hin, wie z.B. in Screen 2 und Screen 5. Screen 9 fällt hingegen durch sehr geringe Stringenz auf.

In den Screenen mit der Ratten-Bibliothek wurden insgesamt 466 Kandidaten gefunden, von denen 58% durch die Selektion auf den Masterplatten I – III als falsche Positive identifiziert wurden. Ferner konnten durch die abschließenden Interaktionsanalysen in Hefen mit dem leeren Köder-Vektor pGBTK7, der für die DNS-bindende-Domäne kodiert, und dem Syndapin-I-Konstrukt 15% der Kandidaten als selbstaktivierend charakterisiert werden, während 5% der Kandidaten keine Interaktion mehr zeigten. Außerdem wurden die Kandidaten auf eine Interaktion mit dem Syndapin-I- Δ SH3-Fusionsprotein hin untersucht und so zwischen Bindungspartnern der SH3-Domäne und des N-Terminus differenziert.

Ein Beispiel hierfür gibt die Abbildung 6. Sie zeigt exemplarisch 3 verschiedene Kandidaten, von denen sich der erste, Nr. 81, als selbstaktivierend

Screen	Köder AS	getestete Klone	% Bibliothek	Art Bibliothek	gefundene Kandidaten	% getestete Klone
1	1-382	1 Mio.	28,6	Ratte	0	0
2	1-382	1,6 Mio.	45,7	Ratte	61	0,00381
3	1-382	10 000	0,3	Ratte	18	0,18
4	1-382	150 000	4,3	Ratte	verloren	0
5	1-441	1,8 Mio.	51,4	Ratte	96	0,00533
6	1-441	245 000	7	Ratte	65	0,02653
7	1-382	nb	nb	Maus	46	nb
8	1-441	3,25 Mio.	92,9	Maus	581	0,01788
9	124-289	465 000	13,3	Ratte	420	0,09032
10	1-128	1,6 Mio.	45,7	Ratte	180	0,01125

Syndapin I & Syndapin I - Köder

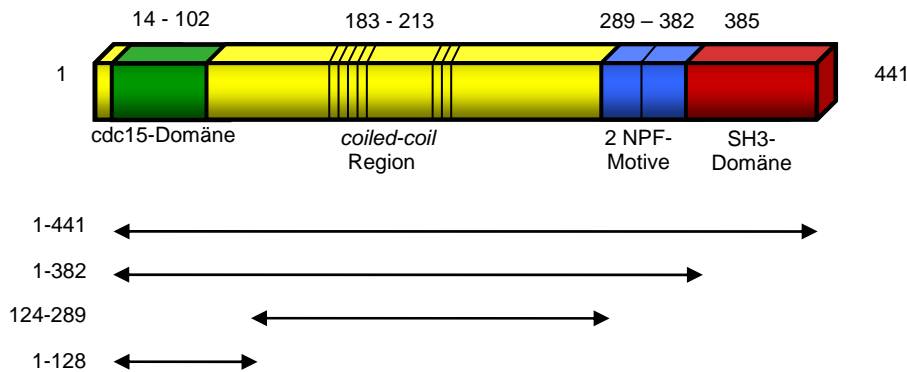


Abbildung 5: Übersicht über die Hefe-zwei-Hybrid-Screene

Die Tabelle gibt eine Übersicht über den prozentualen Anteil (%) der bei dem jeweiligen Screen getesteten unabhängigen Klone der Gehirn - pACT2-Bibliotheken und die Anzahl der insgesamt gefundenen Kandidaten. Für Screen 7 wurden diese Merkmale nicht bestimmt (nb). Die schematische Skizze der gehirnspezifischen Isoform Syndapin I veranschaulicht die Domänenstruktur der eingesetzten Syndapin-Köder, wobei die Zahlen die Position der unterschiedlichen Strukturen bzw. Motiven in der Aminosäuresequenz angeben. Es sind rot die SH3-Domäne, blau die NPF-Motive, straffiert die coiled-coil Region und grün die cdc15-Domäne. Die Pfeile veranschaulichen die bei den Screens eingesetzten Syndapin-Köder.

erweist, da auch mit der DNS-bindenden-Domäne cotransformierte Hefezellen in der Lage sind, auf dem Selektionsagar –WAHL zu wachsen. Demgegenüber erweist sich der zweite gezeigte Kandidat, Nr. 84, als Interaktionskandidat für die SH3-Domäne Syndapins, denn nur die mit dem Syndapin-I-Konstrukt cotransformierten Hefezellen wachsen auf dem Selektionsagar, nicht aber jene, welche mit dem Syndapin-I- Δ SH3-Konstrukt cotransformiert wurden. Kandidat Nr. 92 zeigt im Gegensatz dazu ein Wachstum der Hefen auf dem Selektionsagar nach Cotransformation sowohl des Syndapin-I- als auch des Syndapin-I- Δ SH3-Konstrukts und ist daher ein Kandidat für eine Interaktion mit dem N-Terminus Syndapins.

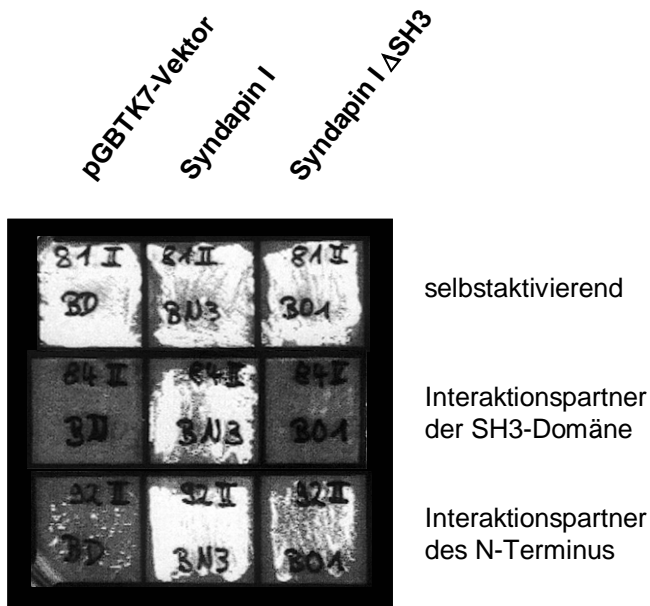


Abbildung 6: Beispiel für die Verifizierung der Kandidaten durch Interaktionsanalysen in Hefen

Die Abbildung zeigt Aufnahmen der Selektionsagarplatten, auf welchen mit den Kandidaten Nr. 81, 84 und 92 bzw. den oben angegebenen Konstrukten cotransformierte Hefezellen ausplattiert wurden. Nach dreitägiger Bebrütung unter Standardbedingungen bei 30°C kann festgestellt werden, welcher Kandidat selbstaktivierend ist (oberes Beispiel), welcher ein Kandidat für eine Interaktion mit der SH3-Domäne Syndapins (mittleres Beispiel) und welcher ein Kandidat für eine Interaktion mit dem N-Terminus (unteres Beispiel).

Bei der Sequenzierung der verbliebenen Kandidaten zeigte sich, daß die ribosomale 16S RNS besonders häufig unter den Kandidaten vertreten war, so daß eine PCR mit spezifischen Primern etabliert wurde, mit der schließlich 14% der Kandidaten als 16S RNS identifiziert werden konnten. Weitere 5% der Kandidaten entfielen auf Proteinfragmente von wenigen Aminosäuren, Proteine im falschen Leseraster, nicht kodierende Bereiche des Genoms oder leere Vektoren und konnten daher ebenfalls von den weiteren Analysen ausgeschlossen werden. Damit erwies sich 1% der Kandidaten aus den Screenen mit der Rattengehirn-cDNS-Bibliothek als echte Proteine bzw. Teile dieser.

Um das Problem mit der artifiziell translatierten, ribosomalen 16S RNS zu umgehen, wurde für zwei weitere Screenen (Screen 7 und 8) eine cDNS-Bank aus der Maus eingesetzt, da auf Grund eines Basenaustauschs in dieser Spezies der von der murinen 16sRNS artifiziell in Hefen translatierte Abschnitt gegenüber der Ratte stark verkürzt ist und daher nicht mehr mit Syndapin interagieren kann. Auf diese Weise konnten weitere 627 Kandidaten für eine Interaktion mit Syndapin I identifiziert werden, von denen 2% im Verlauf der Masterplatten I – III kein Wachstum mehr zeigten und somit aussortiert wurden. Die Verifizierung im Hefesystem mit der DNS-bindenden-Domäne und dem Syndapin-I-Konstrukt durch Wachstums- und Blautest führte zum Ausschluß von 24% der Kandidaten auf Grund von Selbstaktivierung, während 2% keine Reaktion in den betreffenden Interaktionstests zeigten. Die Sequenzierung der verbliebenen Kandidaten ergab für 4% erneut nur Protein-Artefakte, so daß auch diese Kandidaten von den weiteren Analysen ausgeschlossen werden konnten. Somit erwiesen sich 62% der Kandidaten aus diesen beiden Screenen als echte Proteine bzw. Teile dieser.

Nach der Verifizierung der Kandidaten im Hefesystem wurden somit insgesamt 800 Kandidaten sequenziert (Abbildung 7), worunter sich schließlich 121 verschiedene Proteine fanden, von denen 45 zur weiteren Verifizierung durch die

unabhängige Methode der Copräzipitationsanalyse ausgewählt wurden. Bei dieser Auswahl wurden jedoch 125 Kandidaten aus dem Screen Nr. 9 nicht berücksichtigt. Zum einen zeigten Stichproben von Kandidaten aus diesem Screen keine plausiblen Ergebnisse, d.h. sie wurden durch unterschiedliche, nicht mehrfach unabhängig gefundene, unbekannte Proteine oder Proteine, die in anderen Zellkompartimenten auftreten, wie z.B. die mitochondriale Na⁺/K⁺ ATPase, dominiert. Zum anderen deutet die geringe Stringenz jenes Screens auf eine unspezifische Klebrigkeit des Köders hin, was in Einklang mit Erfahrungen mit *coiled-coil* Regionen in anderen Screenen steht, so daß dieser Screen nicht weiter bearbeitet wurde.

Die zur Verifizierung in Copräzipitationsanalysen ausgewählten Kandidaten wurden als GFP-Fusionsproteine überexprimiert und auf eine Interaktion mit Syndapin I hin getestet, wobei GFP solo als Kontrolle diente. So konnte die Interaktion von insgesamt 14 Kandidaten (EHD3, Rhotekin 2, MAP, E2M, RNA *binding* Protein, RNA Helicase, rRNA Promotor *binding* Protein, Spermin Synthase und 6 unbekannte Proteine) bestätigt werden, von denen vier Proteine (EHD3, MAP, Rhotekin 2 und Synbape) zu weiteren Untersuchungen ausgesucht wurden.

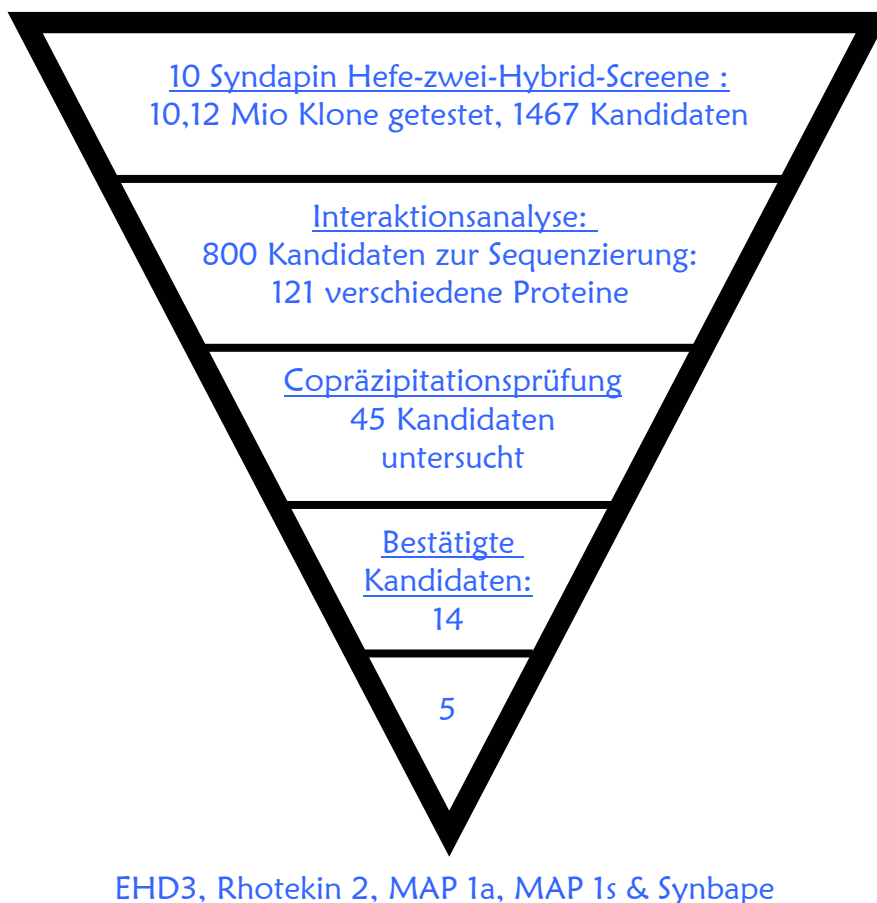


Abbildung 7: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Hefe-zwei-Hybrid-Screenen

Die Abbildung veranschaulicht die Ergebnisse aus den einzelnen Verifizierungsschritten des Hefe-zwei-Hybrid-Systems und der anschließenden unabhängigen Analyse der Kandidaten mittels Copräzipitationsprüfung. Insgesamt konnten auf diese Weise 14 Kandidaten als interaktionspositiv bestätigt werden.

3.2 Syndapine und die EHD-Proteinfamilie

3.2.1 Struktur und Domänen von EHD3

Die Familie der EHD-Proteine (Eps15 Homologie-Domäne enthaltende Proteine) umfaßt bis jetzt vier ubiquitär exprimierte Mitglieder, d.s. EHD 1-4, von denen gezeigt werden konnte, daß sie in die Rezyklierung von Rezeptoren und anderen Membranproteinen aus dem endosomalen Recycling-Kompartiment involviert sind (Mintz *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2001; Galperin *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2005). In Screenen mit unterschiedlichen cDNS-Banken wurden zwei unabhängige Klone (Nr. 139 und Nr. 497) für das Protein EHD3 (Datenbankzugang: gi:10181214) gefunden. Dieses Familienmitglied ist besonders hoch im Gehirn exprimiert. Die beiden Klone stellen Fragmente dar, welche Teile der potentiellen *coiled-coil* Region und die C-terminale EH Domäne des Proteins EHD3 enthalten (Abbildung 8). EH-Domänen sind in der Lage, direkt an NPF-Motive (Konsensus: Asparagin-Prolin-Phenylalanin) einer Aminosäuresequenz zu binden. Als weiteres Motiv findet sich in EHD-Proteinen außerdem ein N-terminaler *P-Loop*, der Bestandteil einer nukleotidbindenden Domäne ist (Braun *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). Schließlich ist im Bereich der *coiled-coil* Region an der Aminosäureposition 315-331 ein bipartielles Kernlokalisierungssignal prognostiziert.

Im Wachstumstest des Hefe-zwei-Hybrid-Systems zeigen die beiden Kandidaten eine deutliche Interaktion sowohl mit Syndapin I (WT Nr 139/497: +++/+++), als auch mit Syndapin I Δ SH3 (WT Nr. 139/497: +++/+++), was in Übereinstimmung mit der Domänenstruktur, welche eine NPF-vermittelte Interaktion nahelegt, auf eine von der SH3-Domäne Syndapins unabhängige Verbindung der beiden Proteine hindeutet.

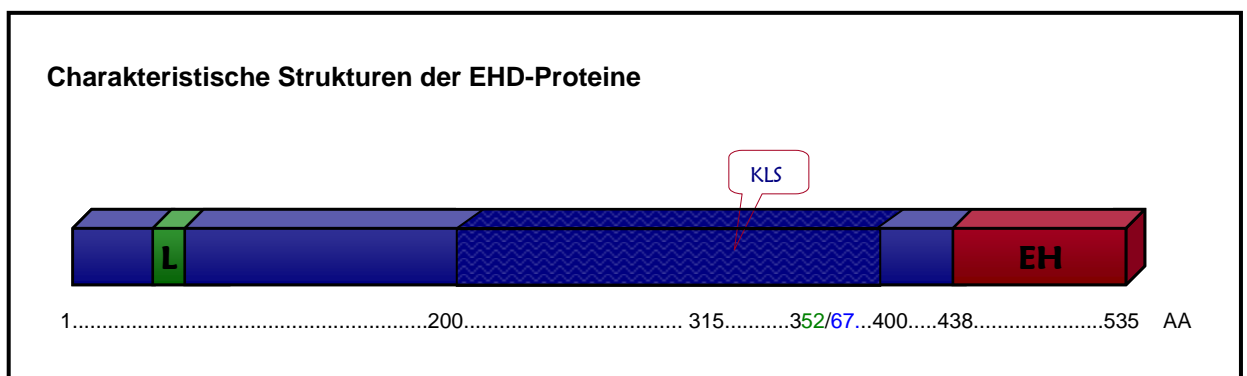


Abbildung 8: Charakteristischen Strukturen der EHD-Proteine

Die Struktur der EHD-Proteine weist N-terminal zunächst einen *P-Loop* auf (grün), der mittlere Teil stellt eine ausgedehnte *coiled-coil*-Region (gewellt) dar, während C-terminal als Interaktionsmotiv eine EH-Domäne (rot) lokalisiert ist. In Grün ist der Beginn von Klon Nr. 497 und in Blau jener von Klon Nr. 139 angegeben. Darüber hinaus ist ein bipartielles Kernlokalisierungssignal (KLS) im Bereich der *coiled-coil* Region vorhanden.

3.2.2 Charakterisierung der Interaktion

Zur näheren Analyse der Interaktion, insbesondere im Hinblick auf die postulierte Abhängigkeit von den NPF-Motiven Syndapins, wurden verschiedene Syndapin-Konstrukte mit dem Klon Nr. 139 in Hefezellen zusammengebracht und durch Analyse der Aktivierung von Reportergenen (Blau- und Wachstumstest) auf eine eventuelle Interaktion der beiden Proteine hin überprüft. Das Konstrukt, welches für den Bereich der NPF-Motive von Syndapin I kodiert, konnte dabei allerdings nicht eingesetzt werden, da es stark selbstaktivierend ist.

Negativkontrolle	Sdp I	Sdp I ΔSH3	Sdp I AS 1-128	Sdp I cc-Region	Sdp II AS 1-130	Sdp II cc-Region	Sdp II I NPF-Region	Sdp II k NPF-Region
BT: -	+++	++	-	-	-	-	++++	++++
WT: -	+++	+++	+	-	-	-	+++	+++

Abbildung 9: Analyse der Interaktion von Syndapinen und Kandidat Nr. 139

Gezeigt sind die Ergebnisse aus einem Blautest (BT) und einem Wachstumstest (WT) von mit den genannten Syndapin-Konstrukten und dem Klon Nr. 139 cotransformierten Hefezellen. Es ist eine Interaktion im Bereich der NPF-Region beider Syndapin-Isoformen zu erkennen.

Der Vergleich der beiden Konstrukte Syndapin I und Syndapin I ΔSH3 deutet auf eine nicht-SH3-Domänen vermittelte Interaktion der beiden Proteine hin. Von den zur weiteren Eingrenzung des Bindungsbereichs eingesetzten Konstrukten zeigen nur solche eine deutliche Interaktion mit dem EHD-Proteinfragment, welche die NPF-Motive enthalten, nicht jedoch solche, welchen dieser Bereich fehlt, wie z.B. der Bereich der *coiled-coil* Region oder der ersten 128 Aminosäuren. Dies gilt sowohl für die Syndapin-Isoformen I und II als auch die beiden Splicevarianten der zweiten Isoform. Dieser Befund deutet somit auf eine direkte Interaktion zwischen dem Protein EHD3 und den NPF-Motiven der verschiedenen Syndapin-Isoformen hin.

Um eine unabhängige Bestätigung der Resultate der Hefe-zwei-Hybrid-Analysen zu erhalten, wurde ein Co-Präzipitationsexperiment mit GST-Fusionsproteinen der unterschiedlichen Syndapin-Isoformen und endogenen EHD-Proteinen des Rattengehirncytosols durchgeführt, da in diesem Organ die Expression von EHD3 erhöht ist. Zusätzlich wurde hierbei ein entsprechendes Fusionsprotein der Syndapin-III-Isoform eingesetzt, welche keine NPF-Motive enthält und daher keine Co-Präzipitation von EHD-Proteinen bewirken sollte (Abbildung 10).

Tatsächlich zeigt sich hierbei eine deutliche, wenn auch im Vergleich mit den Überständen nicht angereicherte (Daten nicht gezeigt), Immunreaktivität für EHD-Proteine in den Eluaten der Co-Präzipitationen mit den Syndapin-Isoformen I und II sowie deren Splicevarianten, nicht aber in dem jener mit Syndapin III. Dabei ist in Konsistenz mit dem zusätzlichen NPF-Motiv der langen Splicevariante von Syndapin II eine besonders deutliche Präzipitation der EHD-Proteine durch die

entsprechenden Fusionsproteine zu erkennen. Somit bestätigt dies Experiment in Übereinstimmung mit dem Auftreten von NPF-Motiven die Interaktion von EHD-Proteinen mit den Syndapin-Isoformen I und II.

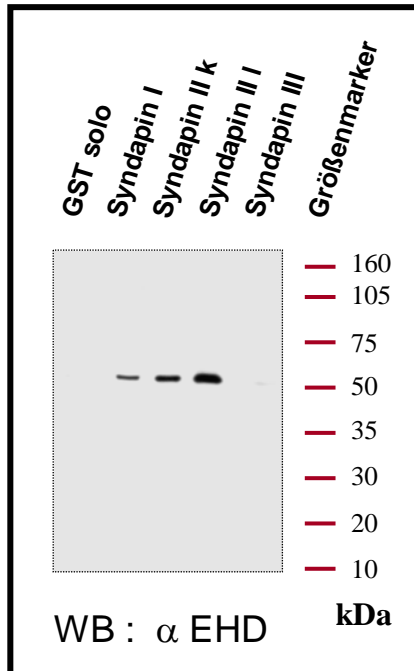


Abbildung 10: EHD-Proteine binden an die Syndapin-Isoformen I, II k und II l

Die Abbildung zeigt einen Western-Blot der Eluate aus einer Co-Präzipitation mit an Glutathion-Sepharose immobilisierten GST-Syndapin-Fusionsproteinen und endogenen EHD-Proteinen aus Rattengehirncytosol. Die Visualisierung erfolgte durch eine Immunfärbung mit dem α EHD-Antikörper hPAST. Dabei zeigen in Übereinstimmung mit dem Vorkommen der NPF-Motive in Syndapinen die Isoformen I, II k und II l eine deutliche Präzipitation der EHD-Proteine, nicht aber die Syndapin-Isoform III.

Da der eingesetzte α EHD-Antikörper hPAST die unterschiedlichen EHD-Protein-Isoformen nicht unterscheidet (Braun *et al.*, 2005), wurde als nächstes eine Co-Präzipitationsanalyse mit den drei interagierenden Syndapin-Varianten und den 4 EHD-Isoformen durchgeführt, um eventuelle Bindungen dieser Proteine zu überprüfen und durch ein vergleichendes Experiment gegebenenfalls Aussagen über bevorzugte Interaktionen bestimmter Isoformen treffen zu können (Abbildung 11). Die hierbei verwendeten EHD-Protein-Konstrukte zur Überexpression dieser Proteine in Mammaliazellen wurden von Frau Diplom-Naturwissenschaftlerin Anne Braun zur Verfügung gestellt. Die gewählten Reaktionsbedingungen sind für alle eingesetzten Syndapin-Konstrukte spezifisch und verursachen keine Assoziation zwischen Syndapinen und der GFP-Markierung (Daten nicht gezeigt).

Hierbei ist zu beobachten, daß außer EHD3 auch EHD 1 und 4 effizient durch die Syndapine I, II l und II k gebunden werden können. Während EHD 1 z. B. durch alle drei untersuchten Syndapin-Varianten in das Eluat überführt wird, präzipitiert keines der untersuchten Syndapine EHD 2, was auf eine allenfalls schwache Affinität für dieses Protein hindeutet. Im Detail zeigen sich interessanterweise Unterschiede in der Bindung der verschiedenen EHD-Proteine durch die Syndapin-Isoformen. So ist zwar kein Unterschied bei der Bindung von EHD3 und 4 durch Syndapin I festzustellen, beide können gleichermaßen in dem betreffenden Eluat detektiert werden, doch zeigen im Gegensatz dazu Syndapin II k und Syndapin II l eine

deutliche Präferenz für EHD3, sie präzipitieren dieses Protein im Vergleich zu den Lysaten deutlich stärker im Eluat, als EHD 4. Ein Unterschied zwischen den Syndapin II - Splicevarianten ist hierbei jedoch nicht zu erkennen.

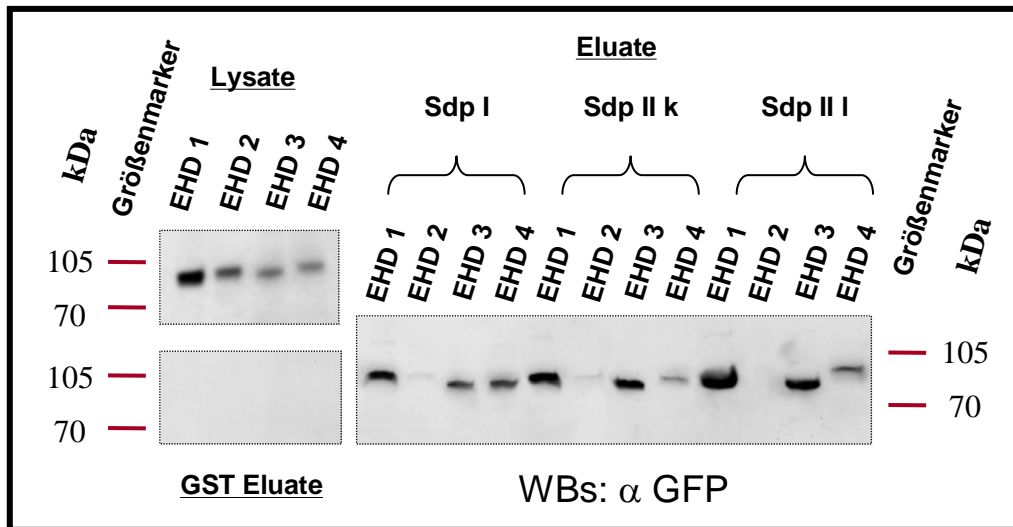


Abbildung 11: Differenzielle Bindung der EHD-Proteine durch Syndapine

Die Abbildung stellt verschiedene Western-Blot-Streifen mit Eluaten einer Co-Präzipitation von Syndapinen und überexprimierten EHD-Proteinen dar. Die Visualisierung erfolgte durch eine α GFP-Immunfärbung. Als Kontrolle sind die Eluate der EHD-Proteine aus einer Co-Präzipitation mit GST solo zu sehen. Die Lysate weisen eine deutlich Expression des Proteins EHD 1 auf, während diese für EHD3 und 4 deutlich schwächer ausfällt. Dennoch werden diese beiden Proteine durch alle 3 Syndapin-Varianten effektiv in die Eluate überführt, nicht jedoch das Protein EHD 2.

Als eine weitere unabhängige Methode zur Analyse der Interaktion *in vivo* wurde eine Koloalisationsstudie in primären, hippocampalen Neuronen durchgeführt. Hierzu wurden einerseits endogenes EHD und Syndapin I immunologisch gefärbt und andererseits Syndapin II, welches in Neuronen nicht detektiert werden konnte, und EHD 1 als GFP- bzw. Xpress-Konstrukt cotransfiziert (Abbildung 12). Dabei ist zu erkennen, daß Syndapin I und EHD Proteine gleichermaßen in den Neuriten lokalisiert sind und hier besonders in Wachstumsspitzen (Daten nicht gezeigt) koloalisieren. Im peripheren neuronalen Netz sind außerdem eine Reihe von Anreicherungen, welche ebenfalls eine Koloalisation von Syndapin I und EHD-Proteinen zeigen, zu erkennen (Abbildung 12 A & B), die möglicherweise synaptische Kontakte repräsentieren. Die Co-Überexpression von Syndapin II und EHD 1 in hippocampalen Neuronen des 14. Tages *in-vitro* demonstriert auch für diese beiden Proteine eine Koloalisation in einer Vielzahl von punktförmigen Strukturen (Abbildung 12 C). Diese Ergebnisse stehen damit in Einklang mit einer Interaktion von Syndapinen und EHD Proteinen im zellulären Kontext.

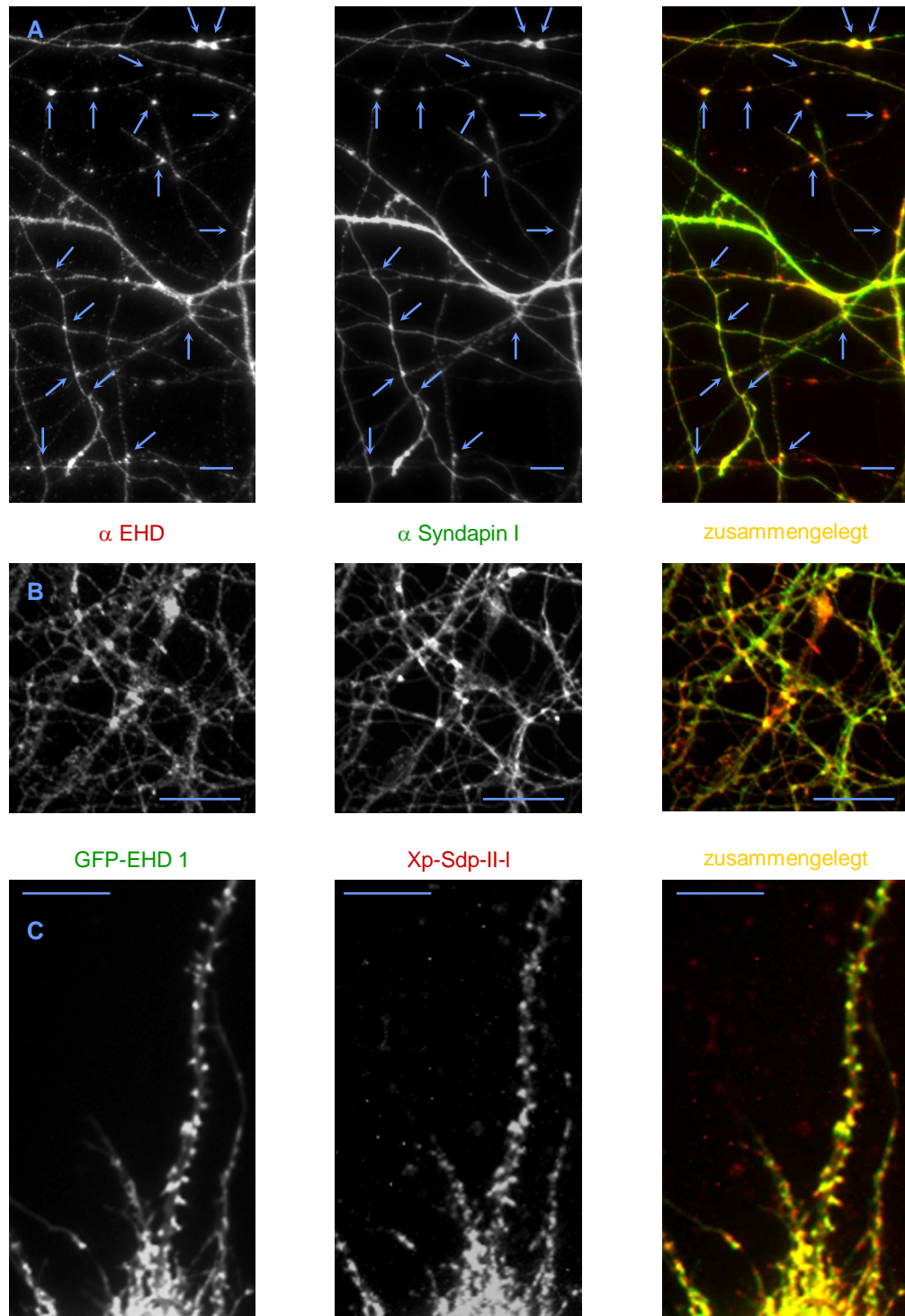


Abbildung 12: Colokalisation von Syndapinen und EHD-Proteinen in hippocampalen Neuronen

A-C) Gezeigt sind Immunfluoreszenzfärbungen hippocampaler Neurone (*Rattus norvegicus*) des 21. (A,B) bzw. 14. (C) Tages *in vitro* aus dissoziierten Primärkulturen geringer (A,B) bzw. hoher (C) Dichte. Der Maßstab (blauer Balken) beträgt 10 μ m. A & B) In Rot dargestellt ist die Immunfluoreszenzfärbung für EHD-Proteine, während in Grün endogenes Syndapin I zu sehen ist. In der Überlagerung ist eine Colokalisation der Proteine in Akkumulationspunkten des peripheren neuronalen Netzes zu erkennen (blaue Pfeile). C) Die Fluoreszenzsignale von exprimiertem GFP-EHD 1 (grün) und Xpress-Syndapin II I (rot) zeigen in der Überlagerung eine Colokalisation auch für diese Isoformen (gelb).

3.3 Membrane-bound Factor – das Rhotekin 2 der Maus

3.3.1 Proteinstruktur und Interaktionsdomänen

In dem mit Syndapin I als Köder durchgeführten Screen Nr. 8 wurden zwei unabhängige Klone gefunden, die einer murinen cDNS-Sequenz entsprechen, welche unter der Zugangsnummer GI:26337104 in öffentlichen Datenbanken als putatives Protein *Membrane-bound Factor* (MBF) publiziert ist. Die Datenbanksequenz beinhaltet ein offenes Leseraster von insgesamt 601 Aminosäuren, die beiden gefundenen Klone umfassen davon die Aminosäuren 457 bis 601 im Falle von Klon Nr. 336 bzw. die Aminosäuren 1 bis 601 im Falle von Klon Nr. 541 (MBF), welcher zusätzlich allerdings noch 99 artifiziell translatierte Basenpaare aus dem 5'-untranslatierten Bereich enthält. Eine vollständige Sequenzierung beider Klone ergab übereinstimmend eine Abweichung gegenüber der Datenbanksequenz in 17 Basenpaaren bzw. 5 Aminosäuren (Abbildung 13 I). Die in Datenbanken publizierten EST-Klone stützen die Datenbanksequenz.

Das Protein selbst hat eine apparente Größe von etwa 77 kDa und weist mehrere bemerkenswerte Strukturen und Motive auf (Abbildung 13 II). Dazu gehört zunächst eine HR1-Domäne (Rho-Effektor-Homologie Region 1), die auch als Rho-bindende-Domäne RBD1 beschrieben wird und sich über die Aminosäuren 12 bis 75 erstreckt. Sie zeichnet sich durch eine α -helikale Sekundärstruktur, die hier an der Position 23 bis 74 lokalisiert ist, aus. An der Position 279 bis 384 folgt eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne), eine Struktur, deren genaue Funktion bisher nicht geklärt ist, die jedoch häufig im Zusammenhang mit zellinternen Signalprozessen und mit der Konstituierung des Cytoskeletts in Erscheinung tritt (z.B. Mayer *et al.*, 1993; Haslam *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1994; Rossman *et al.*, 2003). Darüber hinaus bewerkstelligen PH-Domänen über eine Phosphoinositid-Bindung eine Assoziation von Proteinen mit Membranen (z.B. Maffucci & Falasca, 2001; Rossman *et al.*, 2003). Überdies befinden sich mit den Konsensussequenzen KKVLSPIGEPAPDGKRK und KRKKRR zwei unterschiedliche, ineinander übergehende Kernlokalisierungssignale im Bereich der Aminosäuren 475 bis 494. An letzteres Signal schließt sich mit der Sequenz APLPP ein Motiv an, das für eine über die SH3-Domäne Syndapins vermittelte Protein-Protein Interaktion charakteristisch ist. Die zusätzlich involvierte, positive Ladung wird in diesem Fall durch das basische Segment des zweiten Kernlokalisierungssignals bereitgestellt.

Insgesamt weist das Protein MBF mit einer Übereinstimmung von 72% und einer Ähnlichkeit von 83% seiner Aminosäuren¹ eine klare Homologie zu dem unter der Zugangsnummer gi:25140396 in öffentlichen Datenbanken zugänglichen, menschlichen (*Homo sapiens*) Rhotekin 2 auf (Collier *et al.*, 2004). Da in den entsprechenden Maus-Datenbanken einschließlich der EST-Sammlung kein dem menschlichen Rhotekin 2 ähnlicheres Protein als MBF publiziert ist und außerdem das als Rhotekin der Maus in Datenbanken publizierte Protein eine deutliche

¹ = Prozentangaben beziehen sich auf die Aminosäuresequenz des alignenden Bereichs

Homologie zu den drei Splicevarianten der menschlichen Rhotekin-Isoform 1 (Isoform a: 82% Identität, b: 85% Identität und c: 86% Identität)¹ aufweist (Alignments der publizierten Rhotekine zeigt Tabelle 2 des Anhangs), kann MBF als Rhotekin 2 der Maus angesehen werden (s. a. Collier *et al.*, 2004). Daher wird das Protein im Folgenden auch unter diesem Namen angesprochen.

I) Aminosäuresequenz des unbekannten Proteins MBF

```

MBF : 1 MEGQLLRGLAAQQDCSIREKIDLEIRMREGIWKLLSLSTKKDQVLHAVKNLMVCSARIQA 60
Bank: 1 MEGQLLRGLAAQQDCSIREKIDLEIRMREGIWKLLSLSTKKDQVLHAVKNLMVCSARIQA 60

MBF : 61 YTAELQKSKEEIANQTGARDSSSENKEGESCRGKIALSDIRIPLMWKSDHFSNKECTQR 120
Bank: 61 YTAELQKSKEEIANQTGARDSSSENKEGESCRGKIALSDIRIPLMWKSDHFSNKECTQR 120

MBF : 121 FAIFCLFRMGAQVFDTDMVIVDQTVTVDICFENVTIFNEAGPDFQIKIEVYSCSAEESLST 180
Bank: 121 FAIFCLFRMGAQVFDTDMVIVDQTVTVDICFENVTIFNEAGPDFQIKIEVYSCSAEESLST 180

MBF : 181 NTPRKLAKKLKTSISKATGRKISAAALQEESPEACLLAGSVAGAKYHLLAHTTLTLENAGD 240
Bank: 181 NTPRKLAKKLKTSISKATGRKISAAALQEESPEACLLAGSVAGAKYHLLAHTTLTLENAGD 240

MBF : 241 CFKTHNLSVHGDEECSFWLPLYGNVCCRLVAQPACMAADAFAGFLNEQQTGKGLVGWRRLL 300
Bank: 241 CFKTHNLSVHGDEECSFWLPLYGNVCCRLVAQPACMAADAFAGFLNEQQTGKGLVGWRRLL 300

MBF : 301 YCALRGGKLRFCYGPPEEIEAKVEPALVVPIDKETRIQAVEKDSKKMHCFSVLSTAAGRAV 360
Bank: 301 YCALRGGKLRFCYGPPEEIEAKVEPALVVPIDKETRIQAVEKDSKKMHCFSVLSTAAGRAV 360

MBF : 361 SHIFAADSLADFQEWGAFRQHFFDLSSQWKHCCEELMRIEIMSPRKPPLFLAKEATSVMYY 420
Bank: 361 SHIFAADSLADFQEWGAFRQHFFDLSSQWKHCCEELMRIEIMSPRKPPLFLAKEATSVMYY 420

MBF : 421 DMSIDSPVKLESVTDIIQKKIGETNGQFLIGRDDQSAAPPWAAVFDGNHEMVIEKKVLSSP 480
Bank: 421 DMSIDSPVKLESVTDIIQKKIGETNRQFLIGRDDQSAAPPWAAVFDGNHEMVIEKKVLSSP 480

MBF : 481 TGEPAPDGKRKRRAPLPPTDQPPFCIKTQGRANQSKDSATQAGVSGASPLPSDPRLLLP 540
Bank: 481 TGEPAPDGKRKRRAPLPPTDQPPFCIKTQGRANQSKDSATQAGVSGASSPSDPRLSPP 540

MBF : 541 THHLQKPVAAPRKLLPARKNSSADIGHTDTKTSLDAKPVPVPRQKSIRDILDPRSWLQAQ 600
Bank: 541 THHLQKPVAAPRKLLPARKNSSADIGHTDTKTSLDAKPVPVPRQKSIRDILDPRSWLQAQ 600

MBF : 601 V 601
Bank: 601 V 601
    
```

II) Domänenstruktur

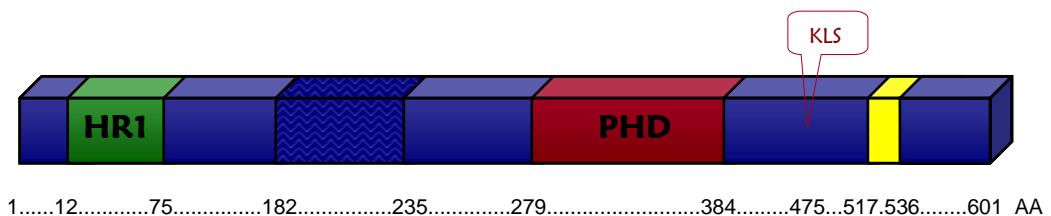


Abbildung 13: Die Proteinstruktur MBFs weist verschiedene Interaktionsmotive auf

I) Aminosäuresequenz des unbekannten Proteins MBF. Angegeben ist die Aminosäuresequenz des in der Datenbank unter der Zugangsnummer GI:26337105 veröffentlichten Proteins sowie das offene Leseraster der Klone 336 und 541, wobei die mit dem Klon Nr. 336 gefundene Teilsequenz in grün dargestellt ist. Unterstrichen ist das Kernlokalisierungssignal. **II) Domänenstruktur.** Dargestellt sind in grün die Rho-Effektor-Homologie Region 1 (HR1-Domäne), in rot die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PHD) und gewellt Bereiche mit vorherrschender helikaler Sekundärstruktur sowie die Lage des Kernlokalisierungssignals (KLS). Außerdem gezeigt ist eine nur für das Datenbankprotein vorhergesagte PEST-Sequenz in gelb.

3.3.2 Ein C-terminales PxxP-Motiv von Rhotekin 2 vermittelt die Interaktion zur SH3-Domäne Syndapins

Um die mittels eines Hefe-Screens identifizierte und in einer Copräzipitationsprüfung mit Kandidat Nr. 336 bestätigte Interaktion von Syndapin und Rhotekin 2 (Daten nicht gezeigt) genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene GST-Syndapin-Fusionsproteine zur Anreicherung von überexprimierten GFP-Fusionsproteinen des Kandidaten Nr. 336 eingesetzt (Abbildung 14).

Zusätzlich zu Syndapin I copräzipitieren auch die beiden Splicevarianten von Syndapin II GFP-336-Fusionsproteine. Im Hinblick auf die untersuchten Fragmente ist festzustellen, daß sowohl die SH3-Domäne von Syndapin I als auch diejenige von Syndapin II eine deutliche Präzipitation der überexprimierten GFP-Fusionsproteine bewirken, während das Fehlen jener Domäne zu einem gänzlichen Verlust der Immunreaktivität in dem betreffenden Eluat führt. Konsistenterweise weist der Bereich der NPF-Motive keine und der des N-Terminus (AS 1-130) von Syndapin II keine nennenswerte Affinität zu dem rekombinanten Rhotekin auf. Die Mutation der SH3-Domäne führt bei beiden untersuchten Isoformen zu einer drastischen Verminderung der Präzipitation rekombinanten Proteinmaterials gegenüber Fusionsproteinen mit intakter SH3-Domäne. Somit ist die SH3-Domäne Syndapins erforderlich und ausreichend für die Interaktion mit Rhotekin 2. Dieser Befund wird auch durch Daten aus dem Hefe-System gestützt, hier zeigt sich eine deutliche Interaktion beider Kandidaten mit Syndapin I (Nr. 336 & 541: Blautest: +++, Wachstumstest: +++), jedoch nicht mit Syndapin I Δ SH3 (Nr. 336 & 541: beide -). Da die SH3-Domäne alleine selbstaktivierend ist, konnte sie in diesem Experiment nicht eingesetzt werden.

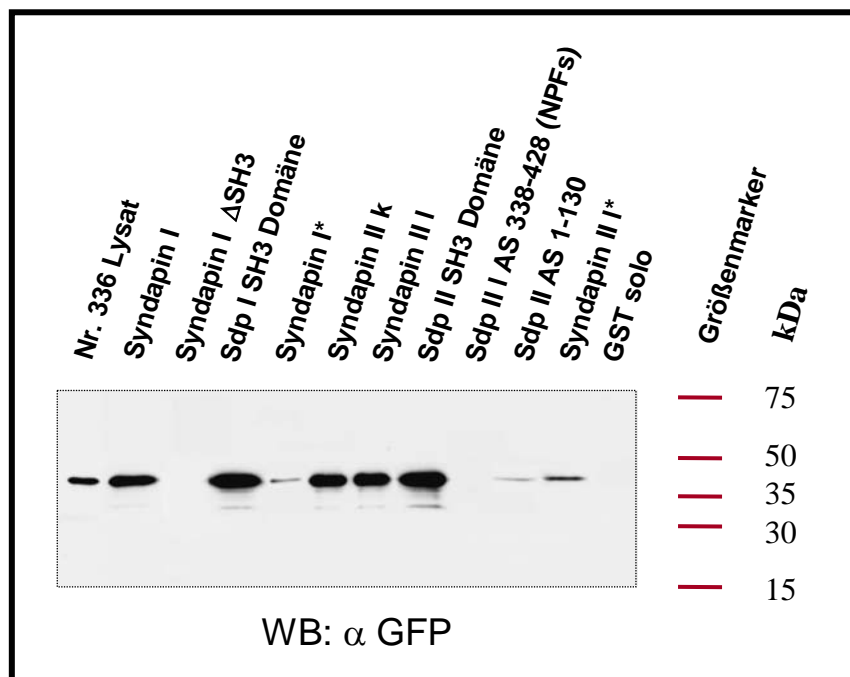


Abbildung 14: Der C-terminale Bereich von Rhotekin 2 bindet an die SH3-Domäne von Syndapin I und II

Auf dem Western-Blot sind Lysat und Präzipitation in HEK-Zellen überexprimierter GFP-336-Fusionsproteine durch unterschiedliche Syndapin-Fusionsproteine mittels einer α GFP-Färbung dargestellt. Als Negativkontrolle fungiert dabei GST solo. Zu erkennen ist eine starke Konzentration des überexprimierten Proteinmaterials in den betreffenden Eluat durch alle die SH3-Domäne enthaltende Fusionsproteine von Syndapin I und II lang bzw. kurz.

Zur Eingrenzung der Bindungsregion für Syndapine auf Rhotekin 2 wurden Deletionskonstrukte von Rhotekin 2 kloniert und GFP-Fusionsproteine dieser auf ihre Affinität zu an Glutathion-Sepharose immobilisiertem Syndapin I hin untersucht (Abbildung 15). So ist eine deutliche Anreicherung der Immunreaktivität für solche rekombinanten Proteine zu erkennen, welche die letzten 215 Aminosäuren von Rhotekin 2 enthalten. Demgegenüber kann für die PH-Domäne (AS 279–386) keine Affinität zu Syndapin festgestellt werden, die rekombinanten Proteine verbleiben im Überstand. Da die Aminosäuren 1-279 weder im Überstand noch im Eluat nachgewiesen werden können, ist eine Aussage zu etwaigen Bindungsmotiven in diesem Bereich von Rhotekin 2 mit dieser Methode nicht möglich. Das Experiment bestätigt daneben die Interaktion von Rhotekin 2 *fl* und Syndapin I *fl* unabhängig.

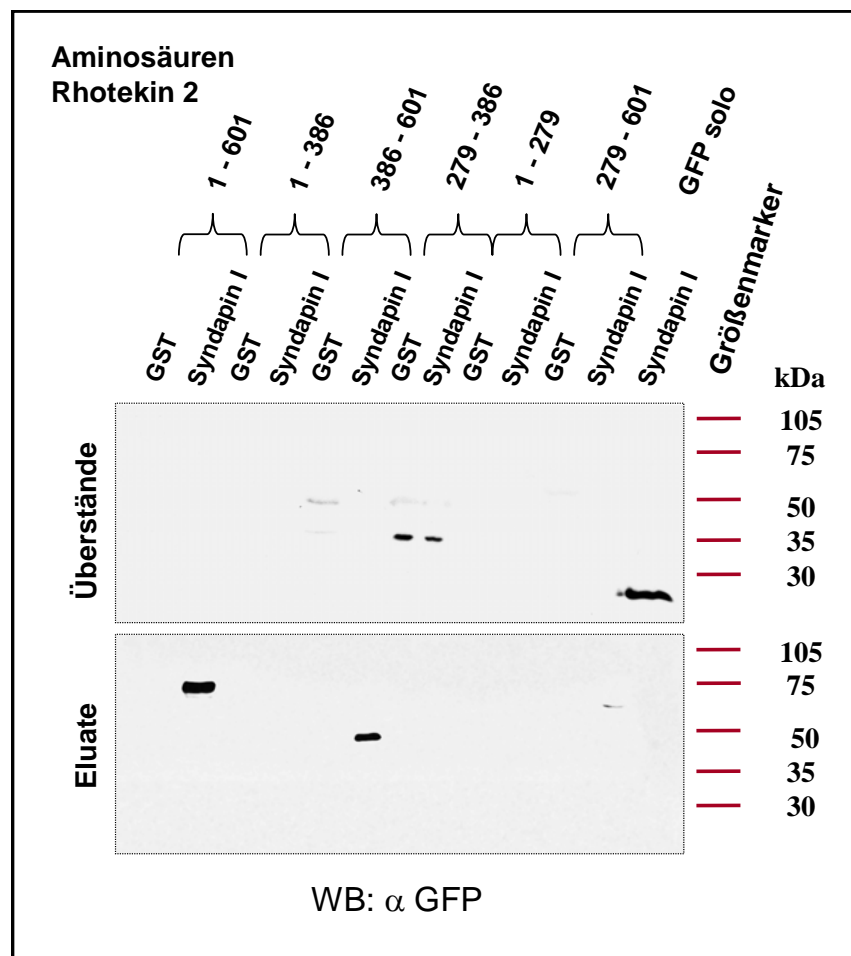


Abbildung 15: Das Syndapin-Bindungsmotiv ist im Bereich der letzten 215 Aminosäuren von Rhotekin 2 lokalisiert

Zu sehen sind Western-Blots der Überstände und Eluate einer Copräzipitationsprüfung mit rekombinantem GST-Syndapin und überexprimierten GFP-Rhotekin-2-Konstrukten. Die Visualisierung erfolgte mit αGFP. Als Negativ-Kontrollen sind GST- und GFP solo gezeigt, eine unspezifische Affinität liegt nicht vor. Eine deutliche Anreicherung der Immunreaktivität erzielen nur Fusionsproteine, welche die letzten 215 Aminosäuren des Proteins beinhalten, doch ist über die ersten 279 Aminosäuren keine Aussage möglich.

Ergebnisse

Es fällt auf, daß trotz der mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachteten, guten Expression aller verwendeten Konstrukte in den HEK-Zellen insgesamt jedoch nur sehr wenig Immunreaktivität in den entsprechenden Lysaten und Überständen nachgewiesen werden kann. Als Grund hierfür ist die Membranassoziation des Moleküls in Betracht zu ziehen, welche eine effektive Überführung in das Zellcytosol weitestgehend verhindert (siehe auch Abschnitt 3.3.5).

Ein Vergleich der PxxP-Motive der bisher identifizierten Syndapin-Interaktionspartner (Abbildung 16) zeigt für Rhotekin 2 an der Position 496 mit den Aminosäuren KRKKRRAPLPP eine charakteristische Konsensussequenz bestehend aus einer Akkumulation positiver Ladung, gefolgt von einem Alanin und Prolin, dem nach einer beliebigen Aminosäure zwei weitere Proline folgen. Da sich darüber hinaus kein weiteres solches Motiv in dem Molekül befindet und auch die Ergebnisse aus dem Hefe-zwei-Hybrid-Screen und den Copräzipitationsanalysen auf ein Bindungsmotiv im Bereich der letzten 185 Aminosäuren hindeuten, ist dieses PxxP-Motiv als Vermittler der Proteininteraktion sehr wahrscheinlich.

Protein	Position P	+	+	+	+	+	+	A/+	P	X	P/X	P	+	+	+
Dynamamin	799							P	A	P	G	P	P	A	G
Synaptojanin	1117							R	P	A	P	P	Q		
Synaptojanin	1123							R	P	P	P	P			
Synapsin	76							A	P	A	P	P	R		
N-WASP	261					R	Q	A	P	P	P	P			
N-WASP	294					R	G	A	P	P	P	P			
Huntingtin	1177								P	M	S	P	K	K	
MAP 1s	830							R	K	P	S	V	P	K	
mSOS	1138				P	V	P	P	P	V	P	P	R	R	R
ProSAP 2	748							R	A	P	P	P	K	R	A
Cordon Bleu	20				K	A	R	A	P	P	P	P	P	G	K
Dynamamin	785					R	R	A	P	A	V	P	P	A	R
MAP 1s	679					H	R	K	P	T	P	P			
MAP 1s	789					R	R	K	A	P	A	R	P		
Cordon Bleu	327			K	K	R	R	A	P	P	P	P			
Synbape	281	K	K	R	R	R	P	A	P	P	P	P			
Cordon Bleu	361		K	K	K	R	R	A	P	A	P	P	P	P	
Rhotekin 2	496	K	R	K	K	R	R	A	P	L	P	P			
Inverse Motive:															
MAP 2	256							+	+	+	P	P	X	P	A/+
MAP 2	462							K	E	P	P	T	P	K	
MAP 1s	564							R	P	P	A	P		A	
MAP 1s	737					R	D	P	P	P	T	P	R		
MAP 1s	744					R	V	P	P	P	L	P			

Abbildung 16: Positiv geladene Aminosäuren in Verbindung mit einem PxxP-Motiv vermitteln die Interaktion zu Syndapins SH3-Domäne

Die Abbildung zeigt einen Vergleich der PxxP-Motive verschiedener bekannter Interaktionspartner der Syndapin-SH3-Domäne. In Rot dargestellt sind positiv geladene Residuen, während in blau die jeweiligen Proline gezeigt sind. Bei Synbape handelt es sich um ein unbekanntes, putatives Protein, das im Verlauf dieser Arbeit als Bindungspartner für die SH3-Domäne Syndapins identifiziert wurde; in grün sind solche Motive gezeigt, die im Bereich der mittels der Hefe-Screene gefundenen Klone lokalisieren. Das resultierende Muster aus positiver Ladung, Alanin, Prolin, ein oder zwei weiteren Aminosäuren, ein oder zwei Prolinen und/oder positiver Ladung kann auch invers auftreten, wie etwa bei den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen.

Diese Befunde aus dem Hefe-zwei-Hybrid-Screen und der Sequenzanalyse deuten ferner darauf hin, daß es sich bei der Interaktion von Syndapin und Rhotekin 2 um eine direkte Verbindung der beiden Moleküle handelt. Um dies experimentell zu untersuchen, wurde erneut eine Präzipitationsprüfung angewandt, in der ausschließlich zuvor aufgereinigte Fusionsproteine, d.s. GST-Syndapin I und mit einer pET-32-Markierung versehenes Rhotekin 2 (His-Rhotekin 2), eingesetzt wurden (Abbildung 17). Als Negativkontrolle fungierte die pET-32-Markierung alleine in Verbindung mit GST solo und GST-Syndapin I. Dabei ist eine starke Präzipitation des rekombinanten Rhotekins durch das GST-Syndapin-Fusionsprotein festzustellen (letzter Blotstreifen). Demgegenüber weist das rekombinante Syndapin I keine Affinität zu der Markierung auf (vierter Blotstreifen). Somit liegt eine direkte Interaktion von Rhotekin 2 und Syndapin I vor.

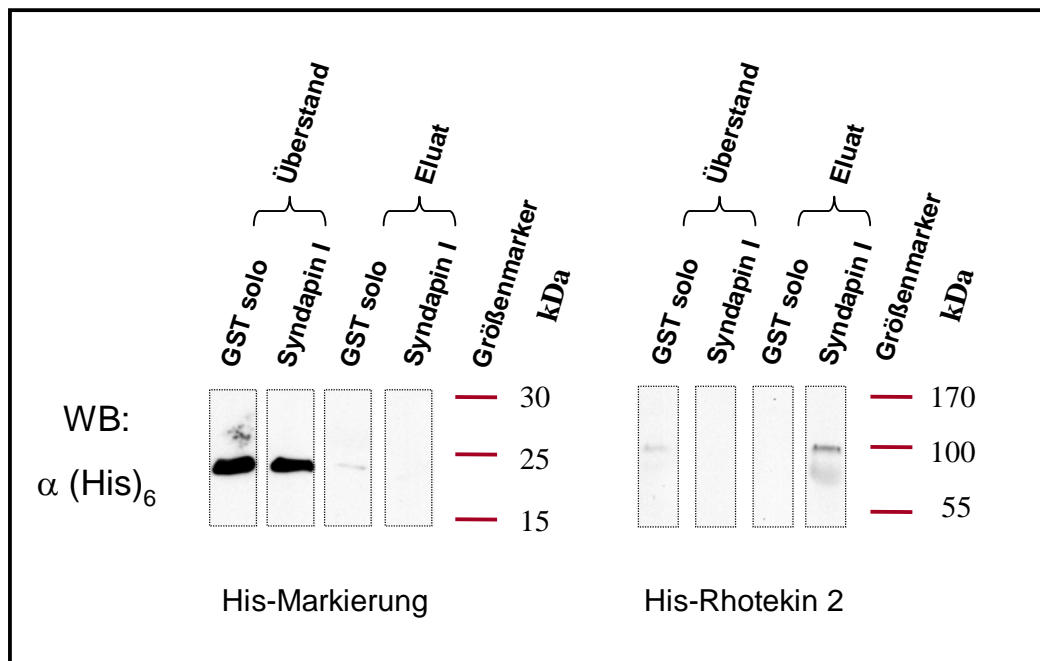


Abbildung 17: Die Interaktion von Syndapin I und Rhotekin 2 ist direkt

Dargestellt sind mit $\alpha(\text{Histidin})_6$ gefärbte Western-Blot-Streifen aus einer mit affinitätsgereinigten Fusionsproteinen bei 300 mM NaCl durchgeführten Copräzipitationsprüfung. Zu sehen sind jeweils Überstand und Eluat. Als Negativkontrolle dient die Histidin-Markierung in Verbindung mit GST solo bzw. GST-Syndapin. Unter den verwendeten Bedingungen ist eine spezifische Anreicherung von rekombinantem Rhotekin 2 durch GST-Syndapin-Fusionsproteine festzustellen.

3.3.3 Charakterisierung des α Rhotekin 2 – Antikörpers

Zur weiteren Analyse der Interaktion von Syndapin und Rhotekin 2, auch unter *in-vivo* Bedingungen, und zur Charakterisierung des neuen Proteins, wurde die Immunisierung zweier Kaninchen und eines Meerschweinchens mit dem an GST fusionierten C-Terminus von Rhotekin 2 (AS 457-601; RTKN-CT) durchgeführt, um

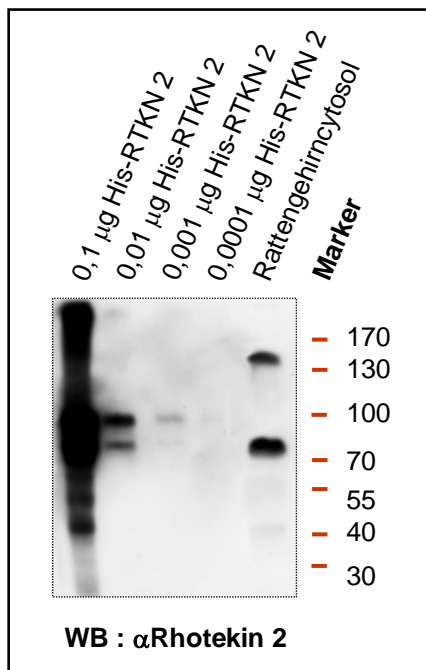
so geeignete Antikörper zu gewinnen. Die Spezifität der Antiseren wurde auf antigenträgenden Western-Blot-Streifen analysiert (Daten nicht gezeigt). Aus dem Serum von Kaninchen 2 wurden die Antikörpern affinitätsgereinigt und in Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenzen (Abbildung 18 I & II) charakterisiert.

Hierbei stellt sich heraus, daß der affinitätsgereinigte α Rhotekin-2-Antikörper nach einer Stunde Exposition des ECL-Films noch 1 ng des betreffenden Antigens (hier: pET-32-markiertes Fusionsprotein, 97 kDa) deutlich detektiert (Abbildung 18 I). Daneben treten bei größeren Proteinmengen weitere Banden geringeren Molekulargewichts auf, bei denen es sich um proteolytisch degradiertes Material handeln könnte. Im Rattengehirncytosol erkennt der affinitätsgereinigte Antikörper endogenes Protein des Molekulargewichts von Rhotekin 2 (77 kDa). Im hochmolekularen Bereich tritt bei etwa 150 kDa eine zusätzliche Bande auf. Hierbei könnte es sich um eine Kreuzreaktivität des Antikörpers handeln, doch deuten die Größe und die Tatsache, daß eine kristallographische Untersuchung der HR-Domäne der Rho-Kinase eine parallele Dimerisierung der alpha-helikalen Bereiche dieser Domäne aufgezeigt hat (Shimizu, *et al.* 2003), eher auf eine SDS-resistente Homomerbildung hin. Allerdings könnte es sich bei der 150 kDa-Bande auch um andere Proteinkomplexe handeln.

Die weitere Charakterisierung des Antikörpers erfolgte durch Immunfluoreszenzstudien mit verschiedenen, in dissoziierten Neuronenkulturen überexprimierten Flag- bzw. GFP-Rhotekin-2-Fusionsproteinen (Abbildung 18 II). FLAG-markiertes Rhotekin 2 zeigt dabei in der Epitop-Färbung eine starke Fluoreszenz des rekombinanten Proteins im Kern der Zelle (Abbildung 18 II A), was in Einklang mit dem vorhergesagten KLS des Proteins steht, daneben aber auch im Soma. Das selbe Muster erscheint in der α Rhotekin-Färbung. Diese Übereinstimmung der beiden Signale spiegelt sich schließlich bei der Überlagerung der entsprechenden Bilder in der intensiven Gelbfärbung der Zelle wider und belegt somit die Kompatibilität der durch die unterschiedlichen Antikörper erzielten Fluoreszenzsignale. Dies bestätigt sich bei der Verwendung des GFP-Rhotekin-2-Konstrukts. Interessanterweise werden dabei außerdem Fortsätze der Dendriten deutlich sichtbar (blaue Pfeile in Abbildung 18 II B), was auf ein Vorkommen von Rhotekin 2 in dendritischen Dornfortsätzen hindeutet.

Bei dem als Negativkontrolle eingesetzten Rhotekin-2-Konstrukt AS 1-279 ist eine relativ gleichmäßige GFP-Fluoreszenz im Soma der transfizierten Zellen zu erkennen, lediglich in den Neuriten ist sie etwas schwächer. Demgegenüber zeigt die α Rhotekin-2-Immunfärbung eine deutliche Akkumulation des Signals im Kern, wobei sich die Färbung der transfizierten Neurone in keiner Weise von der der umgebenden, untransfizierten Zellen unterscheidet und damit aller Wahrscheinlichkeit nach einer Färbung von endogenem Rhotekin 2 entspricht. Das gleiche Bild ist bei mit GFP solo transfizierten Zellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Daher ist der affinitätsgereinigte Antikörper spezifisch, hochaffin und sowohl für Western-Blots als auch für Immunfluoreszenzen einsetzbar.

Abbildung 18: Charakterisierung des α Rhotekin-2-Antikörpers



18 I) Spezifische Erkennung His-markierter und endogener Antigene durch α Rhotekin 2 in Western-Blot Analysen

Diese Abbildung zeigt die Erkennung unterschiedlicher Mengen His-markierter Antigene (97 kDa) sowie endogenen Proteinmaterials aus dem Rattengehirn (30 μ g) durch den affinitätsgereinigten Antikörper α Rhotekin 2. Nach einer einstündigen Exposition des ECL-Films ist eine Detektion von einem ng Fusionsprotein durch α Rhotekin 2 nachweisbar, während 0,1 ng Proteinmaterial nur noch einen schwachen Schatten an der betreffenden Stelle verursacht. Bemerkenswerterweise weist der Antikörper darüber hinaus auch starke Immunreaktivität im Bereich des endogenen Proteins (77 kDa, Rattengehirncytosol) auf. Zusätzlich tritt hier eine weitere Bande bei 150 kDa in Erscheinung, bei der es sich möglicherweise um eine durch die HR-Domäne verursachte Dimerform von Rhotekin 2 oder einen anderen SDS-resistenten Komplex handelt.

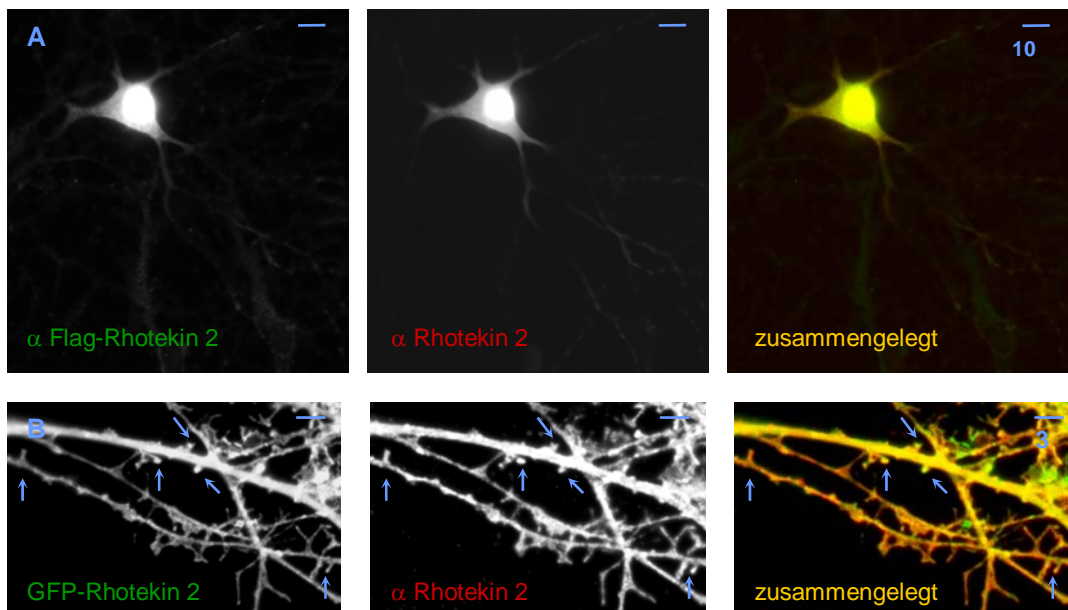


Abbildung 18 II: Spezifische Erkennung unterschiedlich markierter Antigene durch α Rhotekin 2 in hippocampalen Primärkulturen.

A & B) Gezeigt sind Immunfluoreszenzfärbungen hippocampaler Neurone (*Rattus norvegicus*) des 14. Tages *in vitro* aus dissoziierten Primärkulturen hoher Dichte. Die Zahl unter dem blauen Balken gibt den Maßstab der jeweiligen Abbildung in μ m an. In Grün dargestellt ist die Epitop-Färbung (A) bzw. die GFP-Fluoreszenz (B) des jeweils am 11. Tag *in vitro* transfizierten Rhotekin-2-Konstrukts, während in Rot die Immunfluoreszenz des affinitätsgereinigten Antikörpers zu sehen ist. Die in der Überlagerung in Gelb zu erkennende Übereinstimmung der beiden Signale bestätigt die Spezifität des Antikörpers *in vivo*. Die blauen Pfeile in B) weisen auf Dornfortsätze hin, in welchen ebenfalls eine Colokalisation der beiden Signale zu erkennen ist.

3.3.4 Subzelluläre Verteilung

Der neu generierte, affinitätsgereinigte Antikörper für Rhotekin 2 wurde nachfolgend für eine Analyse der subzellulären Verteilung des endogenen Proteins zu analysieren. Hierzu wurden sowohl Colokalisationsuntersuchungen in maturen, hippocampalen Neuronen mit spezifischen Markerproteinen (Abbildung 19) als auch eine biochemische Fraktionierung (Abbildung 20) durchgeführt. Als Marker wurden dabei Tubulin für Dendriten und Piccolo, ProSAP 2 (Synonym: Shank 3), sowie Synapsin für die Visualisierung von Synapsen eingesetzt.

Der Vergleich mit der Tubulin-Färbung zeigt das Vorkommen endogenen Rhotekin 2s in dendritischen Kompartimenten (Abbildung 19 I A, blaue Pfeile). Desweiteren weist der Vergleich mit den synaptischen Markerproteinen Piccolo und ProSAP 2 (Abbildung 19 I B - E) für Rhotekin 2 eine synaptische Lokalisation aus. Dabei überlappen die Immunfluoreszenzsignale von Rhotekin 2 und dem präsynaptischen Marker Piccolo nicht eindeutig, sondern grenzen eher aneinander (Abbildung 19 I C), während eine deutliche Colokalisation mit dem postsynaptischen Marker ProSAP 2 festzustellen ist (Abbildung 19 I E). Die α Rhotekin-2-Färbung weist außerdem zuweilen eine deutliche Immunreaktivität im Bereich des Zellkerns (Abbildung 19 I A, roter Pfeil) auf und zuweilen nicht (Abbildung 19 I D, roter Pfeil).

Ferner findet sich in Wachstumskegeln (Abbildung 19 II A & B) eine Anreicherung der Immunreaktivität für Rhotekin 2 (Abbildung 19 II A, blaue Pfeile und Abbildung 19 II B), die partiell mit dem präsynaptischen Marker Synapsin colokalisiert. Interessanterweise ist diese Colokalisation von Synapsin und Rhotekin 2 nicht auf den eigentlichen Wachstumskegel beschränkt, sondern sie tritt darüber hinaus auch in den Spitzen der von dem Kegel ausgehenden Filopodien auf (Abbildung 19 II B, blauer Pfeil). Zusammengenommen spricht dies für eine Lokalisation von Rhotekin 2 in sowohl axonalen als auch dendritischen Zellkompartimenten, sowie in synaptischen Kontakten.

Bei der biochemischen Darstellung und Analyse unterschiedlicher Zellfraktionen aus Rattengehirnhomogenat (Abbildung 20) ist eine starke Anreicherung des Proteins Rhotekin 2 zu synaptischen Membranen hin festzustellen, ein Umstand, der mit der Membranbindung des Proteins konsistent ist. Darüber hinaus tritt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Colokalisationsstudie mit synaptischen Markern in der Fraktion der postsynaptischen Dichte gleichfalls Immunreaktivität in der erwarteten Molekulargewichtsgröße (77 kDa) auf, doch fällt diese verglichen mit dem Signal aus der Fraktion synaptischer Membranen deutlich schwächer aus. Da durch den Antikörper im Homogenat bei den gewählten Bedingungen keine entsprechende Bande detektiert wird, so daß davon ausgegangen werden muß, daß die Menge des angebotenen Proteins hier unter der Nachweisgrenze liegt, stellen auch die schwachen Banden in der PSD-Fraktion und in der P2-Fraktion eine Anreicherung des Proteins gegenüber des Ausgangshomogenates dar. Insgesamt erweist sich Rhotekin 2 damit als ein synaptisches Membranprotein.

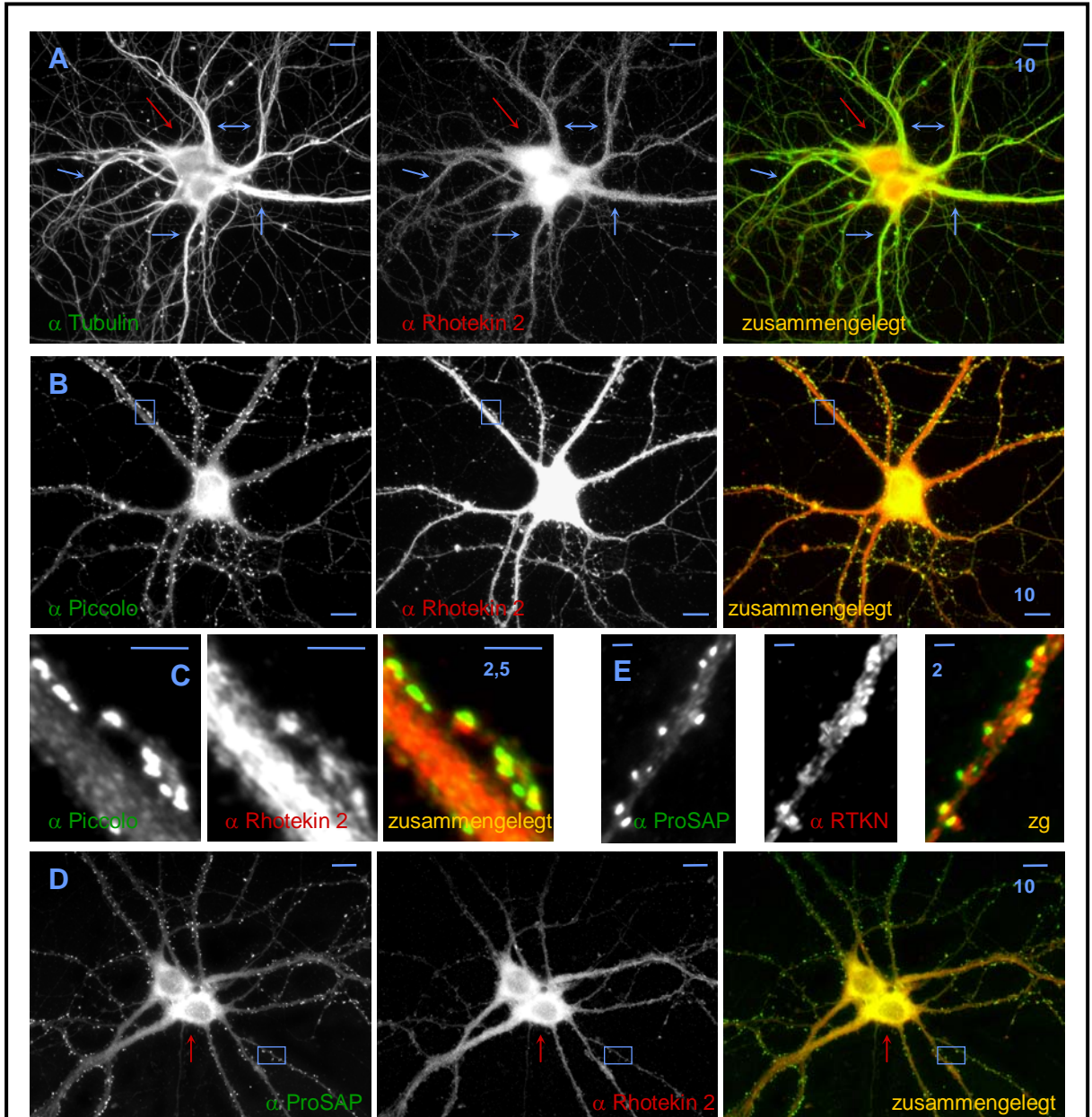


Abbildung 19 I : Rhotekin 2 ist in Dendriten, Synapsen und zuweilen in Kernen lokalisiert

A-E) Gezeigt sind Immunfluoreszenzfärbungen maturer (21 Tage *in vitro*), hippocampaler Neurone (*Rattus norvegicus*) aus dissoziierten Primärkulturen geringer Dichte. Die Zahl unter dem blauen Balken gibt den Maßstab der jeweiligen Abbildung in μm an. A) Dendritische Lokalisation. Die α Tubulin-Färbung (grüner Kanal) visualisiert Dendriten (blaue Pfeile), während der Zellkern ausgespart bleibt (roter Pfeil). Im roten Kanal ist Rhotekin 2 zu sehen, wobei der rote Pfeil auf die hier auftretende Immunreaktivität im Bereich des Zellkerns hinweist. In der Überlagerung ist die Colokalisation der beiden Proteine in dendritischen Kompartimenten in gelb zu erkennen (blaue Pfeile). B) Präsynaptische Färbung. Als präsynaptischer Marker dient Piccolo (grüner Kanal), daneben ist Rhotekin 2 im roten Kanal gezeigt, während die Überlagerung eine Colokalisation von Rhotekin 2 und Piccolo an Synapsen in gelb abbildet. C) Ausschnittsvergrößerung von B. Eine teilweise Überlappung von Rhotekin 2 und Piccolo ist zu sehen. D) Postsynaptische Färbung. Als postsynaptischer Marker ist ProSAP 2 im grünen Kanal zu sehen, während in Rot Rhotekin 2 dargestellt ist. In der Überlagerung erscheint eine Colokalisation in Gelb. Der rote Pfeil weist auf die in diesem Fall fehlende Immunreaktivität für Rhotekin 2 im Bereich des Nukleus hin. E) Ausschnittsvergrößerung aus D. Diverse gelbe Punkte zeigen die Lokalisation von Rhotekin 2 (RTKN) in postsynaptischen Kompartimenten.

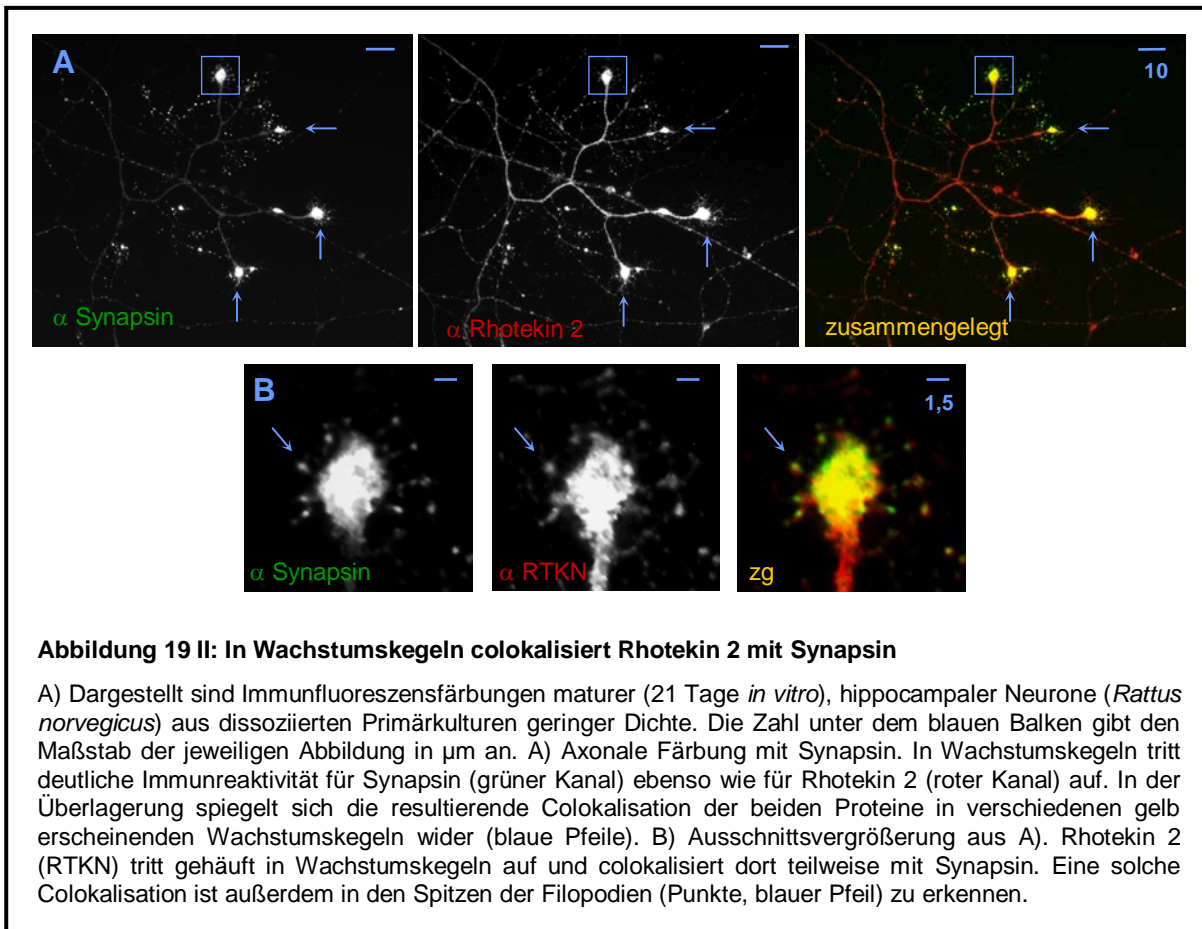


Abbildung 19 II: In Wachstumskegeln colokalisiert Rhotekin 2 mit Synapsin

A) Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen maturer (21 Tage *in vitro*), hippocampaler Neurone (*Rattus norvegicus*) aus dissoziierten Primärkulturen geringer Dichte. Die Zahl unter dem blauen Balken gibt den Maßstab der jeweiligen Abbildung in μm an. A) Axonale Färbung mit Synapsin. In Wachstumskegeln tritt deutliche Immunreaktivität für Synapsin (grüner Kanal) ebenso wie für Rhotekin 2 (roter Kanal) auf. In der Überlagerung spiegelt sich die resultierende Colokalisation der beiden Proteine in verschiedenen gelb erscheinenden Wachstumskegeln wider (blaue Pfeile). B) Ausschnittsvergrößerung aus A). Rhotekin 2 (RTKN) tritt gehäuft in Wachstumskegeln auf und colokalisiert dort teilweise mit Synapsin. Eine solche Colokalisation ist außerdem in den Spitzen der Filopodien (Punkte, blauer Pfeil) zu erkennen.

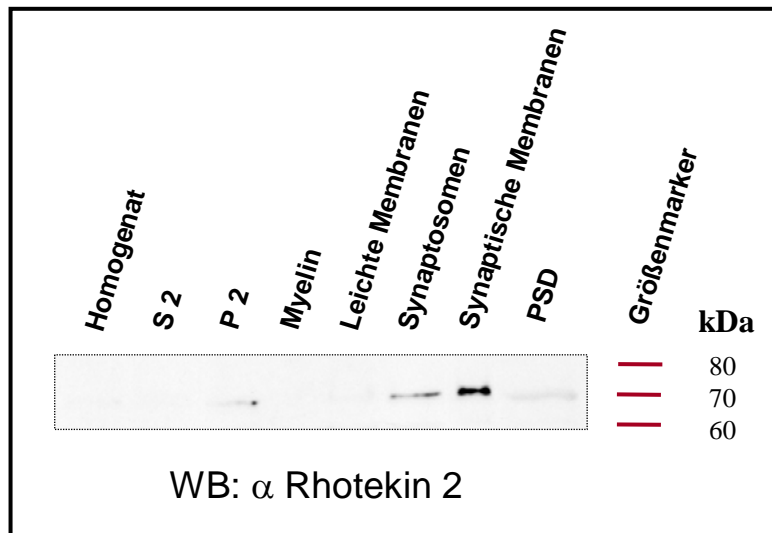


Abbildung 20: Rhotekin 2 ist an synaptischen Membranen angereichert

Gezeigt ist ein mit α Rhotekin 2 gefärbter Western-Blot mit Proben aus einer Zellfraktionierung und Präparation der postsynaptischen Dichte (PSD) aus Rattengehirnhomogenat. Dabei entspricht S2 dem Überstand 2 mit Mikrosomen und Cytosol, während P2 das Pellet 2 mit einer groben Membranfraktion repräsentiert. Es ist eine starke Anreicherung des Proteins zu synaptischen Membranen hin festzustellen, daneben wird das Protein aber auch in der PSD-Fraktion detektiert.

3.3.5 Rhotekin 2 ist ein integrales Membranprotein

Um die Membranassoziation, die in der Zellfraktionierungsanalyse deutlich hervor trat, näher zu charakterisieren, wurde ein Solubilisationsessay mit unterschiedlichen Detergenzien und Ionenstärken sowie einer pH-Wert-Erhöhung durchgeführt (Abbildung 21). Eine gute Extraktion aus der Membranfraktion P2 gelingt dabei mit der auf Steroidgerüsten (hydrophober Teil) und zwitterionischen Gruppen (hydrophiler Teil) basierenden Seife Chaps, deutlich schlechter hingegen gelingt sie mit der ionischen Seife SDS und der nichtionischen Seife Octylglucosid, während kaum eine Solubilisierung des Proteins mit Triton oder mit Chaps in Kombination mit einer hohen Salzkonzentration zu beobachten ist. Keinerlei Extraktion des Proteins ist durch denaturierende Bedingungen (Urea), chaotropische Reagenzien (KSCN), hohe Salzkonzentrationen oder eine pH-Wert-Erhöhung

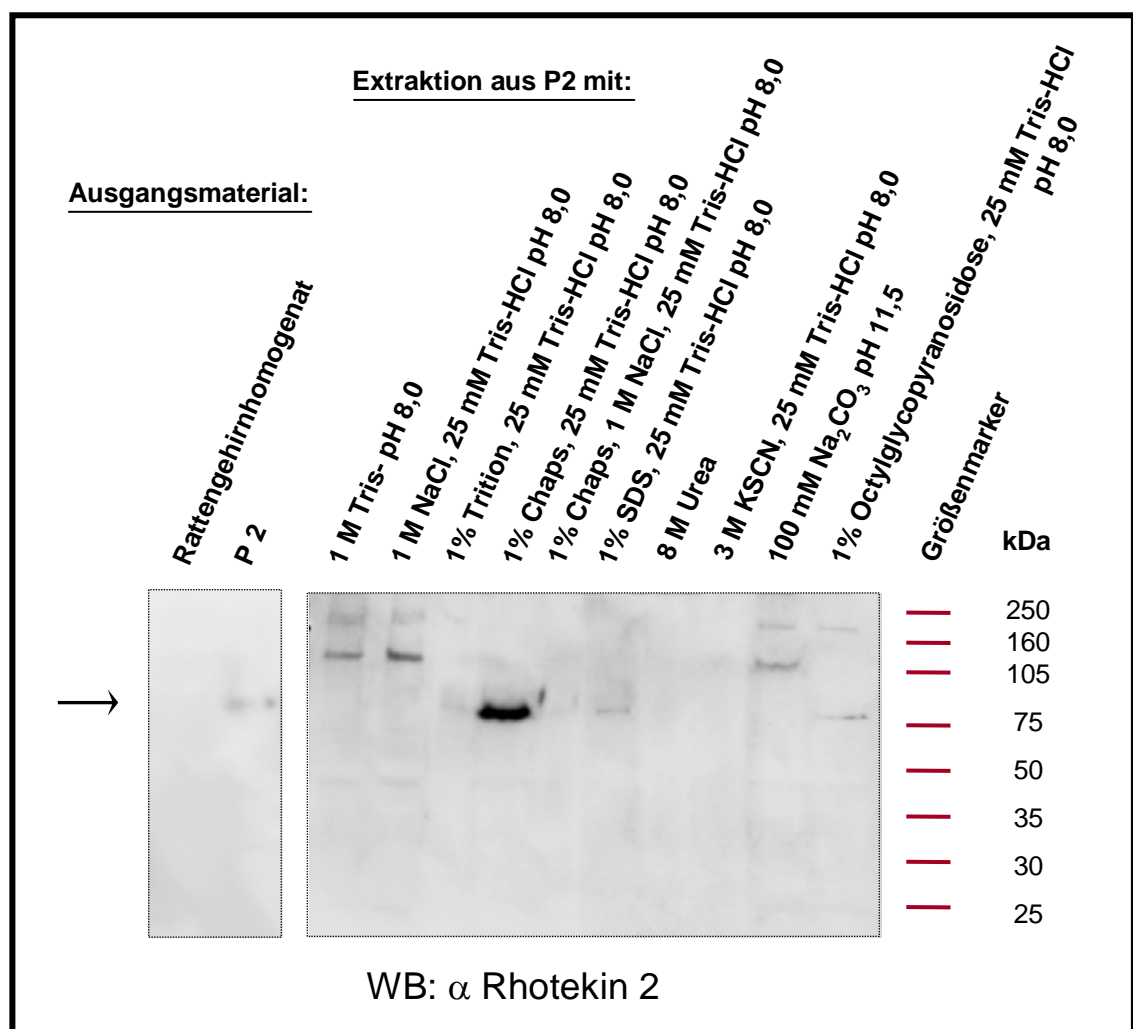


Abbildung 21: Rhotekin 2 ist membranintegriert

Die Abbildung zeigt die Western-Blot-Analyse der Extrakte des Membranaffinitätsexperiments mit anschließender αRhotekin-2-Markierung. Die verwendeten Solubilisationslösungen sind vollständig angegeben. Aufgetragen sind jeweils 15 µl Probe. Der Pfeil verweist auf die erwartete Molekulargewichtsgröße von Rhotekin-2-Monomeren. Eine Extraktion von Rhotekin 2 gelingt mit Seifen wie Chaps und Octylglycopyranosidose oder SDS.

festzustellen. Da alkalische Lösungen typischerweise periphere Membranproteine solubilisieren, scheint es sich bei Rhotekin 2 nicht um ein solches zu handeln. Die insbesondere bei Behandlung mit der zwitterionischen Seife Chaps beobachtete, starke Anreicherung der Immunreaktivität in dem Extrakt deutet vielmehr auf ein integrales Membranprotein hin.

Bemerkenswerterweise treten bei der Solubilisation mit hoher Salzkonzentration und hohem pH-Wert zusätzlich Banden in der etwaigen Größe eines Dimers auf. Wie bereits dargelegt, ist eine Dimerisierung der Rhotekine möglich (Shimizu *et al.* 2003). Ferner ist eine Verankerung der HR-Domäne durch ihre α -helikale Struktur (45% hydrophobe, unpolare Aminosäuren) in der Membran denkbar. Dadurch könnte Rhotekin 2 als Monomer über die HR-Domäne in die Membran integriert sein, andererseits aber im Dimerzustand, wenn diese Domäne nicht mehr direkt für eine Wechselwirkung mit Membranlipiden zur Verfügung steht, nur noch eine periphere Bindung, etwa durch die PH-Domäne, aufweisen.

3.3.6 Hinweise auf die *in-vivo*-Relevanz der Interaktion

Der erste Hinweis auf eine Bedeutung der Interaktion auch unter *in-vivo*-Bedingungen kommt aus der vergleichenden Analyse der Gewebeverteilung von Rhotekin 2 (Abbildung 22) und Syndapinen. Rhotekin 2 ist wie Syndapin I und II im Gehirn (Abbildung 18 I) exprimiert. Daneben tritt es noch im Testis und schwach im Lungenhomogenat auf, wo die beiden Splicevarianten von Syndapin II ebenfalls vorkommen (Qualmann *et al.*, 1999, Qualmann & Kelly, 2000; Modregger *et al.*, 2000). Damit ist eine Interaktion zwischen Rhotekin 2 und Syndapinen in diesen Geweben möglich.

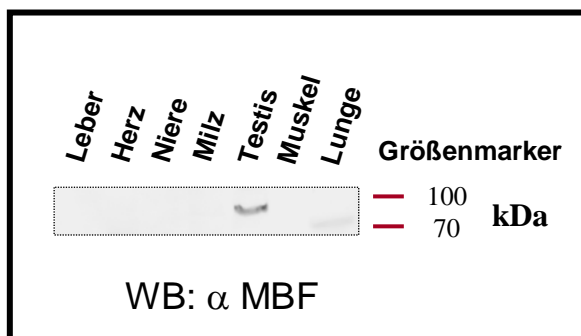


Abbildung 22: Expressionsanalyse

Dargestellt ist ein Western-Blot-Streifen verschiedener Gewebekomponenten. Die Visualisierung fand durch eine Immunfärbung mit α Rhotekin 2 statt. Es sind von jedem Gewebe 30 μ g Proteinmaterial aufgetragen. Dabei zeigt sich nur in Testis eine klare Expression Rhotekin 2s. Eine schwache Bande kann außerdem im Lungenhomogenat detektiert werden.

Vor diesem Hintergrund wurde der Frage nachgegangen, mit welchen der im Gehirn exprimierten Syndapin-Isoformen Rhotekin 2 interagiert. Hierzu wurde eine Präzipitations-Analyse mit immobilisiertem GST-RTKN-CT aus Rattengehirncytosol (Abbildung 23 A & B) durchgeführt. In den Eluaten zeigt sich sowohl eine spezifische Präzipitation von endogenem Syndapin I als auch von endogenem Syndapin II durch das rekombinante Rhotekin 2. Die beiden durch die α Syndapin-II-Färbung detektierten Banden entsprechen wahrscheinlich den Splicevarianten von

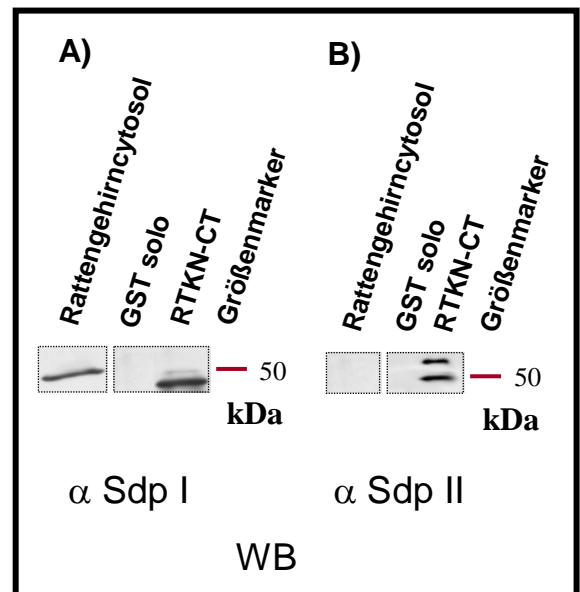
Syndapin II (55 bzw. 60 kDa). Dies spricht für eine Interaktion zwischen Rhotekin 2 und den Syndapinen I, II k und II l auch unter kompetitiven Reaktionsbedingungen.

Abbildung 23:
Rhotekin 2 präzipitiert endogenes Syndapin I und II aus dem Rattengehirncytosol

Es sind Western-Blot-Streifen der Eluate einer Präzipitations-Analyse mit GST-fusioniertem Rhotekin 2 (AS 457-601; RTKN-CT) und Rattengehirncytosol gezeigt. Zur Kontrolle wurden 20 µg Rattengehirncytosol aufgetragen.

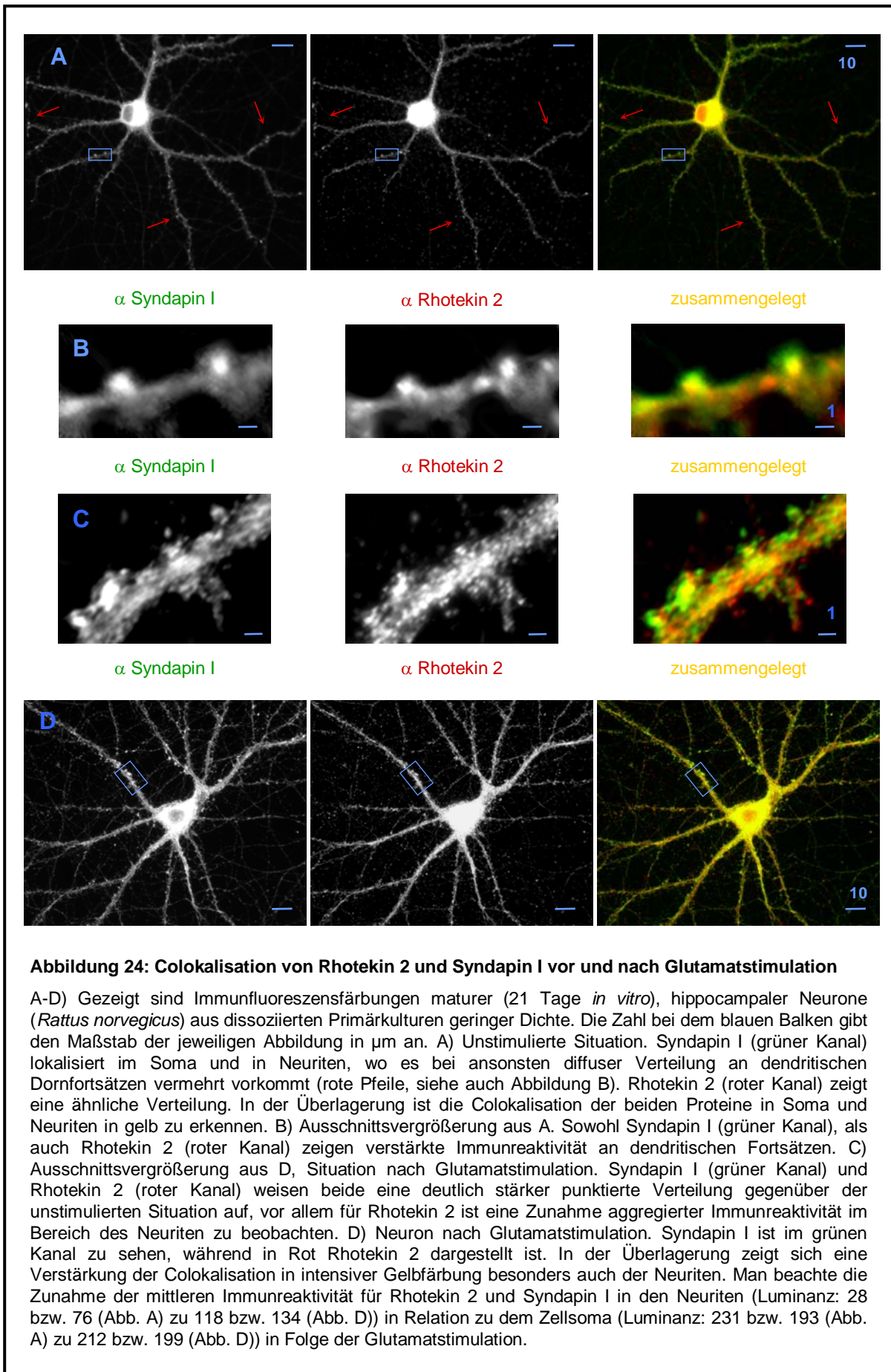
A) αSyndapin I - Färbung.
 B) αSyndapin II - Färbung.

Zu erkennen ist eine spezifische Präzipitation der beiden Syndapin-Isoformen in den Eluat (RTKN-CT). Dabei könnten die in B) zu sehenden Banden Syndapin II l und Syndapin II k entsprechen.



Um die Colokalisation und damit die Möglichkeit der Interaktion der beiden Proteine *in-vivo* zu überprüfen, wurde eine Doppelfärbung primärer, hippocampaler Neurone für Syndapin I und Rhotekin 2 durchgeführt (Abbildung 24). Die Ergebnisse zeigen hierbei eine deutliche Übereinstimmung der Fluoreszenzsignale besonders in Neuriten auf, wobei eine Konzentration der Immunreaktivität sowohl für Syndapin I als auch für Rhotekin 2 in dendritischen Fortsätzen beobachtet werden kann (Abbildung 24 A & B). Dies ist konsistent mit der unter Überexpression rekombinanten Rhotekins bemerkten Lokalisation des Proteins in dendritischen Dornfortsätzen (Abbildung 18 II B) und der biochemischen Analyse der subzellulären Verteilung, welche Rhotekin 2 an synaptischen Membranen und in der PSD nachweist (Abbildung 19). Diese Colokalisation der beiden Proteine *in vivo* zeigt, daß die Möglichkeit einer Interaktion im zellulären Kontext ebenfalls gegeben ist.

Bemerkenswerterweise deuten Stimulationsexperimente mit Glutamat oder KCl auf eine Zunahme der neuritischen Lokalisation und damit der Colokalisation von Syndapin I und Rhotekin 2 nach Erregung der Neurone hin (Abbildung 24 A & B vs. C & D). Die in Bild B zu sehende Konzentration der Proteine in Dornfortsätzen tritt dabei gegenüber der Färbung des Dendriten selbst in den Hintergrund. Um diesen optischen Befund zu stützen, wurde die mittlere Immunfluoreszenzintensität der Dendriten und als Referenz die des Zellsomas für Syndapin I und für Rhotekin 2 gemessen. Daraus ergibt sich für Syndapin I eine Zunahme der Luminanz von durchschnittlich +58 und für Rhotekin 2 von +90 in den Dendriten, während die Differenz für das Soma +6 bzw. -19 beträgt. Damit legen diese Ergebnisse eine funktionelle Bedeutung der Interaktion im Zusammenhang mit synaptischen Membranprozessen in Folge einer Glutamatstimulation nahe.



3.3.7 Rhotekin 2 kann in den Zellkern translozieren

Die unter Stimulation beobachteten Veränderungen in der Lokalisation von Rhotekin 2 einerseits und die in den Immunfluoreszenzfärbungen festgestellten Unterschiede in der Kernlokalisierung von Rhotekin 2 andererseits deuten auf eine Translokation des Proteins zwischen Kern und Soma der Zellen hin. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Stimulations- und Inhibitionsexperimente mit primären, hippocampalen Neuronen durchgeführt und anschließend die Verteilung von Rhotekin 2 analysiert (Abbildung 25).

Es zeigt sich, daß bezüglich der Kernlokalisierung ein hoch signifikanter Unterschied zwischen Stimulations- und Inhibitionsverhältnissen besteht: Während Rhotekin 2 unter Inhibitionsbedingungen vorwiegend im Zellkern detektiert werden kann, ist die Immunreaktivität für dieses Protein unter Glutamatstimulation im Soma angereichert. Die Kontrolle durch Depolarisation der Neurone mittels KCl zeigt hierbei den gleichen Effekt an, doch ist dieser im Vergleich zu Glutamat nochmals signifikant erhöht. Bei den Inhibitionen ist kein Unterschied zwischen dem AMPAR-Inhibitor CNQX und einer Kombination aus diesem mit dem NMDAR-Inhibitor APV festzustellen. Dies deutet auf ein AMPA-Rezeptor-abhängiges Translozieren von Rhotekin 2 zwischen Zellkern und Soma hin.

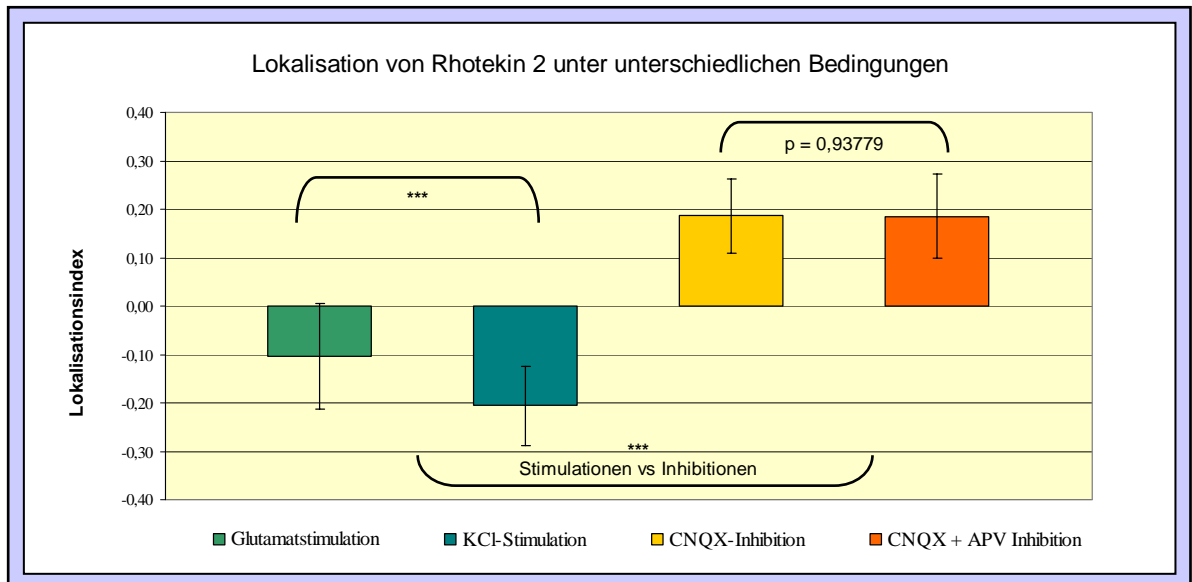


Abbildung 25: Einfluß von Stimulation und Inhibition primärer, hippocampaler Neurone auf die Kernlokalisierung von Rhotekin 2

Die Abbildung veranschaulicht die Ergebnisse aus den Stimulations- und Inhibitionsexperimenten mit primären, hippocampalen Neuronen aus dissoziierten Kulturen geringer Dichte des Tags 20 bzw. 21 *in vitro*. Die verwendeten Bedingungen sind in der Legende angegeben. Der Lokalisationsindex beschreibt die Verteilung zwischen Kern und Soma als Durchschnitt aus den Einzelsummen der Lokalisationen geteilt durch die betreffende Anzahl der Neurone des jeweiligen Deckgläschens. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall dar. Alle Vergleiche resultieren in statistisch hoch signifikanten (***, $p < 0,001$) oder quasi identischen ($p \approx 1$) Ergebnissen.

3.4 Syndapin und Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs)

3.4.1 Die Mikrotubuli-assoziierten Proteine 1a und 2

3.4.1.1 Belege für eine Interaktion

In Screen 8 wurde ein Klon (Nr. 398) gefunden, welcher für die Aminosäuren 2534 bis 2732 von MAP 1a (*Rattus norvegicus*) kodiert. Diese Interaktion konnte in einer Copräzipitationsprüfung mit in HEK-Zellen überexprimierten GFP-Fusionsproteinen des Kandidaten 389 und GST-Syndapin I als Bindungspartner unabhängig verifiziert werden (Abbildung 26 A): Es ist eine spezifische Überführung des angebotenen Proteinmaterials aus dem Lysat in das Eluat zu erkennen. Zur weiteren Analyse der Interaktion von Syndapin I und nativem MAP 1a wurde erneut ein Copräzipitationsexperiment durchgeführt, in dem die Bindung endogener Proteine aus dem Rattengehirncytosol an Syndapin I getestet wurde (Abbildung 26 B). Im Vergleich zu der Negativkontrolle ist eine deutliche Konzentration der Immunreaktivität für MAP 1a durch das Syndapin-I-Konstrukt in dem betreffenden Eluat zu erkennen. Dieser Befund bestätigt somit die Interaktion von Syndapin I und endogenem MAP 1a.

In Neuronen, die sowohl Syndapin I als auch Syndapin II exprimieren, findet sich mit MAP 2 eine weitere Isoform der Mikrotubuli-assoziierten Proteine. Daher wurde in einer Copräzipitationsprüfung untersucht, ob auch endogenes MAP 2 mit diesen Syndapin-Isoformen interagieren kann (Abbildung 27). So stellt sich heraus, daß MAP 2 spezifisch sowohl durch die SH3-Domäne von Syndapin I als auch durch diejenige von Syndapin II copräzipitiert wird, während die Interaktion durch eine Mutation der Domäne unterbunden wird. Damit ist die SH3-Domäne Syndapins notwendig und hinreichend für die Bindung von MAP 2. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Sequenzanalyse von MAP 2, welche an der Position 256 bzw. 462

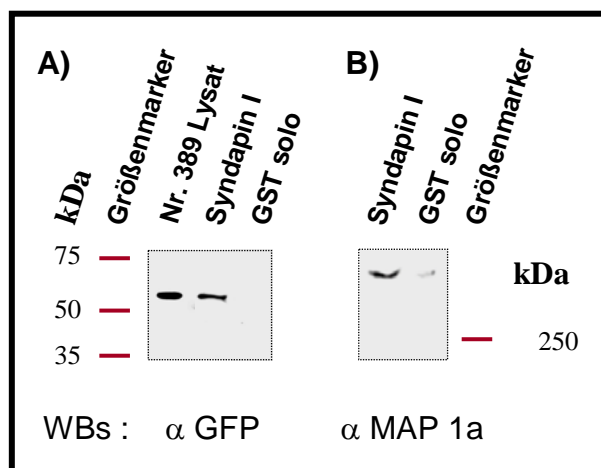


Abbildung 26: Syndapin I bindet MAP 1a

Dargestellt sind Western-Blots zweier Copräzipitationen mit immobilisiertem GST-Syndapin I und überexprimierten GFP-Fusionsproteinen des Klons Nr. 389 bzw. endogenem Proteinmaterial aus Rattengehirncytosol. Als Negativkontrolle dient jeweils GST solo.

A) Copräzipitation von GFP-389 und Syndapin I. Die Visualisierung der Proteinbanden aus Lysat und Eluat erfolgte durch eine α GFP-Immunfärbung

B) Copräzipitation von endogenem MAP 1a und Syndapin I. Durch eine Immunfärbung für MAP 1a werden die Proteinbanden der Eluate sichtbar.

Die beiden Experimente zeigen eine spezifische Präzipitation von sowohl rekombinantem als auch von endogenem MAP 1a durch Syndapin I.

der Aminosäuresequenz mit den Konsensussequenzen **KEPPTPK** bzw. **KPPKPA** je ein typisches, inverses Interaktionsmotiv für eine Bindung an die SH3-Domäne Syndapins aufzeigt (Abbildung 16). Mit den Sequenzen **RPSPPR** (Position AS 2544) und **RAKPASARR** (Position AS 2583) finden sich solche Motive auch in dem durch den Klon Nr. 389 kodierten MAP 1a – Fragment, doch sind die Motive zwischen MAP 1a und MAP 2 nicht konserviert. Dies könnte auf eine differenzielle Interaktion zwischen Syndapinen und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen *in vivo* hindeuten.

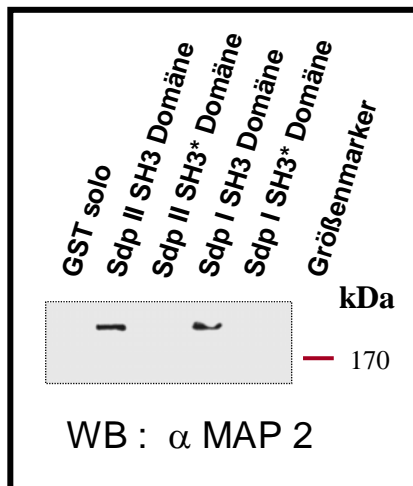


Abbildung 27: Die Bindung von MAP 2 an Syndapin ist SH3-Domänen-vermittelt

Die Abbildung zeigt einen α MAP 2 gefärbten Western-Blot der Eluate einer Copräzipitationsanalyse mit den SH3-Domänen von Syndapin I und II bzw. ihren mutierten Formen, welche als GST-Fusionsproteine eingesetzt wurden. Als Kontrolle ist GST solo gezeigt. Zu erkennen ist eine spezifische Bindung von MAP 2 durch die beiden Syndapine.

3.4.1.2 Hinweise auf die Bedeutung der Interaktion *in-vivo*

Ein Hinweis auf die *in-vivo*-Relevanz der Interaktion von Syndapin I und MAP 2 resultiert aus der subzellulären Verteilung der beiden Proteine (Abbildungen 28 & 29): Beide treten in gleichen Kompartimenten auf, so findet sich eine starke Immunreaktivität sowohl für Syndapin I als auch für MAP 2 in cytosolischen Fraktionen oder der Fraktion der Synaptischen Membranen. Daneben weisen beide Proteine übereinstimmend keine Anreicherung zu der PSD hin auf, wenn auch eine schwache Immunreaktivität in dieser Fraktion für Syndapin I und MAP 2 feststellbar ist.

Ein vergleichbares Bild ergibt sich für Syndapin II 1 (Abbildung 30). Es kann gleichermaßen in allen untersuchten Fraktionen der PSD-Präparation detektiert werden, so auch in der cytosolischen Fraktion, in der der Synaptischen Membranen und in der PSD-Fraktion. Damit erscheint Syndapin II ebenfalls in Kompartimenten, in welchen MAP 2 nachgewiesen werden kann. Somit ist die in der Copräzipitation von MAP 2 und der SH3-Domäne von Syndapin II gezeigte Interaktion der beiden Proteine im Hinblick auf ihre subzelluläre Verteilung *in vivo* gleichfalls möglich.

Ein weiterer Beleg für die *in-vivo*-Relevanz der Interaktion der beiden Proteine ergibt sich aus einer Colokalisationsanalyse in maturen hippocampalen Neuronen (Abbildung 31). Hier kann Syndapin I nicht nur im Soma der Zelle, sondern auch in

Abbildung 28:
Subzelluläre Verteilung von Syndapin I

Die Darstellung zeigt einen Western-Blot mit jeweils 40 µg Proteinmaterial aus einer PSD-Präparation. Bei den gezeigten Ausschnitten handelt es sich um zwei verschiedene lange Expositionen (1 Minute (Homogenat – Synaptische Membranen) bzw. 60 Minuten (PSD)). Die Färbung der Proteinbanden erfolgte durch αSyndapin-I-Antikörper. Es ist zu erkennen, daß Syndapin I in allen Fraktionen nachgewiesen werden kann.

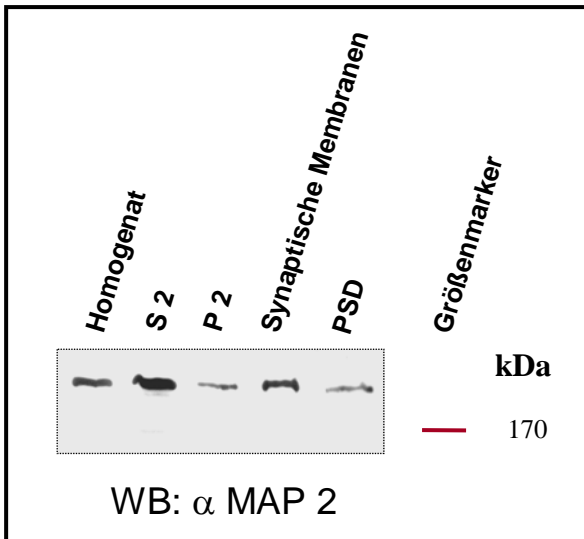
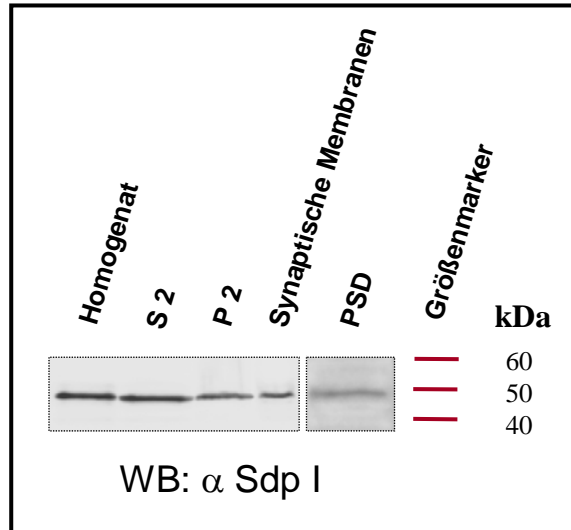
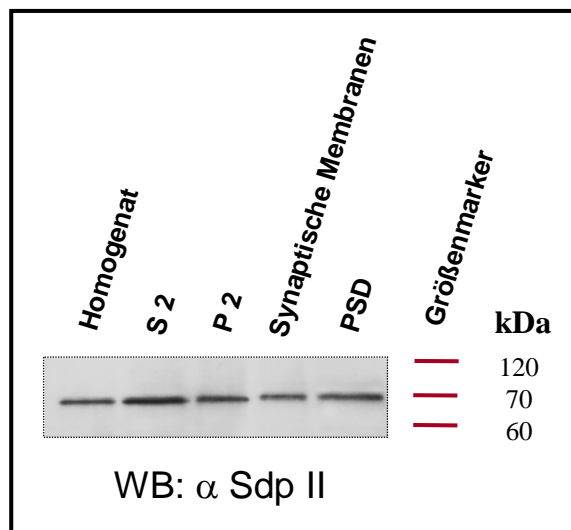


Abbildung 29:
Subzelluläre Verteilung von MAP 2

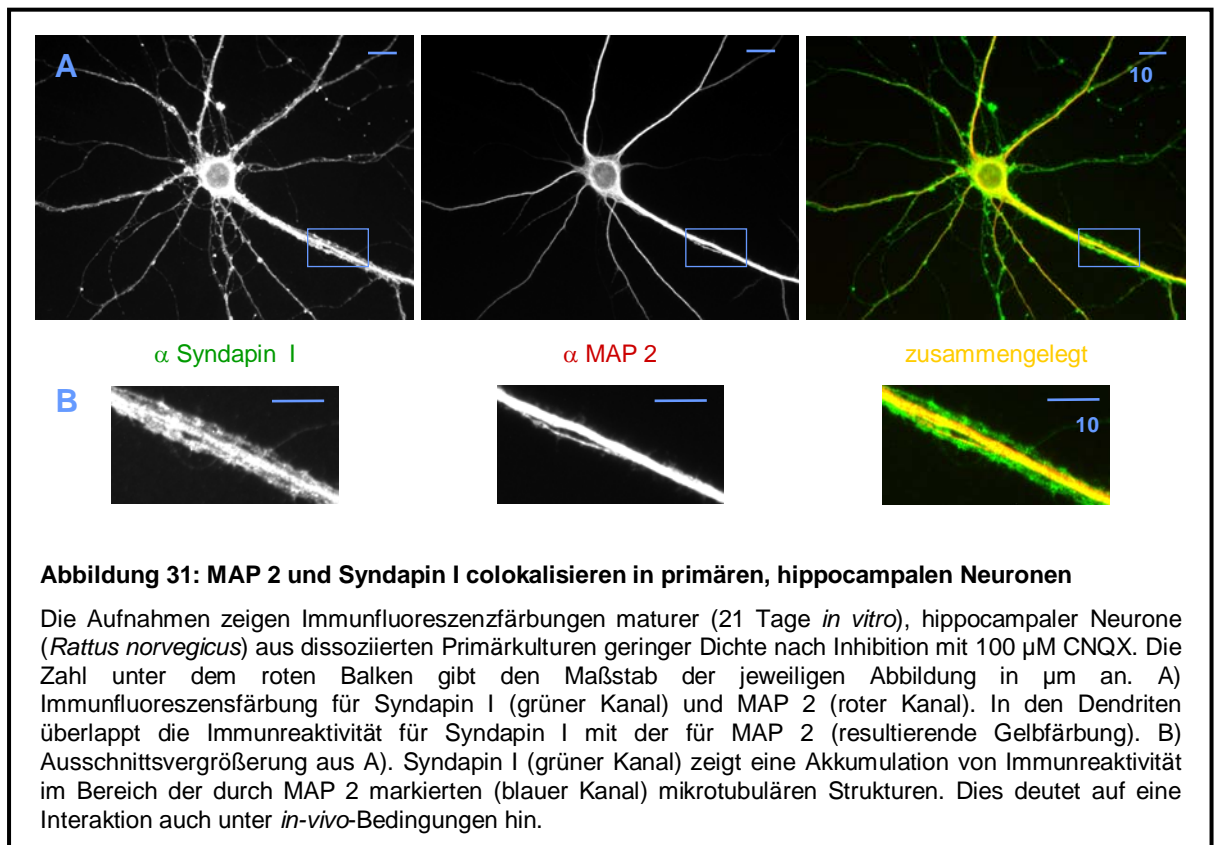
Gezeigt ist ein Western-Blot verschiedener Proben (40 µg Protein je Bahn) aus einer PSD-Präparation und einer Kernpräparation. Die Visualisierung erfolgte durch eine αMAP2-Immunfärbung. Deutliche Immunreaktivität tritt vor allem in der cytosolischen Fraktion, aber auch in der synaptischen Membranfraktion auf.

Abbildung 30:
Subzelluläre Verteilung von Syndapin II

Die Abbildung zeigt einen Western-Blot mit jeweils 40 µg Proteinmaterial aus einer PSD-Präparation. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte durch αSyndapin-II-Antikörper. Es ist zu erkennen, daß Syndapin II in allen Fraktionen gleichermaßen detektiert werden kann.



Neuriten klar detektiert werden. Zudem zeigt sich eine deutliche Anreicherung der Immunreaktivität für Syndapin I an mikrotubulären Strukturen, welche durch MAP 2 markiert wurden. Dies ist konsistent mit einer Interaktion der beiden Proteine *in-vivo* in Dendriten. Interessanterweise entstand dieses Bild, welches im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine besonders ausgeprägte Colokalisation der beiden Proteine zeigt, nach einer zehnmütigen Inhibition der Neuronenkultur mit 100 μ M CNQX, ein Umstand, der auf einen funktionellen Aspekt der Interaktion von Syndapin I und MAP 2 im Zusammenhang mit der Signalübertragung hindeuten könnte.



3.4.2 MAP 1s: Ein neues, murines Mikrotubuli-assoziiertes Protein

3.4.2.1 Interaktionsdomänen und Struktur des murinen Proteins MAP 1s

In dem Screen 8 wurde ein Klon (Nr. 435) gefunden, welcher für den C-terminalen Teil eines murinen Proteins kodiert, das unter der Nummer GI: 27370520 in öffentlichen Datenbanken zugänglich ist. Es handelt sich dabei um ein Protein, welches unter unterschiedlichen Namen (BPY2 *interacting protein* 1 (Lau & Zhang, 2000) oder C19ORF5 (Liu & McKeehan, 2002) oder VCY2iP1 (VCY2 (*variable charge*, Y

chromosome 2) interacting protein 1 (Wong *et al.*, 2004)) in Mammalia angesprochen wird und dessen humanes Ortholog (64% Identität) auch als MAP 1s publiziert ist (Orban-Nemeth *et al.*, 2005). Da dieses Protein strukturell und biochemisch als Mikrotubuli-assoziiert charakterisiert ist (Orban-Nemeth *et al.*, 2005), wird auch das murine Ortholog im Folgenden als MAP 1s bezeichnet. Das Molekulargewicht jenes Proteins beträgt 120 kDa. In Abhängigkeit des exprimierenden Gewebes kann MAP 1s außerdem spezifisch in eine schwere (AS 1 – 754) und eine leichte Kette (AS 755 – 973) gespalten werden, wobei die leichte Kette Mikrotubuli stabilisieren und außerdem Aktin binden kann, während die schwere Kette als regulatorisches Element in dem betreffenden Proteinkomplex beschrieben wird (Orban-Nemeth *et al.*, 2005). Der Klon Nr. 435 selbst enthält ein Insert von 1200 bp, der sequenzierte Bereich umfaßt dabei ein offenes Leseraster von 241 Aminosäuren, welche den Aminosäuren 733 bis 973 des in der Datenbank publizierten Proteins entsprechen.

Für das Protein selbst sind verschiedene Strukturen vorhergesagt, so etwa eine ausgedehnte Prolin-reiche Domäne im Bereich der Aminosäuren 536 bis 837. Darüber hinaus enthält der durch den Klon Nr. 435 kodierte Teil des murinen Proteins an der Position 774 bis 780 ein Kernlokalisierungssignal bestehend aus den 7 Residuen **PSRSRKA**, in denen der unterstrichene Teil das für jenes Signal charakteristische, basische Segment bildet, welches entsprechend innerhalb von 3 Aminosäuren nach dem Prolin einsetzt. Ferner beinhaltet das Protein mehrere Motive, die als Konsensussequenz für eine Interaktion mit der SH3-Domäne Syndapins in Betracht kommen (vergleiche Abbildung 16). Dazu gehören die Sequenzen **RPPAP** an Position 564 und **HRKPTPP** an Position 679 der Aminosäuresequenz. Auf den in dem Hefe-zwei-Hybrid Screen gefundenen Teil des Moleküls entfallen ebenfalls mehrere PxxP-Motive, so folgen mit der Sequenz **RDPPPTPRVPPPLP** zwei inverse Muster an der Position 737 der Aminosäuresequenz und ein weiteres solches Motiv folgt mit der Sequenz **RSRKAPARP** unmittelbar nach dem Kernlokalisierungssignal an der Position 780. An der Position 830 tritt mit der Sequenz **RKPSVPK** ebenfalls ein potentiell Bindungsmotiv für die SH3-Domäne Syndapins auf. Das inverse Interaktionsmuster an der Position 744 ist jedoch das einzige, welches zwischen Maus und Mensch konserviert ist, lediglich die positive Ladung tragende Aminosäure Arginin ist in der humanen Sequenz gegen die ebenfalls positiv geladene Aminosäure Lysin ausgetauscht.

3.4.2.2 MAP 1s interagiert mit der SH3-Domäne Syndapins

Mittels Copräzipitationsprüfungen mit überexprimierten GFP-435-Fusionsproteinen wurde eine Analyse der Bindungsregion für MAP 1s auf Syndapin vorgenommen (Abbildung 32). Die deutliche Präzipitation des GFP-435-Fusionsproteins durch immobilisiertes Syndapin I bestätigt die durch das Hefe-zwei-Hybrid-System ermittelte Interaktion. Da für MAP 1s eine ubiquitäre Expression beschrieben ist (Orban-Nemeth *et al.*, 2005), wurde im Folgenden untersucht, ob auch die

gleichfalls ubiquitär exprimierte Syndapin-II-Isoform mit MAP 1s assoziieren kann. Abbildung 32 zeigt, daß der C-Terminus von MAP 1s durch GST-Fusionsproteine von Syndapin II effizient copräzipitiert wird.

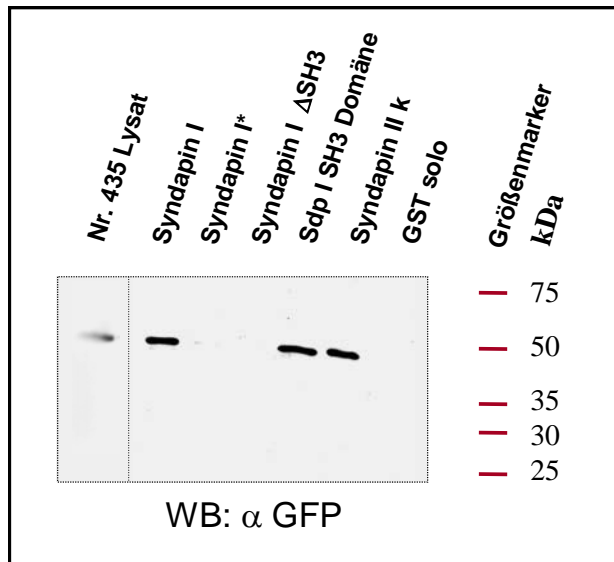


Abbildung 32:
Analyse der Bindungsdomäne auf Syndapinen für das murine MAP 1s

Der Western Blot zeigt eine Probe des HEK-Zellysats (1. Proteinbahn) mit dem überexprimierten GFP-435-Fusionsprotein sowie die Eluate nach Copräzipitation an immobilisierten GST-Syndapin-I-Fusions-proteinen bzw. an GST solo als Negativkontrolle. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch eine Immunfärbung mit α GFP. Alle Fusionsproteine mit einer intakten SH3-Domäne zeigen eine starke Präzipitation der Immunreaktivität aus dem Lysat in die entsprechenden Eluate. Die beiden eingesetzten Syndapin-Isoformen I und II kurz zeigen beide eine starke Assoziation mit dem rekombinanten Kandidaten Nr.435.

Auf Grund der Sequenzanalyse des murinen Proteins MAP 1s, welche im Bereich des gefundenen Proteinfragments zwei Interaktionsmotive für eine SH3-Domänen vermittelte Bindung an Syndapine ergeben hatte, steht darüber hinaus eine Abhängigkeit der Präzipitation von dieser Domäne zu erwarten. Tatsächlich zeigt sich in Konsistenz mit dieser Hypothese keine Präzipitation des rekombinanten Materials durch das mutante Syndapin I (Syndapin I*) oder das Syndapin Δ SH3 – Fusionsprotein, während die SH3 Domäne von Syndapin I eine deutliche Konzentration der Immunreaktivität in den Eluaten bewirkt. In Einklang mit der hohen Homologie der SH3-Domänen der unterschiedlichen Syndapin-Isoformen, ist keine Differenz in der Bindungsaffinität zu Syndapin I und II beobachtbar. Damit ist die SH3-Domäne Syndapins erforderlich und ausreichend zur Vermittlung der Bindung von MAP 1s. Dieses Ergebnis wird außerdem durch Analysen im Hefe-System, welche eine spezifische Bindung für Syndapin I (Blautest: +++++, Wachstumstest: +++++) und nicht für Syndapin I Δ SH3 (-) anzeigen, gestützt.

3.4.2.3 MAP 1s-Fusionsproteine reichern endogenes Syndapin I an

Um zu analysieren, ob auch endogenes Syndapin I mit dem C-Terminus von MAP 1s assoziieren kann, wurden rekombinante GST-Proteine des Kandidaten Nr. 435 für ein weiteres Präzipitationsexperiment eingesetzt, in dem die Bindung von endogenem Syndapin aus Rattengehirncytosol durch MAP 1s untersucht wurde (Abbildung 33). Es ist eine starke Immunreaktivität für Syndapin I in dem Eluat mit

rekombinatem MAP 1s zu erkennen, während in der Negativkontrolle mit GST-solo kein Syndapin I detektiert werden kann. Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, daß auch endogenes Syndapin spezifisch durch MAP 1s gebunden werden kann.

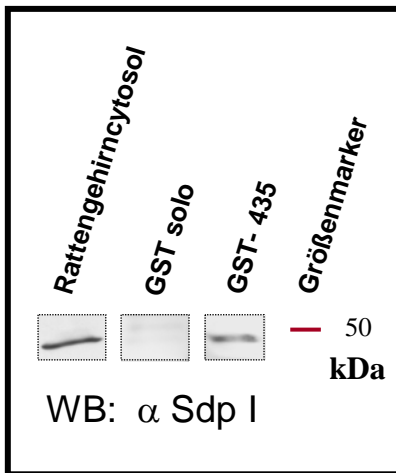


Abbildung 33: Copräzipitation von endogenem Syndapin I durch GST-Fusionsproteinen des C-Terminus von MAP 1s

Gezeigt sind Western-Blot-Streifen der Eluate einer Copräzipitationsprüfung mit Rattengehirncytosol und dem GST-fusioniertem C-Terminus von MAP 1s (Kandidat Nr. 435). Als Kontrolle ist das Eluat von GST solo dargestellt. Die Färbung wurde mit α Syndapin I durchgeführt. Es ist eine deutliche Copräzipitation von endogenem Syndapin I in dem Eluat des GST-435-Fusionsproteins zu erkennen.

3.5 Synbape – ein unbekanntes Protein mit 2 Kernlokalisationsignalen

3.5.1 Struktur und Motive des neuen Proteins Synbape

In dem Screen Nr. 8 wurden mit dem Syndapin I - Köderprotein insgesamt 6 unabhängige Klone eines Proteins gefunden, welches unter der Zugangsnummer gi:33416990 als potentielles Protein in den Datenbanken beschrieben ist (Abbildung 34 I). Da keiner dieser Klone den N-terminalen Teil des Proteins vollständig enthielt, wurde mit spezifischen Primern eine PCR-Reaktion auf einer Maus-cDNS Bibliothek durchgeführt, bei der ein 1110 bp umfassendes Fragment generiert werden konnte, dessen Sequenzierung allerdings in 2 Basenpaaren eine Abweichung von der Datenbanksequenz ergab. Da jedoch z.B. der EST-Klon gi:15575407 mit der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten cDNS-Sequenz in dem betreffenden Bereich übereinstimmt, beruht dieser Unterschied möglicherweise auf Sequenzierfehlern in dem Datenbankeintrag. Eine Abweichung auf Aminosäureebene ergibt sich aus den Sequenzierungsunterschieden nicht. Das Protein umfaßt insgesamt 369 Aminosäuren und hat dabei ein apparentes Molekulargewicht von ca. 47 kDa. Es erhielt den Namen Synbape (Syndapin bindendes Protein mit Anfang, Pest und Ende; Abkürzung: Ape).

Etablierte Interaktionsdomänen oder Sekundärstrukturen weist das Protein Synbape nicht auf. Lediglich für den mittleren Teil (AS 145-229) ist eine ausgedehnte PEST-Sequenz vorhergesagt (Abbildung 34 II). Entsprechend klassifiziert auch der errechnete Instabilitätsindex von 93,1 das Protein als instabil. Zudem fällt die Aminosäuresequenz durch einen mit 21,4% hohen Anteil an Prolinen auf.

I) Aminosäuresequenz des unbekannten Proteins Synbape

```

1    METLCPPRRLAVPASPRGSPCSPTPLKPRRGTPEFSPLCLRALAFCAAKPRPSSLGLGP    60
61    GELAPRTPVLLGPPASPCTGGWAADGLKHLGGQAGRPSDVSSPAREDADVAVCPGGGEEE    120
121   EGGGGFPHFGAGSCAPPGRCPAPLRPQDSPTNPAWSPRRPARGLDAASSPPLEPGSPPPS    180
181   PPAGLSPEPAPSEQVPASEAPGGGDPAPTAPAPALSPSTADAAPDPPRDRLRQEHFNRL    240
241   IRRSKLWCYAKGFALDTPSLRRGPERPAAKARGAAKRRRPAPPPSVQPRRPVPTLPTS    300
301   STFSLLDCFPCPPALVVEENGLGPASSLRLQGDAKPPPAHPLWKWQMGGPVPEPPGLK    360
361   SWWVNLEEL
    
```

II) Proteinstruktur und Hefe-zwei-Hybrid-Klone

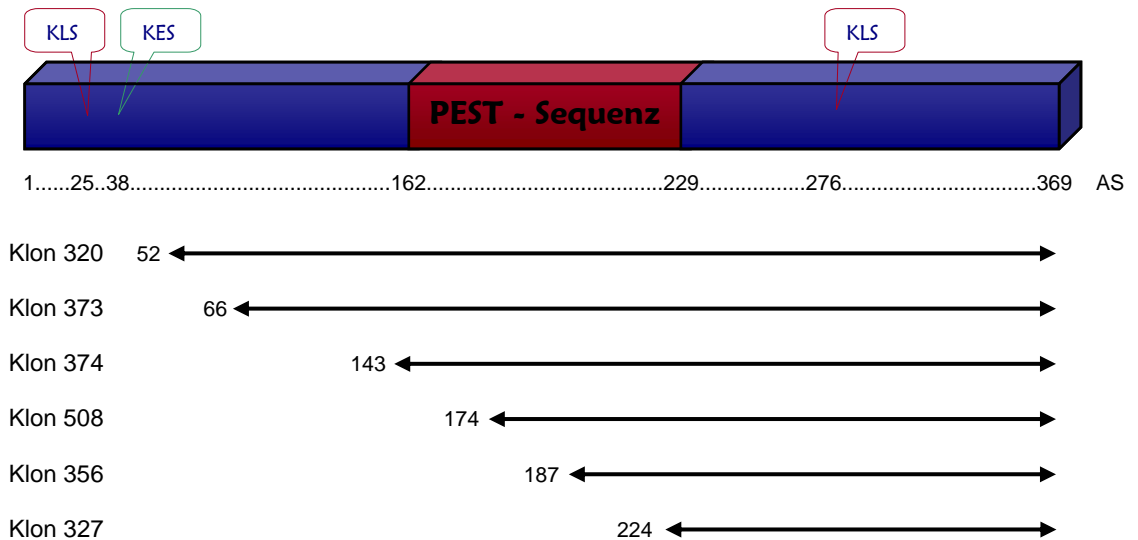


Abbildung 34: Strukturen und Motive des unbekannten Proteins Synbape

I) Aminosäuresequenz des unbekannten Proteins Synbape. Angegeben ist die vollständige Aminosäuresequenz des in der Datenbank veröffentlichten Proteins, wobei der Anfang der beiden Klone Nr. 320 (AS 47) und Nr. 327 (AS 224) schwarz unterstrichen dargestellt ist. In Rot gezeigt sind die beiden Kernlokalisationssignale und in Grün das Kernexportsignal. Das Motiv für eine Interaktion mit der SH3-Domäne Syndapins ist durch eine blaue Unterstreichung kenntlich gemacht. **II) Proteinstruktur und Hefe-zwei-Hybrid-Klone.** Die PEST-Sequenz ist in Rot dargestellt, ferner ist die Position der verschiedenen Signalsequenzen angegeben. Die Pfeile symbolisieren die in dem Hefe-Screen ermittelten Klone, welche für unterschiedliche Fragmente des Proteins Synbape kodieren. Die entsprechende Anfangsaminosäure ist angegeben.

Interessanterweise befinden sich darüber hinaus an der Position 25-30 und 276-280 je ein Kernlokalisationssignal, das erstere besteht dabei aus einem Prolin, welchem nach einer weiteren Aminosäure ein 4 Aminosäuren umfassendes, basisches Segment mit einem Lysin und zwei Argininen folgt. Das zweite Kernlokalisationssignal, welches hinter der PEST-Sequenz liegt, umfaßt ein basisches Segment aus 5 Residuen, an das sich unmittelbar ein Prolin anschließt, welches in 2 überlappende Konsensusmotive für eine Interaktion mit der SH3-Domäne Syndapins überleitet (s. a. Abbildung 16). Dabei stellt das Kernlokalisationssignal gleichzeitig die positive Ladung für eine solche, mögliche Interaktion. In Übereinstimmung mit

dem Auftreten dieser beiden Signalsequenzen weist die Lokalisationsvorhersage nach Reinhardt mit einer Zuverlässigkeit von 94,1% ebenfalls auf ein Vorkommen des Proteins im Nukleus hin. Ferner befindet sich im Bereich der Aminosäuren 38 bis 48 eine Konsensussequenz für den Kernexport, welche aus 3 Wiederholungen von durch 2-6 beliebige Aminosäuren getrennten Leucinen besteht (Konsensus: Lx₂₋₆Lx₂₋₃LxL), jedoch in umgekehrter Reihenfolge zu den bisher beschriebenen Kernexportsignalen (z.B. Xia *et al.*, 2003) auftritt (LxLx₂Lx₄L).

Verwandte Proteine konnten bisher nur in wenigen Mammalia, so im Menschen (*Homo sapiens*; gi:6102666, 74% Identität)¹ und in der Ratte (*Rattus norvegicus*, Genom: ref|NW_047338.1, 88% Identität)¹ ermittelt werden. In anderen Vertebraten, wie Vögeln (hier: *Gallus gallus*, Haushuhn), Fröschen (hier: *Xenopus laevis*) und Fischen (hier: *Fugu rubripes*), deren Genome ebenfalls intensiv analysiert werden, konnten hingegen ebensowenig ähnliche Proteine oder entsprechende genomische Sequenzen identifiziert werden wie in Insekten (hier: *Drosophila melanogaster*, Fruchtfliege) oder Nematoden (hier: *Caenorhabditis elegans*, Fadenwurm). Dies weist darauf hin, daß es sich bei Synbape um ein phylogenetisch junges Protein handelt, das beispielsweise in Insekten noch nicht existiert. In anderen als den genannten Säugetieren, wie z.B. Hauskatze (*Felis catus*), Haushund (*Canis familiaris*), Hausschaf (*Ovis aries*), Hausrind (*Bos taurus*) und Hausschwein (*Sus scrofa*) blieb die Suche ebenfalls erfolglos. Da jedoch bis jetzt noch nicht alle Genome der angeführten Spezies vollständig durchsequenziert sind, kann nicht ausgeschlossen werden, daß in Zukunft weitere Synbape-Homologe entdeckt werden.

3.5.2 Synbape interagiert mit der SH3-Domäne Syndapins über ein C-terminales PxxP-Motiv

Nachdem die Interaktion von Syndapin I und Kandidat Nr. 320 (AS 52-369) bzw. Nr. 327 (AS 224-369) durch Copräzipitationsanalysen verifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde die Bindung im Folgenden näher analysiert. Auf Grund der Analyse der Aminosäuresequenz des neuen Proteins Synbape, welche ein typisches Interaktionsmotiv für die SH3-Domäne Syndapins an der Aminosäureposition 281-286 ergeben hatte, stand zu erwarten, daß es sich dabei um eine durch die SH3-Domäne Syndapins vermittelte Interaktion handelt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden immobilisierte GST-Syndapin-Fusionsproteine für ein Copräzipitationsexperiment mit überexprimierten GFP-320-Fusionsproteinen eingesetzt (Abbildung 35 A).

Die Analysen zeigen, daß das rekombinante Protein des Klons Nr. 320 durch Syndapin I aus dem Lysat gebunden wird, diese Bindung jedoch durch eine Mutation der SH3-Domäne unterbunden wird. Ebensowenig ist das Syndapin-I-ΔSH3-Fusionsprotein in der Lage, das rekombinante Protein zu präzipitieren. Im Gegensatz dazu bewirkt die intakte SH3-Domäne von Syndapin I alleine eine Konzentration der Immunreaktivität für das GFP-320-Fusionsprotein in dem

entsprechenden Eluat. Somit ist die SH3-Domäne Syndapins hinreichend und erforderlich für eine Bindung des Klons Nr. 320. Da eine Mutation der SH3-Domäne sowohl im Gesamtproteinkontext als auch in der einzelnen Domäne ausreichend ist, die Assoziation der beiden Proteine gänzlich zu verhindern, handelt es sich bei der Interaktion um eine klassische SH3-Domänen-Bindung. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit weiteren, im Hefe-System durch Blautest und Wachstumstest gewonnenen Daten, welche eine spezifische Interaktion für beide angeführten Klone (Nr. 320 und Nr. 327) mit Syndapin I (Blautest: ++++ bzw. Wachstumstest: +++) anzeigen, nicht jedoch mit Syndapin Δ SH3 (beide -).

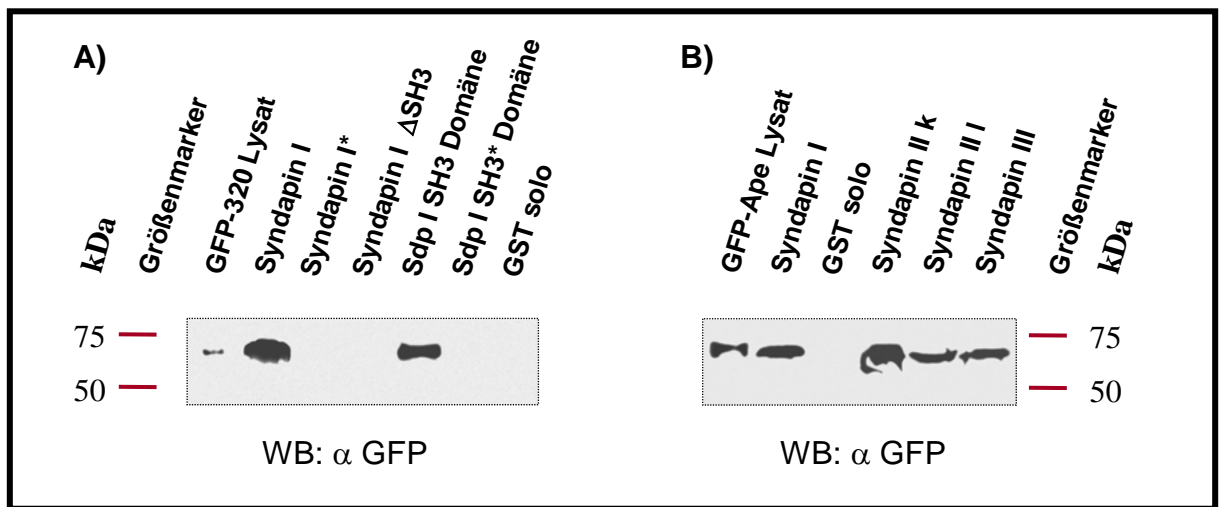


Abbildung 35: Synbape interagiert mit allen Syndapin-Isoformen und Splicevarianten und die Interaktion wird über die SH3-Domäne Syndapins vermittelt

Die Abbildung zeigt Western-Blots der HEK-Zellysate und der Eluate aus Copräzipitationsanalysen zur Eingrenzung der Interaktion von Syndapin und Synbape auf Syndapinen. Die Visualisierung erfolgte durch eine α GFP-Immunfärbung. Als Negativkontrolle dient GST solo. A) Copräzipitation von GFP-320- (AS 52-369) mit unterschiedlichen GST-Syndapin-I-Fusionsproteinen. Das rekombinante Synbape wird spezifisch durch alle Syndapin-I-Fusionsproteine, die eine intakte SH3-Domäne enthalten, präzipitiert. B) Copräzipitation von FL-Synbape und Syndapin-Isoformen. Es wurde ein GFP-Konstrukt des Gesamtproteins Synbape (GFP-APE) in HEK-Zellen überexprimiert und mit den entsprechenden GST- Syndapin-Fusionsproteinen inkubiert. Dabei ist eine spezifische Bindung aller untersuchten Syndapin-Isoformen und -Splicevarianten festzustellen.

Aus den bisherigen Ergebnissen ergeben sich zwei weitere Fragen: 1.) Ist die Interaktion mit Syndapin I auf C-terminale Fragmente des Proteins Synbape beschränkt oder hat sie auch im Gesamtproteinkontext Synbapes Bestand? 2.) Interagiert Synbape auch mit den anderen Syndapin-Isoformen, wie es die hohe Homologie der SH3-Domänen vermuten läßt? Um diese Fragen zu beantworten, wurde mit Hilfe einer cDNA-Bibliothek ein für das Gesamtprotein kodierendes Fragment amplifiziert, in den entsprechenden GFP-Vektor inkloniert, in HEK-Zellen überexprimiert und in einer Copräzipitationsprüfung mit GST-Fusionsproteinen der unterschiedlichen Syndapin-Isoformen und Splicevarianten eingesetzt (Abbildung 35 B). Es zeigt sich, daß rekombinantes GFP-Synbape auch im Gesamtproteinkontext durch Syndapin I spezifisch präzipitiert wird. Für die beiden

Splicevarianten von Syndapin II und für Syndapin III ist ebenfalls eine spezifische Copräzipitation von Synbape zu beobachten. Entsprechend der hohen Homologie der SH3-Domänen der verschiedenen Syndapin-Isoformen ist kein Unterschied in der Affinität der entsprechenden Fusionsproteine zu Synbape festzustellen.

Die im Hefe-zwei-Hybridsystem gefundenen Synbape-Klone deuten auf ein Bindungsmotiv für Syndapin im Bereich der letzten 145 Aminosäuren hin (vergleiche Abbildung 34). Mit der Verifizierung des Kandidaten Nr. 327 in einem Copräzipitationsassay wurde dieser Befund außerdem durch eine unabhängige Methode bestätigt. Im Hinblick auf die Struktur Synbapes, insbesondere die Lage der PEST-Sequenz im Bereich der Aminosäuren 162-230, wurden vier entsprechende Konstrukte angefertigt, von denen das letzte den durch den Klon 327 implizierten Bindungsbereich noch einmal unterteilt. Diese Konstrukte wurden als GFP-Fusionsproteine in HEK-Zellen überexprimiert und einer Copräzipitationsanalyse mit GST-Syndapin-I-Fusionsproteinen unterzogen (Abbildung 36).

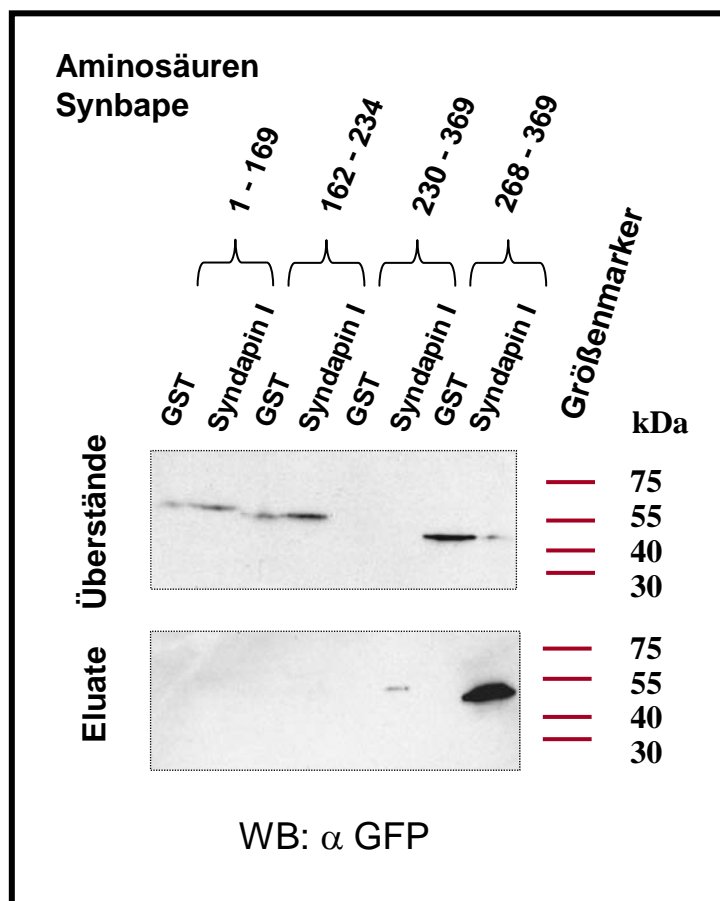


Abbildung 36: Das Bindungsmotiv für Syndapin ist im Bereich der C-terminalen 107 Aminosäuren Synbapes lokalisiert

Gezeigt sind Western-Blots mit Überständen und Eluaten einer Copräzipitationsanalyse. Hierzu wurden verschiedene Synbape-Konstrukte als GFP-Fusionsproteine in HEK-Zellen überexprimiert und auf ihre Anreicherung durch Syndapin I in Eluaten hin untersucht. Die Visualisierung erfolgte durch α GFP-Immunfärbung. Damit kann die Bindung von Syndapin an Synbape auf die C-terminalen 107 Aminosäuren Synbapes eingegrenzt werden.

Dabei stellt sich heraus, daß nur solche Fusionsproteine durch Syndapin I im Eluat konzentriert werden, welche die C-terminalen 107 Aminosäuren Synbapes

enthalten. Dies ist konsistent mit den zuvor angeführten Analysen im Hefe-zwei-Hybrid-System und der Verifizierung der Kandidaten. Hinweise auf ein weiteres Bindungsmotiv im N-Terminus gibt die Analyse hingegen nicht.

Der Vergleich der PxxP-Motive (Abbildung 16) zeigt für Synbape an der Position 281, und damit in der ermittelten Bindungsregion, zwei entsprechende und überlappende Konsensussequenzen mit einer ausgeprägten Akkumulation positiver Ladung, wie sie für keine andere in der betreffenden Interaktionsregion lokalisierte PxxP-Sequenz festzustellen ist. Im Gegensatz zu diesen enthält zumindest das 2. an jener Position befindliche, potentielle Interaktionsmotiv (Start: AS 283) außerdem das typischerweise vorangestellte Alanin (Position 282). Damit vereinigt dieses Motiv als einziges alle drei postulierten Bindungsmerkmale (positive Ladung, vorrausgehendes Alanin, zusätzliche(s) Prolin(e)) und ähnelt so z.B. stark den putativen Syndapin-Bindungsmotiven in N-WASP. Daher ist dieses Motiv, obgleich das Vorliegen einer weiteren Bindungsstelle für Syndapin im Bereich der letzten 107 Aminosäuren Synbapes auf Grund der derzeitigen experimentellen Datenlage nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Interaktion verantwortlich.

3.5.3 Die Interaktion von Syndapin und Synbape ist direkt

Um zu überprüfen, ob es sich bei der ermittelten Interaktion von Syndapin und Synbape um eine direkte Verbindung der beiden Moleküle handelt, wie es etwa durch die Interaktionsanalysen im Hefe-System und die Sequenzanalyse nahegelegt wird, wurde als unabhängige Methode ein Copräzipitations-Experiment (Abbildung 37) mit affinitätsgereinigten Fusionsproteinen durchgeführt. Hierzu wurden Syndapin I als GST- und Synbape als mit einer His-Markierung versehenes Fusionsprotein eingesetzt.

Das Experiment zeigt, daß das rekombinante Syndapin I in der Tat eine weitestgehende Überführung des angebotenen Synbape-Materials aus dem Überstand (vorvorletzter Blotstreifen) in das Eluat (letzter Blotstreifen) bewirkt, nicht aber das GST solo (vorletzter Blotstreifen). Die Kontrollexperimente mit der His-Markierung und GST-Syndapin-I-Fusionsproteinen zeigen ebenfalls keine Affinität dieser beiden Proteine an, His solo verbleibt im Überstand (zweiter Blotstreifen) und kann nicht im Eluat detektiert werden (vierter Blotstreifen). Daher ist eine durch die His- oder/und GST-Markierung verursachte Assoziation ausgeschlossen. Somit liegt eine spezifische und direkte Interaktion von Synbape und Syndapin I vor.

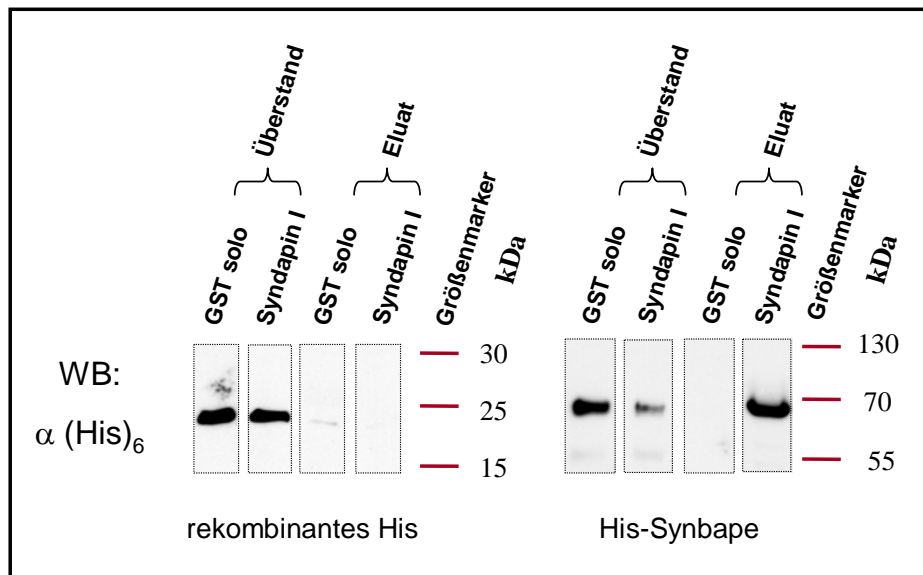


Abbildung 37: Die Interaktion von Syndapin und Synbape ist direkt

Dargestellt sind mit $\alpha(\text{His})_6$ gefärbte Western-Blot-Streifen der Überstände und Eluate einer mit affinitätsgereinigten Fusionsproteinen bei 300 mM NaCl durchgeführten Copräzipitationsprüfung. Als Negativkontrolle dient rekombinantes His in Verbindung mit GST solo bzw. GST-Syndapin. Unter den verwendeten Bedingungen ist eine spezifische Anreicherung von His-Synbape-Fusionsproteinen durch GST-Syndapin-I-Fusionsproteine festzustellen.

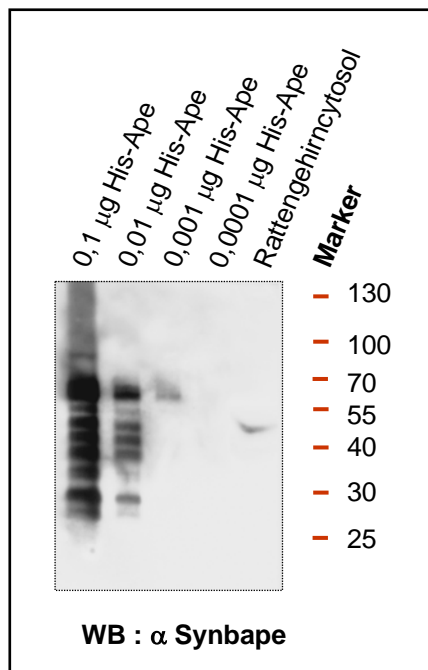
3.5.4 Ein polyklonaler Antikörper gegen Synbape

Um die Interaktion von Synbape und Syndapin auch unter *in-vivo*-Verhältnissen untersuchen zu können, wurde die Herstellung von Antikörpern durch die Immunisierung von Kaninchen unternommen. Aus dem Serum des Kaninchens 2 erfolgte die Affinitätsaufreinigung selbiger, die sodann in Western-Blot- und Immunfluoreszenzanalysen charakterisiert wurden.

Der affinitätsgereinigte α Synbape-Antikörper erkennt in Western-Blot-Analysen (Abbildung 38 I) His-markierte Fusionsproteine gut und kann unter den gewählten Bedingungen bis zu 1 ng Material detektieren. Bei den zusätzlich zu beobachtenden Proteinbanden niederen Molekulargewichts handelt es sich wahrscheinlich um Produkte proteolytischen Abbaus. Die Immunfärbung zeigt außerdem im Rattengehirncytosol eine etwas schwache, doch klare Immunreaktivität im Bereich des für endogenes Synbape erwarteten Molekulargewichts von 47 kDa und weist damit erstmals eine Expression Synbapes im Gehirn nach. Darüber hinaus gibt der affinitätsgereinigte Antikörper keinen Hinweis auf eine Kreuzreaktivität mit anderen endogenen Proteinen. Somit ist der aufgereinigte Antikörper in der Lage, endogenes Synbape in Western-Blot-Analysen spezifisch zu detektieren. Dabei deutet die eher geringe Intensität der Immunreaktivität für endogenes Synbape auf eine möglicherweise schwache Expression des Proteins im Gehirn hin.

Sodann wurde die Spezifität des neuen Antikörpers im zellulären Kontext untersucht, wozu COS-7-Zellen mit einem GFP-Synbape-Konstrukt (AS 1-369) transfiziert und mit α Synbape immunologisch gefärbt wurden (Abbildung 38 II). Es

Abbildung 38: Charakterisierung des affinitätsgereinigten Synbape-Antikörpers



38 I) Spezifische Erkennung His-markierter Antigene durch α Synbape in Western-Blot Analysen

Diese Abbildung zeigt die Erkennung unterschiedlicher Mengen Histidin-markierter Antigene (His-Ape; 67 kDa) sowie endogenen Proteinmaterials aus dem Rattengehirn (30 μ g) durch den affinitätsgereinigten Antikörper α Synbape (1:5000 in B*). Nach einer einstündigen Exposition des ECL-Films ist eine Detektion von einem ng Fusionsprotein durch α Synbape zu beobachten, während 0,10 ng Proteinmaterial keine Immunfärbung verursachen und damit bei den gewählten Inkubationsbedingungen unter der Detektionsgrenze liegen. Daneben sind mehrere charakteristische Banden niederen Molekulargewichts zu sehen, bei denen es sich wahrscheinlich um proteolytische Produkte handelt. Bemerkenswerterweise weist der Antikörper im Gegensatz zu dem terminalen Antiserum darüber hinaus auch eine klare Bande im Bereich des endogenen Proteins (47 kDa, Rattengehirncytosol) auf.

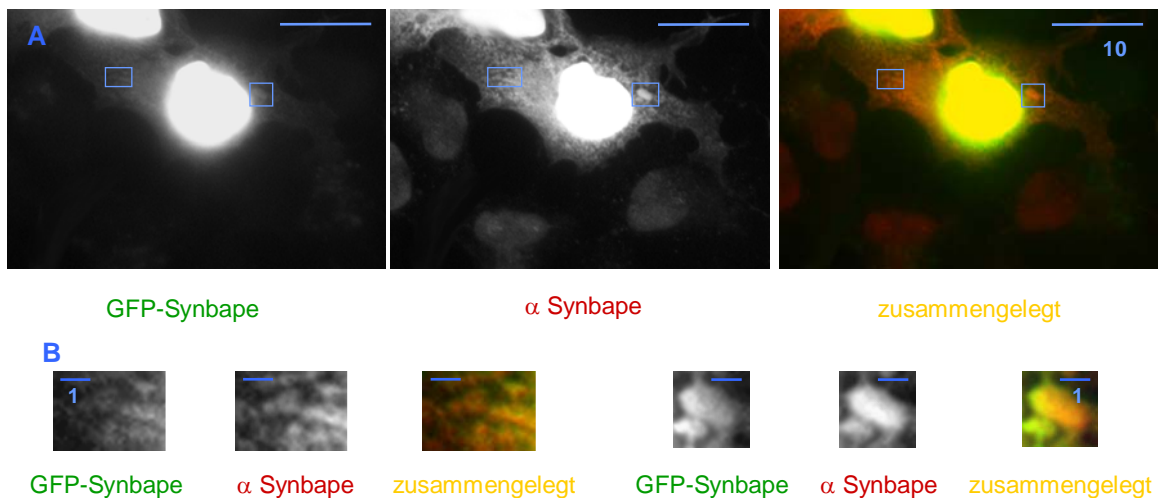


Abbildung 38 II: Spezifische Erkennung unterschiedlich markierter Antigene durch α Synbape in COS-7-Zellen.

A&B) Gezeigt sind Immunfluoreszenzfärbungen dissoziierter COS-7-Zellen des 2. Kultivierungstags bzw. 24 h nach Transfektion mit dem GFP-Synbape-Konstrukt (AS 1-369). Die Zahl unter dem blauen Balken gibt den Maßstab der jeweiligen Abbildung in μ m an. In Grün dargestellt ist dies GFP-Fluoreszenz des Synbape-Fusionsproteins, während in Rot die Immunfluoreszenz des affinitätsgereinigten Antikörpers zu sehen ist. Die in der Überlagerung in Gelb zu erkennende Übereinstimmung der beiden Signale bestätigt die Spezifität des Antikörpers *in vivo*. B) Ausschnittsvergrößerungen aus A). Zu erkennen ist eine Übereinstimmung des GFP-Signals mit der Antikörperfärbung in subzellulären Strukturen.

fällt auf, daß sich das rekombinante Proteinmaterial Synbapes sehr stark im Zellkern anreichert (Abbildung 38 II A), während das GFP-solo-Signal keine solche klare Präferenz für den Nukleus zeigt, sondern die Zelle gleichmäßig ausfüllt (Daten nicht gezeigt). Das α Synbape-Signal zeigt hierbei im Vergleich zu untransfizierten Zellen weder eine intensivere Fluoreszenz in transfizierten Zellen noch eine Übereinstimmung dieser mit dem GFP-Signal in subzellulären Strukturen, sondern demonstriert die gleiche Kernfärbung wie in untransfizierten Zellen, die höchstwahrscheinlich auf endogenes Synbape zurückzuführen ist.

Im Gegensatz dazu weist das Fluoreszenzsignal des affinitätsgereinigten Antikörpers in GFP-Synbape exprimierenden Zellen ebenso wie das GFP-Synbape-Signal die höchste Intensität in dem nukleären Zellkompartiment auf. Gleichzeitig ist die Fluoreszenzintensität des α Synbape-Signals insgesamt in transfizierten Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen drastisch verstärkt. Die GFP-Synbape-Fluoreszenz im Cytosol ist gering, doch sind verschiedene subzelluläre Strukturen zu erkennen, welche in der α Synbape-Färbung gleichfalls hervortreten und in der Überlagerung eine gute räumliche Übereinstimmung der beiden Fluoreszenzsignale erkennen lassen (Abbildung 38 II B). Damit erweisen sich der Antikörper auch im zellulären Zusammenhang als spezifisch. Die auffällige Anreicherung der Immunreaktivität in den Zellkernen steht dabei in Übereinstimmung mit den beiden postulierten Konsensussequenzen Synbapes für eine derartige Lokalisation.

3.5.5 Auch unter *in-vivo* Bedingungen können Syndapin und Synbape interagieren

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob die unter *in-vitro*-Bedingungen festgestellte Interaktion von Syndapin und Synbape auch unter *in-vivo*-Verhältnissen stattfinden kann. Als Kriterien dienen hierbei ein gemeinsames Auftreten in räumlichen und zeitlichen Dimensionen, eine Interaktion im zellulären Kontext sowie eine Assoziation von endogenem Proteinmaterial.

Dazu wurde zunächst die Gewebeverteilung von Synbape anhand von Gewebehomogenaten analysiert (Abbildung 39). Synbape wird nur in Gehirn, Testis und spurenweise in der Lunge exprimiert. Nicht zu detektieren ist es hingegen in Geweben wie Herz, Leber, Niere oder auch Muskel. Da Syndapin III jedoch nur in diesem letztgenannten Gewebe auftritt, kann eine *in-vivo* Relevanz der *in-vitro* gefundenen Interaktion von Syndapin III und Synbape damit ausgeschlossen werden. Syndapin I hingegen ist ausschließlich im Gehirn exprimiert (Qualmann *et al.*, 1999; Modregger *et al.*, 2000), während Syndapin II zusätzlich im Testis vorkommt, so daß eine Interaktion von Synbape und diesen beiden Isoformen durchaus möglich ist.

Um darüber hinaus eine Co-Verteilung von Syndapinen und Synbape auf subzellulärer Ebene zu überprüfen, wurde eine Fraktionierung von Gehirnhomogenat durchgeführt und die einzelnen Proben wurden auf das Vorkommen von Syndapin I und II sowie Synbape hin untersucht (Abbildung 39).

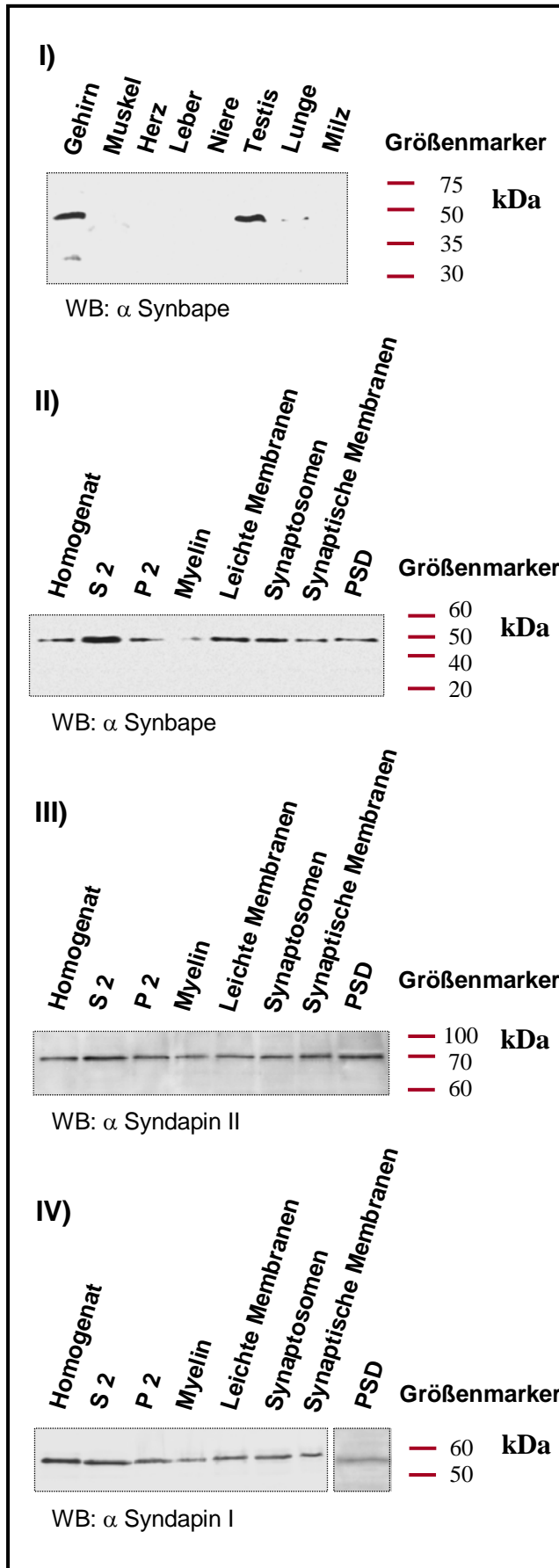


Abbildung 39: Charakterisierung der Verteilung von Synbape im Vergleich zu Syndapinen

I) Gewebeverteilung von Synbape. Gezeigt ist ein α Synbape gefärbter Western-Blot mit Proben diverser Gewebekomponenten. Aufgetragen sind jeweils 40 μ g Proteinmaterial. Synbape ist vorwiegend in Gehirn und Testis exprimiert und darüber hinaus in Spuren in der Lunge detektierbar. Bei der außerdem im Gehirn zu erkennenden, niedermolekularen Bande könnte es sich um ein Produkt proteolytischen Abbaus handeln.

II) Subzelluläre Verteilung von Synbape. Dargestellt ist ein Western-Blot-Streifen mit 40 μ g Protein aus unterschiedlichen subzellulären Fraktionen, der einer α Synbape-Immundefärbung unterzogen wurde. Synbape tritt in nahezu allen untersuchten Kompartimenten in vergleichbaren Mengen auf. Lediglich die Myelin-Fraktion weist kaum Synbape-Signal auf, während in der Fraktion der löslichen Proteine (S2) eine leichte Anreicherung des Signals für Synbape zu beobachten ist.

III) Subzelluläre Verteilung von Syndapin II I. Dargestellt ist ein Western-Blot-Streifen mit 40 μ g Protein aus unterschiedlichen subzellulären Fraktionen, der einer α Syndapin-II-Immundefärbung unterzogen wurde. Syndapin II tritt in allen untersuchten Kompartimenten in vergleichbaren Mengen auf.

IV) Subzelluläre Verteilung von Syndapin I. Dargestellt ist ein Western-Blot-Streifen mit 40 μ g Protein aus unterschiedlichen subzellulären Fraktionen, der einer α Syndapin-I-Immundefärbung unterzogen wurde. Bei den beiden getrennten Abschnitten handelt es sich um eine unterschiedliche Exposition des ECL-Films (Homogenat – Synaptische Membran: 1 Minute, PSD: 60 Minuten). Syndapin I ist in allen untersuchten Kompartimenten in vergleichbaren Mengen detektierbar, nur die PSD-Fraktion zeigt eine wesentlich geringere Immunreaktivität.

Syndapin II tritt in allen analysierten Kompartimenten gleichermaßen auf (Abbildung 39 IV), wie auch Syndapin I, das nur in der PSD-Fraktion im Vergleich zu den übrigen Fraktionen eine geringere Intensität der Immunreaktivität aufweist (Abbildung 39 III). Synbape (Abbildung 39 II) zeigt eine deutliche Anreicherung in der Fraktion der löslichen Proteine sowie in geringerem Umfang an leichten Membranen und Synaptosomen, während für die Fraktionen der Synaptischen Membranen und der PSD die Immunreaktivität für Synbape etwas geringer ausfällt. In der Myelin-Fraktion ist nur wenig Synbape detektierbar. Damit weist Synbape in der Western-Blot-Analyse eine ähnliche Verteilung zu den beiden Syndapin-Isoformen I und II I auf. Somit bestätigt sich die Möglichkeit einer Interaktion unter *in-vivo* Bedingungen auch auf subzellulärer Ebene. Da alle Analysen unter Verwendung adulter Ratten durchgeführt wurden, ist eine Co-Expression der beiden Proteine in nennenswertem Umfang während dieser zeitlichen Phase gegeben.

Als weitere unabhängige Methode zur Bestätigung der Interaktion von Syndapin und Synbape wurde eine heterologe Co-Immunpräzipitation (Abbildung 40) mit überexprimierten GFP-Syndapin- und FLAG-Synbape-Fusionsproteinen durchgeführt. Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen zeigt GFP-Syndapin-I keine unspezifische Assoziation an FLAG-Antikörper (Braun *et al.*, 2005). Es ist zudem eine gute Co-Expression der beiden transfizierten Konstrukte in Verbindung mit einer effizienten Extraktion der Fusionsproteine zu beobachten (Lysate). FLAG-Synbape wird spezifisch durch die immobilisierten FLAG-Antikörper nicht aber durch nichtimmun-IgGs präzipitiert (IP). GFP-Syndapin-I copräzipitiert ebenfalls spezifisch (CoIP). Daher kann mit diesem Experiment eine spezifische Interaktion von Syndapin I und Synbape demonstriert werden. Somit ist eine Verbindung der in Mammaliazellen produzierten Interaktionspartner Synbape und Syndapin auch unter kompetitiven Bedingungen möglich, womit der Bestand der Interaktion in einer ersten Annäherung an die *in-vivo*-Situation gezeigt werden konnte.

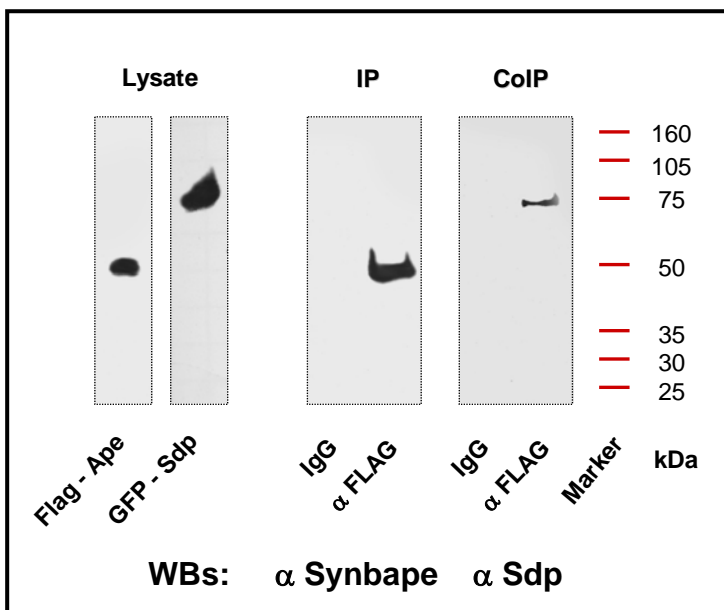


Abbildung 40:
Die Interaktion von Synbape und Syndapin kann durch eine heterologe Co-Immunpräzipitation bestätigt werden

Dargestellt sind Western-Blot-Streifen von Lysaten und Eluaten einer heterologen Co-Immunpräzipitation. Flag-Synbape- und GFP-Syndapin-I-Konstrukte wurden gemeinsam in HEK-Zellen überexprimiert und durch immobilisierte α Flag-Antikörper als Komplex präzipitiert. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge IgG eines Normalserums aus der Maus eingesetzt. Die Visualisierung erfolgte durch α Synbape- bzw. α Syndapin-I-Immunfärbungen. Es zeigt sich eine spezifische Co-Präzipitation für das Syndapin-Fusionsprotein.

Im Anschluß wurde die Interaktion durch Rekonstruktion im zellulären Kontext untersucht. Hierfür wurde der Umstand genutzt, daß Synbape im Gegensatz zu Syndapin im Zellkern auftritt (s.a. Abbildung 54), um zu überprüfen, ob durch Überexpression eines GFP-Synbape-Konstrukts in hippocampalen Neuronen endogenes Syndapin in den Zellkern rekrutiert werden kann. Ein solches Phänomen würde auf das Vorliegen einer robusten Bindung schließen lassen.

Tatsächlich läßt sich eine derartige Delokalisation von endogenem Syndapin I beobachten (Abbildung 41): Das GFP-Synbape-Fusionsprotein formt, wie es auch für endogenes Synbape sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen beobachtet werden kann, rundliche Akkumulate im Zellkern. Endogenes Syndapin I kann in diesem Zellkompartiment normalerweise jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 41, α Syndapin-I-Fluoreszenzfärbung und Abbildung 54 A-C). Im Gegensatz dazu zeigt die Cofärbung für endogenes Syndapin I in Neuronen, welche GFP-Synbape überexprimieren, eine zwar weniger intensive, aber deutliche Immunreaktivität an der Stelle der Synbape-Akkumulate; die beiden Proteine colokalisieren hier deutlich. Außerdem ist gegenüber untransfizierten Zellen eine deutliche Anreicherung von endogenem Syndapin an der Membran des Zellkerns zu erkennen. Zum Vergleich wurden Neurone außerdem mit GFP solo transfiziert, welches ebenfalls im Zellkern lokalisiert, dort jedoch keine Akkumulationen aufweist und darüber hinaus die Zelle gleichmäßig ausfüllt. Eine quantitative Auswertung ergab (Abbildung 42), daß unter Überexpression von GFP-Synbape-Fusionsproteinen endogenes Syndapin I in

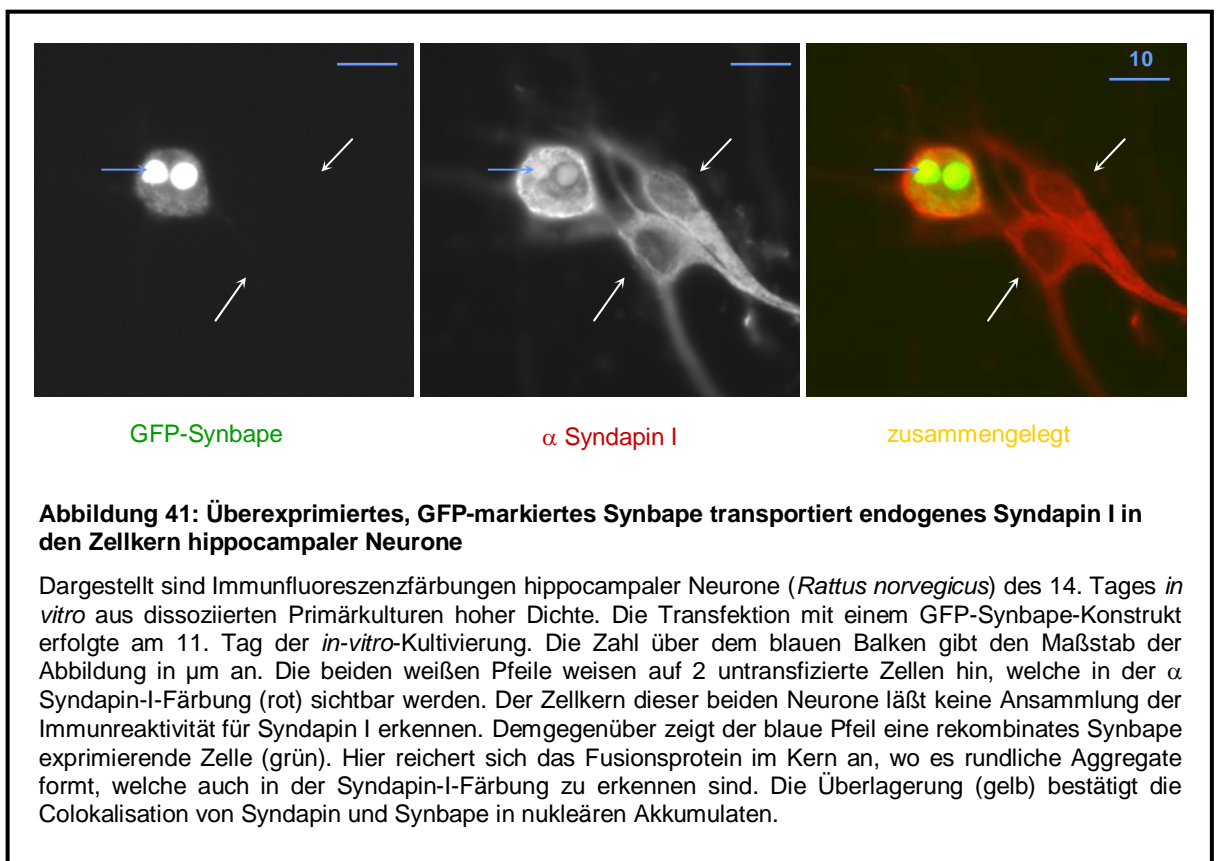
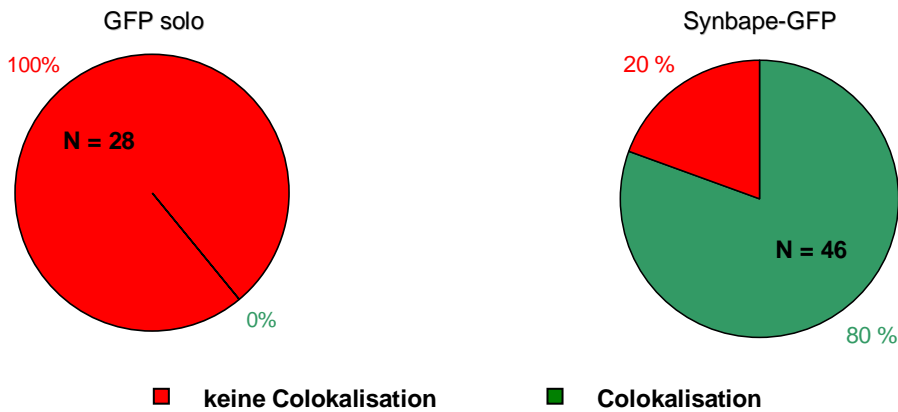


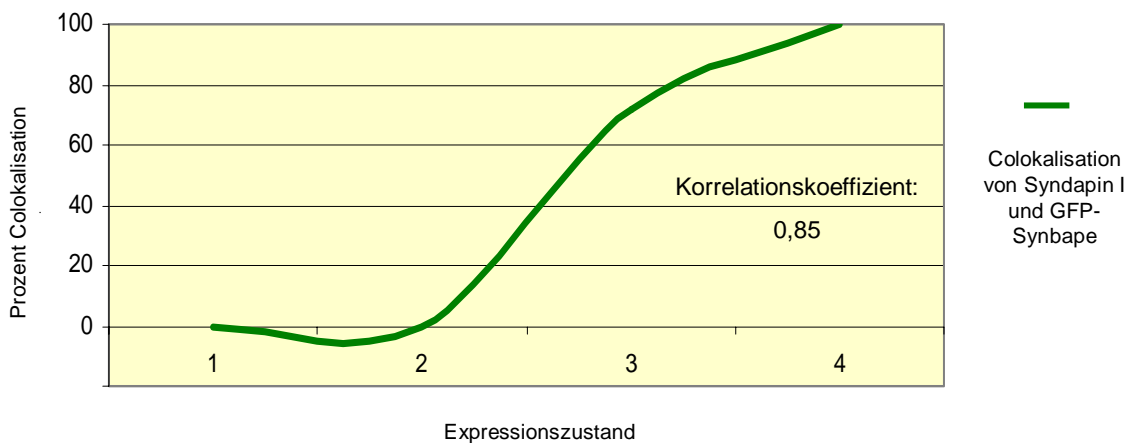
Abbildung 42: Quantitative Untersuchung der Kernlokalisierung von Syndapin I bei Überexpression von Synbape in primären, hippocampalen Neuronen

I) Unter Überexpression transportiert Synbape Syndapin I in den Zellkern hippocampaler Neurone



Gezeigt ist das Auftreten von Syndapin I im Zellkern primärer, hippocampaler Neurone unter Überexpression GFP solos (links) bzw. eines GFP-Synbape-Konstrukts (rechts). In Rot ist jeweils der Anteil der Neurone dargestellt, welcher keine Colokalisation von Syndapin I und Synbape im Zellkern aufweist, während in Grün der colokalisierende Anteil dargestellt ist. Es ist zu erkennen, daß Syndapin in 80 % aller das Synbape-Konstrukt expremierenden Neurone in den Zellkern transportiert wird; unter Kontrollbedingungen, d.h. unter Überexpression von GFP solo, kann dies hingegen nie festgestellt werden. Verwendet wurden dissoziierte Primärkulturen hoher Dichte des 14. Tages *in vitro*, die am 11. Kultivierungstag mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert wurden.

II) Die Kernlokalisierung von Syndapin I ist abhängig von dem Expressionszustand Synbapes



Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der Zellen, welche in Abhängigkeit des jeweiligen Expressionszustandes eine Colokalisation von Syndapin und Synbape im Zellkern zeigen (grüner Graph). Dieser ist folgendermaßen bestimmt: 1) Kern mit Synbape-GFP gefüllt, aber nicht strahlend, 2) Kern strahlend, 3) Akkumulate sind zu erkennen und 4) Akkumulate strahlen. Der Korrelationskoeffizient weist dabei mit einem Wert von 0,9 auf eine starke positive Korrelation zwischen Colokalisation und Expressionszustand hin. Ob es sich bei den verschiedenen Expressionszuständen um unterschiedliche Expressionsstärken oder auch funktionell bedingte Unterschiede handelt, kann hiermit allerdings nicht entschieden werden.

80% der Fälle in nukleären Akkumulaten beobachtet werden kann, während es nie (0%) im Zellkern detektiert werden kann, wenn GFP solo co-überexprimiert wird.

Darüber hinaus ist eine deutliche Abhängigkeit des Effekts von dem Expressionszustand des Synbape-Fusionsproteins festzustellen (Abbildung 42 II). Bei niederen Expressionszuständen (1-2) kann keine Anreicherung Syndapins im Bereich des Kerns beobachtet werden. Diese Fälle stellen im Wesentlichen die 20% der Zellen, in denen der Effekt nicht festgestellt werden konnte (Abbildung 42 I). Demgegenüber zeigen 95% aller Neurone, welche Akkumulate von GFP-Synbape im Zellkern aufweisen (Expressionszustände 3 & 4) eine Colokalisation mit Syndapin. Der Korrelationskoeffizient spiegelt diesen Zusammenhang ebenfalls wieder: Er beträgt 0,85 und belegt damit eine positive Korrelation von Expressionszustand und Colokalisationslevel. Diese Daten sprechen somit für eine Interaktion der beiden untersuchten Proteine im zellulären Zusammenhang.

Schließlich erfolgte die Analyse der Interaktion endogener Proteine mittels einer Co-Immunfärbung von endogenem Syndapin I und Synbape in adulten hippocampalen Neuronen und einer Co-Immunpräzipitation von Syndapin und Synbape aus Rattengehirncytosol (Abbildung 43-45). Hierzu wurde die Präzipitation von Syndapin-I-Synbape-Komplexen durch kovalent an eine Matrix gekoppelte α Synbape-Antikörper untersucht. Als Kontrolle fungiert eine äquivalente Menge an das Antigen nicht erkennendem Kaninchen-IgG. Dabei wird Synbape spezifisch an die mit α Synbape gekoppelte Matrix gebunden (Immunpräzipitation, Abbildung 43) und eine spezifische Copräzipitation von Syndapin I beobachtet werden kann. Somit ist eine Interaktion der nativen Proteine möglich und Syndapin I und Synbape liegen im Rattengehirncytosol komplexiert vor.

Die Co-Immunfärbungen der beiden untersuchten Proteine (Abbildungen 44 & 45) weist auf eine Colokalisation in verschiedenen Zellkompartimenten hin. So treten Syndapin I und Synbape übereinstimmend in somatisch-dendritischen Kompartimenten auf (Abbildung 44 & 45 A, vergleiche auch Abbildung 31), während Synbape außerdem im Zellkern angereichert ist (Abbildung 44 A & 45 A). An filamentösen Strukturen ist dabei eine Colokalisation der beiden Proteine zu erkennen, wie die Ausschnittsvergrößerungen B und C der Abbildung 44 im Detail bestätigen. Die filamentösen Strukturen konnten durch eine MAP-2- Immunfärbung als Mikrotubuli identifiziert werden (s.a. Abbildungen 54 & 31).

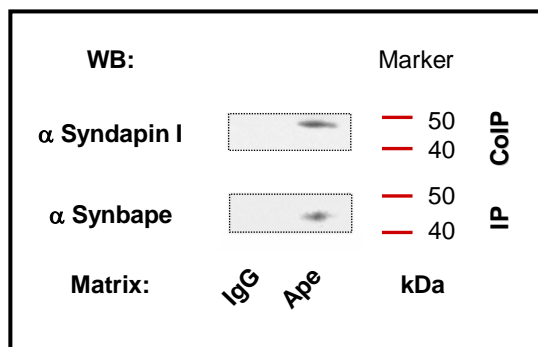
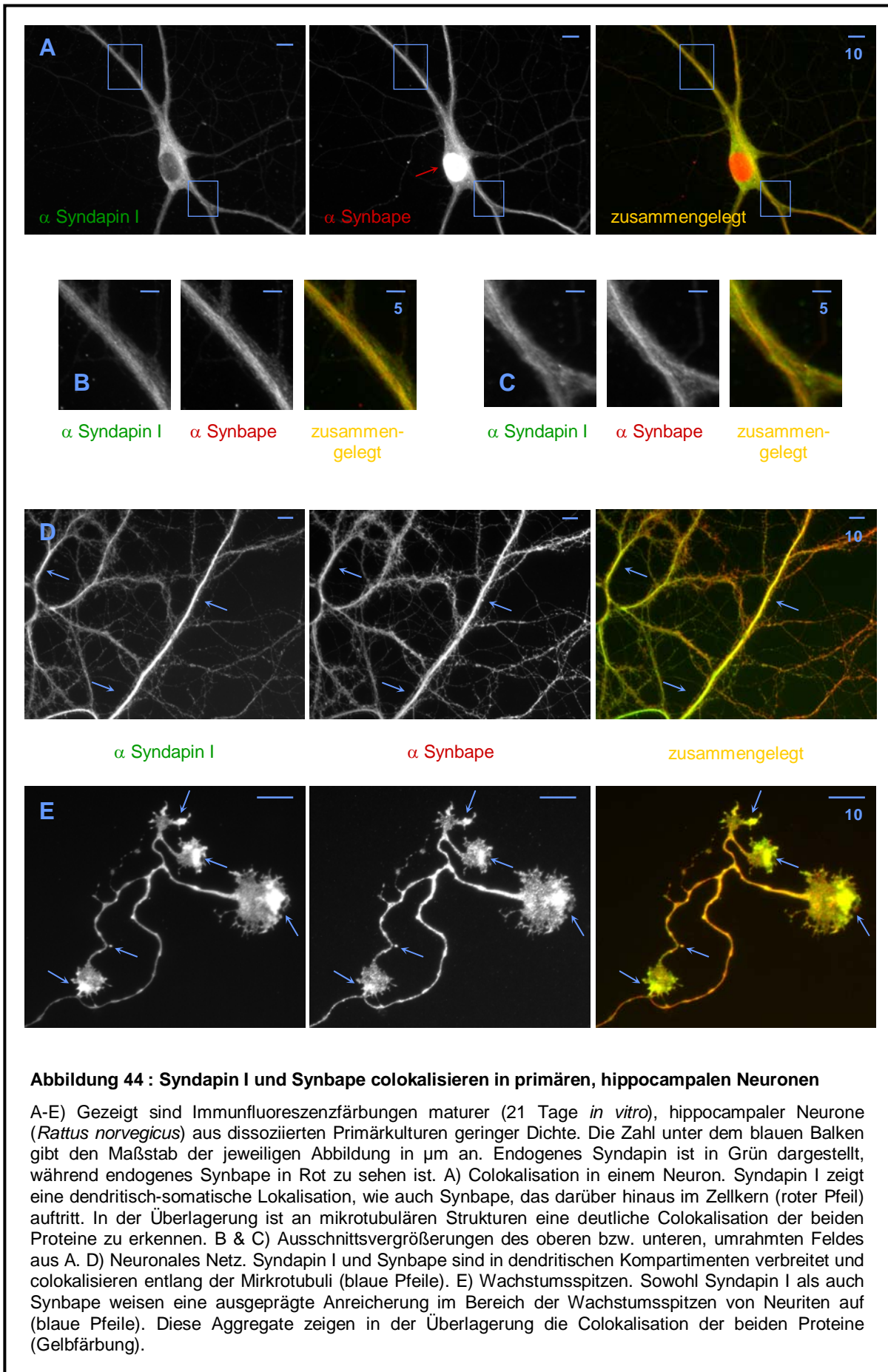


Abbildung 43:
Co-Präzipitation von endogenem Syndapin I und Synbape

Zu sehen sind mit α Syndapin I und α Synbape-Immunfärbungen visualisierte Western-Blot-Streifen der Eluate einer Co-Immunpräzipitation der beiden Proteine aus 2 mg Rattengehirncytosol durch kovalente Bindung des α Synbape-Antikörpers an eine Matrix (Ape). Als Kontrolle wurde die gleiche Menge Kaninchen-IgG eingesetzt. Dabei ist eine spezifische Immunpräzipitation von Synbape und eine spezifische Co-Immunpräzipitation von Syndapin festzustellen.



Unter starker Vergrößerung (Abbildung 45 D) ist zu erkennen, daß Syndapin I und Synbape zudem in Dornfortsätzen, welche durch eine Färbung mit α MAP-2-Antikörpern visualisiert wurden, detektiert werden können, wenn auch nur ein geringer Anteil der Gesamtimmunreaktivität für Syndapin I in diesen Kompartimenten lokalisiert ist. Demgegenüber ist ein erheblicher Anteil von Syndapin I seitlich auf die Dendriten aufgelagert; es handelt sich dabei höchstwahrscheinlich um das bereits beschriebene präsynaptische Vorkommen des Proteins (Qualmann *et al.*, 1999). In Wachstumsspitzen von Neuriten ist eine ausgeprägte Anreicherung von Syndapin I und Synbape im Bereich der Übergangszone des Kegels erkennbar, wo eine Akkumulation beider Proteine auftritt (Abbildung 44 E). Somit veranschaulichen die Colokalisationsstudien das für die Interaktion in der Zelle erforderliche gemeinsame Auftreten der endogenen Proteine und belegen die *in-vivo*-Relevanz der biochemisch demonstrierten Interaktion. Die Anreicherung in Wachstumsspitzen spricht dabei möglicherweise für eine Bedeutung der Interaktion im Zusammenhang mit Veränderungen des Aktincytoskletts der Zelle.

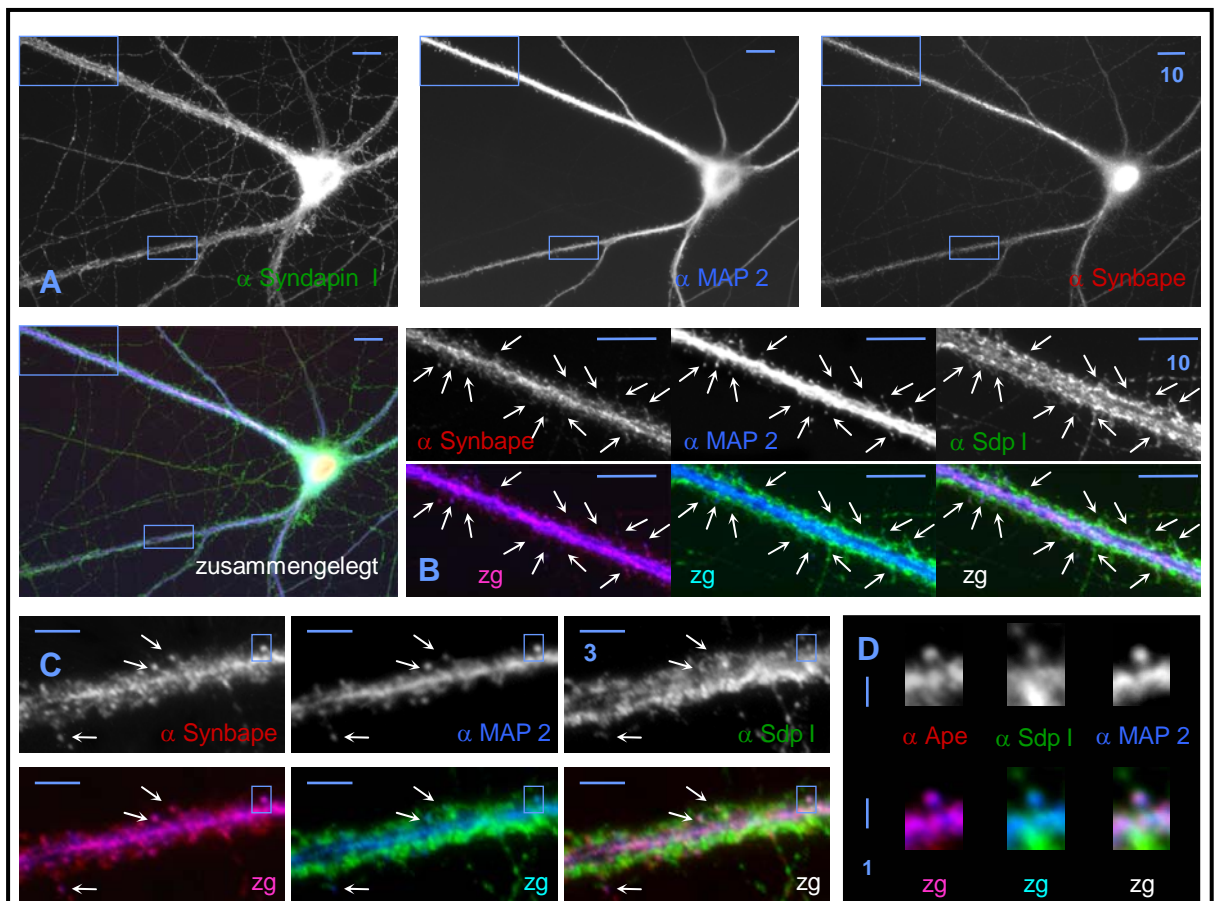


Abbildung 45: Syndapin I und Synbape können in dendritischen Dornen detektiert werden

Die Aufnahmen zeigen Immunfluoreszenzfärbungen maturer (21 Tage *in vitro*), hippocampaler Neurone (*Rattus norvegicus*) aus dissoziierten Primärkulturen geringer Dichte nach Glutamatstimulation. Die Zahl unter dem blauen Balken gibt den Maßstab der jeweiligen Abbildung in μ m an. A) Immunfluoreszenzfärbung für Synbape (roter Kanal), Syndapin I (grüner Kanal) und MAP 2 (blauer Kanal). In den Dendriten überlappt die Immunreaktivität für alle drei Proteine. B-D) Ausschnittsvergrößerungen aus A). Eine α MAP-2-Färbung dient zur Visualisierung der Dornfortsätze, die durch Pfeile gekennzeichnet sind. Syndapin I und Synbape können gemeinsam in den dendritischen Dornen detektiert werden.

3.5.6 Synbape, Syndapin I und dendritische Dornfortsätze

3.5.6.1 Synbape und Syndapin I beeinflussen unter Überexpression die Morphologie dendritischer Dornfortsätze

Wie die Analyse der biochemischen Zellfraktionierung (Abschnitt 3.5.5) gezeigt hat, ist Synbape in synaptischen Fraktionen wie die der Synaptischen Membranen und die der PSDs vertreten. Gleiches gilt für Syndapin I. Dieser Befund wird durch den Nachweis der beiden Proteine in Dornfortsätzen gestützt. Zudem bietet die Interaktion von Syndapin I und N-WASP eine Verbindungsmöglichkeit zu der Regulation von Aktinfilamenten, welche besonders an dynamischen Prozessen wie der Endocytose oder der Veränderung der Zellmorphologie beteiligt sind, so z.B. in Wachstumsspitzen oder in Dornfortsätzen. Aus diesen Gründen wurde als erste funktionelle Charakterisierung von Synbape und seiner Interaktion mit Syndapin I der Einfluß der beiden Proteine auf die Morphologie jener Dornen untersucht.

Hierzu wurden primäre, hippocampale Neurone mit Synbape- und Syndapin-I-Konstrukten in Kombination mit dsRed oder GFP cotransfiziert und diese während der Entwicklung der synaptischen Kontakte von Tag 11 bis Tag 14 der *in-vitro*-Haltung exprimiert. Durch die Füllung der Neurone mit dsRed bzw. GFP erfolgte die Visualisierung der Zellmorphologie. Gleichzeitig wurde dieser Fluoreszenzfarbstoff als Referenz für numerische und anatomische Vergleiche der Dornfortsätze in den Kategorien Filopodium, pilzförmiger, kleiner & dicker und verzweigter Dorn genutzt (Abbildungen 46-52). Dabei zeigen sich insgesamt zwei unterschiedliche Trends in den Effekten der beiden Proteine (Abbildung 46): Während Syndapin I hauptsächlich die Vergrößerung der Köpfe pilzförmiger Dornfortsätze zu Lasten der Hälse bewirkt, zeigt Synbape eher eine Halsverlängerung. Bei den pilzförmigen Dornen zeigen beide Proteine zusammen einen additiven Effekt: Die pilzförmigen Dornen ähneln Luftballons, sie haben lange Hälse und dicke Köpfe. Daneben treten bei Einzelexpression der beiden Proteine abnormal verzweigte Dornfortsätze mit pilzförmigen Charakter auf, welche jedoch unter Cotransfektion nicht mehr in solchen Ausmaßen beobachtet werden können.

Im Detail sind einige weitere, interessante Effekte festzustellen (Abbildungen 47-52). So zeigt sich für Synbape (Abbildungen 48 & 52) bei den pilzförmigen Dornfortsätzen, welche als ausgereifte Postsynapsen angesehen werden, ein mit durchschnittlich -15,8% deutlicher und hoch signifikanter Rückgang in ihrem Anteil an der Gesamtanzahl, doch dafür sind sie in ihrer Gesamtlänge mit im Durchschnitt +0,25 µm gegenüber der Kontrolle etwas, aber ebenfalls hoch signifikant, vergrößert. Die kleinen, dicken Dornen weisen demgegenüber eine hoch signifikante Zunahme sowohl in ihrer Gesamtgröße (+0,13 µm) als auch in ihrem Anteil (+16,1%) auf, wobei letzteres ebenso auf die verzweigten Dornfortsätze zutrifft. Mit einem Zuwachs von 2,0% auf 5,0% ist ihr Anteil unter Überexpression von Synbape mehr als verdoppelt (Abbildung 47). Eine signifikante Zunahme der Gesamtzahl der Dornen einer Zelle

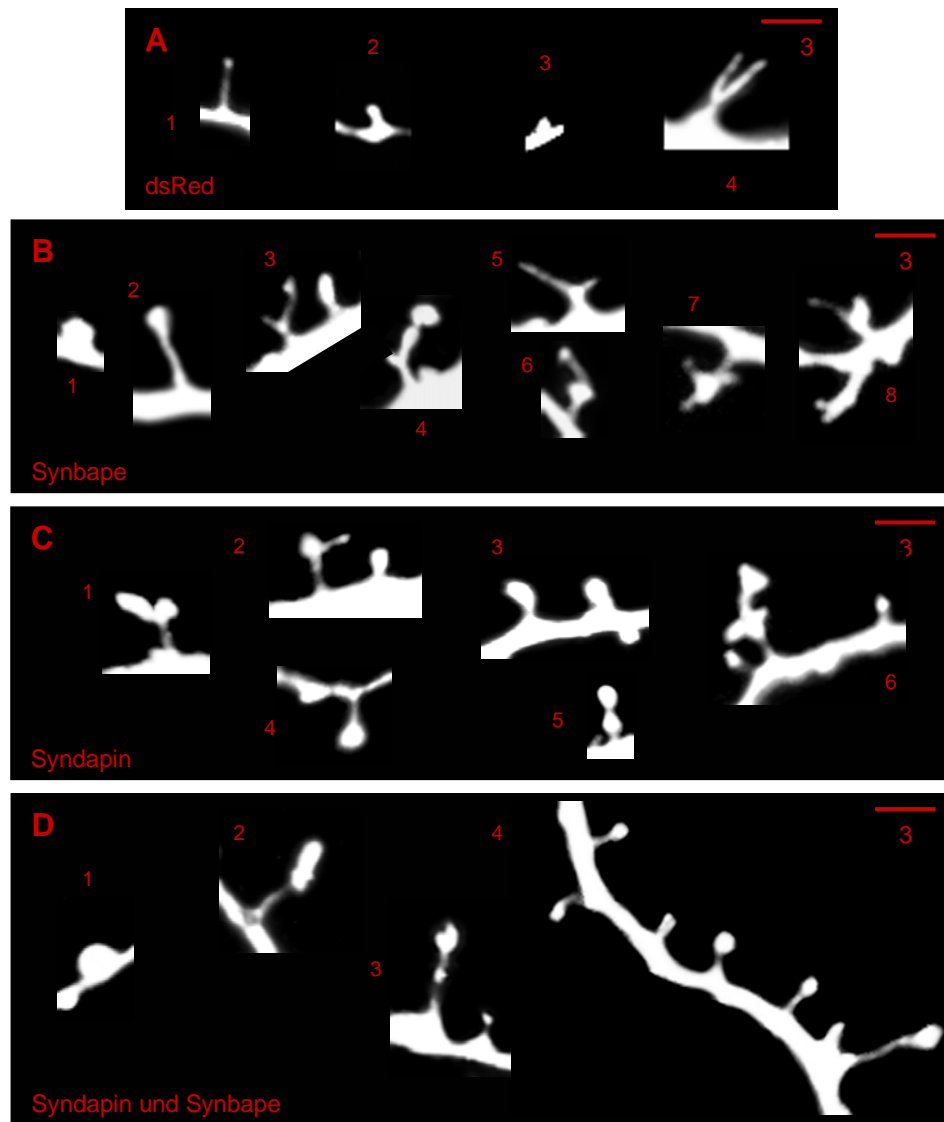


Abbildung 46: Syndapin I und Synbape beeinflussen die Morphologie dendritischer Dornfortsätze

A-D) Die Abbildungen zeigen Dornfortsätze von mit dsRed bzw. im Falle von Syndapin mit GFP gefüllten Neuronen aus dissoziierten Hippocampuskulturen, welche am 11. und 12. Tag *in-vitro* mit den angegebenen Konstrukten cotransfiziert wurden. A) Kontrolle. In Anlehnung an Pak et al. (2001) werden dendritische Dornfortsätze im Folgenden in die Kategorien (1) filopodia-förmig, (2) pilzförmig, (3) klein und dick und (4) verzweigt eingeteilt. B) Synbape-modulierte Dornen. Unter 1 ist ein vergrößerter Dorn des Typs (3) zu sehen, während 2 einen pilzförmigen Dornfortsatz mit stark verlängertem Hals zeigt. Bild 3 stellt 2 pilzförmige Dornen dar, von denen einer verzweigt ist. Die Bilder 4 – 8 demonstrieren weitere Beispiele für verzweigte Dornfortsätze, wie sie besonders für mit Synbape transfizierte Neurone charakteristisch sind. C) Syndapin-I-beeinflußte Dornfortsätze. Die Bilder zeigen unterschiedlich veränderte, pilzförmige Dornen, welche typischerweise einen ausgeprägten Kopf aufweisen (2, 3 & 4), aber auch verzweigt sein können (1, 5 & 6). Demgegenüber sind die Hälse häufig stark reduziert (Bilder 2 und 3). D) Effekte der Coexpression von Syndapin I und Synbape. Bild 1 zeigt einen vergrößerten Dornen der Kategorie (3). Während die pilzförmigen Dornen Merkmale beider Konstrukte vereinigen (z.B. Bild 2 & 3), d.h. verlängerte Hälse und dicke Köpfe aufweisen, werden die auffälligen Verzweigungen selten (Bilder 2 – 4). Dadurch erscheinen die pilzförmigen Dornen typischerweise wie kleine Luftballons (Bild 4, insbesondere rechts unten).

Ergebnisse

Kategorie	Sdp I	Kntr.	Ape	Kntr.	Sdp I/Ape	Kntr.	SdpISH3/Ape	Kntr.
<u>durchschnittliche Größen in μm</u>								
Filopodia	1,8 ***	2,1	2,3 *	2,1	2,5 ***	2,1	2,0	1,9
Pilzförmige	1,1 *	1,1	1,3 ***	1,0	1,6 ***	1,1	1,1 *	1,1
Dicke	0,4 ***	0,3	0,5 ***	0,3	0,6 ***	0,3	0,4 *	0,4
Verzweigte	1,7 *	2,3	2,2	2,2	2,4	2,3	1,9	2,1
<u>durchschnittliche prozentuale Anteile an der Gesamtzahl</u>								
Filopodia	20,9 ***	31,9	35,6	32,4	29,2	31,9	28,6	30,5
Pilzförmige	47,5	43,3	25,0 ***	40,8	23,5 ***	43,3	38,6 ***	44,6
Dicke	27,6 *	23,1	37,7 ***	21,6	44,0 ***	23,1	31,1 **	23,4
Verzweigte	4,0 ***	1,8	5,0 ***	2,0	3,3 *	1,8	1,7	1,5

Abbildung 47: Zusammenfassung der Daten aus den Dornfortsatzanalysen

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die ermittelten durchschnittlichen Größen und prozentualen Anteile der Dornfortsätze in den verschiedenen Kategorien der einzelnen Experimente. Signifikante Veränderungen gegenüber der Kontrolle sind als schwach signifikant (*), signifikant (**) und hoch signifikant (***) angegeben.

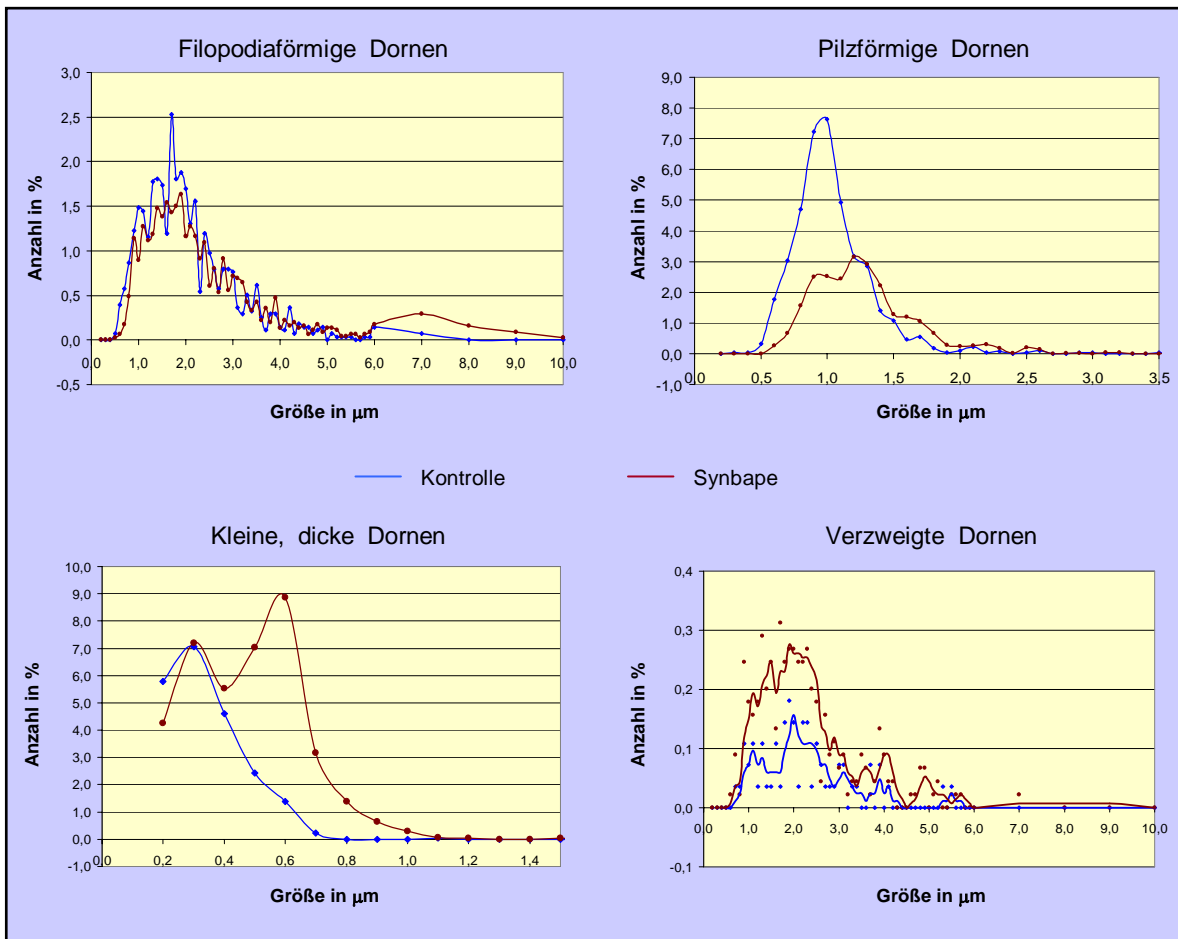


Abbildung 48: Prozentuale Verteilung der Dornfortsätze unter dem Einfluß überexprimierten Synbapes

Gezeigt ist der prozentuale Anteil der verschiedenen Dornengrößen in den jeweiligen Kategorien an der Gesamtzahl aller für das Konstrukt ausgewerteten dendritischen Dornen. Die Kontrolle setzt sich aus GFP- und dsRed solo überexprimierenden Zellen zusammen, ein signifikanter Unterschied besteht zwischen diesen Kontrollgruppen nicht. Bei der Expression von Synbape wurde ebenfalls keine Auswirkung der Markierung (Flag oder GFP) festgestellt. Während sich bei den filopodiaförmigen Dornfortsätzen keine Veränderungen gegenüber der Kontrolle erkennen lassen, zeichnet sich bei den pilzförmigen Dornen ein Rückgang ab. Demgegenüber sind kleine, dicke Dornen vermehrt und vergrößert, wie auch die verzweigten Dornfortsätze.

ist jedoch für Synbape genausowenig wie für Syndapin I oder eine Kombination von Konstrukten beider Proteine festzustellen.

Für Syndapin I (Abbildungen 49 und 52) ist im Gegensatz zu Synbape mit –11% eine hoch signifikante Abnahme in dem Anteil der filopodiaförmigen Dornfortsätze bei einer gleichzeitig ebenfalls signifikanten Abnahme ihrer durchschnittlichen Länge um 0,33 μm festzustellen. Demgegenüber deutet sich bei den pilzförmigen Dornen mit einer durchschnittlichen Erhöhung ihres Anteils um +4,2% zwar eine Zunahme an, doch ist diese nicht signifikant. Ihre Gesamtlänge ist mit durchschnittlich +0,13 μm schwach signifikant vergrößert. Wie Abbildung 46 zeigt, ist dieser Zuwachs hauptsächlich einer Ausdehnung des Kopfbereiches zuzuschreiben. Die Auswirkungen, welche die kleinen, dicken Dornfortsätze aufweisen, ähneln denen Synbapes (Abbildungen 48 und 52); sie sind signifikant

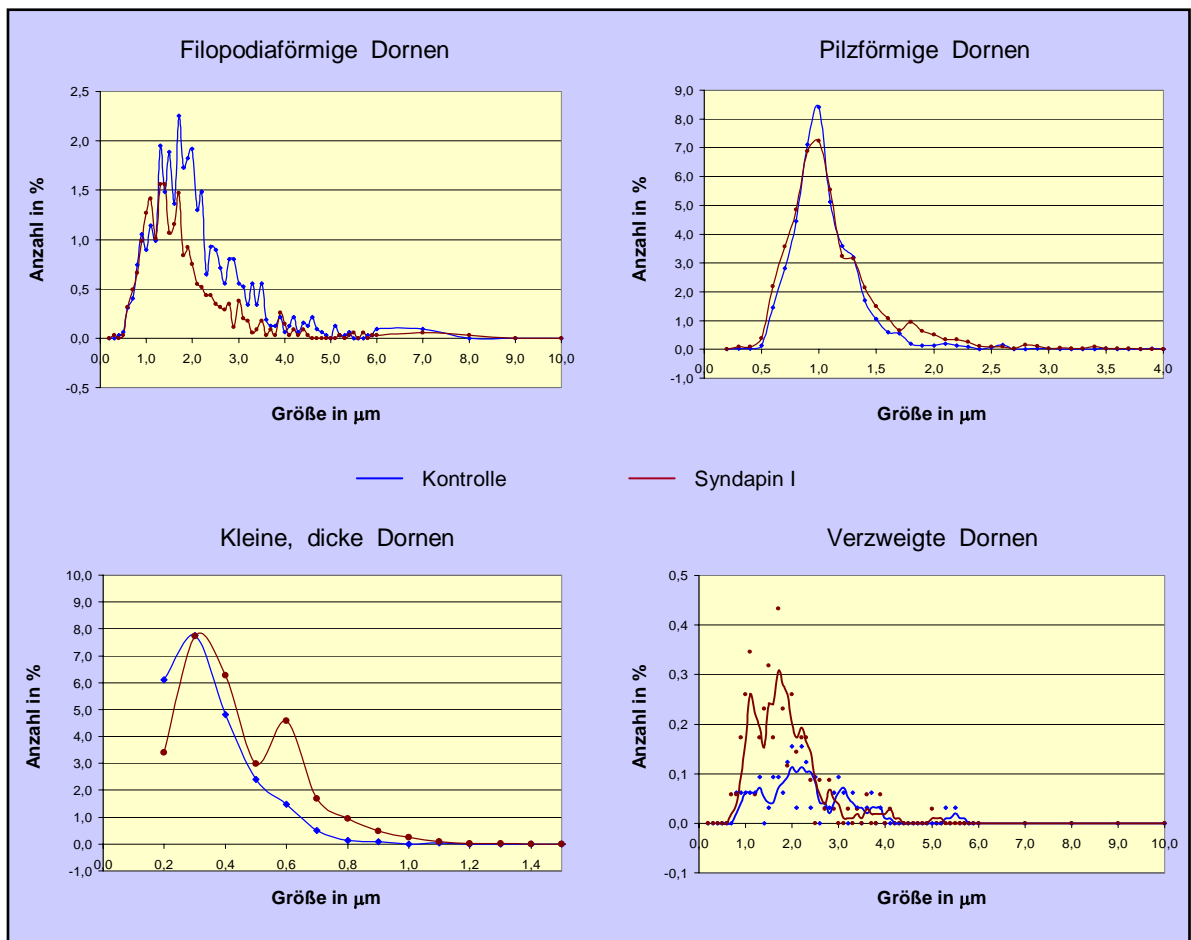


Abbildung 49: Prozentuale Verteilung der dendritischen Dornfortsätze unter dem Einfluß von überexprimiertem Syndapin I

Gezeigt ist der prozentuale Anteil der verschiedenen Dornengrößen in den jeweiligen Kategorien an der Gesamtzahl aller für das GFP-Syndapin I - Konstrukt ausgewerteten dendritischen Dornen. Als Kontrolle dienen mit dsRed solo gefüllte Neurone. Während sich bei den pilz- und filopodiaförmigen Dornfortsätzen eine geringfügige Abnahme ihres Anteils an der Gesamtzahl der dendritischen Dornfortsätze gegenüber der Kontrolle abzeichnet, zeigen die kleinen, dicken Dornen eine Zunahme in Größe und Anteil, was in geringerem Ausmaß auch auf die verzweigten Dornfortsätze zutrifft.

vergrößert (+0,09 μm) und vermehrt (+8,9%). Schließlich zeigt sich bei den verzweigten Dornen mit durchschnittlich +2,2% eine hoch signifikante, prozentuale Zunahme, während ihre Größe mit $-0,59 \mu\text{m}$ gegenüber der Kontrolle schwach signifikant verringert ist. Die Betrachtung der Bilder aus Abbildung 46 zeigt, daß dieser Effekt möglicherweise auf die Verzweigung von pilzförmigen Dornen (besonders Bild 1) zurückgeführt werden kann, welche mit einer normalen Länge von durchschnittlich $1,1 \mu\text{m}$ gewöhnlich um $1,2 \mu\text{m}$ kleiner als verzweigte Dornfortsätze sind (Abbildung 47). Daher spricht dieser Befund ebenfalls für eine Beeinflussung der maturen, pilzförmigen Dornfortsätze durch Syndapin.

Die Cotransfektion von Neuronen mit Syndapin I und Synbape (Abbildung 50) weist im Vergleich mit den Einzeltransfektion sowohl distinkte als auch additive bzw. synergistische Effekte auf. Zu letzteren sind vor allem die Veränderungen bei den kleinen, dicken Dornen zu rechnen. Hier ist mit einer hoch signifikanten Zunahme von +20,9% bzw. $+0,21 \mu\text{m}$ bei beiden ermittelten Parametern die gleiche Tendenz wie bei der getrennten Überexpression der jeweiligen Proteine zu erkennen (Abbildung 52). Die durch die Co-Überexpression der beiden Proteine verursachte, prozentuale Veränderung ist im Vergleich zu dem Effekt Syndapins nochmals hoch signifikant erhöht und auch im Vergleich zu Synbape deutet sich hier eine weitere, wenn auch statistisch nicht signifikante, Vergrößerung des Anteils gegenüber der Einzeltransfektion an. Etwas anders sieht es bei der durchschnittlichen Gesamtlänge der kleinen, dicken Dornen aus, sie ist mit $+0,21 \mu\text{m}$ sowohl gegenüber Synbape- als auch gegenüber Syndapin-I-Einzelexpressionen hoch signifikant vergrößert.

Bei den Größen der pilzförmigen Dornfortsätze ist in Analogie zu den kleinen, dicken Dornen in der Co-Überexpression ein hochsignifikanter Zuwachs von $+0,55 \mu\text{m}$ gegenüber der Kontrolle zu beobachten, ein Wert, der im Vergleich zu den bei den Einzeltransfektionen gefundenen Ergebnissen erneut eine hoch signifikante Zunahme repräsentiert (Abbildung 52). Daneben ist, wie auch bei der Einzeltransfektion mit Synbape, eine mit $-19,7\%$ hoch signifikante Abnahme des Anteils der pilzförmigen Dornfortsätze zu beobachten, welche damit in etwa dem Effekt der alleinigen Expression von Synbape entspricht, aber hoch signifikant von dem für Syndapin I ermittelten Effekt verschieden ist. Damit sind sowohl bei den pilzförmigen als auch bei den kleinen dicken Dornen keine signifikanten Verteilungsunterschiede gegenüber der Einzelexpression Synbapes festzustellen, während sich in den Größen der beiden Dornentypen eine signifikante Tendenz zur Verlängerung gegenüber den Einzelexpressionen abzeichnet. Diese Tendenz trifft auch auf den Vergleich von Syndapin I und Synbape zu, insbesondere bei den maturen, pilzförmigen Dornfortsätzen nimmt der Längenzuwachs im Vergleich von Syndapin I zu Synbape zu Syndapin I / Synbape hoch signifikant zu.

Auf Seite der Unterschiede ist verglichen mit der alleinigen Expression Syndapins bei den filopodiaförmigen Dornfortsätzen bei Co-Expression von Syndapin I und Synbape zunächst eine hoch signifikante Abnahme der Reduktion des Anteils an der Gesamtzahl der Dornfortsätze zu erkennen, so daß hier mit $-2,7\%$ insgesamt keine signifikante Abweichung von der Kontrolle mehr festgestellt

werden kann. Ähnliches gilt für die verzweigten Dornfortsätze: Während bei der Einzeldexpression der beiden Proteine eine hoch signifikante Zunahme des Anteils dieses Typs Dornen zu beobachten ist, ist in der Doppeltransfektion nur noch eine geringe und schwach signifikante Zunahme des Anteils jener Dornen von 1,8% auf 3,3% festzustellen (Abbildung 47), doch ist auf Grund der eher geringen Gesamtzahl dieser Dornen und der damit verbundenen, relativ hohen Varianz der Stichprobe kein statistisch gesicherter Unterschied zu den Einzeltransfektionen nachweisbar (Abbildung 52).

Drastische Effekte finden sich hingegen bei dem Vergleich der Größen der filipodiaförmigen Dornen unter Einzel- und Doppelüberexpression: Während die alleinige Überexpression von Syndapin I eine signifikante Reduktion ihrer Größe um $0,33 \mu\text{m}$ auf $1,8 \mu\text{m}$ bewirkt (Abbildung 47 und 52), verursacht diejenige Synbapes eine lediglich schwach signifikante Zunahme ihrer Länge um durchschnittlich $+0,26 \mu\text{m}$ auf $2,3 \mu\text{m}$. Bei gemeinsamer Überexpression der Proteine etabliert sich von

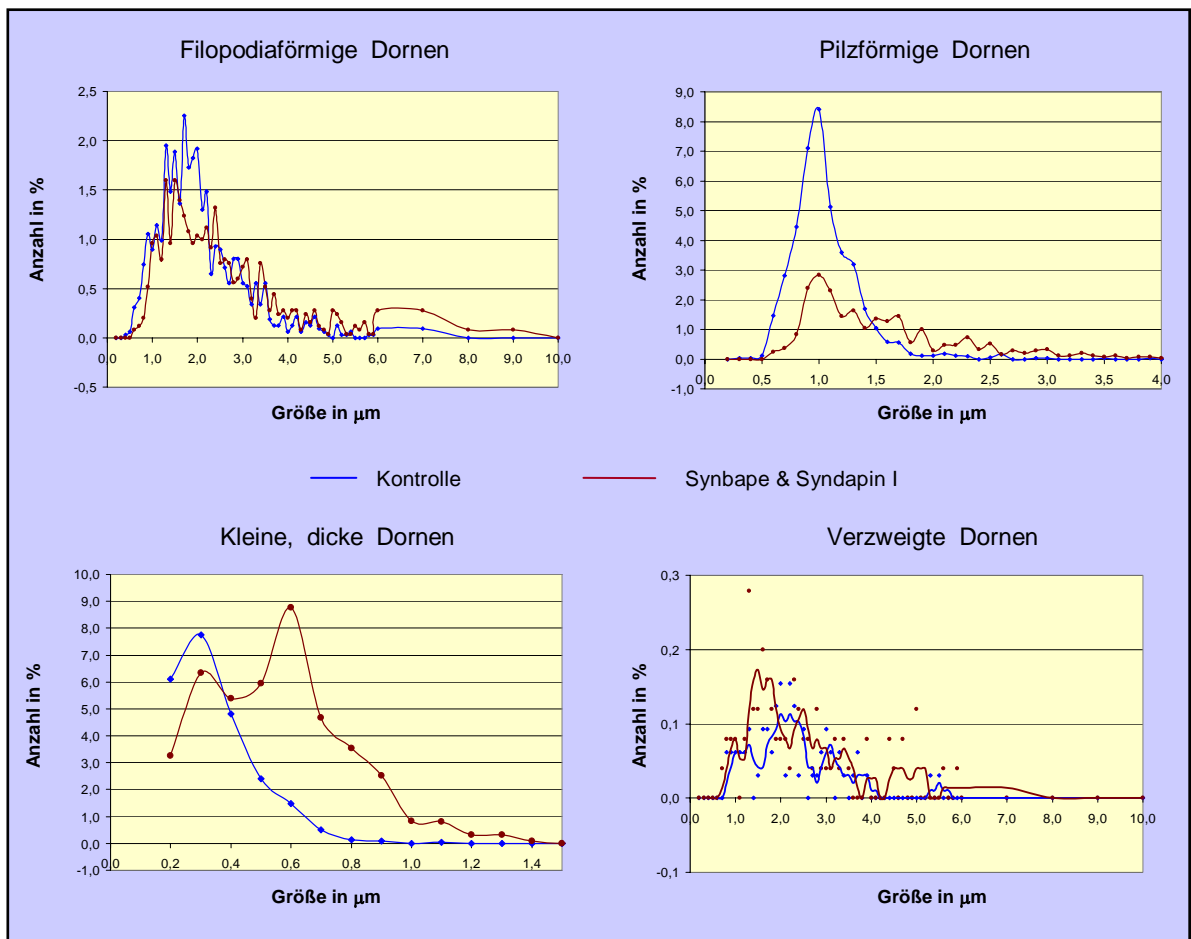


Abbildung 50: Prozentuale Verteilung der dendritischen Dornfortsätze unter dem Einfluß von co-überexprimiertem Synbape und Syndapin I

Gezeigt ist der prozentuale Anteil der verschiedenen Dornengrößen in den jeweiligen Kategorien an der Gesamtzahl aller für die Cotransfektion von ausgewerteten dendritischen Dornen. Als Kontrolle dienen mit dsRed solo gefüllte Neurone. Während pilzförmige und kleine, dicke Dornen drastische Veränderungen in Größe und prozentualem Anteil zeigen, sind bei den filipodiaförmigen und verzweigten Dornfortsätzen keine deutlichen Effekte auszumachen.

diesen gegensätzlichen Effekten jedoch derjenige Synbapes, die Filopodia zeigen eine gegenüber der Kontrolle und der Einzelexpression von Syndapin I hoch signifikante Längenzunahme um 0,4 μm (Abbildung 52).

Zusammengenommen sprechen diese Daten damit einerseits für eine Modulation der Formation des Dornenhalses, worauf nicht nur die Verlängerung desselben durch Synbape alleine, sondern auch das vermehrte Auftreten von Verzweigungen unter Einzelüberexpression beider Proteine hindeutet. Besonders aber die Entstehung der ballonartigen Dornen in der Kategorie der pilzförmigen Dornfortsätze unter Doppelüberexpression belegt, daß darüber hinaus die Interaktion der beiden Proteine hierfür von Bedeutung ist. Andererseits zeigen die Daten bezüglich der pilz- und filopofiaförmigen Dornen auch (Abbildungen 46 und 52), daß Syndapin I außerdem in die Kopfbildung und damit in die Reifung der Dornen involviert ist, auf einen diesbezüglichen Beitrag Synbapes geben die Ergebnisse jedoch keinen Hinweis. Während sowohl die prozentuale Verteilung der Dornfortsatztypen als auch die Länge der Filopodien allein der Modulation durch Synbape zu unterliegen scheinen, zeigt sich nicht nur im Hinblick auf die in der Kategorie der pilzförmigen Dornen entstehenden ballonförmigen Dornfortsätze, sondern auch bei den vermehrt auftretenden, kleinen, dicken Dornen ein synergistischer Effekt der beiden Proteine, was auf eine Bedeutung der Interaktion von Syndapin I und Synbape für diese Effekte hinweist.

Vor diesem Hintergrund wurde nun durch ein weiteres Experiment die Bedeutung der Interaktion von Syndapin I und Synbape für die Modulation der Morphologie der Dornfortsätze analysiert. Zu diesem Zweck wurden Synbape und die SH3-Domäne von Syndapin I, von welcher durch Frau McS-Biologin Akvile Inciute gezeigt worden war, daß sie die Dornenmorphologie nicht signifikant beeinflusst, in primären, hippocampalen Neuronen co-überexprimiert (Abbildung 51). Es wurde der Hypothese nachgegangen, daß bei annähernd gleicher Expression der beiden Konstrukte durch Bindung der SH3-Domäne von Syndapin I an Synbape die Wirkung desselben nivelliert werden kann.

Insgesamt läßt sich eine deutliche Annäherung an die Kontrollverhältnisse feststellen, die Effekte der Synbape-Überexpression werden supprimiert. So zeigt sich bei dem prozentualen Anteil der verzweigten Dornfortsätze mit 1,7% kein signifikanter Unterschied mehr zu der Kontrolle (Abbildung 47); damit unterscheidet sich dieser Wert hoch signifikant von den beiden Einzeltransfektionen (Abbildung 52). Bei den kleinen dicken Dornen zeichnen sich mit einer durchschnittlichen Zunahme um nur +7,7% von 23,4 auf 31,1% ebenfalls signifikante Unterschiede zu Synbape bzw. seiner Cotransfektion mit Syndapin I ab (Abbildungen 52 und 47), diese beiden Experimente demonstrieren eine wesentlich stärkere Erhöhung der Anteile an kleinen, dicken und verzweigten Dornen. Am deutlichsten spiegeln allerdings die pilzförmigen Dornfortsätze den genannten Trend wider: Die mit -15,8% drastische Reduktion des relativen Anteils an pilzförmigen Dornen durch Überexpression Synbapes, die durch Co-Überexpression mit dem Gesamtprotein von

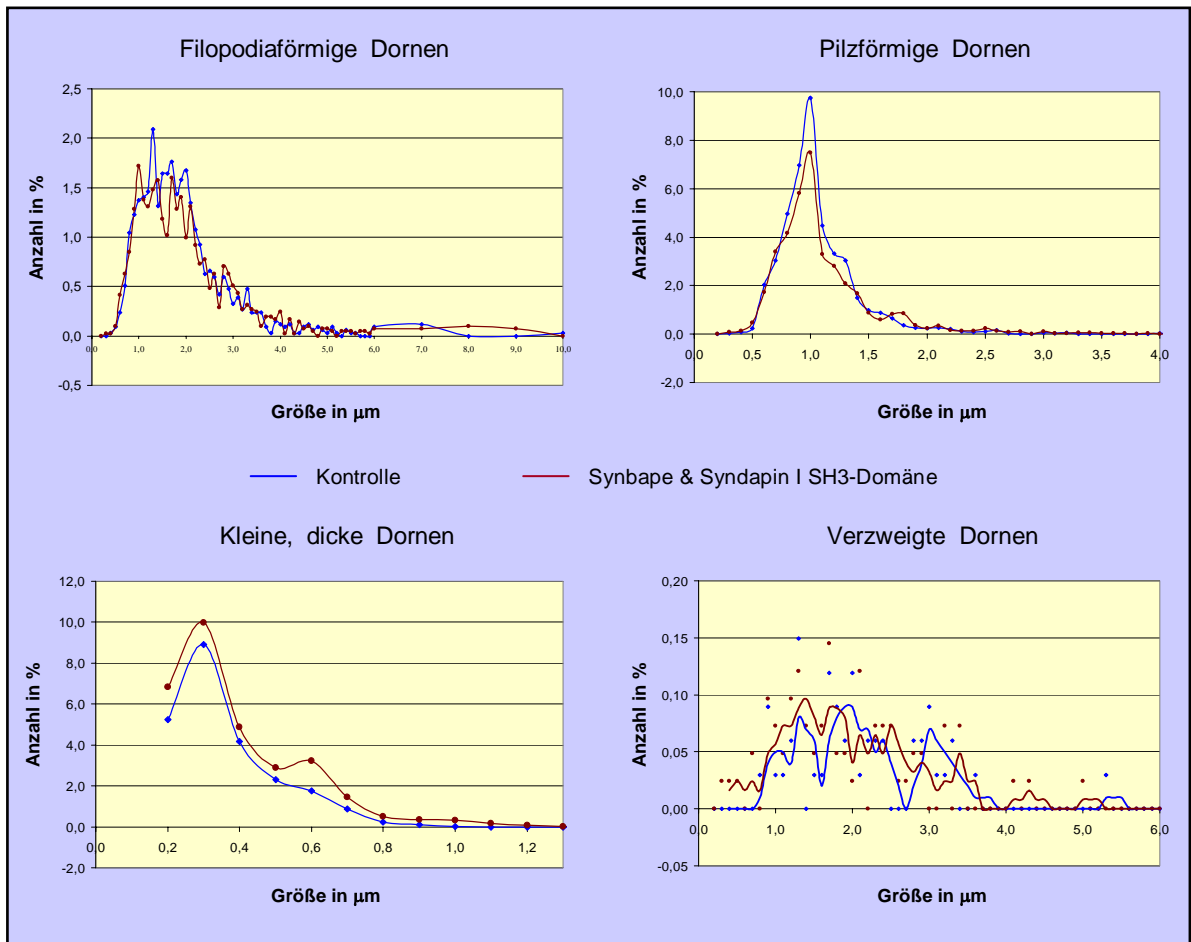


Abbildung 51: Prozentuale Verteilung der dendritischen Dornfortsätze unter dem Einfluß der Co-Überexpression von Synbape und der SH3-Domäne Syndapins

Gezeigt ist der prozentuale Anteil der verschiedenen Dornengrößen in den jeweiligen Kategorien an der Gesamtzahl aller für die Cotransfektion von Synbape und der SH3-Domäne von Syndapin I ausgewerteten dendritischen Dornen. Als Kontrolle dienen mit dsRed solo gefüllte Neurone. Dabei ist eine Annäherung an die Verhältnisse der Kontrolle festzustellen.

Syndapin I noch weiter gesteigert wird, kann durch eine Co-Überexpression der SH3-Domäne von Syndapin I deutlich und hoch signifikant auf nur noch $-6,0\%$ abgeschwächt werden.

Ähnliches gilt für die Größenverhältnisse dieser Dornenkategorie, mit einem durchschnittlichen Längenzuwachs von $0,04 \mu\text{m}$ sind die pilzförmigen Dornen nur noch unwesentlich größer als Kontrolldornen und hoch signifikant verschieden von der Syndapin I - Einzelexpression. Die kleinen, dicken Dornen bestätigen hinsichtlich ihrer Größenrelationen diesen Effekt ebenfalls, sie unterscheiden sich mit einer durchschnittlichen Längenzunahme von gleichfalls $0,04 \mu\text{m}$ signifikant von den übrigen Daten. Damit stellt dieses Experiment eine partielle Wiederherstellung der Kontrollverhältnisse dar. Zudem legen die Ergebnisse nahe, daß für die beobachteten Effekte als Erklärung nicht nur die SH3-Domänen-vermittelte Interaktion der beiden Proteine von Bedeutung ist, sondern zusätzlich der N-Terminus Syndapins benötigt wird, möglicherweise auf Grund seiner Fähigkeit zur Dimerisierung.

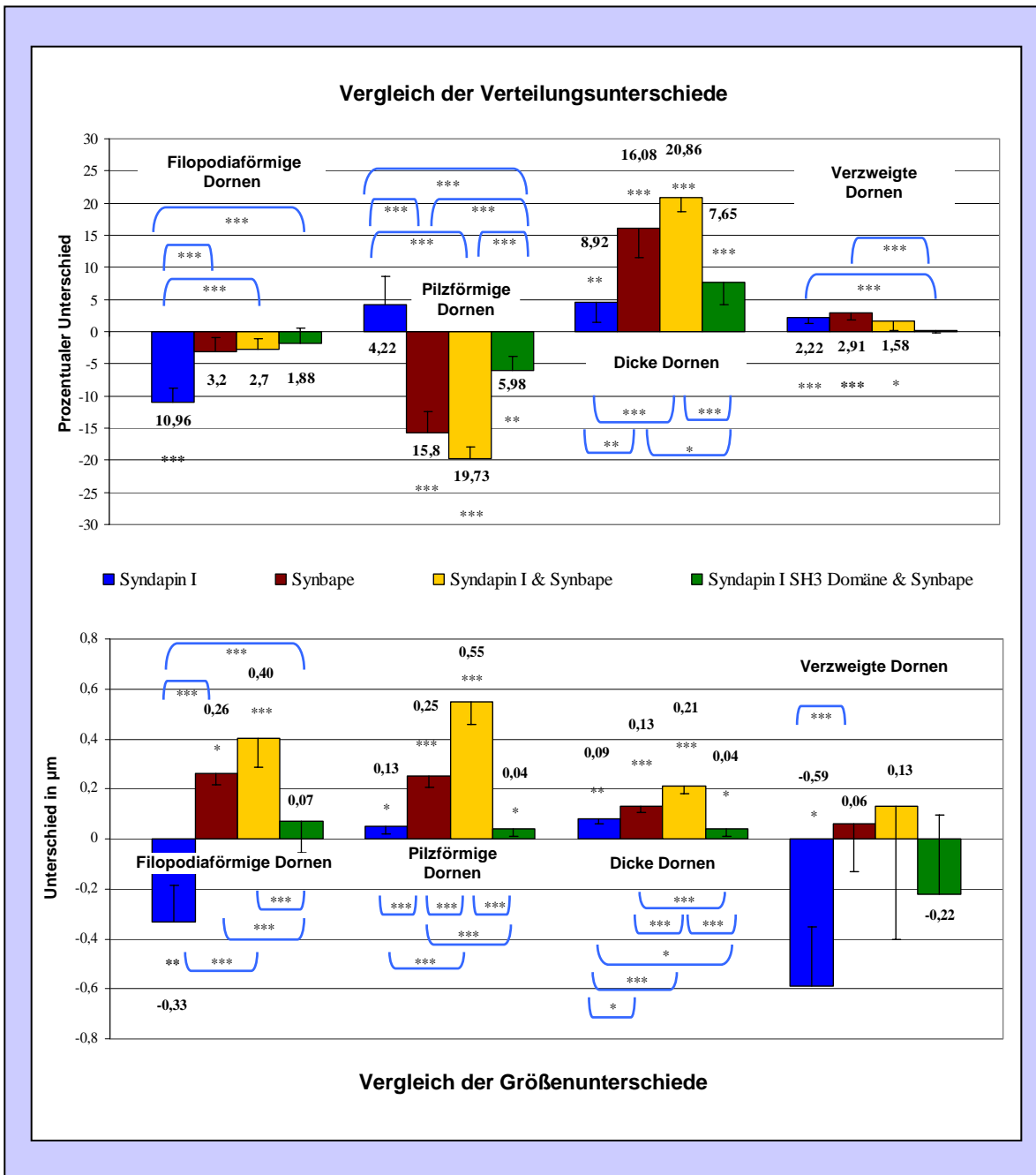
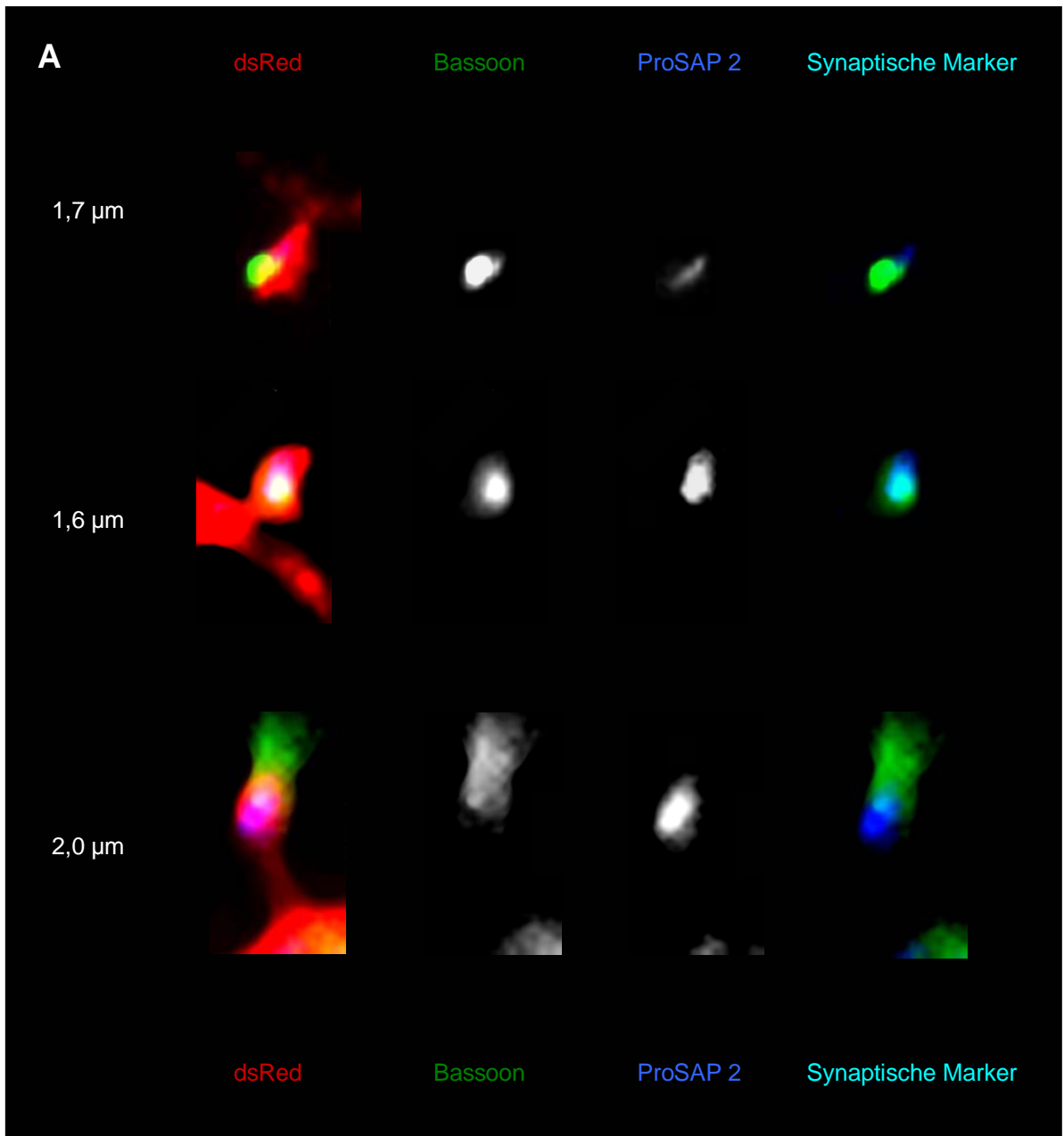


Abbildung 52: Vergleich der Auswirkungen der verschiedenen Syndapin I – Synbape – Transfektionen auf die Dornenmorphologie in Relation zu der Kontrolle

Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen, durch die Expression der einzelnen Konstrukte verursachten, Unterschiede in den Dornfortsatztypen als Differenz zur Kontrolle (Nulllinie). Dabei ist das Ergebnis aus der Transfektion mit Syndapin als blauer Balken, mit Synbape als roter Balken, mit Syndapin und Synbape als gelber Balken und mit Synbape und der SH3-Domäne Syndapins als grüner Balken demonstriert. Signifikanzen sind als schwach signifikant mit $p < 0,05$ (*), als signifikant mit $p < 0,01$ (**) und als hoch signifikant mit $p < 0,001$ (***) angegeben. Das Konfidenzintervall wird durch den Fehlerbalken dargestellt. Die Quervergleiche (blaue Klammern) stellen den Unterschied der um den Kontrollwert bereinigten Gruppen aus den jeweils möglichen, paarweisen Kombinationen dar. Die obere Abbildung zeigt den Vergleich der Verteilungsunterschiede, die untere den der Größenunterschiede. Dabei sind differenzielle und synergistische Effekte für Syndapin und Synbape festzustellen, während die Einführung der SH3-Domäne zu einer Annäherung an die Kontrollverhältnisse führt. Detaillierte Erläuterungen der Ergebnisse bietet Abschnitt 3.7.6. Zu den Methoden siehe auch Abschnitt 2.2.5.2.3.

3.5.6.2 Veränderte Dornen können synaptisch integriert sein

Die bei Expression von Syndapin I und Synbape bzw. der Kombination der beiden Protein beobachteten, drastischen Veränderungen der Morphologie der Dornfortsätze lassen es fraglich erscheinen, ob diese noch synaptisch in das Neuronennetz eingebunden sein können, d.h. ob sie über präsynaptische Kontakte und postsynaptische Dichten verfügen können. Dies zu überprüfen, wurden erneut primäre, hippocampale Neurone mit den genannten Konstrukten transfiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen Bassoon und ProSAP 2 als synaptische Markerproteine immunologisch gefärbt (Abbildung 53). Zur Verifizierung der Doppeltransfektion, die mittels Immunfluoreszenzfärbung nicht mehr möglich war,



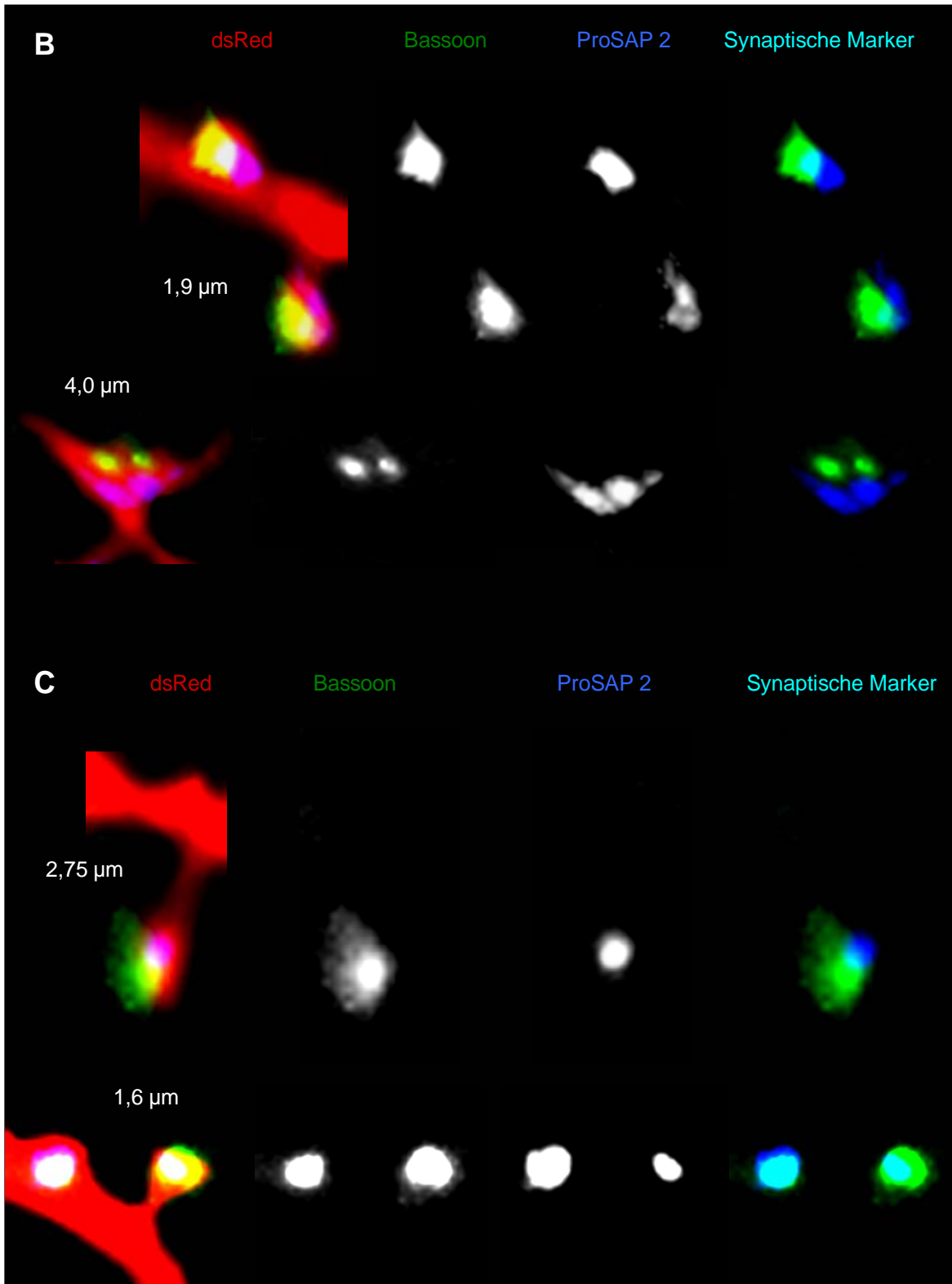


Abbildung 53: Synaptische Integration der veränderten Dornfortsätze

Die Abbildung demonstriert verschiedene, morphologisch veränderte Dornfortsätze aus Transfektionen primärer, hippocampaler Neurone aus dissoziierten Kulturen des 14. Tages *in-vitro* mit Synbape (A), Syndapin I (B) und Syndapin I & Synbape (C). Die Visualisierung der Zellmorphologie erfolgte durch Cotransfektion von dsRed. Zusätzlich wurden präsynaptische Kontakte und postsynaptische Dichten durch immunologische Färbung von Bassoon (grün) bzw. ProSAP 2 (blau) visualisiert. Die Größen der Dornen sind einzeln in μm angegeben. Es ist zu sehen, daß die veränderten Dornfortsätze strukturell in das Neuronennetz integriert sind.

wurden die pilzförmigen Dornen der analysierten Zellen vermessen und statistisch mit den vorangegangenen Analysen verglichen; dabei zeigen die beiden Stichproben mit $p \approx 0,8$ eine praktisch identische Verteilung jener Dornfortsätze; die betreffenden Neurone sind also Syndapin-I-Synbape cotransfiziert.

Die Ergebnisse demonstrieren, daß die veränderten Dornfortsätze aller drei Transfektionsvarianten (Syndapin I, Synbape und Syndapin I & Synbape) sowohl präsynaptische Kontakte als auch postsynaptische Dichten besitzen können. Damit sind sie strukturell in das Netzwerk der Neuronenkultur integriert.

3.5.7 Synbape und der Zellkern

3.5.7.1 Synbape kann im Zellkern von Neuronen nachgewiesen werden

Die Immunfärbungen primärer, hippocampaler Neurone aus dissoziierten Kulturen zeigen immer wieder Zellen, in denen der Kern ein starkes Fluoreszenzsignal aufweist und Zellen, in denen dies nicht der Fall ist (Abbildungen 54 A und B). Eine Cofärbung mit DAPI, einem blau erscheinenden Fluoreszenzfarbstoff, welcher durch eine DNS-Assoziation Zellkerne spezifisch markiert, veranschaulicht einerseits die nukleäre Lokalisation von Synbape, andererseits demonstriert sie aber auch die gleiche Varianz in der Lokalisation (Daten nicht gezeigt). Daraus erhebt sich die Frage, ob es sich bei diesem Phänomen um einen physiologisch relevanten Effekt handelt oder um einen artifiziellen Effekt der Immunocytochemie. Als eine unabhängige Methode zur Beantwortung dieser Frage wurde daher zunächst eine Präparation der Zellkerne aus adulten Rattenhirnen (siehe auch Abschnitt 2.2.2.12) durchgeführt.

So zeigt sich, daß Synbape im Gegensatz zu Syndapin I nicht nur in den beiden Fraktionen löslicher Proteine auftritt, sondern zudem in der Fraktion der Zellkerne detektiert werden kann (Abbildung 54 C). Eine Anreicherung liegt aber nicht vor. Die Unterschiede zwischen Syndapin I und Synbape in der Verteilung zwischen den Fraktionen S0 und S2 reflektieren dabei Differenzen in der Löslichkeit der beiden Proteine. Die Doppelbande in der α Synbape-Färbung, welche besonders in der Kernfraktion hervortritt, ist wahrscheinlich auf in der Langwierigkeit des Protokolls begründetem proteolytischen Abbau des Proteins zurückzuführen.

Das damit bestätigte Vorkommen von Synbape im Nukleus von Neuronen steht auch in Einklang mit der Proteinsequenzanalyse (Absatz 3.5.1), welche für Synbape zwei Kernlokalisierungssignale aufgezeigt hatte. Eine Mutationsanalyse, in welcher die Konsensusresiduen der Kernlokalisierungssignale zu Alaninen umgewandelt wurden, zeigt, daß diese Sequenzen in der Tat für die Kernlokalisation des Proteins verantwortlich sind: Überexprimierte GFP-Fusionsproteine des mutierten Synbapes lokalisieren nicht mehr im Kern, sondern im Soma der Zelle.

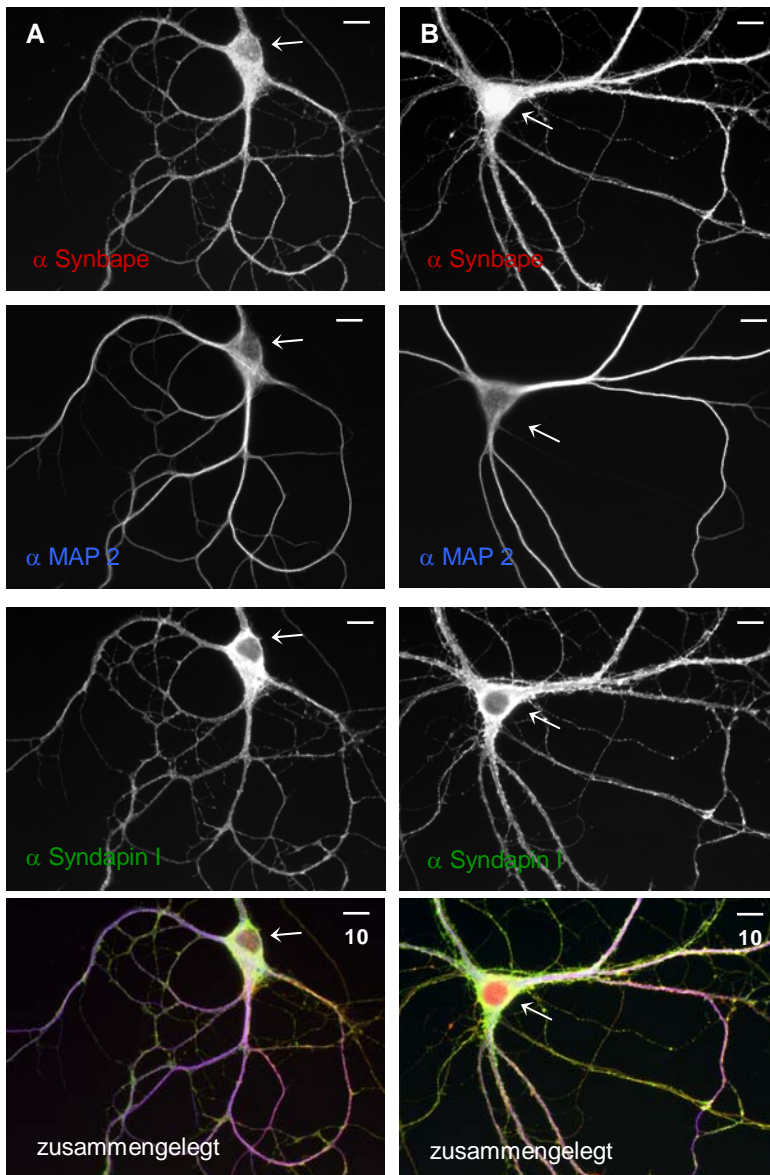
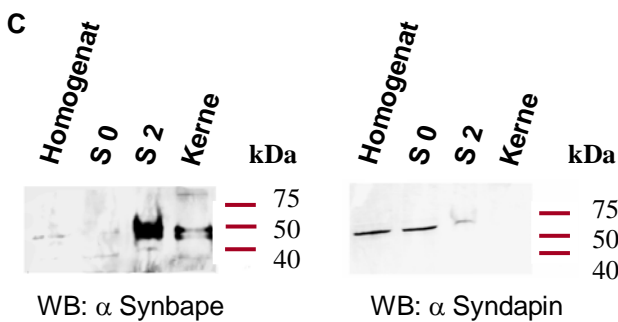


Abbildung 54: Synbape kann im Zellkern auftreten

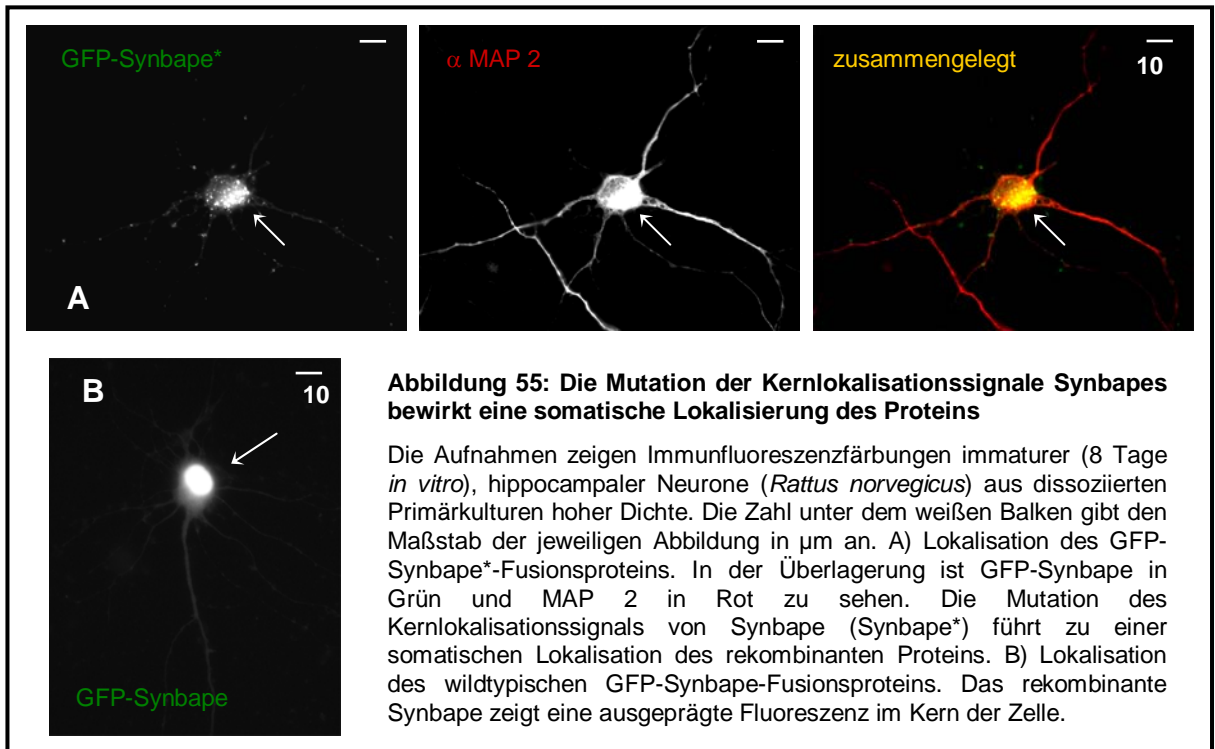
Es sind Immunfluoreszenzfärbungen maturer (21 Tage *in vitro*), hippocampaler Neurone (*Rattus norvegicus*) aus dissoziierten Primärkulturen geringer Dichte gezeigt. Die Zahl unter dem weißen Balken gibt den Maßstab der jeweiligen Abbildung in μm an. In der Überlagerung ist Synbape in Rot, MAP 2 in Blau und Syndapin I in Grün zu sehen. A) Synbape zeigt keine nukleäre Lokalisation. Wie auch MAP 2 und Syndapin I kann Synbape in diesem Neuron nicht im Zellkern detektiert werden. B) Synbape zeigt eine nukleäre Lokalisation. Im Gegensatz zu den anderen beiden gezeigten Proteinen tritt Synbape in dieser Zelle konzentriert im Zellkern auf.



C) Kernfraktionsanalyse.

Die Darstellung zeigt zwei Western-Blots mit jeweils 40 μg Protein der angegebenen Proben einer Präparation von Zellkernen aus adulten Rattenhirnen, welche einer Immunfärbung für Syndapin I und Synbape unterzogen wurden. Dabei zeigt sich, daß Synbape im Gegensatz zu Syndapin I außer in den Fraktionen löslicher Proteine auch im Zellkern zu finden ist. Die Doppelbanden in der α Synbape-Färbung sind wahrscheinlich auf proteolytische Degradation zurückzuführen.

Dort bilden sie eine Vielzahl kleiner Agglomerate (Abbildung 55 A), während nicht-mutiertes GFP-Synbape immer im Kern auftritt (Abbildung 55 B). Die damit dokumentierte Funktionalität der Kernlokalisationssequenzen stützt gleichfalls die physiologische Relevanz der Kernlokalisierung.



Zur weiteren Analyse der in der Zellkultur beobachteten und biochemisch bestätigten Kernlokalisierung Synbapes wurde außerdem eine immunhistologische Untersuchung des Proteins an sagittalen Gehirnschnitten der Maus durchgeführt.

Die Ergebnisse aus den Immunfärbungen für Synbape zeigen zunächst eine ubiquitäre Expression des Proteins im Gehirn (Abbildung 56), so kann es beispielsweise im Cortex, *Cerebellum*, *Cori plexus*, Hippocampus und im *Olfaktorischen Bulbus* detektiert werden. Interessanterweise sind dabei Unterschiede zu erkennen. So zeigt in Übereinstimmung mit den Beobachtungen in der Zellkultur der Vergleich der Synbape-Färbung mit der Dapi-Färbung im Cortex (Abbildung 56 A), aber auch im Hippocampus (Abbildung 56 C & D) oder im *Olfaktorischen Bulbus* (Abbildung 56 E, G & H) Zellen, in welchen eine Anreicherung der Immunreaktivität im Zellkern zu beobachten ist, und Zellen, in denen dies nicht der Fall ist. Im *Cerebellum* (Abbildung 56 B) ist Synbape vermehrt in den Zellkernen der grauen Substanz zu sehen, während am Übergang zu der weißen Substanz (Vergrößerung, Purkinjzellschicht) zwei Purkinjzellen zu erkennen sind, in denen Synbape nicht im Zellkern detektiert werden kann (schwarzer Pfeil). Eine dritte Purkinjzelle läßt jedoch eine nukleäre Konzentration des Immunfluoreszenzsignals für Synbape erkennen, welche mit der Dapi-Färbung übereinstimmt (weißer Pfeil).

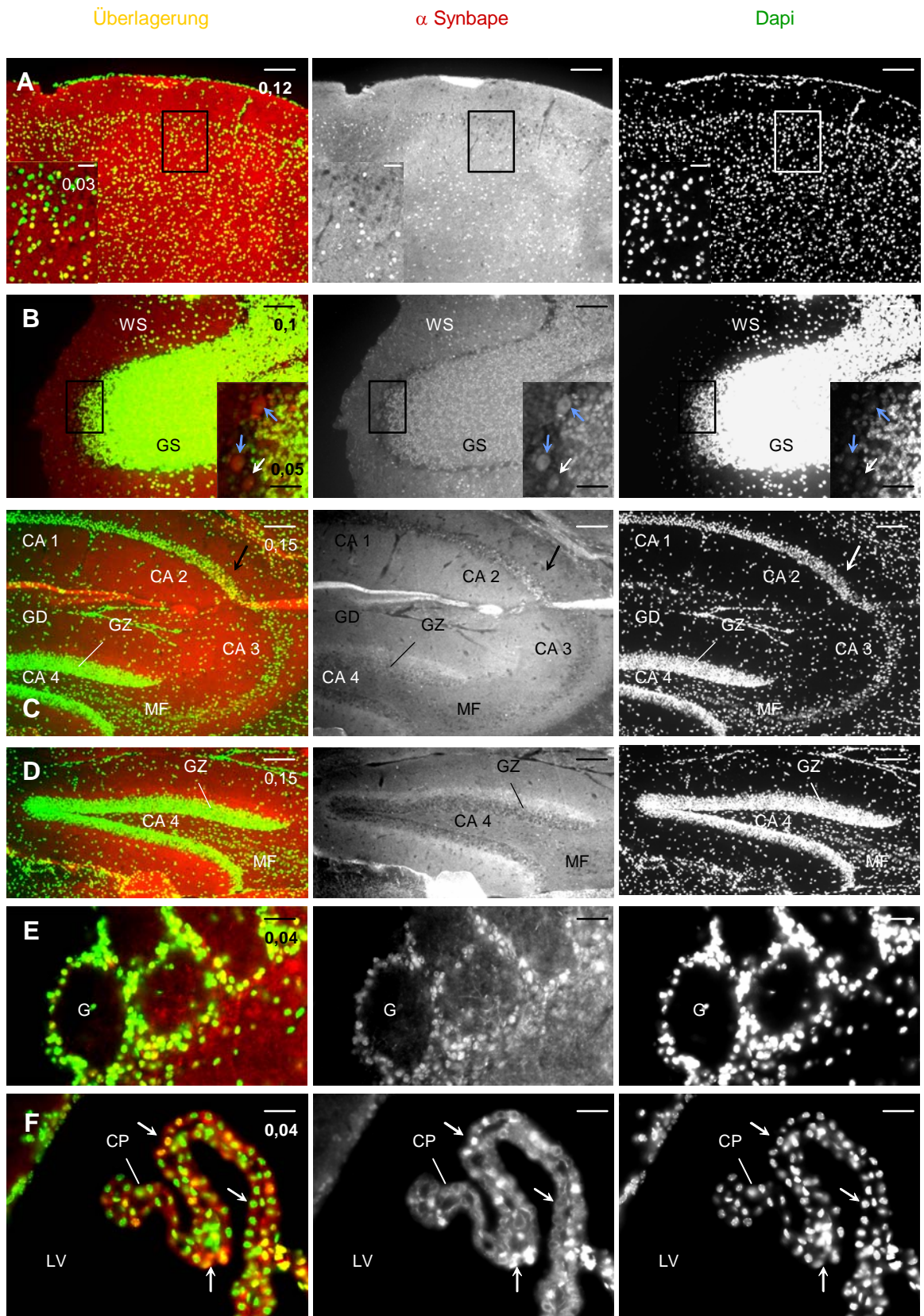
Im Hippocampus (Abbildung 56 C & D) zeigt Synbape verschiedene, bemerkenswerte Muster, so ist eine Häufung des Immunfluoreszenzsignals für Synbape in der CA2-Region zu sehen, nicht aber in den Regionen CA1 und CA3. Die Körnerzellen im Bereich des *Gyrus Dentatus* weisen kaum somatisch oder nuklär lokalisierte Immunreaktivität für Synbape auf. Im Gegensatz dazu ist eine intensivere Immunreaktivität in dem Bereich der Dendriten jener Neurone zu erkennen, die sich entsprechend der geringeren Verästelung der Dendriten in unmittelbarer Nähe der Soma verdichtet. Demgegenüber lassen die Axone der Körnerzellen (Moosfaser, CA-4-Region) keine Anreicherung der Immunreaktivität für Synbape erkennen lassen.

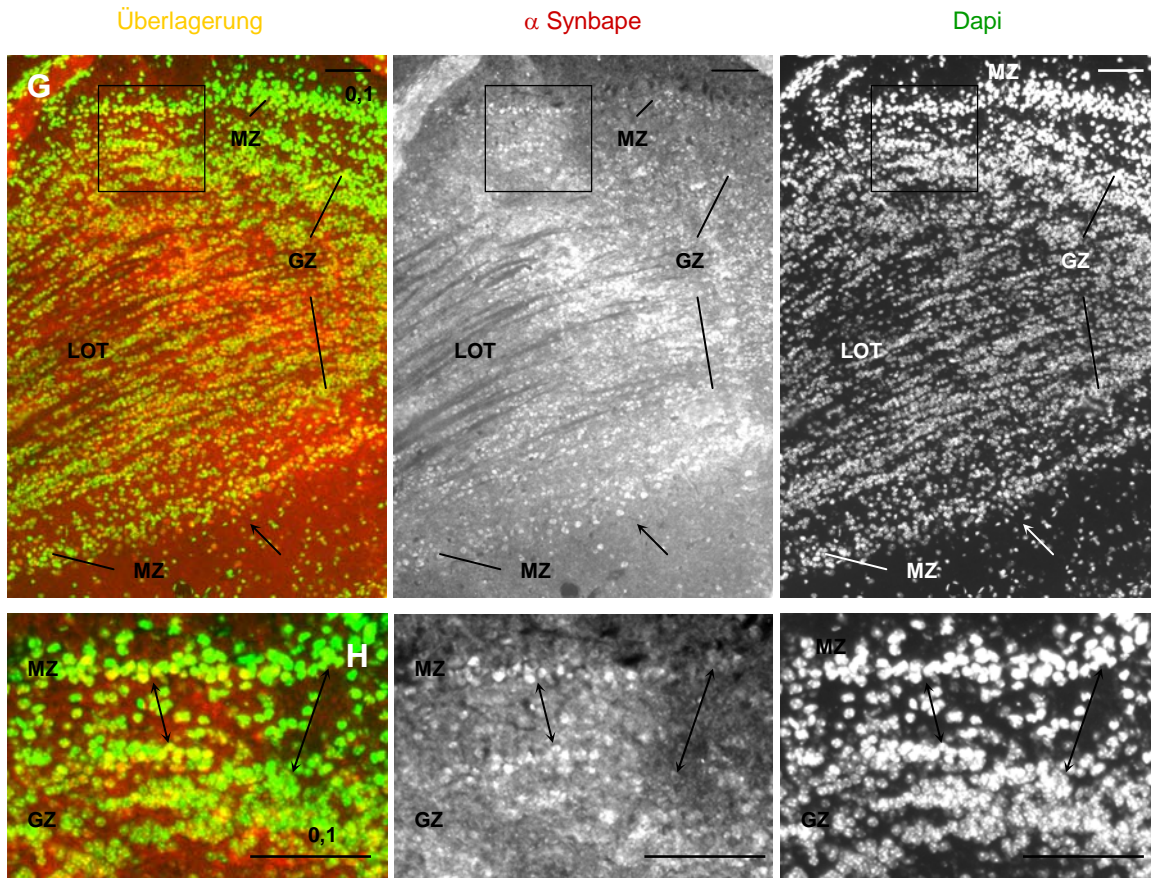
In den *Glomeruli* des *Olfaktorischen Bulbus* weisen die periglomerularen Zellen ein deutliches Fluoreszenzsignal für Synbape auf (Abbildung 56 E), während die Glomeruli selber kaum Signal enthalten. Ferner zeigen die nachfolgenden Zellschichten, d.s. die Mitralzellschicht und die Körnerzellschicht sowie der laterale, olfaktorische Trakt eine relativ gleichmäßige Expression des Proteins (Abbildung 56 G & H). Der *Cori plexus* des Lateralen Ventrikels, welcher den *Liquor* bildet, zeigt ebenfalls eine Expression von Synbape. Wie in anderen Hirnarrealen demonstriert Synbape hier erneut teils eine deutliche Kernlokalisierung und teils nicht (Pfeile in Abbildung 56 F). Die Daten belegen somit das Auftreten von Synbape in neuronalen Zellkernen *in-vivo* und deuten ferner auf eine funktionelle Bedeutung der Kernlokalisierung des Proteins hin. Hierfür ist jedoch ein nuklear-cytoplasmatisches Pendeln Synbapes zu postulieren.

Auf den nächsten beiden Seiten:

Abbildung 56: Synbape ist ubiquitär im Gehirn adulter Mäuse exprimiert

A-F) Die Abbildung zeigt Immunfluoreszenzbilder für verschiedene, sagittale Gehirnschnitte adulter Mäuse (*Mus musculus*). Die Färbungen erfolgten mit α Synbape und Dapi (Zellkernmarkierung). Der Maßstab des jeweiligen Bildes ist in mm angegeben. A) *Cortex*. Die Vergrößerung demonstriert die Variabilität in der nukleären Lokalisation Synbapes. B) *Cerebellum* mit grauer (GS) und weißer Substanz (WS). Die Vergrößerung zeigt für Synbape positive Purkinjezellen am Übergang von weißer und grauer Substanz (Pfeile, Purkinjezellschicht). C) *Hippocampus*. GD = *Gyrus Dentatus*, MF = Moosfaser. Der Pfeil weist auf die Expression Synbapes in der CA2 Region hin, während in den Regionen CA1 und CA3 keine Detektion des Proteins zu erkennen ist. D) *Gyrus Dentatus* mit beginnender Moosfaser (MF) und Körnerzellen (GZ). Es zeigt sich für Synbape eine ausgeprägte Häufung des Fluoreszenzsignals im Bereich der Dendriten der Körnerzellen (GZ). E) *Glomeruli* (G: *Glomerulus*) des *Olfaktorischen Bulbus*. Es zeigt sich eine deutliche Expression Synbapes in periglomerularen Zellen. F) Lateraler Ventrikel (LV) mit *Cori plexus* (CP). Hier kann Synbape ebenfalls nachgewiesen werden. Die Pfeile weisen auf Unterschiede in der Kernlokalisierung Synbapes hin. G) Weitere Zellschichten des *Olfaktorischen Bulbus*. MZ = Mitralzellschicht, GZ = Körnerzellschicht, LOT = Lateraler, olfaktorischer Trakt. Auch hier weisen die Pfeile auf Unterschiede in der Kernlokalisierung Synbapes hin. H) Ausschnittsvergrößerung aus G.





3.5.7.2 Synbap transloziert zwischen Zellkern und Soma

Zusätzlich zu den beiden Kernlokalisationssequenzen weist die Sequenz von Synbap ein Kernexportsignal auf (Absatz 3.5.1), ein Umstand, der möglicherweise auf ein nuclear-cytoplasmatisches Pendeln des Proteins unter *in-vivo*-Verhältnissen hindeutet. Um dies zu untersuchen, wurden Neurone mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen Leptomycin B behandelt (Abbildung 57), ein Cytotoxin, welches den Kernexport durch Bindung an den Exportrezeptor CRM1 blockiert (z.B. Hamamoto *et al.*, 1983; Fukuda *et al.*, 1997; Adachi *et al.*, 2000).

Die Ergebnisse zeigen unter Kontrollverhältnissen zunächst einen durchschnittlichen Anteil von 45% der Immunfluoreszenz für Syndapin I und von 54% der für Synbap im Zellkern. Der geringe Unterschied dieser beiden Werte resultiert dabei zum Einen aus dem Umstand, daß in der Syndapin-I-Färbung das Cytosol auf Grund der nicht-konfokalen Aufnahmen einen gewissen Hintergrund zum Zellkern bildet und zum Anderen daraus, daß nicht alle Neurone Synbap gleichermaßen im Kern zeigen (vergleiche auch Abschnitt 3.5.7.1). Dies ändert sich jedoch unter Leptomycin-B-Anwendung: Während unter Kontrollbedingungen 5 von 12 aufeinanderfolgenden Zellen keine Kernlokalisierung für Synbap aufweisen, ist es nach einer zehnminütigen Applikation von 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Leptomycin B nur noch eine Zelle. Bei Anwendung von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Leptomycin B schließlich befindet sich unter 12

Neuronen keine Zelle mehr, welche keine Kernlokalisierung demonstriert. Darüber hinaus ist für Synbape eine konzentrationsabhängige und signifikante Zunahme des Immunfluoreszenzanteils, welcher auf den Zellkern entfällt, festzustellen: Sie beträgt +11% im Vergleich der niederen Konzentration (0,03 µg/µl Leptomycin B) mit der Kontrolle und noch einmal +9% im Vergleich der höheren Konzentration (0,1 µg/µl Leptomycin B) mit der niederen. Dies entspricht einer relativen Zunahme von +20% im Falle der niederen Konzentration bzw. von +37% im Falle der höheren Konzentration gegenüber der Kontrolle. Im Gegensatz dazu sind in dem Experiment für Syndapin I keinerlei Veränderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu erkennen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Synbape *in-vivo* in den Zellkern importiert wird, nicht jedoch Syndapin I, es kann auch mit dieser Methode nicht im Zellkern nachgewiesen werden. Bei Synbape hingegen belegt die festgestellte Anreicherung Synbapes im Zellkern durch Inhibition des nuklearen Exports ein Pendeln des Proteins zwischen Cytosol und Nukleus unter *in-vivo* Bedingungen.

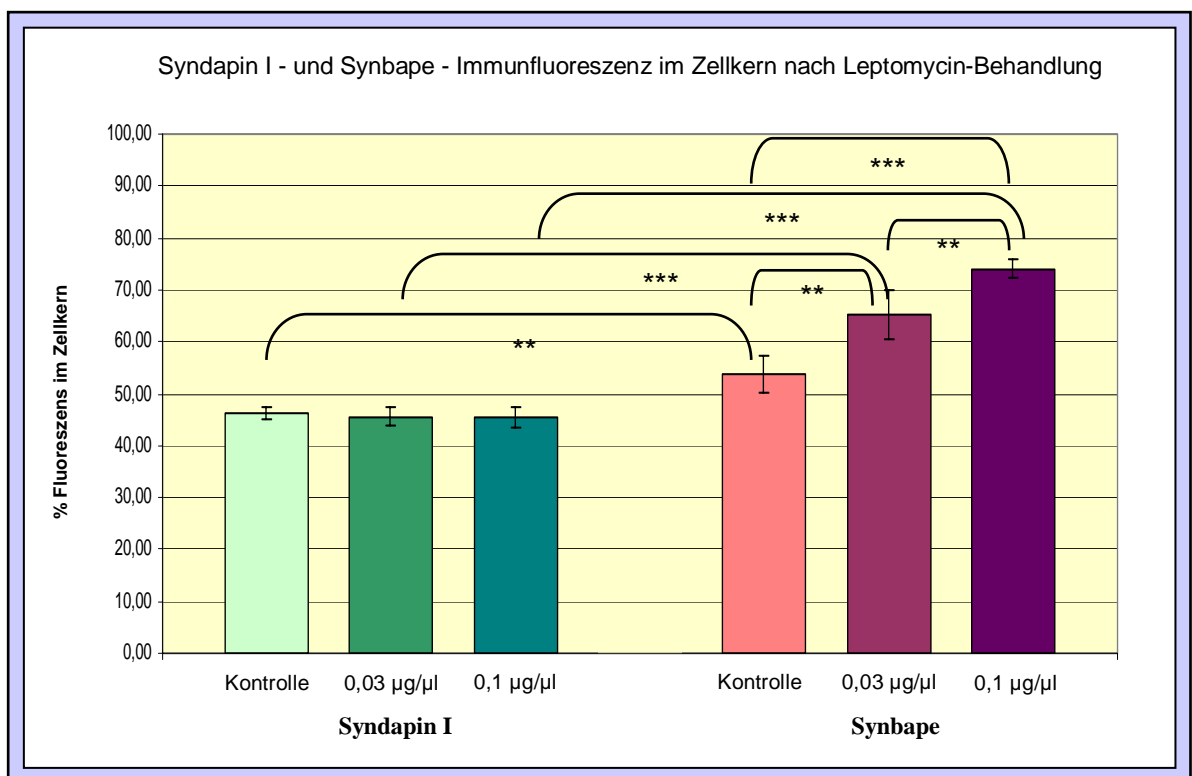


Abbildung 57: Unter Leptomycin-Einwirkung reichert sich Synbape im Zellkern an, nicht jedoch Syndapin I

Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Messungen der Immunfluoreszenz von endogenem Syndapin I und Synbape im Zellkern primärer, hippocampaler Neurone des 21. Tages der *in-vitro*-Kultivierung in geringer Dichte. Hierzu wurden zwei verschiedene Konzentrationen (15 µg bzw. 50 µg je 500 µl Medium entsprechend 0,03 bzw. 0,1 µg/µl) des Cytotoxins Leptomycin B (LMB, dunkle Farbtöne), welches den nuklearen Export endogener Proteine blockiert, eingesetzt und mit der Kontrolle (helle Farbtöne) verglichen. Auf der y-Achse ist der mittlere, prozentuale Anteil der Gesamtimmunfluoreszenz aus Soma und Zellkern gezeigt, welcher auf den Zellkern entfällt. Statistisch relevante Unterschiede sind als signifikant (**) und hoch signifikant (***) angegeben. Der Fehlerbalken repräsentiert das Konfidenzintervall (n (Zellen) = 12). Es ist eine signifikante Zunahme der Immunfluoreszenz für Synbape im Zellkern der Neurone mit steigender Konzentration des Inhibitors festzustellen. Syndapin I hingegen zeigt keine Veränderungen.

3.5.7.3 Die Kernlokalisierung Synbapes kann durch Stimulation oder Inhibition von synaptischer Aktivität beeinflusst werden

Die beobachtete Translokation endogenen Synbapes in den Kern von Neuronen (siehe Abschnitt 3.5.7.2) warf die Frage auf, welche endogenen Faktoren die subzelluläre Verteilung von Synbape beeinflussen können. Eine naheliegende Möglichkeit ist ein Zusammenhang mit der Stimulation oder Inhibition bestimmter Rezeptorklassen wie z.B. der AMPA- oder NMDA-Rezeptoren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden adulte, primäre Neuronenkulturen geringer Dichte biochemisch stimuliert oder inhibiert und die Lokalisation von Synbape analysiert (Abbildung 58).

Dabei zeigt sich, daß sowohl Stimulationen als auch Inhibitionen der beiden angeführten Rezeptorklassen eine hoch signifikante Veränderung der Lokalisation Synbapes gegenüber der Kontrolle verursachen: Während bei Inhibition Synbape gegenüber dem Soma im Zellkern vermindert ist, ist es bei Stimulation vermehrt dort zu finden. Letzteres wird auch durch die Depolarisation der Neurone mit KCl gestützt, sie zeigen keinen Unterschied zu der Glutamatstimulation. Die Inhibitionen von AMPA- oder NMDA-Rezeptoren durch CNQX bzw. APV weisen gleichfalls keinen Unterschied zueinander auf, doch in Kombination wird der Effekt auf die Lokalisation Synbapes signifikant verstärkt, diese wird also durch beide Rezeptorklassen in synergistischer Weise beeinflusst. Die Kontrolle selbst weist eine Verteilung von Synbape zwischen Zellkern und -soma auf, welche nicht ausgeglichen ist, sondern eine Tendenz zu einer vermehrten Kernlokalisierung Synbapes erkennen läßt.

Interessante Unterschiede sind ferner bei einer Kombination aus Stimulation und Inhibition festzustellen; hier zeigen die Experimente eine Bedeutung beider Rezeptorklassen für die Lokalisation Synbapes an, denn die Inhibition von mindestens einem Rezeptortyp bewirkt mindestens eine Nivellierung des Glutamatstimulationseffektes auf Kontrollniveau. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den NMDA-Rezeptoren zu. Hier ist die Inhibition dieser Rezeptorklasse trotz gleichzeitiger Stimulation ausreichend, um eine gegenüber der Kontrolle und der Kombination aus Inhibition der AMPA-Rezeptoren und Stimulation hoch signifikante Verschiebung der Lokalisation von Synbape in das Soma zu erzielen.

Bemerkenswerterweise sind die dargestellten Effekte von Stimulation und Inhibition synaptischer Aktivität auf die Lokalisation von Synbape bereits nach einer relativ kurzen Phase der Behandlung (Abschnitt 2.2.5.3) klar festzustellen. Dies zeigt, daß die Verteilung von Synbape in der Zelle als dynamisch anzusehen ist. In Übereinstimmung hiermit ist die gleiche Zeitspanne ebenfalls ausreichend, um eine Anreicherung Synbapes im Zellkern durch Inhibition des nuklearen Exports (vergleiche Abschnitt 3.5.7.2) zu erreichen.

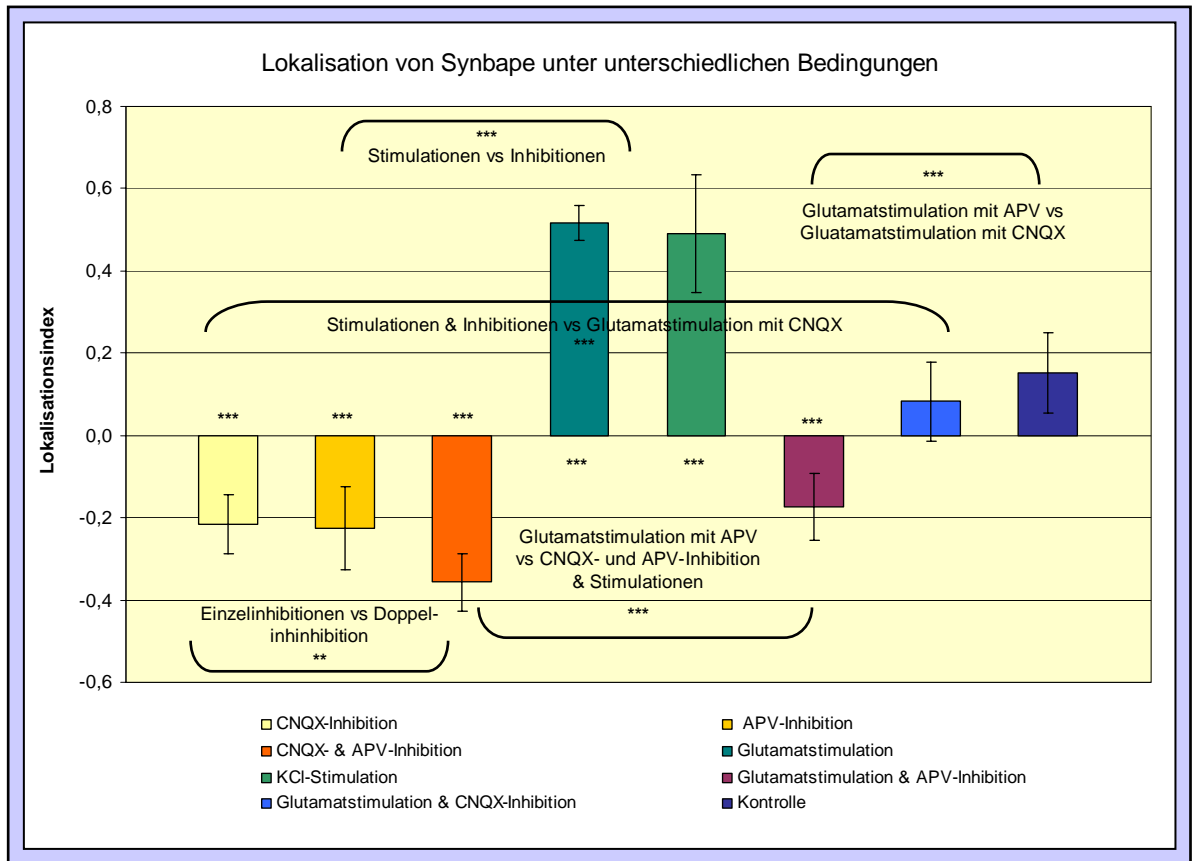


Abbildung 58: Einfluß von Stimulation und Inhibition primärer, hippocampaler Neuronen auf die Verteilung von Synbape

Die Abbildung veranschaulicht die Ergebnisse aus den Stimulations- und Inhibitionsexperimenten mit primären, hippocampalen Neuronen aus dissoziierten Kulturen geringer Dichte des Tags 20 bzw. 21 *in vitro*. Die verwendeten Bedingungen sind in der Legende angegeben. Der Lokalisationsindex beschreibt die Verteilung der Immunreaktivität von endogenem Synbape zwischen Kern und Soma; positive Werte bedeuten eine überwiegende Kernlokalisation, negative eine überwiegende Lokalisation im somato-dendritischen Raum. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall dar. Statistisch relevante Unterschiede sind als signifikant (**, $p < 0,01$) und hoch signifikant (***, $p < 0,001$) angegeben. Keine signifikanten Unterschiede konnten zwischen den beiden Einzelinhibitionen, zwischen den Einzelinhibitionen und der Glutamatstimulation mit APV, zwischen Kontrolle und Glutamatstimulation mit CNQX bzw. zwischen Glutamatstimulation und KCl-Stimulation ermittelt werden. Alle anderen Vergleiche mündeten in signifikanten und hoch signifikanten Differenzen in der vorherrschenden Verteilung von Synbape.

3.5.7.4 Synbape tritt in Nucleoli auf

Die beobachtete, aktivitätsabhängige Translokation von Synbape in den Nucleus wirft die Frage nach ihrer funktionellen Bedeutung auf. Eine Zugangsmöglichkeit zu dieser Frage bietet eine genauere Betrachtung dieser Zellkompartimente: Sie zeigen rundliche Akkumulate des endogenen Proteins (Abbildung 59), wie sie zuvor auch unter Überexpression epitopmarkierter Fusionsproteine beobachtet werden konnten (vergleiche Abschnitt 3.5.5). Darüber hinaus weisen Gliazellen ebenfalls fast immer solche Aggregate auf, während sie in Neuronen in der Regel nur zu bemerken sind, wenn Synbape vermehrt im Zellkern detektiert werden kann. Dies ist bei einer schwachen Mehrheit der Zellen der Fall.

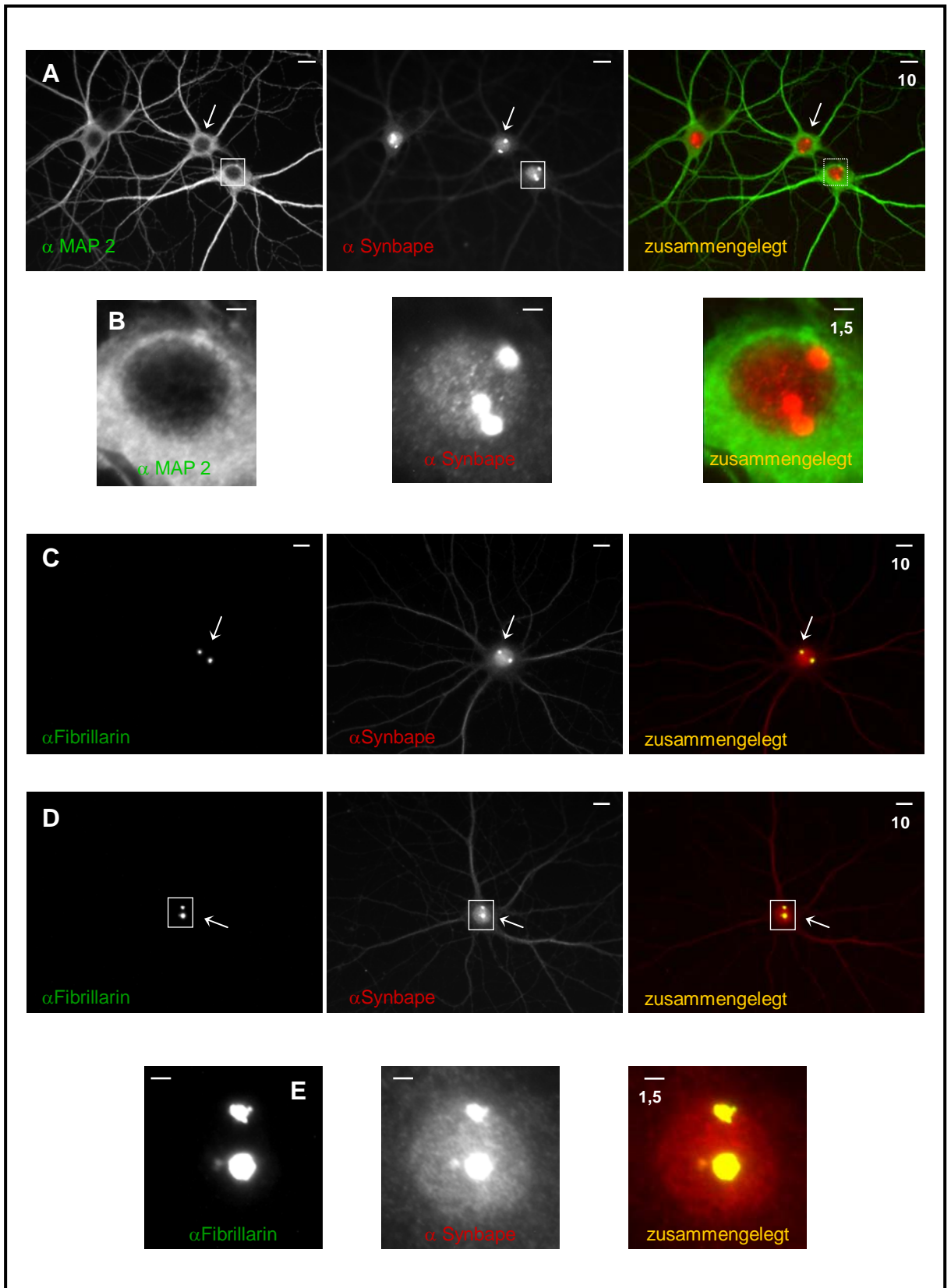
Da diese Akkumulate in Form und räumlicher Ausdehnung an Nucleoli erinnern, wurde eine Co-Immunfärbung für Synbape und den Nucleoli-Marker Fibrillarin, ein Protein, das in die Methylierung der rRNS involviert ist, durchgeführt.

So zeigt sich, daß Synbape in jenen Akkumulaten in der Tat mit Fibrillarin colokalisiert (Abbildung 59 C – E). Daher handelt es sich bei den Subkompartimenten, in welchen Synbapes akkumuliert, um Nucleoli. Bemerkenswerterweise zeigen die Zellen, adulte, hippocampale Neurone aus dissoziierten Kulturen geringer Dichte, meist zwischen 2 und 4 dieser Subkompartimente (Abbildung 59 A & B). Das gleiche Bild ist bei Gliazellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Das Erscheinen von Synbape in Nucleoli deutet auf eine Rolle in der Transkription, RNS-Reifung oder bei der Zusammensetzung der Ribosom-Untereinheiten hin.

Auf der nächsten Seite:

Abbildung 59 : Synbape colokalisiert mit dem Nucleoli-Marker Fibrillarin

Die Aufnahmen zeigen Immunfluoreszenzfärbungen maturer (21 Tage *in vitro*), hippocampaler Neurone (*Rattus norvegicus*) aus dissoziierten Primärkulturen geringer Dichte. Die Zahl unter dem Balken gibt den Maßstab der jeweiligen Abbildung in μm an. Endogenes Fibrillarin ist in Grün dargestellt, während endogenes Synbape in Rot und MAP 2 in Blau zu sehen sind. Die Rechtecke markieren die Bereiche der Ausschnittsvergrößerung. A) Beispiel für eine Synbape-Färbung. Die MAP-2-Färbung markiert die Dendriten und das Soma der Neurone, wobei der Zellkern ausgespart bleibt. Die verhältnismäßig kurze Belichtung für Synbape zeigt, daß der Kern nicht gleichmäßig gefärbt ist, sondern rundliche Akkumulate erhöhter Immunreaktivität aufweist (Pfeil). B) Ausschnittsvergrößerung aus A). C & D) Co-Immunfärbung für Fibrillarin und Synbape. Die Bilder demonstrieren die gute Übereinstimmung der beiden Fluoreszenzsignale und belegen damit die Colokalisation. E) Ausschnittsvergrößerung aus D. Synbape weist eine starke Immunreaktivität in den Fibrillarin-markierten Nucleoli auf.



4 Diskussion

Es konnten mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems eine Reihe von Kandidaten für eine Interaktion mit Mitgliedern der Syndapin-Familie identifiziert und einige von ihnen nachfolgend verifiziert und näher charakterisiert werden. Darunter fand sich mit dem Protein Synbape ein unbekanntes, potentiell Proteine, das hier im Zusammenhang mit seiner Interaktion mit Syndapinen primär beschrieben und charakterisiert wurde. Auf diese Weise konnte nicht nur das Bild der an synaptischen Prozessen beteiligten Proteine ergänzt werden, sondern es konnten auch neue Informationen zu Funktionen der Syndapin-Familie gewonnen werden.

So sind Syndapine bisher vor allem als Verknüpfungsglied an der Schnittstelle von Endocytose und Aktin-Cytosklett beschrieben worden (Qualmann *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1999; Qualmann & Kelly, 2000; Kessels & Qualmann, 2002; DaCosta *et al.*, 2003; Kessels & Qualmann, 2004). Die Analyse der Interaktionen mit EHD 3 sowie mit Synbape den MAPs deuten nun auf eine Rolle der Syndapine in der Rezyklierung (Braun *et al.*, 2005) hin und implizieren außerdem eine Verbindung zu dem Mikrotubuli-Cytoskelett der Zelle.

4.1 Welche Bedeutung hat die Interaktion von Syndapinen und EHD-Proteinen?

Syndapine sind bisher als eine molekulare Verbindung zwischen der Vesikelformierung in der Rezeptor-vermittelten Endocytose und dem Aktin-Cytoskelett charakterisiert worden (Qualmann & Kessels, 2002). EHD-Proteine hingegen fungieren in der Rezyklierung von Rezeptoren und anderen Membranproteinen aus dem endosomalen Recycling-Kompartiment (Mintz *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2001; Galperin *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2005). Die im Rahmen dieser Studie gefundene und verifizierte Interaktion jener beiden Protein-Gruppen legt nun nahe, daß die Syndapin-Familie Teil eines generelleren Mechanismus des Membranumsatzes in der Bildung von Transportvesikeln ist.

So konnte zunächst mittels Analysen im Hefe-zwei-Hybrid-System und Copräzipitationen gezeigt werden, daß nicht nur das gehirnspezifische Syndapin I sondern auch die beiden Splicevarianten von Syndapin II, d.s. Syndapin II l und k, mit EHD-Proteinen interagieren, auch unter kompetitiv-regulativen Bedingungen (Abbildungen 9 und 10). Für Syndapin III, die muskelspezifische Isoform, konnte hingegen keine Interaktion demonstriert werden. Die Interaktionsstudien im Hefe-zwei-Hybrid-System geben Aufschluß über die Ursache: Das Bindungsmotiv für EHD-Proteine ist im Bereich der NPF-Region lokalisiert (Abbildung 9), eine Konsensussequenz, die in Syndapin III nicht vorkommt. In Übereinstimmung hiermit ist in der Copräzipitationsprüfung eine verstärkte Konzentration der Immunreaktivität für EHD-Proteine in dem Eluat von Syndapin II l gegenüber Syndapin II k zu beobachten; diese lange Splicevariante enthält ein zusätzliches NPF-Motiv. Das Ergebnis ist konsistent mit der Charakterisierung der EH-Domänen als

Bindungspartner für NPF-Motive (z.B.: Salcini *et al.*, 1997; Confalonieri & Di Fiore, 2002).

Darüber hinaus legen weiterführende Experimente eine differenzielle Interaktion zwischen den einzelnen Isoformen der beiden Proteine nahe. Copräzipitationsanalysen (Abbildung 11) zeigen daß, während EHD 1 und auch EHD 3 bzw. EHD 4 an beide Syndapin Isoformen bzw. ihre Splicevarianten binden, für EHD 2 keine Interaktion mit einem Mitglied der Syndapin-Familie nachgewiesen werden kann. Eine vergleichende Sequenzanalyse (Braun *et al.*, 2005) der EH-Domänen gibt Hinweise auf die möglichen Gründe: Anhand eines mit der 2. EH-Domäne von Eps15 komplexierten NPF-Motivs des Hrb-Proteins konnte gezeigt werden, daß die Aminosäure der Position M203 jener EH-Domäne einen direkten Kontakt zu dem dem NPF folgenden Leucin herstellt (deBeer *et al.*, 2000). In Analogie hierzu könnten das an der analogen Aminosäureposition in den EHD-Proteinen 1, 3 und 4 lokalisierte Asparagin bzw. Lysin einen Kontakt zu der den NPF-Motiven folgenden Glutamin- bzw. Asparaginsäure der Syndapine vermitteln. Im Gegensatz dazu ist bei EHD2 an der betreffenden Position eine nukleophile Aminosäure (Serin) und in den EH-Domänen von Eps15 und Intersectin, zwei Proteine, welche ebenfalls keine Affinität zu Syndapinen aufweisen (Braun *et al.*, 2005), eine hydrophobe Aminosäure (Methionin, Leucin bzw. Phenylalanin) lokalisiert. Ein weiterer Aminosäureaustausch, welcher die beobachteten Bindungsunterschiede zu den einzelnen Mitgliedern der EHD-Proteinfamilie unterstützen könnte, findet sich an der Position, die in der 2. EH-Domäne von Eps15 V154 entspricht. Die hier lokalisierte Aminosäure ist strikt hydrophob in den EH-Domänen von Eps15 und Intersectin, jedoch azid bei den Proteinen EHD 1, 3 und 4, mit Tryptophan aber hydrophob in EHD 2. Die Lokalisation einer hydrophoben Aminosäure an dieser Position könnte also die Nichtbindung von Eps15, Intersectin und EHD2 an Syndapine stützen.

Interessanterweise korreliert diese differentielle Interaktion von Proteinen der EHD-Familie und Syndapinen mit der Gewebeverteilung dieser Proteine. So zeigen Expressionsanalysen einer Reihe von verschiedenen Geweben für die EHD-Proteine 1, 3 und 4 eine gute Übereinstimmung mit dem Auftreten der Syndapin-Isoformen I und II k bzw. II l. Hingegen tritt EHD2, welches im Gegensatz zu EHD1, 3 und 4 keine starke Assoziation zu Syndapinen aufweist, vornehmlich im Muskel auf, wo jene Syndapine nicht detektiert werden können, dafür jedoch das NPF-lose Syndapin III spezifisch exprimiert ist. Dies könnte auf eine explizite Unterbindung der Interaktion im Zusammenhang mit der Funktion von Muskelgewebe hindeuten.

In über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte durch Mutationsanalysen gezeigt werden, daß in der Tat die NPF-Motive für die Interaktion verantwortlich sind. Durch ein *Blot-Overlay*-Experiment konnte außerdem die durch die Hefe-zwei-Hybrid-Analysen nahegelegte Direktheit der Interaktion unabhängig bestätigt werden, während die *in-vivo*-Relevanz der Interaktion durch heterologe und endogene Co-Immunopräzipitationen, sowie eine Rekonstruktion des Proteinkomplexes an intrazellulären Membranen lebender Zellen demonstriert werden konnte. Dominant-negative Studien mit überexprimierten Bindungsmotiven von Syndapin II bzw.

EHD1 ergaben schließlich eine Inhibition der Rezyklierung von Transferrin in die Plasmamembran, während durch Co-Überexpression der angegriffenen Proteinkomponente der Effekt nivelliert werden konnte. Damit erweisen sich Syndapin-EHD-Komplexe als bedeutsam für die endocytotische Rezyklierung von Rezeptoren (Braun *et al.*, 2005).

Die Interaktion von Syndapinen mit EHD-Proteinen zeigt, daß Syndapine nicht nur durch ihre Interaktion mit Dynamin in die Endocytose und über eine Assoziation mit E2 und Rix in die Ubiquitinylierung sondern auch in die endosomale Rezyklierung von Proteinen involviert sein können. Diese ubiquitäre Rolle der Syndapine im Zusammenhang mit Membranumsätzen und Vesikelformierung könnte auf der durch ihre Interaktion mit N-WASP, einem potenten Aktivator des Arp2/3-Komplexes, ermöglichten Verbindung zu dem Aktin-Cytoskelett beruhen. Um diese Funktion zu erfüllen, ist eine simultane Bindung mehrerer Interaktionspartner erforderlich. Da die Interaktion mit EHD-Proteinen über die NPF-Motive Syndapins vermittelt wird, alle anderen, bisher beschriebenen Interaktionspartner jedoch an die SH3-Domäne binden, ist eine Vernetzung von endosomaler Rezyklierung und Aktin-Cytoskelett möglich. Eine weitere Möglichkeit zu einer solchen Verknüpfung bietet die Fähigkeit der Syndapine, über ihren N-Terminus (Δ NPF, Δ SH3) zu dimerisieren. Durch die damit verbundene Erhöhung der Anzahl der möglichen Verknüpfungen des EHD/Syndapin-Komplexes mit weiteren Interaktionspartnern könnten Syndapine als molekulare Basis für die Formierung dynamischer, multivalenter Gerüste nicht nur an der Plasmamembran sondern auch an der Membran des endosomalen Rezyklierungskompartiments fungieren. Die Akkumulation von sowohl Syndapin I als auch EHD-Proteinen in synaptischen Regionen (Abbildung 12), ihre Detektion in postsynaptischen Kompartimenten (Abbildung 45; Braun *et al.*, 2005) und die Involvierung von EHD-Proteinen in die Rezyklierung von AMPA-Rezeptoren (Park *et al.*, 2004) deuten dabei auf eine Rolle des EHD/Syndapin-Komplexes in der Verwirklichung von synaptischer Plastizität hin.

4.2 Rhotekin 2 – eine Verknüpfung von Syndapinen und Membranen?

Die bisher dargelegte Involvierung Syndapins in Membranumsätze und die Vesikelformierung oder die Rezyklierung von Rezeptoren impliziert eine weitere Fähigkeit Syndapins, nämlich eine Verbindung zwischen Membran und z.B. dem Aktincytoskelett der Zelle herstellen zu können. Eine solche Möglichkeit bietet das Protein Rhotekin 2.

Durch eine Reihe von Copräzipitationsanalysen konnte gezeigt werden, daß die SH3-Domäne der Syndapin-Isoformen I und II mit dem murinen Rhotekin 2 interagiert, die Assoziation direkt ist und die Bindung durch ein Motiv im Bereich der letzten 215 Aminosäuren von Rhotekin 2 vermittelt wird, wo mit der Sequenz KRKKRRAPLPP ein charakteristisches Interaktionsmotiv für eine solche Assoziation mit der SH3-Domäne der Syndapine lokalisiert ist (Abbildungen 14 - 16). Dieser

Befund ist konsistent mit den im Hefe-zwei-Hybrid-System ermittelten Daten, welche für zwei unabhängige Klone, die für das Protein Rhotekin 2 kodieren, ebenfalls eine direkte Interaktion mit der SH3-Domäne Syndapins demonstrieren. Durch eine Mutationsanalyse des Bindungsmotivs könnten diese Ergebnisse ergänzt werden.

Verschiedene Hinweise auf die *in-vivo*-Relevanz der Interaktion von Syndapinen und Rhotekin 2 liegen ebenfalls vor. So zeigt beispielsweise die Untersuchung von unterschiedlichen Rattengeweben eine übereinstimmende Expression von Rhotekin 2 (Abbildungen 18 I und 22) und Syndapin I sowie II k (Qualmann *et al.*, 1999, Qualmann & Kelly, 2000; Modregger *et al.*, 2000) im Gehirn, während Rhotekin 2 darüber hinaus noch im Testis deutlich und in der Lunge geringfügig exprimiert ist, wo Syndapin II gleichfalls nachgewiesen werden kann (Modregger *et al.*, 2000). Daher ist eine Interaktion der beiden Proteine in diesen Geweben möglich. Eine Assoziation mit der Isoform Syndapin III, welche auf Grund der hohen Homologie der SH3-Domänen vermutet werden kann, kann jedoch auf der Basis dieser Daten als irrelevant betrachtet werden, da Syndapin III muskelspezifisch ist und Rhotekin 2 in diesem Gewebe nicht nachgewiesen werden konnte. Für menschliches Rhotekin 2 (bei beiden Rhotekinen handelt es sich um die Splicevariante RTKN 2a; siehe auch Tabelle 2 des Anhangs) konnte eine Expression in Muskelgewebe auf der Basis von RT-PCRs ebenfalls nicht nachgewiesen werden, während im Gehirn eine deutliche Expression dieses Proteins detektiert wurde (Collier *et al.*, 2004).

Die Analyse der subzellulären Verteilung Rhotekins in Neuronen stützt die *in-vivo*-Relevanz der Interaktion von Syndapinen und Rhotekin 2 ebenfalls. Durch biochemische Fraktionierungsanalysen konnte das gemeinsame Vorkommen von Rhotekin 2 und den Syndapin-Isoformen I und II in Fraktionen wie die der Synaptosomen, der Synaptischen Membranen und der PSD demonstriert werden (Abbildungen 39 III & IV und 20). In Immunfluoreszenzfärbungen zeigt die subzelluläre Lokalisation von Rhotekin ein ähnliches Muster wie die von Syndapin I, beide Proteine können z.B. in dendritisch-somatischen Zellkompartimenten (Abbildungen 19 und 44 & 45), aber auch in Wachstumskegeln (Abbildungen 44 und 19 II) detektiert werden. In Übereinstimmung hiermit zeigen Colokalisationsstudien (Abbildung 24) in maturen, hippocampalen Neuronen gleichfalls ein gemeinsames Auftreten von Rhotekin 2 und Syndapin I besonders in postsynaptischen Kompartimenten. Interessanterweise deuten die Beobachtungen und Fluoreszenzmessungen ferner auf eine Zunahme der Colokalisation der beiden Proteine in dendritischen Kompartimenten in Folge von Glutamatstimulation hin. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Rolle der Syndapine in Membranumsätzen bei der Vesikelformierung und der Rezeptor-Rezyklierung (vergleiche Absatz 4.2); hier kann durch die Stimulation eine Steigerung der Umsatzrate von Membranen und Transportvesikeln angenommen werden und damit die Zunahme einer Interaktion mit einem Protein, welches als ein Verbindungsglied zwischen Membranen (siehe weiter unten) und Syndapinen, organisatorischen und vernetzenden Komponenten der Endocytose- bzw.

Rezyklierungsmaschinerie, angesehen werden kann.

Für eine derartige Membranassoziation Rhotekins sprechen sowohl die Sequenzanalyse als auch die biochemische Charakterisierung des Proteins. So zeigt die Analyse der Proteinstruktur an der Position 279 bis 384 eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) auf, eine Struktur, deren genaue Funktion bisher zwar nicht geklärt ist, die jedoch über eine Phosphoinositid-Bindung eine Assoziation des Proteins mit Membranen bewerkstelligen kann (z.B. Maffucci & Falasca, 2001; Rossman *et al.*, 2003). Darüber hinaus enthält Rhotekin 2 mit der im Bereich der Aminosäuren 12 bis 84 positionierten HR1-Domäne eine Struktur, welche für eine Membraneinbettung in Betracht kommt: Die HR1-Domäne zeichnet sich durch eine ausgedehnte und zu 45% aus hydrophoben bzw. unpolaren Aminosäuren bestehende, α -helikale Sekundärstruktur aus, die damit als Membrananker fungieren könnte. Ein erstes Indiez für eine solche Funktion gibt der Umstand, daß sich rekombinante Proteine, welche diesen Teil von Rhotekin 2 enthalten (AS 1-279), im Gegensatz zu solchen, welche nur die PH-Domäne (AS 279-386) umfassen, aus HEK-Zellysaten quasi nicht extrahieren ließen (vergleiche Abbildung 15). Entsprechend zeigt auch die Zellfraktionierungsuntersuchung (Abbildung 20) eine ausgeprägte Anreicherung des Proteins Rhotekin 2 an synaptischen Membranen und eine experimentelle Analyse der Membranassoziation von Rhotekin 2 (Abbildung 21) klassifiziert es schließlich als integrales Membranprotein.

Interessanterweise wurden darüber hinaus in der Membranassoziationsanalyse bei der Solubilisation mit hoher Salzkonzentration und hohem pH-Wert zusätzlich Banden in der etwaigen Größe eines Dimers beobachtet. Tatsächlich besteht die Möglichkeit der Dimerbildung von Rhotekinen durch eine parallele Anlagerung zweier HR-Domänen (Shimizu *et al.* 2003). Daher könnte die Membranassoziation von Rhotekin 2 durch eine Dimerbildung reguliert sein. Nach dieser Hypothese würde Rhotekin 2 im monomeren Zustand als integrales Membranprotein vorliegen, von dem lediglich der C-Terminus für Interaktionen (z.B. mit Syndapinen) zur Verfügung steht, während die PH-Domäne über eine Phosphoinositid-Bindung an die Membran gebunden und die HR1-Domäne in die Membran integriert ist. Erfolgt eine Dimerisierung zweier Rhotekine, so würde die HR1-Domäne nicht mehr für die Membranintegration zur Verfügung stehen und das Protein nur noch über die PH-Domäne mit der Membran verbunden sein. In Übereinstimmung hiermit steht der Umstand, daß sich die postulierten Dimere in der Membranassoziationsanalyse wie periphere Membranproteine, nicht aber wie integrale verhalten. Schließlich ist auch eine möglicherweise durch weitere Proteine regulierte Dissoziation der Dimere von der Membran denkbar. Eine solche Membrandissoziation wurde durch zwei weitere Befunde bestätigt: Zum Einen zeigt die Proteinstruktur mit den Sequenzen KKVLSPIGEPAPDGKRRK und KRKKRR an der Position 475 ff. zwei ineinanderübergehende, charakteristische Kernlokalisationssignale und das endogene Protein kann dementsprechend durch Immunfluoreszenzfärbungen im Nukleus von Neuronen nachgewiesen werden. Zum Anderen deutet das Stimulationsexperiment (Abbildung 25) auf eine von der

synaptischen Aktivität, insbesondere der Stimulation von AMPA-Rezeptoren, abhängige Translokation des Proteins aus dem Zellkern in das Soma hin, wo unter diesen Umständen auch eine erhöhte Colokalisation mit Syndapin beobachtet werden kann (Abbildung 24). Dies ist konsistent mit der Überlegung, daß eine Syndapinbindung die Kernlokalisierungssignale durch deren unmittelbare Nachbarschaft zu dem Bindungsmotiv für die Syndapin-SH3-Domäne sterisch blockieren könnte: Eine Assoziation mit Syndapin würde Rhotekin im Soma der Zelle halten. Daraus läßt sich die Hypothese aufstellen, daß Rhotekin 2 als Monomer über eine Interaktion mit Syndapinen eine Verknüpfung von Membranen und Aktin-Cytoskelett herstellen kann, welche beispielsweise bei der Formierung von Vesikeln in Folge synaptischer Aktivität von Bedeutung sein könnte, während es im Ruhezustand möglicherweise als Dimer oder durch weitere Interaktionspartner monomerisiert im Zellkern lokalisiert ist. Da Syndapin I jedoch nicht im Zellkern nachweisbar ist, bleibt die Interaktion der beiden Proteine höchstwahrscheinlich auf das Soma beschränkt. Auf Grund der unterschiedlichen Lokalisation des putativen Dimerisierungsmotivs und des Syndapinbindungsmotivs ist ein Einfluß der Dimer- bzw. Monomerisierung von Rhotekinen auf die Assoziation mit Syndapinen nicht zu erwarten. Durch Copräzipitationsstudien mit unterschiedlich markierten Rhotekinen und Rhotekin-Fragmenten sowie Solubilitätsanalysen aus verschiedenen Rhotekin-Fragmente überexprimierenden Zellen könnte dieses Modell verifiziert werden.

Außerdem besteht die Möglichkeit einer HR1-Domänen vermittelten Interaktion mit dem G-Protein Rho, wie sie für Rhotekin 1 nachgewiesen werden konnte (Reid *et al.*, 1996). Proteine der Rho-Familie fungieren auf vielfältige Weise in der Regulation von Aktin- und Mikrotubuli-Cytoskelett und sind so z.B. auch in die Dynamik dendritischer Dornen involviert (Newley *et al.*, 2004). Weitere Studien mit dieser Isoform zeigen außerdem eine Assoziation mit TIP1 (Tax (humanes T-Zellen Leukämie Virus Typ 1 Protein) *interacting protein 1*), einem PDZ-Domänen-Protein, und demonstrieren, daß es sich bei Rhotekin 1 und TIP1 um Bestandteile einer Signalkaskade handelt, welche durch eine Komplexierung mit aktiviertem Rho über weitere, bisher unbekannte Bestandteile eine maximale Aktivierung des SRE (Serum Responsiv Element) im Nukleus bewirken (Reynaud *et al.*, 2000). Das SRE schließlich kann in Kombination mit Transkriptionsfaktoren unterschiedliche Genpromotoren aktivieren. Im Hinblick auf eine solche potentielle Signaltransduktionsfunktion der HR-Domäne bestehen jedoch zwei entscheidende Unterschiede zwischen Rhotekin 2 und Rhotekin 1: Zum Einen enthält Rhotekin 1 im Gegensatz zu Rhotekin 2 kein Kernlokalisierungssignal, Rhotekin 2 könnte daher im Gegensatz zu Rhotekin 1 selbst als Genaktivator fungieren, und zum Anderen ist die Konsensussequenz für die Interaktion mit der PDZ-Domäne von TIP1 zwischen Rhotekin 1 und Rhotekin 2 nicht konserviert. Daher ist eine Interaktion von TIP1 und Rhotekin 2 unwahrscheinlich und damit eine Aktivierung des SRE durch Rhotekin 2 fraglich. Somit ist eine experimentelle Analyse der Funktion der HR1-Domäne von Rhotekin 2, insbesondere im Hinblick auf eine Assoziation mit Rho und/oder eine

Selbstassoziation, von großem Interesse. Copräzipitationsstudien mit präparierten Kernen können in Verbindung mit Massenspektrometrie zur Klärung der Funktion der Kernlokalisation von Rhotekin 2 beitragen.

4.3 Welche Bedeutung kommt einer Verbindung von Syndapinen mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen zu?

Mehrere Interaktionspartner von Syndapin, welche in dieser Studie identifiziert werden konnten, gehören zu der Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine; es sind dies MAP 1a, MAP 2 und MAP 1s. Die Proteine dieser Familie sind an die Oberfläche der Mikrotubuli gebunden, stabilisieren sie und tragen zu ihrer Formierung und Ausrichtung bei (z.B. Marx *et al.*, 2000).

In einer Reihe von unterschiedlichen Copräzipitationsprüfungen konnte die Interaktion von Syndapinen und den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen bestätigt werden, auch unter kompetitiv-regulativen Bedingungen (Abbildungen 26, 27 und 33). Bei allen untersuchten Mikrotubuli-assoziierten Proteinen konnten darüber hinaus mehrere, verschiedene Motive identifiziert werden, welche als Konsensussequenz für eine Interaktion mit der SH3-Domäne von Syndapinen in Betracht kommen. In Übereinstimmung mit diesem Befund demonstrieren sowohl MAP 2 als auch MAP 1s eine spezifische Copräzipitation mit der SH3-Domäne Syndapins und zeigen entsprechend der hohen Homologie dieser Domänen keinen Unterschied in der Affinität zu den Syndapin-Isoformen I oder II (Abbildungen 27 und 32). Interessanterweise sind sowohl das zwischen Mensch und Maus konservierte Interaktionsmotiv von MAP 1s als auch die beiden in MAP 2 ermittelten Motive im Vergleich zu allen anderen untersuchten Syndapin-SH3-Domänen-Interaktionsmotiven invers angeordnet (Abbildung 16). Dies gilt ebenfalls für das zweite potentielle Syndapin-SH3-Domänen-Interaktionsmotiv des mittels des Hefe-zwei-Hybrid-Systems identifizierten MAP-1a-Fragments. Mutationsanalysen könnten aufklären, welche dieser Motive eine Syndapin-Bindung vermitteln.

Darüber hinaus liegen verschiedene Hinweise auf die *in-vivo*-Relevanz der Interaktion von Syndapinen mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen vor. Subzelluläre Fraktionierungen etwa zeigen, daß sowohl die Syndapin-Isoformen I und II als auch das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 in Gehirngewebe in den gleichen subzellulären Kompartimenten, d.s. beispielsweise die Fraktion der löslichen Proteine, der Synaptischen Membranen und der PSD, nachgewiesen werden können (Abbildungen 28 - 30). Eine Colokalisationsstudie mit Syndapin I und MAP 2 in adulten, hippocampalen Neuronen (Abbildung 31) bestätigt diesen Befund ebenfalls. Damit ist eine Interaktion dieser Proteine im zellulären Kontext möglich und könnte beispielsweise durch Copräzipitationsprüfungen mit endogenem Material experimentell analysiert werden. Interessanterweise ist die dargestellte Colokalisation von Syndapin I und MAP 2 nach einer zehnminütigen Inhibition der Neuronenkultur mit 100 µM CNQX besonders deutlich. Dieser Aspekt könnte auf

eine funktionelle Bedeutung der Interaktion von Syndapin I und MAP 2 im Zusammenhang mit der Signalübertragung an chemischen Synapsen hindeuten. Diese Überlegung steht in Einklang mit der Detektion der beiden Proteine in der Fraktion der PSD. Eine Verbindung zwischen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen bzw. dem Mikrotubuli-Cytoskelett und Kalziumsignalen könnte hierbei das Kalziumsensorprotein Calmodulin darstellen, so konnte z.B. eine Interaktion von Calmodulin und MAP 1a nachgewiesen werden (Seidenbecher *et al.*, 2004).

Bisher sind Syndapine hauptsächlich im Zusammenhang mit der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts bei endocytotischen Prozessen, nicht jedoch mit der des Mikrotubuli-Cytoskeletts, charakterisiert worden. Die hier aufgezeigte Interaktion von Syndapinen und MAPs legt zudem eine Verknüpfung der beiden Cytoskelettsysteme und ihrer unterschiedlichen Dynamik mit Syndapinen als Schaltstelle nahe, da sie durch ihre Fähigkeit zu dimerisieren auch zwei über die SH3-Domäne regulierte Systeme gleichzeitig beeinflussen können. Allerdings gibt es Hinweise, daß eine solche Verknüpfung direkt über MAPs möglich ist; MAP 2 beispielsweise kann nicht nur an Mikrotubuli binden, sondern auch an filamentöses Aktin (z.B. Dehmelt & Halpain, 2004). Somit könnten Syndapine auf Grund ihrer Interaktion mit MAPs und N-WASP als Koordinatoren oder Regulatoren der Cytoskelettsysteme bei dynamischen Prozessen wie der Vesikelformation oder dem Vesikeltransport fungieren. Andererseits könnten sie aber auch Bestandteil eines transportierten Komplexes sein. Beide Thesen sind konsistent mit der beobachteten Lokalisation von Syndapinen entlang von Mikrotubuli (Abbildungen 31, 44 und 45).

4.4 Synbape – ein Signal zwischen Syndapinen und Nukleus?

Mit dem Protein Synbape konnte ein unbekanntes, potentiell Protein identifiziert werden, das eine robuste Interaktion mit der SH3-Domäne der Syndapine zeigt. Dies konnte in vielfältigen Experimenten demonstriert werden. So zeigen Copräzipitationen mit überexprimierten GFP-Synbape-Fusionsproteinen eine Interaktion zwischen der SH3-Domäne Syndapins und einem Motiv im Bereich der letzten 107 Aminosäuren Synbapes an. In Einklang mit der hohen Homologie der SH3-Domänen binden dabei *in vitro* alle drei Syndapin-Isoformen sowie die beiden Splicevarianten von Syndapin II gleichermaßen rekombinantes Synbape (Abbildungen 35 und 36). Außerdem konnte die Interaktion als direkt charakterisiert werden (Abbildung 37). Alle diese Ergebnisse sind konsistent mit den Daten aus den Hefe-zwei-Hybridscreenen (Abschnitt 3.5.2), welche gleichfalls eine direkte Interaktion zwischen Synbape und der SH3-Domäne von Syndapin I belegen, mit der Struktur der dabei gefundenen Klone (Abbildung 34), die auf ein Interaktionsmotiv im Bereich der letzten 224 AS Synbapes hinweist und der Sequenzanalyse (Abbildung 16), welche ein Bindungsmotiv für die SH3-Domäne Syndapins an der Position 281 von Synbape anzeigt. Da es sich bei diesem Motiv jedoch um ein verschachteltes handelt, das als einzig bisher identifiziertes Syndapin-

Interaktionsmotiv zwei übergreifende PxxP-Motive beinhaltet, stellt sich die Frage, welche jener Aminosäuren für die Assoziation mit Syndapinen verantwortlich sind. Dies könnte durch eine Mutationsanalyse experimentell untersucht werden.

Bezüglich der *in-vivo*-Relevanz der demonstrierten Assoziation von Syndapinen und Synbape konnte mit diversen Methoden gezeigt werden, daß die die beiden Proteine tatsächlich *in vivo* interagieren können. So weist die Gewebeverteilung von Synbape und Syndapinen eine Co-Expression von Synbape und Syndapin I und Syndapin II k im Gehirn und bzw. von Synbape und den beiden Splicevarianten von Syndapin II im Testis aus. Eine *in-vivo* Relevanz der *in-vitro* gefundenen Interaktion von Syndapin III und Synbape erscheint hingegen unwahrscheinlich, da Syndapin III muskelspezifisch ist, während Synbape in diesem Gewebe nicht nachgewiesen werden kann (Abbildung 39 I; Qualmann *et al.*, 1999; Modregger *et al.*, 2000).

Durch Translokationsstudien mit überexprimierten GFP-Synbape-Fusionsproteinen in primären, hippocampalen Neuronen, konnte sodann demonstriert werden, daß der Synbape-Syndapin-I-Komplex auch im zellulären Kontext Bestand hat und die Assoziation der beiden Proteine stark genug ist, daß der Proteinkomplex über einen unbekanntes Cargomechanismus durch die Kernporen in den Zellkern hinein transportiert werden kann. Als alternative Erklärung für die Colokalisation der beiden Proteine im Zellkern käme ein nukleäres Auftreten von Syndapin I in geringen Mengen in Betracht, welche durch die Überexpression Synbapes an distinkten Orten konzentriert und damit in der Immunfluoreszenz sichtbar werden. Hierfür konnte jedoch weder durch Kernpräparationen (Abbildung 54) noch durch eine Inhibition des Proteinexports aus dem Zellkern (Abbildung 57) ein experimenteller Beleg erbracht werden, so daß diese Erklärung als unwahrscheinlich einzustufen ist, wenn sie auch auf Grund der zeitlichen Differenz zwischen der 10 Minuten dauernden Inhibition des Kernexports und der 2 bis 3 Tage währenden Überexpression nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Der Bestand des Syndapin-I-Synbape-Komplexes unter den kompetitiv-regulativen Bedingungen des zellulären Kontextes wird außerdem noch durch die unabhängige Methode der heterologen Co-Immunpräzipitation demonstriert. Das Vorliegen von einer Interaktion von Syndapin I und Synbape vortäuschenden Postsolubilisationsartefakten, die bei Co-Immunpräzipitationen theoretisch auftreten können, ist durch die Translokationsstudien ausgeschlossen, da diese im Gegensatz zu Co-Immunpräzipitationen in lebenden Zellen durchgeführt werden.

Durch eine endogene Co-Immunpräzipitationen mit Proteinen des Rattengehirncytosols konnte schließlich auch die Interaktion von natürlichem Syndapin I und Synbape nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wird außerdem durch die Colokalisationsstudien mit diesen beiden Proteinen gestützt, sie belegen ein zeitlich-räumliches Zusammenkommen von Synbape und Syndapin I *in vivo*, so etwa in dendritisch-somatischen Kompartimenten, vor allem entlang von Mikrotubuli-Filamenten, in dendritischen Dornfortsätzen und Wachstumskegeln (Abbildungen 44 und 45). Auffällig ist dabei, daß die Colokalisation besonders

deutlich in den Spitzen der Wachstumskegel ist, wo die Immunreaktivität für beide Proteine stark konzentriert ist. Da hier der Umsatz des Aktincytoskeletts besonders hoch ist und außerdem zur Lenkung des Axons entlang der extrazellulären Bahndungsproteine eine Koordination von Actin-Cytoskelett und Mikrotubuli-Cytoskelett erforderlich ist (einen Überblick geben Zhou & Cohan, 2004), könnte Syndapin hier als Regulator und Verknüpfer von besonderer Bedeutung sein. Dies ist konsistent mit den in Abschnitt 4.4 erläuterten Interaktionen von Syndapin I und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen und der publizierten Colokalisation von filamentösem Aktin und dynamischen Mikrotubuli in Wachstumsspitzen (Schaefer *et al.*, 2002). Da ferner Synbape ebenfalls mit Mikrotubuli colokalisiert und in Copräzipitationsexperimenten und endogenen Co-Immunpräzipitationsanalysen spezifisch mit MAP 2 assoziiert (Daten nicht gezeigt), ist eine Bedeutung der Interaktion von Synbape und Syndapin I in Verbindung mit Rearrangements der Cytoskelette und ihrer Koordination in der Zelle plausibel.

Vor diesem Hintergrund erscheint eine Funktion der Interaktion von Syndapin I und Synbape in der Kontrolle des Cytoskeletts beispielsweise von Filopodien und anderen dendritischen Dornfortsätzen sehr wahrscheinlich. Tatsächlich kann dies durch eine Reihe von Daten über die beiden Proteine und ihren Einfluß auf Dornen demonstriert werden. Dabei sind insgesamt zwei unterschiedliche Trends in den Effekten der beiden Proteine zu beobachten: Während Syndapin I hauptsächlich die Vergrößerung der Köpfe pilzförmiger Dornfortsätze zu Lasten der Hälse bewirkt, zeigt Synbape eher eine Halsverlängerung (Abbildung 46). Bei den pilzförmigen Dornen zeigen beide Proteine zusammen einen additiven bzw. synergistischen Effekt auf: Die pilzförmigen Dornen ähneln Luftballons, sie haben lange Hälse und dicke Köpfe, was sich in einer deutlichen Verlängerung der pilzförmigen Dornen widerspiegelt. Daneben treten bei Einzelexpression der beiden Proteine in hoher Anzahl abnormal verzweigte Dornfortsätze mit pilzförmigen Charakter auf, welche jedoch unter Cotransfektion nicht mehr in solchen Ausmaßen beobachtet werden können. Im Vergleich dazu kann durch die Co-Überexpression von Synbape und der SH3-Domäne von Syndapin I eine partielle Wiederherstellung des Kontroll-Phänotyps erreicht werden. Dies zeigt, daß tatsächlich eine durch die SH3-Domäne Syndapins vermittelte Interaktion der beiden Proteine für die beobachteten Co-Überexpressionsphänotypen verantwortlich ist. Drei verschiedene Hypothesen können mechanistische Erklärungen für die festgestellten, morphologischen Effekte bieten:

Nach der ersten Hypothese würde endogenes Syndapin I durch die Überexpression Synbapes in den dendritischen Dornfortsätzen depletiert und durch die Kernlokalisierung Synbapes delokalisiert. Dieses Modell entspricht damit den in den Abbildungen 41 und 42 dargestellten Vorgängen unter Überexpression von rekombinantem Synbape. Es könnte nicht nur die veränderten Dornfortsätze unter Überexpression von Synbape, sondern auch die Annäherung an die Kontrollverhältnisse unter Co-Überexpression mit der SH3-Domäne erklären, denn

in diesem letzteren Fall würde die SH3-Domäne mit endogenem Syndapin um eine Synbape-Bindung konkurrieren und somit die Delokalisation endogenen Syndapins reduzieren. Bei der Co-Überexpression von Synbape und Syndapin I muß für dieses Modell jedoch postuliert werden, daß die Expression von Synbape höher ist als diejenige von Syndapin I, so daß immernoch endogenes Syndapin I depletiert werden kann. Tatsächlich ist dies in den Immunfluoreszenzfärbungen zu beobachten, die GFP-Fluoreszenz erscheint deutlich intensiver als die von Xpress-Syndapin I. Gegen das Modell spricht allerdings, daß unter diesen Bedingungen eine signifikante Verstärkung der durch rekombinantes Synbape verursachten Effekte festzustellen ist und nicht die gleichen oder rückläufige Effekte beobachtet werden wie unter Einzelüberexpression von Synbape. Die Frage, warum Syndapin I alleine ausreichend ist, einen Effekt auf die Dornfortsätze auszuüben, kann dieses Modell schließlich gar nicht beantworten, so daß es als Erklärung für die demonstrierten Effekte ausscheidet.

Nach der zweiten Hypothese üben Syndapin I und Synbape getrennte Effekte aus, d.h. Syndapin I lokalisiert in dendritischen Dornfortsätzen (Abbildung 45) und kann dort unter Überexpression die beobachteten Effekte durch seinen Einfluß auf das Aktin-Cytoskelett induzieren, während Synbape als Signal z.B. in Folge von Glutamatstimulation in den Kern translozieren und von dort aus indirekt über weitere Signalkaskaden ebenfalls eine Veränderung der Dornfortsätze bewirken kann. Eine Interaktion von Syndapin I und Synbape ist hierfür nicht erforderlich, kann jedoch als alternative Möglichkeit zur Auslösung einer Translokation Synbapes in den Zellkern als Variante dieses Modells in Betracht gezogen werden. Beide Thesen erklären die Effekte der Einzelüberexpressionen von Syndapin I und Synbape. Um die additiven bzw. synergistischen Effekte unter Co-Überexpression der beiden Proteine zu erläutern, müssen allerdings durch beide Proteine über unterschiedliche Signalkaskaden vergleichbare Effekte verursacht werden. Dies ist theoretisch durchaus möglich. Die durch die gemeinsame Überexpression der SH3-Domäne von Syndapin I und Synbape verursachte Annäherung an den Kontrollphänotyp würde nach diesem Modell schließlich dadurch zu erklären sein, daß Synbape durch die starke Bindung an diese Domäne davon abgehalten wird, in nennenswertem Umfang in den Zellkern zu translozieren und damit keine Effekte mehr verursachen kann. Dies steht in klarem Widerspruch zu der Beobachtung, daß offensichtlich selbst der wesentlich größere Proteinkomplex aus Syndapin I und Synbape in den Zellkern gebracht werden kann, nicht aber Synbape von einer Translokation in den Zellkern abhält (Abbildung 41). Außerdem sollte nach diesem Modell unter Co-Expression mit der SH3-Domäne von Syndapin I eine verminderte Immunfluoreszenz von GFP-Synbape im Zellkern erkennbar sein, doch geben die Experimente keinen Anhaltspunkt dafür. Sie zeigen vielmehr eine gemeinsame Anreicherung der SH3-Domäne von Syndapin I und Synbape im gesamten Zellkern (Daten nicht gezeigt). Damit ist dieses Modell ebenfalls abzulehnen.

Die dritte Hypothese schließlich nimmt an, daß Synbape und Syndapin I in dendritischen Dornfortsätzen lokalisiert sind (Abbildung 45), dort interagieren

können und durch eine Modulation des Cytoskeletts eine Veränderung der Dornen bewirken. Die Effekte, welche Syndapin I alleine ausübt, wäre demzufolge durch eine Veränderung des Aktin-Cytoskeletts über eine Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch N-WASP oder/und eine Einflußnahme auf das Mikrotubuli-Cytoskelett über Mikrotubuli-assoziierte Proteine erklärbar. Die Effekte, welche unter Einzelüberexpression von Synbape zu beobachten sind, könnten gemäß dieser These sowohl auf eine direkte Modulation des Mikrotubuli-Cytoskeletts über Mikrotubuli-assoziierte Proteine wie MAP 2 (s.o.) als auch auf einen durch die Interaktion mit Syndapin vermittelten Einfluß auf das Aktin-Cytoskelett zurückgeführt werden. In der Co-Überexpression der beiden Proteine würden sich demnach die Effekte synergistisch verstärken, was mit den Beobachtungen konsistent ist. Die Co-Überexpression von Synbape mit der SH3-Domäne schließlich zeigt, daß die Synbape-Effekte über eine Wechselwirkung mit endogenem bzw. überexprimiertem Syndapin vermittelt werden, da im Gegensatz zu der alleinigen Überexpression Synbapes eine Rückführung auf die Kontrollverhältnisse erfolgt. So ist beispielsweise ein hoch signifikanter Rückgang der verzweigten Dornen gegenüber der Einzelexpression Synbapes festzustellen (Abbildung 52). Gleiches gilt für die pilzförmigen Dornfortsätze, die Reduktion ihres Anteils nimmt hoch signifikant ab. Wäre für die beobachteten Effekte hingegen keine Interaktion von Synbape und Syndapin erforderlich, so hätten hierbei die gleichen Effekte wie unter Einzelüberexpression von Synbape bzw. der SH3-Domäne von Syndapin I festgestellt werden müssen. Damit ist das Modell einer funktionellen Interaktion von Syndapin I und Synbape in dendritischen Dornen das einzige, welches alle experimentellen Daten der Dornfortsatzstudien integrieren kann.

Im Hinblick auf Syndapin stellt sich die Frage, warum Syndapin I einen Einfluß auf die Dornfortsätze hat und die SH3-Domäne nicht. Es muß für diesen Einfluß also der N-terminale Teil von Syndapin erforderlich sein. Diese Überlegung ist konsistent mit experimentellen Befunden zur Modulation des kortikalen Aktin-Cytoskeletts durch Syndapine in nicht-neuronalen Zellen. Hier führt die Überexpression von Syndapin I und Syndapin II zu einer Arp2/3-Komplex-abhängigen Bildung von mit unzähligen Filopodien besetzten Lamellipodia (Qualmann & Kelly, 2000). Die Bildung dieser Aktin-reichen Strukturen ist dabei sowohl von SH3-Domänen vermittelten Interaktionen, wie beispielsweise der mit N-WASP, dem Aktivator des Arp2/3-Komplexes (Qualmann *et al.*, 1999; Qualmann & Kelly, 2000), als auch von dem N-Terminus der Syndapine abhängig: Eine Entfernung oder funktionelle Deaktivierung einer dieser beiden Komponenten ist ausreichend, um den Kontrollphänotyp wiederherzustellen (Qualmann & Kelly, 2000).

Es bestehen drei Möglichkeiten, die funktionelle Verknüpfung von Synbape mit dem Aktin-Cytoskelett durch Syndapine zu erklären. Zum Einen könnte Synbape zunächst mit der SH3-Domäne Syndapins interagieren und sodann durch einen weiteren, bisher unbekanntem Interaktionspartner des N-Terminus' von Syndapin ein Wechsel des Bindungspartners der SH3-Domäne induziert werden, welcher die Verbindung zu dem Cytoskelett der Zelle ermöglicht. Zum Anderen

könnte ein solcher unbekannter Interaktionspartner des N-Terminus zwei Syndapine miteinander vernetzen und so die gleichzeitige Assoziation zweier unterschiedlicher Interaktionspartner der SH3-Domäne ermöglichen. Gegen beide Hypothesen ist einzuwenden, daß trotz intensiver Suche bisher kein in Betracht kommender Interaktionspartner des N-Terminus identifiziert werden konnte, dafür aber eine Vielzahl von Interaktionspartnern der SH3-Domäne bereits bekannt sind bzw. neu identifiziert werden konnten. Dies deutet darauf hin, daß der N-Terminus eine andere Funktion als die Bindung von Proteinen hat, während diese Funktion in erster Linie durch die SH3-Domäne wahrgenommen wird. In Übereinstimmung mit dieser Überlegung enthält der N-Terminus Syndapins im Gegensatz zu vielen anderen synaptischen Proteinen keine etablierte Interaktionsdomäne und zeigt alleine bis auf eine Zunahme der Anzahl der dicken Dornen (Daten von Frau *McS-Biologin* Akvile Inciute) keine signifikanten Effekte: Er kann weder das Aktin- oder das Mikrotubuli-Cytoskelett beeinflussen, noch durch die Bildung von Heterodimeren aus endogenem und überexprimiertem Syndapin I eine Vernetzung bewirken, die endogenes Syndapin nicht auch erreichen könnte. Zusammengefasst deuten diese Daten daher darauf hin, daß für die beobachteten Effekte von Syndapin I und Synbape auf dendritische Dornfortsätze die Verknüpfung mindestens zweier SH3-Domänen durch eine Dimerisierung (Trimerisierung) des N-Terminus erforderlich ist. Neueste Daten des Labors stützen diese Dimerisierungshypothese (Kessels & Qualmann, unpubliziert): Die N-terminale *cdc15*-Domäne kann sowohl eine Selbstassoziation als auch eine Interaktion zu einem etwas weiter C-terminal liegenden Bereich vermitteln, die SH3-Domänen bleiben also für eine gleichzeitige Bindung zweier oder mehrerer Interaktionspartner frei. Dies bedeutet im Hinblick auf das dargestellte Modell, daß Syndapin-I-Synbape-Komplexe über einen weiteren Interaktionspartner der SH3-Domäne Syndapins (MAP 2, N-WASP) entweder das Mikrotubuli- oder auch das Aktin-Cytoskelett der Zelle beeinflussen kann.

Schließlich stellt sich die Frage, ob in dieses Modell auch die Effekte der Stimulationsexperimente integriert werden können. Synbape kann je nach Situation sowohl vorwiegend im Soma als auch vorwiegend im Kern von Zellen detektiert werden (Abbildungen 54 und 56) und zwischen diesen beiden Zellkompartimenten in Folge von synaptischer Aktivität translozieren (Abschnitte 3.5.7.2 und 3.5.7.3). Zwei prinzipielle Möglichkeiten sind hierzu denkbar: Zum Einen könnten durch eine Stimulation der synaptischen Aktivität Membrantransport- und Rezyklierungsprozesse eingeleitet werden, in denen Syndapin eine Verbindung zu dem Cytoskelett der Zelle herstellt, während es gleichzeitig mit Synbape interagiert. Diese oder eine Interaktion mit weiteren Faktoren könnte eine "Aktivierung" Synbapes bewirken, welches daraufhin in den Zellkern transloziert. Zum Anderen könnte die Interaktion von Syndapin I und Synbape im Ruhezustand vorliegen und die Aktivierung von Glutamatrezeptoren über die damit verbundenen Signaltransduktionsprozesse eine Dissoziation verursachen, so daß das freigewordene Synbape in den Zellkern translozieren kann. In diesem Fall müßte eine weitere Verbindung Syndapin daran hindern, mit in den Kern transportiert zu

werden. Hierfür kommen sowohl eine direkte Assoziation mit den postsynaptischen Gerüstproteinen der Shank/ProSAP-Familie (unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe) als auch eine indirekte über Dynamin 2 in Betracht (Qualmann *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 2001), außerdem ist eine Verknüpfung mit dem Aktin-Cytoskelett via N-WASP und den Arp2/3-Komplex (z.B. Kessels & Qualmann, 2004) möglich. Um zu klären, welche Rolle die beiden Kernlokalisierungssignale von Synbape im Zusammenhang mit der Morphologie der dendritischen Dornfortsätze spielen, sollten Konstrukte mit sowohl einzeln als auch in Kombination mutierten Kernlokalisations- und Kernexportsignalen in Bezug auf ihre Lokalisation und mögliche Effekte auf die Dornenmorphologie analysiert werden. RNAi-Studien können diese Analysen ergänzen. Die Ergebnisse dieser weiterführenden Dornenmorphologiestudien sollten außerdem Einblick in die Funktion Synbapes bei der Interaktion mit Syndapin und den Realitätsbezug des oben dargelegten Modells geben.

Interessanterweise zeigen die Dornfortsätze unter Einzelüberexpression von Syndapin I Merkmale, wie kurze pilzförmige Dornen mit verdickten Köpfen und eine Abnahme des Anteils der Filopodien, welche für mature, synaptisch aktive Dornfortsätze charakteristisch sind, während die unter Überexpression von Synbape bzw. Syndapin I und Synbape zu beobachtenden, verlängerten, pilzförmigen Dornen häufig unter Deafferentiation zu bemerken sind (vergleiche Fiala *et al.*, 2002). Dies mag ein Hinweis darauf sein, daß die Interaktion von Syndapin und Synbape unter Stimulationsbedingungen keine Rolle spielt und Synbape in den Zellkern translozieren kann, während unter Inhibitionsbedingungen die beiden Proteine assoziiert sind und damit einen im Sinne Syndapins gegenläufigen bzw. im Sinne Synbapes synergistischen Effekt auf die Dornfortsätze ausüben. Dies ist konsistent mit den bei den Dornfortsätzen beobachteten morphologischen Effekten und dem Umstand, daß eine Interaktion von Syndapin und Synbape das 2. Kernlokalisierungssignal Synbapes sterisch blockieren könnte.

Auch die spezifische Lokalisation von Synbape an Nucleoli paßt in dieses Bild. Dabei steht der Umstand, daß eine Mehrzahl von Nucleoli in den hippocampalen Neuronen und Gliazellen beobachtet wurden in Einklang mit immunhistologischen Studien (Bouffant *et al.*, 2000): Hier zeigen Neurone der CA3-Region gleichfalls mehrere Nucleoli. Nucleoli sind in die Transkription von ribosomaler RNS, das Prozessieren der pre-rRNS und das Zusammensetzen der ribosomalen Untereinheiten involviert. Um gezielt der Funktion von Synbape in Nucleus und vor allem in Nucleoli nachzugehen, sollten Kern- und Nucleolipräparationen durchgeführt werden, um durch Copräzipitationen mit immobilisiertem Synbape in Verbindung mit Massenspektroskopie Interaktionspartner, die in diesen Kompartimenten von besonderer Bedeutung sind, zu finden. Eine Funktion von Synbape in solchen ribosomalen Prozessen, wie sie durch die Colokalisation mit dem Nucleolimarker Fibrillarin nahegelegt wird (Abbildung 57), mag für eine Rolle Synbapes in der Regulation der Proteinbiosynthese, die für langfristige, synaptische Veränderungen unerlässlich ist, sprechen. Somit käme Synbape eine Bedeutung im Bezug auf synaptische Plastizität und die Bildung von Langzeitgedächtnis zu.

5. Literaturverzeichnis

- Adachi, M. (2000) Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148:849-856.
- Ales, E., Tabares, L., Poyato, J.M., Valero, V., Lindau, M. and de Toledo, A.G. (1999) High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol.* 1(1):40-4.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. and Struhl. 1990. *Current protocols in molecular biology.* Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York
- Bamburg, I.R. (1999) Proteins of the ADF/cofilin family:essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15:185-230.
- Bendixen, C., Gangloff, S. and Rothstein, R. (1994) A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 22(9):1778-9.
- Bingol, B. and Schuman, E.M. (2004) A proteasome-sensitive connection between PSD-95 and GluR1 endocytosis. *Neuropharmacology* 47(5):755-63.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-23.
- Blanpied, T.A. and Ehlers, M.D. (2004) Microanatomy of dendritic spines: Emerging principles of synaptic pathology in psychiatric and neurological disease. *Biol. Psychiatry* 55(12):1121-7.
- Blanpied, T.A., Scott, D.B. and Ehlers, M.D. (2002) Regulation and dynamics of clathrin at specialized endocytic zones in dendrites and spines. *Neuron* 36:435-449.
- Blitzer, R.D., Iyengar, R. and Landau, E.M. (2005) Postsynaptic signaling networks: Cellular cogwheels underlying long-term plasticity. *Biol. Psychiatry* 57(2):113-9.
- Bock, J. and Braun, K. (1999a) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptor activation suppresses learning-induced synaptic elimination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2485-2490.
- Bock, J. and Braun, K. (1999b) Filial imprinting in domestic chicks is associated with spine pruning in the associative area, dorsocaudal neostriatum. *Eur. J. Neurosci.* 11:2566-2570.

- Böckers, T.M., Bockmann, J., Kreutz, M.R. *and* Gundelfinger, E.D. (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):903-10.
- Bouffant, F., Minter, P., Traiffort, E., Ruat, M. *and* Sladeczek, F. (2000) Multiple Subcellular Localizations of PCTAIRE-1 in Brain. *Molecular and Cellular Neuroscience* 16, 388–395
- Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principles of Protein-Dye Binding. *Analyt. Biochem.* 72:248-254.
- Braun, A., Pinyol, R., Dahlhaus, R., Koch, D., Fonarev, P., Grant, B.D., Kessels, M.M. *and* Qualmann, B. (2005) EHD Proteins Associate with Syndapin I and II and Such Interactions Play a Crucial Role in Endosomal Recycling. *Mol. Biol. Cell.* 16(8):3642-58.
- Cajal, R. (1888) Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trim. Histol. Norm.* 1:1-10.
- Cajal, R. (1891) Significació n fisioló gica de las expansiones protoplá smicas y nerviosas de la sustancia gris. *Rev. Cienc. Med. Barcel.* 22:1-15.
- Carlin, R.K., Grab, D.J., Cohen, R.S. *and* Siekevitz, P. (1980) Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J. Cell Biol.* 86(3):831-45.
- Carroll, R.C., Lissin, D.V., von Zastrow, M., Nicoll, R.A. *and* Malenka, R.C. (1999) Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat. Neurosci.* 2(5):454-60.
- Carroll, R.C. *and* Zukin, R.S. (2002) NMDA-receptor trafficking and targeting: Implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci.* 25:571-577.
- Carroll, R.C., Beattie, E.C., von Zastrow, M. *and* Malenka, R.C. (2001) Role of AMPA-receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:315-324.
- Chan, S.A. *and* Smith, C. (2001) Physiological stimuli evoke two forms of endocytosis in bovine chromaffin cells. *J Physiol.* 537(Pt 3):871-85.
- Chang, F.L. *and* Greenough, W.T. (1984) Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 309:35-46.

- Chen, H.J., Rojas-Soto, M., Oguni, A. *and* Kennedy, M.B. (1998) A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase. II. *Neuron* 20(5):895-904.
- Chen, Y.A. *and* Scheller, R.H. (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2):98-106.
- Chicurel, M .E. *and* Harris, K.M. (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(2):169-82.
- Choquet, D. *and* Triller, A. (2003) The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:251-265.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. *and* Wingfield, P.T. (2001) *Current Protocols in Protein Science.* (John Wiley Current Protocols, Series Editor:Virginia Benson Chanda)
- Colledge, M., Snyder, E.M., Crozier, R.A., Soderling, J.A., Jin, Y., Langeberg, L.K., Lu, H., Bear, M.F. *and* Scott, J.D. (2003) Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* 40(3):595-607.
- Collier, F.M., Gregorio-King, C.C., Gough, T.J., Talbot, C.D., Walder, K. *and* Kirkland, M.A. (2004) Identification and characterization of a lymphocytic Rho-GTPase effector: rhotekin-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324(4):1360-9.
- Confalonieri, S. *and* Di Fiore, P.P. (2002) The Eps15 homology (EH) domain. *FEBS Lett.* 513(1):24-9.
- Cooney, J.R., Hurlburt, J.L., Selig, D.K., Harris, S.M. *and* Fiala, J.C. (2002) Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J. Neurosci.* 22:2215-2224.
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M.R., Luthi, A. *and* Kim, W.T. (1999) Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99(2):179-88.
- Da Costa, S.R., Sou, E., Xie, J., Yarber, F.A., Okamoto, C.T., Pidgeon, M., Kessels, M.M., Mircheff, M.K., Schechter, J.E., Qualmann, B. *and* Hamm-Alvarez, S.F. (2003) Impairing actin filament or syndapin functions promotes accumulation of clathrin-coated vesicles at the apical plasma membrane of acinar epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 14(11):4397-413.
- de Beer, T., Hoofnagle, A.N., Enmon, J.L., Bowers, R.C., Yamabhai, M., Kay, B.K. *and* Overduin, M. (2000) Molecular mechanism of NPF recognition by EH domains. *Nat. Struct. Biol.* 7:1018-1022.

- Dehmelt, L. *and* Halpain, S. (2004) Actin and microtubules in neurite initiation: Are MAPs the missing link? *J. Neurobiol.* 58(1):18-33.
- Deisseroth, K., Mermelstein, P.G., Xia, H. *and* Tsien, R.W. (2003) Signaling from synapse to nucleus: The logic behind the mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13(3):354-65.
- Dieck, T.S., Sanmarti-Vila, L., Langnaese, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K.H., Kampf, U., Franzer, J.T., Stumm, M., Garner, C.C. *and* Gundelfinger, E.D. (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG / glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J. Cell Biol.* 142(2):499-509.
- Doolittle, M.H., Martin, D.C., Davis, R.C., Reuben, M.A. *and* Elovson, J. (1991) A two-cycle immunoprecipitation procedure for reducing nonspecific protein contamination. *Anal. Biochem.* 195(2):364-8.
- Dreger, M. (1999) Analysis of posttranslational modifications of nuclear envelope proteins. <http://www.diss.fu-berlin.de>
- Ehlers, M.D. (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28(2):511-25.
- Ehlers, M.D. (2003) Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Neurosci.* 6:231-242.
- El-Husseini, A.E., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R. A. *and* Brecht, D.S. (2000a) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290:1364-1368.
- El-Husseini, A.E., Topinka, J.R., Lehrer-Graiwer, J.E., Firestein, B.L., Craven, S.E., Aoki, C. *and* Brecht D.S. (2000b) Ion channel clustering by membrane-associated guanylate kinases. Differential regulation by N-terminal lipid and metal binding motifs. *J. Biol. Chem.* 275(31):23904-23910.
- Fang, M., Jaffrey, S.R., Sawa, A., Ye, K., Luo, X., Snyder, S.H. *and* Fang (2000) Dexas1: A G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON. *Neuron* 28:183-193.
- Feldman, M.L. *and* Dowd, C. (1975) Loss of dendritic spines in aging cerebral cortex. *Anat. Embryol.* 148:279-301.
- Fiala, J.C. *and* Harris, K.M. (1999) Dendrite structure. G. Stuart, N. Spruston, M. Hausser (Eds.), *Dendrites*, Oxford University Press, Oxford, pp. 1-34.

- Fiala, J.C., Feinberg, M., Popov, V. *and* Harris, K.M. (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 18:8900-8911.
- Fiala, J.C., Spacek, J. *and* Harris, K.M. (2002) Review Dendritic Spine Pathology: Cause or Consequence of Neurological Disorders? *Brain Research Reviews* 39:29- 54.
- Fields, S. *and* Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230):245-6.
- Finley, R.L. *and* Brent, R. (1994) Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(26):12980-4.
- Fukuda, M., Asano S, Nakamura T., Adachi M., Yoshida M., Yanagida M. *and* Nishida E. (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390:308-311.
- Gaidarov, I. *and* Keen, J.H. (1999) Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* 146(4):755-64.
- Gaidarov, I., Chen, Q., Falck, J.R., Reddy, K.K. *and* Keen, J.H. (1996) A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit. Implications for the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 271:20922-20929.
- Galperin, E., Benjamin, S., Rapaport, D., Rotem-Yehudar, R., Tolchinsky, S. *and* Horowitz, M. (2002) EHD3: A protein that resides in recycling tubular and vesicular membrane structures and interacts with EHD1. *Traffic* 3(8):575-89.
- Garner, C.C., Zhai, R.G., Gundelfinger, E.D. *and* Ziv, N.E. (2002) Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* 25(5):243-51.
- Gibson, T.J., Hyvonen, M., Musacchio, A., Saraste, M. *and* Birney, E. (1994) PH domain:the first anniversary. *Trends Biochem. Sci.* 19(9):349-53.
- Gietz, D., St Jean, A.R., Woods, A. *and* Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20:1425.
- Globus, A., Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L. *and* Diamond, M.C. (1973) Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 82:175-181.
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 1:175-82.

- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. *and* Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36(1):59-74.
- Grant, B., Zhang, Y., Paupard, M.C., Lin, S.X., Hall, D.H. *and* Hirsh, D. (2001) Evidence that RME-1, a conserved *C. elegans* EH-domain protein, functions in endocytic recycling. *Nat. Cell Biol.* 3:573-579.
- Gray, E.G. (1959) Electron microscopy of synaptic contacts on dendritic spines of the cerebral cortex. *Nature* 183:1592-1594.
- Gundelfinger, E.D., Kessels, M.M. *and* Qualmann, B. (2003) Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:127-139.
- Hamamoto, T., Seto, H. *and* Beppu, T. (1983) Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. I. Taxonomy of the producing strain and their fermentation, purification and characterization. *J. Antibiot.* 36:639-645.
- Harris, K.M. (1999) Structure, development and plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9:343-348.
- Harris, K.M. *and* Kater, S.B. (1994) Dendritic spines:cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:341-71.
- Harris, K.M., Jensen, F.E. *and* 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.
- Haslam, R.J., Koide, H.B. *and* Hemmings, B.A. (1993) Pleckstrin domain homology. *Nature* 363(6427):309-10.
- Hegde, A.N. (2004) Ubiquitin-proteasome-mediated local protein degradation and synaptic plasticity. *Prog. Neurobiol.* 73(5):311-57.
- Helmuth, M., Altroock, W., Bockers, T.M., Gundelfinger, E.D. *and* Kreutz, M.R. (2001) An electrotransfection protocol for yeast two-hybrid library screening. *Anal. Biochem.* 293:149-52.
- Hering, H. *and* Sheng, M. (2001) Dendritic spines:structure, dynamics and regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(12):880-8.
- Hicks, G.R. *and* Raikhel, N.V. (1995) Protein import into the nucleus: An integrated view. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:155-188.
- Hinshaw, J.E. (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:483-519.

- Hoffman, C.S. *and* Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57(2-3):267-72.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. *and* Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153(1):163-8.
- Jarousse, N. *and* Kelly, R.B. (2001) Endocytotic mechanisms in synapses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:461-9.
- Jockusch, W.J., Praefcke, G.J., McMahon, H.T. *and* Lagnado, L. (2005) Clathrin-dependent and clathrin-independent retrieval of synaptic vesicles in retinal bipolar cells. *Neuron.* 46(6):869-78.
- Kaech, S., Fischer, M., Doll, T. *and* Matus, A. (1997) Isoform Specificity in the Relationship of Actin to Dendritic Spines. *J. Neurosci.* 17(24):9565-9572.
- Kessels, M.M. *and* Qualmann, B. (2002a) Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis. *EMBO J.* 21(22):6083-94.
- Kessels, M.M. *and* Qualmann, B. (2002b) Endocytosis and the cytoskeleton. *Int. Rev. Cytol.* 220:93-144.
- Kessels, M.M. *and* Qualmann, B. (2004) The syndapin protein family: Linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 117(15):3077-86.
- Kessels, M.M., Engqvist-Goldstein, A.E., Drubin, D.G. *and* 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):351-66.
- Kim, J.H., Liao, D., Lau, L.F. *and* Huganir, R.L. (1998) SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron.* (4):683-91.
- Klann, E., Antion, M.D., Banko, J.L. *and* Hou, L. (2004) Synaptic plasticity and translation initiation. *Learn. Mem.* 11(4):365-72.
- Koch, C. *and* Zador, A. (1993) The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *J. Neurosci.* 13:413-422.
- Kossel, A.H., Williams, C.V., Schweizer, M. *and* Kater, S.B., (1997) Afferent innervation influences the development of dendritic branches and spines via both activity-dependent and non-activity-dependent mechanisms. *J. Neurosci.* 17:6314-6324.
- Kreienkamp, H.J. (2002) Organisation of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2(5):581-6.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lau, K.C., So, K.F. and Tay, D. (1992) APV prevents the elimination of increase in hippocampal dentate spine density in the 6 h post-training period of consolidation. *Neuroscience* 87:607-613.
- Lau, Y.F. and Zhang, J. (2000) Expression analysis of thirty one Y chromosome genes in human prostate cancer. *Mol. Carcinog.* 27(4):308-21.
- Lee, D.W., Zhao, X., Scarselletta, S., Schweinsberg, P.J., Eisenberg, E., Grant, B.D. and Greene, L.E. (2005) Interaction of RME-1/EHD1 with nucleotide. *J. Biol. Chem.* in press.
- Lendvai, B., Stern, E.A., Chen, B. and Svoboda, K. (2000) Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 404:876-881.
- Lin, R.C. and Scheller, R.H. (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:19-49.
- Lin, S.X., Grant, B., Hirsh, D. and Maxfield, F.R. (2001) Rme-1 regulates the distribution and function of the endocytic recycling compartment in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 3:567-572.
- Liu, L. and McKeehan, W.L. (2002) Sequence analysis of LRPPRC and its SEC1 domain interaction partners suggests roles in cytoskeletal organization, vesicular trafficking, nucleocytosolic shuttling, and chromosome activity. *Genomics.* 79(1):124-36.
- Lowndes, M. and Stewart, M.G. (1994) Dendritic spine density in the lobus parolfactorius of the domestic chick is increased 24 h after one-trial passive avoidance training. *Brain Res.* 654:129-136.
- Lund, J.S. and Holbach, S.M. (1991) Postnatal development of thalamic recipient neurons in the monkey striate cortex. Part I: Comparison of spine acquisition and dendritic growth of layer 4C alpha and beta spiny stellate neurons. *J. Comp. Neurol.* 309:115-128.
- Luscher, C., Xia H., Beattie, E.C., Carroll, R.C. and von Zastrow, M. (1999) Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* 24(3):649-58.
- Maffucci, T. and Falasca, M. (2001) Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: A role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism. *FEBS Lett.* 506(3):173-9.

- Malenka, R.C. *and* Nicoll, R.A. (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci.* 16(12):521-7.
- Malinow, R. *and* Malenka, R.C. (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25:103-126.
- Marrs, G.S., Green, S.H. *and* Dailey, M. (2001) E. Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nature Neurosci.* 4:1006-1113.
- Marx, A., Pless, J., Mandelkow, E.M. *and* Mandelkow, E. (2000) On the rigidity of the cytoskeleton: are MAPs crosslinkers or spacers of microtubules? *Cell. Mol. Biol.* 46(5):949-65.
- Matus, A. (2000) Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290:754-758.
- Mayer, B.J., Ren, R., Clark, K.L. *and* Baltimore, D. (1993) A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 73(4):629-30.
- Mintz, L., Galperin, E., Pasmanik-Chor, M., Tulzinsky, S., Bromberg, Y., Kozak, C.A., Joyner, A., Fein, A. *and* Horowitz, M. (1999) EHD1 - an EH-domain-containing protein with a specific expression pattern. *Genomics* 59:66-76.
- Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M. *and* Plomann, M. (2000) All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *Journal of Cell Science* 113:4511-4521.
- Moser, M.B., Trommald, M., Egeland, T. *and* Andersen, P. (1997) Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.* 380:373-381.
- Moss, S.J. *and* Smart, T.G. (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:240-250.
- Mülhardt, C. (2003) *Der Experimentator - Molekularbiologie / Genomics.* Spektrum Verlag.
- Muller, W. *and* Connor, J.A. (1991) Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca²⁺- responses. *Nature* 354:73-76.
- Mullins, R.D. *and* Welch, M.D. (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18:247-88.
- Murthy, V.N., Schikorski T., Stevens, C.F. *and* Zhu, Y. (2001) Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. *Neuron* 32:673-682.
- Newey, S.E., Velamoor, V., Govek, E.E. *and* Aelst, L. (2004) Rho GTPases, Dendritic Structure, and Mental Retardation. www.interscience.wiley.com

- Nong, Y., Huang, Y.Q. *and* Salter, M.W. (2004) NMDA receptors are movin' in. *Curr Opin Neurobiol.* 14(3):353-61.
- Okabe, S., Miwa, A. *and* Okado, H. (2001) Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J. Neurosci.* 21:6105-6114.
- Okamoto, P.M., Gamby C., Wells, D., Fallon, J. *and* Vallee, R.B. (2001) Dynamin isoform-specific interaction with the Shank/ProSAP scaffolding proteins of the postsynaptic density and actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 276(51):48458-65.
- O'Malley, A., O'Connell, C. *and* Regan, C.M. (1998) Ultrastructural analysis reveals avoidance conditioning to induce a transient increase in hippocampal dentate spine density in the 6 h posttraining period of consolidation. *Neuroscience* 87:607-613.
- Orban-Nemeth, Z., Simader, H., Badurek, S., Trancikova, A. *and* Propst, F. (2005) Microtubule-associated protein 1S, a short and ubiquitously expressed member of the microtubule-associated protein 1 family. *J. Biol. Chem.* 280(3):2257-65.
- Pak, D.T., Yang, S., Rudolph-Correia, S., Kim, E. *and* Sheng, M. (2001) Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP. *Neuron* 31:289-303.
- Palfrey, H.C. *and* Artalejo, C.R. (1998) Vesicle recycling revisited: rapid endocytosis may be the first step. *Neuroscience* 83(4):969-89.
- Park, M., Penick, E.C., Edwards, J.G., Kauer, J.A. *and* Ehlers, M.D. (2004) Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 305(5692):1972-5.
- Parnass, Z., Tashiro, A. *and* Yuste, R. (2000) Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus* 10:561-568.
- Passafaro, M. *and* Sheng, M. (1999) Synaptogenesis: The MAP location of GABA receptors. *Curr. Biol.* 9(7):261-3.
- Patrick, G.N., Bingol, B., Weld, H.A. *and* Schuman, E.M. (2003) Ubiquitin-mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. *Curr. Biol.* 13(23):2073-81.
- Penzes, P., Beeser, A., Chernoff, J., Schiller, M.R., Eipper, B.A., Mains, R.E. *and* Huganir, R.L. (2003) Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-ephB receptor activation of the rho-GEF kalirin. *Neuron* 37:263-274.
- Peters, A. *and* Kaiserman-Abramof, I.R. (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* 127:321-355.

- Platt, E.J., Karlsen, K., Lopez-Valdivieso, A., Cook, P.W. *and* Firestone, G.L. (1986) Highly sensitive immunoabsorption procedure for detection of low-abundance proteins. *Anal. Biochem.* 156(1):126-35.
- Purpura, D.P. (1974) Dendritic spine dysgenesis and mental retardation. *Science* 186:1126-1128.
- Qualmann, B. *and* Kelly, R.B. (2000) Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J. Cell Biol.* 148(5):1047-62.
- Qualmann, B., Boeckers, T.M., Jeromin, M., Gundelfinger, E.D. *and* Kessels, M.M. (2004) Linkage of the actin cytoskeleton to the postsynaptic density via direct interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank family. *J. Neurosci.* 24(10):2481-95.
- Qualmann, B., Kessels, M.M. *and* Kelly, R.B. (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 150(5):111-116.
- Qualmann, B., Roos, J., Di Gregorio, P.J. *and* Kelly, R.B. (1999) Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol. Biol. Cell* 2:501-13.
- Rakic, P., Bourgeois, J.P., Eckenhoff, M.F., Zecevic, N. *and* Goldman-Rakic, P.S. (1986) Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science* 232:232-235.
- Rehm, H. (2002) *Der Experimentator - Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum-Verlag.
- Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P. *and* Narumiya, S. (1996) Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a Serine/Threonine Kinase, PKN, and Rhoophilin in the Rho-binding Domain. *J. Biol. Chem.* 271(23):13556-13560.
- Reynaud, C., Fabre, S. *and* Jalinot, P. (2000) The PDZ Protein TIP-1 Interacts with the Rho Effector Rhotekin and is involved in Rho signaling to the Serum Response Element. *J. Biol. Chem.* 275(43):33962-33968.
- Ringstad, N., Gad, H., Low, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O. *and* De Camilli, P. (1999) Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 24(1):143-54.
- Rossmann, K.L., Cheng, L., Mahon, G.M., Rojas, R.J., Snyder, J.T., Whitehead, I.P. *and* Sondek, J. (2003) Multifunctional roles for the PH domain of Dbs in regulating Rho GTPase activation. *J. Biol. Chem.* 278(20):18393-400.

- Sabatini, B.L., Maravall, M. *and* Svoboda, K. (2001) Ca²⁺ signaling in dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11:349-356.
- Sala, C., Piech, V., Wilson, N.R., Passafaro, M., Liu, G. *and* Sheng, M. (2001) Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* 31:115-130.
- Salcini, A.E., Confalonieri, S., Doria, M., Santolini, E., Tassi, E., Minenkova, O., Cesareni G., Pelicci, P.G. *and* Di Fiore, P.P. (1997) Binding specificity and in vivo targets of the EH domain, a novel protein-protein interaction module. *Genes Dev.* 11:2239-2249.
- Salinovitch, O. *and* Montelaro, R.C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium odecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156(2):341-7.
- Schaefer, A.W., Kabir, N., Forscher, P. (2002) Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J. Cell Biol.* 158(1):139-52.
- Schafer, D.A. (2002) Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr Opin Cell Biol.*14(1):76-81.
- Scheibel, M.E., Lindsay, R.D., Tomiyasu, U. *and* Scheibel, A.B. (1975) Progressive dendritic changes in aging human cortex. *Exp Neurol.*47(3):392-403.
- Schiestl, R.H. *and* Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16:339-46.
- Seidenbecher, C.I., Landwehr, M., Smalla, K.H., Kreutz, M., Dieterich, D.C., Zuschratter, W., Reissner, C., Hammarback, J.A., Bockers, T.M., Gundelfinger, E.D. *and* Kreutz, M.R. (2004) Caldendrin but not calmodulin binds to light chain 3 of MAP1A/B: an association with the microtubule cytoskeleton highlighting exclusive binding partners for neuronal Ca(2+)-sensor proteins. *J. Mol. Biol.* 336(4):957-70.
- Sheng, M. *and* Lee, S. (2001) H. AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission. *Cell* 105:825-828.
- Shepherd, G.M. (1996) The dendritic spine: a multifunctional integrative unit. *J Neurophysiol.* 75(6):2197-210.
- Shimizu, T., Ihara, K., Maesaki, R., Amano, M., Kaibuchi, K. *and* Hakoshima, T. (2003) Parallel coiled-coil association of the RhoA-binding domain in Rho-kinase. *J. Biol. Chem.* 278(46):46046-51.

- Simpson, F., Hussain, N.K., Qualmann, B., Kelly, R.B., Kay, B.K., McPherson, P.S. *and* Schmid, S.L. (1999) SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat Cell Biol.* 1(2):119-24.
- Slepnev, V.I. *and* de Camilli, P. (2000) Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 1(3):161-72.
- Song, W. *and* Zinsmaier, K.E. (2003) Endophilin and synaptojanin hook up to promote synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 40(4):665-7.
- Sorra, K.E. *and* Harris, K.M. (2000) Overview on the structure, composition, function, development and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10:501-511.
- Sotelo, C. (1990) Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J. Exp. Biol.* 153:225-249.
- Spacek, J. *and* Harris, K. (1997) Three-dimensional organization smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and rat. *J. Neurosci.* 17:190-203.
- Steward, O. *and* Schuman, E.M. (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:299-325.
- Sudhof, T.C. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375(6533):645-53.
- Sudhof, T.C. (2000) The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28(2):317-20
- Svoboda, K. *and* Mainen, Z.F. (1999) Synaptic [Ca²⁺]:intracellular stores spill their guts. *Neuron* 22:427-430.
- Tabares, L., Ales, E., Lindau, M. *and* de Toledo A.G. (2001) Exocytosis of catecholamine (CA)-containing and CA-free granules in chromaffin cells. *J Biol Chem.* 276(43):39974-9
- Terrell, J., Shih, S.C., Dunn, R. *and* Hicke, L. (1998) A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell* 1:193-202.
- Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Bron, C.R. *and* Muller, D. (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402:421-425.
- Toni, N. Buchs, P.A., Nikonenko, I., Povilaitite, P., Parisi, L. *and* Muller, D. (2001) Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. *J. Neurosci.* 21:6245-6251.

- Towbin, H., Staehelin, T. *and* Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(9):4350-4.
- Triller, A. *and* Choquet, D. (2005) Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! *Trends Neurosci.* 28(3):133-9.
- Valtschanoff, J.G. *and* Weinberg, R.J. (2001) Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. *J Neurosci.* 21(4):1211-7.
- Vazquez, L.E., Chen, H.J., Sokolova, I., Knuesel, I. *and* Kennedy, M.B. (2004) SynGAP regulates spine formation. *J. Neurosci* 24(40):8862-72.
- Wenthold, R.J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N. *and* Petralia, R.S. (2003) Trafficking of nmda receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:335-358.
- West, A.E., Griffith, E.C. *and* Greenberg, M.E. (2002) Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat. Rev. Neurosci.* 3(12):921-31.
- Wickens, J. (1988) Electrically coupled but chemically isolated synapses:dendritic spines and calcium in a rule for synaptic modification. *Prog. Neurobiol.* 31:507-528.
- Wong, E.Y., Tse, J.Y., Yao, K.M., Lui,V.C., Tam, P.C. *and* Yeung, W.S. (2004) Identification and characterization of human VCY2-interacting protein: VCY2IP-1, a microtubule-associated protein-like protein. *Journal Biol. Reprod.* 70 (3):775-784.
- Xia, J., Lee, D.H., Taylor, J., Vandelft, M. *and* Truant, R. (2003) Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum. Mol. Genet.* 12(12):1393-403.
- Yuste, R. *and* Bonhoeffer, T. (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:1071-1089.
- Yuste, R. *and* Denk, W. (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682-684.
- Yuste, R., Majewska, A. *and* Holthoff, K. (2000) From form to function: Calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat. Neurosci.* 3:653-659.
- Zhang, J.Z., Davletov, B.A., Sudhof, T.C. *and* Anderson, R.G. (1994) Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2:implications for membrane recycling. *Cell.* 78(5):751-60.
- Zhou, F.Q. *and* Cohan, C.S. (2004) How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets. *J. Neurobiol.* 58(1):84-91.

6. Abbildungsverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
1	Der Vesikelzyklus	8
2	Die Syndapin-Familie	10
3	Skizze verschiedener Dornfortsatztypen	14
4	Schematische Darstellung eines dendritischen Dornfortsatzes	15
5	Übersicht über die Hefe-zwei-Hybrid-Screene	50
6	Beispiel für die Verifizierung der Kandidaten durch Interaktionsanalysen in Hefen	51
7	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Hefe-zwei-Hybrid Screenen	52
8	Aminosäuresequenz und Proteinstruktur von EHD-Proteinen	53
9	Analyse der Interaktion von Syndapinen und Kandidat Nr. 139	54
10	EHD-Proteine binden an die drei Syndapin-Isoformen I, II k und II l	55
11	Differenzielle Bindung der EHD-Proteine durch Syndapine	56
12	Colokalisation von Syndapinen und EHD-Proteinen in hippocampalen Neuronen	57
13	Die Proteinstruktur MBFs weist verschiedene Interaktionsmotive auf	59
14	Der C-terminale Bereich von Rhotekin 2 bindet an die SH3-Domäne von Syndapin I und II	60
15	Das Syndapin-Bindungsmotiv ist im Bereich der letzten 215 Aminosäuren von Rhotekin 2 lokalisiert	61
16	Positiv geladene Aminosäuren in Verbindung mit einem PxxP-Motiv vermitteln die Interaktion zu Syndapins SH3-Domäne	62
17	Die Interaktion von Syndapin I und Rhotekin 2 ist direkt	63
18	Charakterisierung des α Rhotekin-2-Antikörpers	65
19	Lokalisation von Rhotekin 2 in primären, hippocampalen Neuronen	67/68
20	Rhotekin 2 ist an synaptischen Membranen angereichert	68
21	Rhotekin 2 ist membranintegriert	69
22	Expressionsanalyse	70
23	Rhotekin 2 präzipitiert endogenes Syndapin I und II aus dem Rattengehirncytosol	71
24	Colokalisation von Rhotekin 2 und Syndapin I vor und nach Glutamatstimulation	72
25	Einfluß von Stimulation und Inhibition primärer, hippocampaler Neurone auf die Kernlokalisation von Rhotekin 2	73
26	Syndapin I bindet MAP 1a	74
27	Die Bindung von MAP 2 an Syndapin ist SH3-Domänen-vermittelt	75
28	Subzelluläre Verteilung von Syndapin I	76
29	Subzelluläre Verteilung von MAP 2	76

30	Subzelluläre Verteilung von Syndapin II	76
31	MAP 2 und Syndapin I colokalisieren in primären, hippocampalen Neuronen	77
32	Analyse der Bindungsdomäne auf Syndapinen für das murine MAP 1s	79
33	Copräzipitation von endogenem Syndapin I durch GST-Fusionsproteinen des C-Terminus von MAP 1s	80
34	Strukturen und Motive des unbekanntem Proteins Synbape	81
35	Synbape interagiert mit allen Syndapin-Isoformen und Splicevarianten und die Interaktion wird über die SH3-Domäne Syndapins vermittelt	83
36	Das Bindungsmotiv für Syndapin ist im Bereich der C-terminalen 107 Aminosäuren Synbapes lokalisiert	84
37	Die Interaktion von Syndapin und Synbape ist direkt	86
38	Charakterisierung des affinitätsgereinigten α Synbape-Antikörpers	87
39	Charakterisierung der Verteilung von Synbape im Vergleich zu Syndapinen	89
40	Die Interaktion von Synbape und Syndapin kann durch eine heterologe Co-Immunpräzipitation bestätigt werden	90
41	Überexprimiertes, GFP-markiertes Synbape transportiert endogenes Syndapin I in den Zellkern hippocampaler Neurone	91
42	Quantitative Untersuchung der Kernlokalisierung von Syndapin I bei Überexpression von Synbape in primären, hippocampalen Neuronen	92
43	Co-Präzipitation von endogenem Syndapin I und Synbape	93
45	Syndapin I und Synbape können in dendritischen Dornen detektiert werden	95
44	Syndapin I und Synbape colokalisieren in primären, hippocampalen Neuronen	94
46	Syndapin I und Synbape beeinflussen die Morphologie dendritischer Dornfortsätze	97
47	Zusammenfassung der Daten aus den Dornfortsatzanalysen	98
48	Prozentuale Verteilung der dendritischen Dornfortsätze unter dem Einfluß überexprimierter Synbape-Konstrukte	98
49	Prozentuale Verteilung der dendritischen Dornfortsätze unter dem Einfluß von überexprimiertem Syndapin I	99
50	Prozentuale Verteilung der dendritischen Dornfortsätze unter dem Einfluß von co-überexprimiertem Synbape und Syndapin I	101
51	Prozentuale Verteilung der dendritischen Dornfortsätze unter dem Einfluß der Co-Überexpression von Synbape und der SH3-Domäne Syndapins	103
52	Vergleich der Auswirkungen der verschiedenen Syndapin I – Synbape – Transfektionen auf die Dornenmorphologie in Relation zu der	104

Abbildungsverzeichnis

	Kontrolle	
53	Synaptische Integration der veränderten Dornfortsätze	105/6
54	Synbape kann im Zellkern auftreten	108
55	Die Mutation der Kernlokalisierungssignale Synbapes bewirkt eine somatische Lokalisation des Proteins	109
56	Synbape ist ubiquitär im Gehirn adulter Mäuse exprimiert	111/2
57	Unter Leptomycin-Einwirkung reichert sich Synbape im Zellkern an, nicht jedoch Syndapin I	113
58	Einfluß von Stimulation und Inhibition primärer, hippocampaler Neuronen auf die Verteilung von Synbape	115
59	Synbape colokalisiert mit dem Nucleoli-Marker Fibrillarin	117

7. Abkürzungsverzeichnis

Ω	Ohm
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
2D	Zweidimensional
Abb.	Abbildung
AMPA	a-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
AP5	D-2-Amino-5-phosphonopentansäure
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ca	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAZ	Cytomatrix an der aktiven Zone
cc	<i>coiled coil</i>
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CNQX	6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion
CREB	cAMP response element binding protein
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxiribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreit
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHD	Eps15-Homologie-Domäne
EST	expressed Sequence Tag
F	Farad
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
GABA	g-Aminobuttersäure
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	N2-Hydroxyethylpiperazin-2'-ethansulfonsäure

Abkürzungsverzeichnis

Hz	Hertz
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani Broth
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
M	Molar
mA	Milliampere
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNS	<i>Messenger</i> -Ribonukleinsäure
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
N	Normal
NBQX	6-Nitro-7-sulphamoyl-benz(f)quinoxalin-2,3-dion
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
p.A.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	PSD-95/DLG/ZO-1
PEG	Polyethylenglycol
Pfu	<i>Pyruococcus furiosus</i>
PKC	Proteinkinase C
POX	Meerrettichperoxidase
ProSAP	Prolinrich Synapse Associated Protein
PSD	postsynaptische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
s.a.	siehe auch
sec	Sekunde
SH3	Src-Homologie 3

Sp	Stopp
SV	synaptisches Vesikel
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)amino-methan
V	Volt
vergl.	vergleiche
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung g
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

9. Anhang

Tabelle 1

Name	Beschreibung kodiertes Protein	Protein AS	AS - Sequenz	Primer in 5'→3' Richtung vor / zurück	Schnitt- stellen	Vektor
BEL 1	ATPase FL	617	1 - 617	CGGAATTCATGGATTTCTCCAAGCTACCC / CGCGTCGACCTAGTCTTCAAGGCTACG	EcoR1 Sal1	pCMV- Tag2b
QH1	Brain Lipid binding Protein	132	7-122	Klon 228 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
WD2	Contactin 2	1040	807 - 983	Klon 473 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
AVN2	Cytosolic sorting protein PACS-1b oder 1a	961	150 - 223	Klon 456 subkloniert	Sac1 Hind3	p EGFP- cw3
ATU 1	EH Domänen Protein EHD 3 C-Terminus mit EHDomäne	535	367-535	Klon 139 subkloniert	BamH1 Hind3	p CMV- Tag3c
PL1	EH Domänen Protein EHD 3 C-Terminus mit EHDomäne	535	367-535	Klon 139 subkloniert	EcoR1 EcoR1	p EGFP- cw3
SE1	HRas l	251	1 - 53/Sp	Klon 460 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
UN1	MAP 1a Fragment	2774	2534 - 2732	Klon 398 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
VG 2	MAP 1s C-terminales Fragment	973	733 - 973	Klon 435 subkloniert	EcoR1 Xho1	pGEX- 4T2
VF 2	MAP 1s C-terminales Fragment	973	733 - 973	Klon 435 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
AEL 3	Rhotekin 2 FL	601	1 - 601	CGAAGCTTATGGAGGGGCAGCTGCTG / CGGTCGACCTATACTTGTGCTTGGAGCCA	Hind3 Sal1	Topo TA
BGH1	Rhotekin 2 Anfang, HR- bis Beginn PH- Domäne	601	1 - 279	subkloniert aus AHV 1	BamH1 Xho1	p EGFP- cw3

Anhang

AHV 1	Rhotekin 2 Anfang, HR- bis Beginn PH-Domäne	601	1 - 279	CGAAGCTTATGGAGGGGCAGCTGCTG / CGGTTCGACCTAATCTGCAGCCATGCAAGCT	Hind3 ApaI	Topo TA
BGI1	Rhotekin 2 Anfang, HR- und PH-Domäne	601	1 - 386	subkloniert aus AEJ 1	Hind3 ApaI	p EGFP-cw3
AEJ 1	Rhotekin 2 Anfang, HR- und PH-Domäne	601	1 - 386	CGAAGCTTATGGAGGGGCAGCTGCTG / CGGTTCGACCTAACAACAATGCTTCCATTGGCT	Hind3 Sal1	Topo TA
BGJ2	Rhotekin 2 FL	601	1 - 601	subkloniert aus AEL 3	Hind3 ApaI	p EGFP-cw3
BGK2	Rhotekin 2 MBDomäne	601	386 - 601	subkloniert aus AEK 1	Hind3 ApaI	p EGFP-cw3
AEK 1	Rhotekin 2 MBDomäne	601	386 - 601	CGAAGCTTGGCCAATGGAAGCATTGTTGT / CGGTTCGACCTATACTTGTGCTTGGAGCCA	Hind3 Sal1	Topo blunt
SB1	Rhotekin 2 MBDomäne	601	376 - 601	Klon 336 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP-cw3
SD1	Rhotekin 2 MBDomäne	601	376 - 601	Klon 336 subkloniert	EcoR1 Xho1	pGEX-4T2
ACU1	Rhotekin 2 PH Domäne	601	279 - 386	subkloniert aus AEM 1	Hind3 ApaI	p EGFP-cw3
AEM 1	Rhotekin 2 PH Domäne	601	279 - 386	CGAAGCTTGCATTTGCAGGATTCCTTAAT / CGGTTCGACCTAACAACAATGCTTCCATTGGCT	Hind3 Sal1	Topo TA
ACW1	Rhotekin 2 PH- und MBDomäne	601	279 - 601	subkloniert aus AHW 1	Hind3 ApaI	p EGFP-cw3
AHW 1	Rhotekin 2 PH- und MBDomäne	601	279 - 601	CGAAGCTTGCATTTGCAGGATTCCTTAAT / CGGTTCGACCTATACTTGTGCTTGGAGCCA	Hind3 Sal1	Topo TA
BEI5	Rhotekin 2 FL	601	1 - 601	subkloniert aus AEL3	Hind3 ApaI	pCMV-Tag2b
BSQ1	Rhotekin 2 FL	601	1 - 601	subkloniert aus AEL3	Hind3 XhoI	pET 32b
BSR1	Rhotekin 2 MBDomäne	601	376 - 601	Klon 336 subkloniert	EcoR1 Xho1	pET 32c
BSS1	Synbape	369	52 - 369	Klon 320 subkloniert	EcoR1 Xho2	pET 32c

Anhang

AVS1	nArgBP2	645	401 - 548	Klon 902 subkloniert	Sac1 Hind3	p EGFP- cw3
QE 2	upP Rix FL mit unkodierender Sequenz	156	1 - 156	Klon 197 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
PV1	RNA binding Protein (Interleukin enhancer binding Factor3)	910	545 - 646	Klon 137 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
PY1	putative RNA Helicase	ub	69	Klon 163 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
VX3	RNA-Promotor binding Protein (Ribin; C-terminales Fragment)	295	243-295	Klon 453 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
RFB3	Syndapin III ¹ FL	424	1 - 424	CGGAATTCATGGCTCCAGAGGAGGACGCC / CGCGTCGACTCAGGCACCCACACATTCTAC	EcoR1 Sal1	pGEX- 5X-1
BET 1	Syndapin III FL	424	1 - 424	subkloniert aus RFB 3	EcoR1 Sal1	pCMV- Tag2b
QB1	Spermin Synthase	366	-26 - 90	Klon 180 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
RV1	Synbape	369	52 - 369	Klon 320 (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
RY1	Synbape	369	224 - 369	Klon 327 (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
RX1	Synbape	369	52 - 369	Klon 320 subkloniert	EcoR1 Xho1	pGEX- 4T2
SA1	Synbape	369	224 - 369	Klon 327 subkloniert	EcoR1 Xho1	pGEX- 4T2
AHA1	Synbape 2. NLS bis Ende	369	268 - 369	subkloniert aus AHN1	EcoR1 Sal1	pEGFP- C2
AHN1	Synbape 2. NLS bis Ende	369	268 - 369	CGGAATTCGCGGCCAAAGCCCGTGGA / GCGGTCGACTCATAGTTCTTCCAAGTTGAC	EcoR1 Sal1	Topo TA
AHQ 1	Synbape Anfang bis einschl. 0,3 PEST	369	1 - 169	CGGAATTCATGGAGACTCTGTGTCCTCCT / CGCGTCGACCTAACTGCTAGCTGCATCAAGACC	EcoR1 Sal1	pCMV- Tag2b
BEN 7	Synbape Anfang bis einschl. 0,3 PEST	369	1 - 169	subkloniert aus AHQ1	EcoR1 Sal1	pEGFP- C2

Anhang

BEQ 7	Synbape Ende PEST bis Ende	369	230 - 369	subkloniert aus AHO2	EcoRI SalI	pEGFP- C2
AHO 2	Synbape Ende PEST bis Ende	369	230 - 369	CGGAATTCCGCGATCTCCGCCAGGAA / GCGGTCGACTCATAGTTCTTCCAAGTTGAC	EcoRI SalI	pCMV- Tag2b
BEG3	Synbape FL	369	1 - 369	CGGAATTCATGGAGACTCTGTGTCCTCT / GCGGTCGACTCATAGTTCTTCCAAGTTGAC	EcoRI SalI	pCMV- Tag2b
BEF3	Synbape FL	369	1 - 369	subkloniert aus BEG3	EcoRI SalI	pEGFP- C2
BST2	Synbape FL	369	1 - 369	subkloniert aus BEG3	EcoRI SalI	pET 32a
AHB1	Synbape PEST	369	162 - 234	CGGAATTCGGGGTCTTGATGCAGCTAGC / CGCGTCGACCTATTCTGGCGGAGATCGCG	EcoRI SalI	pEGFP- C2
AHP2	Synbape PEST	369	162 - 234	CGGAATTCGGGGTCTTGATGCAGCTAGC / CGCGTCGACCTATTCTGGCGGAGATCGCG	EcoRI SalI	Topo TA
BGB	Synbape* FL	369	1 - 369	CGGAATTCATGGAGACTCTGTGTCCTCT / AAACTCTGGGGTCCCCGCAGCCCGCGGGCGGCGTAGGCGAGCAGGG + CCCTGCTCGCCTACGGCCGCGGCGGGCTGCGGGACCCCAGAGTTT / GGGCGGGGGCGGCGCTGCCGCAGCTGCTGCTGCGGCTGCTCCACGGGC + GCCCCGTGGAGCAGCCGCAGCAGCAGCTGCGGCAGCGCCGCCCGCCCCG / GCGGTCGACTCATAGTTCTTCCAAGTTGAC	EcoRI SalI	pEGFP- C2
BN3	Syndapin I'	441	1-441	subkloniert aus BG2	EcoRI BamHI	pAS2-1
OE2	Syndapin I	441	1 - 128	CGGAATTCATGTCTGGCCCCTACGATG / CGCGGATCCTACTCCTTGAAGCCGCCCATG	EcoRI BamHI	pGBTK 7
OF1	Syndapin I	441	124 - 289	CGGAATTCGGCGGCTTCAAGGAGACGA / CGCGGATCCTAGCCACTGGTGCTACGGAAC	EcoRI BamHI	pGBTK 7
OG1	Syndapin I	441	336 - 386	CGGAATTCTCCCAGGCTGGGGACCGTG / CGCGGATCCTATCCCTTGGCATCGTCCTCG	EcoRI BamHI	pGBTK 7
N10	Syndapin I'	441	376-441	CGCGGATCCAACCCCTTCGAGGACGATGC / CGGAATTCCTATATAGCCTCAACGTAG	BamHI EcoRI	pGEX- 2T
BE6	Syndapin I'	441	1-382	CGCGGATCCATGTCTGGCTCCTACGATG / CGGAATTCCTAGGCATCGTCCTCGAAGGG	BamHI EcoRI	pGEX- 2T
BG2	Syndapin I'	441	1-441	CGCGGATCCATGTCTGGCCCCTACGATG / CGGAATTCCTATATAGCCTCAACGTAG	BamHI EcoRI	pGEX- 2T

Anhang

DH1	Syndapin I ¹	441	1-441	subkloniert aus BG2	BamH1 EcoRI	pcDNA3 .1HisC
DF1	Syndapin I ¹	441	376-441	subkloniert aus N10	BamH1 EcoRI	pcDNA3 .1HisC
BSU 1	Syndapin I	441	1 - 128	subkloniert aus OE2	EcoRI Sal1	pGEX- 5x1
BSV 1	Syndapin I	441	124 - 289	subkloniert aus OF1	EcoRI Sal1	pGEX- 5x1
BSW1	Syndapin I	441	336 - 386	subkloniert aus OG1	EcoRI Sal1	pGEX- 5x1
BO1	Syndapin I ¹	441	1-382	subkloniert aus BE6	EcoRI BamH1	pAS2-1
CA1	Syndapin I * ¹	441	376-441	CGCGGATCCAACCCCTTCGAGGACGATGC / CGGAATTCCTATATAGCCTCAACGTAGTTGGCAAGATAGAG	BamH1 EcoRI	pGEX- 2T
CC1	Syndapin I * ¹	441	1-441	CGCGGATCCATGTCTGGCCCCTACGATG / CGGAATTCCTATATAGCCTCAACGTAGTTGGCAAGATAGAG	BamH1 EcoRI	pGEX- 2T
OA1	Syndapin II 1	488	1 - 130	CGGAATTCATGTCTGTCACCTACGATG / CGCGGATCCTACTCCTTGAAGCCTCCCATC	EcoRI BamH1	pGBTK 7
OB1	Syndapin II 1	488	126 - 339	CGGAATTCGGAGGCTTCAAGGAGACCA / CGCGGATCCTATCCAGACTGGTCACCTGTC	EcoRI BamH1	pGBTK 7
OC3	Syndapin II 1	488	338 - 428	CGGAATTCTCTGGACAGAACAAGCCTA / CGCGGATCCTATCCTGAGGTAGTGTCTCG	EcoRI BamH1	pGBTK 7
CX7	Syndapin II 1 ¹	488	1-488	CGCGGATCCATGTCTGTCACCTACGATGA / CGGAATTCTCACTGGATAGCCTCAGCATAG	BamH1 EcoRI	pGEX- 2T
DE1	Syndapin II 1 ¹	488	419-488	CGCGGATCCAACCCGTTTGACGAGGACAC / CGGAATTCTCACTGGATAGCCTCAGCATAG	BamH1 EcoRI	pGEX- 2T
BSX1	Syndapin II 1	488	1 - 130	subkloniert aus OA1	EcoRI Sal1	pGEX- 5x1
BSY1	Syndapin II 1	488	126 - 339	subkloniert aus OB1	EcoRI Sal1	pGEX- 5x1
BSZ1	Syndapin II 1	488	338 - 428	subkloniert aus OC3	EcoRI Sal1	pGEX- 5x1
SZ4	Syndapin II 1 * ¹	488	383-488	CGCGGATCCAAGGCCAAAAATGTCAGCAG / CGGAATTCCTACTGGATAGCCTCGACATAGTTGGCTAGGTATAG	BamH1 EcoRI	pGEX- 2T

Anhang

OD2	Syndapin II s	447	338 - 387	CGGAATTCTCTGGACAGAACAAGCCTA / CGCGGATCCTATCCTGAGGTAGTGTCCCTCG	EcoRI BamH1	pGBTK 7
CW1	Syndapin II s ¹	447	1-447	CGCGGATCCATGTCTGTACCTACGATGA / CGGAATTCTCACTGGATAGCCTCAGCATAG	BamH1 EcoRI	pGEX- 2T
BTA1	Syndapin II s	447	338 - 387	subkloniert aus OD2	EcoR1 Sal1	pGEX- 5x1
AVH 5	Ubiquitin-conjugating enzyme	116	1 - 116	Klon 342 subkloniert	EcoR1 Sal1	p EGFP- cw3
PI3	unbekanntes, potentielles Protein	ub	>92	Klon 99 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
VI7	unbekanntes, potentielles Protein	ub	>125	Klon 488 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
PF2	unbekanntes, potentielles Protein	ub	98	Klon 96 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
VL4	unbekanntes, potentielles Protein	ub	110/Sp	Klon 559 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
WM1	unbekanntes, potentielles Protein	ub	78/Sp	Klon 466 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
WY6	unbekanntes, potentielles Protein	ub	32/Sp	Klon 355 subkloniert (Xho 1 in Sal 1)	EcoR1 Xho1	p EGFP- cw3
AWX 1	Proenkephalin	269	12 - 188	Klon 1302 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
AWY 1	Proenkephalin	269	12 - 188	Klon 1302 subkloniert	EcoR1 Xho1	p CMV- Tag3c
AXC 1	Carboxypeptidase E	476	185 - 331	Klon 1312 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
AXN 1	Splice Variante Stathmin (RB3)	216	37 - 216	Klon 1332 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
AYA 1	Sclip (Stathmin-Familie)	180	8 - 133	Klon 1350 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
AYJ 1	SRB 7 (FL) (supressor of RNA polymerase B)	144	1 - 144	Klon 1306 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
AYK 1	SRB 7 (FL) (supressor of RNA polymerase B)	144	1 - 144	Klon 1306 subkloniert	EcoR1 Xho1	p CMV- Tag3c

Anhang

AYP 1	Guanylat Kinase 1	198	88 - 198	Klon 1353 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
AYX 1	Ferritin, heavy polypeptide 1	182	30 - 182	Klon 1360 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
AZC 1	unbekanntes, potentiell Protein	ub	144/Sp	Klon 1361 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
AZN 1	unbekanntes, potentiell Protein, ähnlich Keratin	423	125 - 301	Klon 1373 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
AZX 1	Ubiquitin	305	238 - 305	Klon 1382 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
BAC 1	cytoplasmatisches beta- Aktin	375	198 - 375	Klon 1386 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
BAK 1	PKC zeta iaP	439	17 - 143	Klon 1399 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
BAT 1	unbekanntes, potentiell Protein	ub	97/Sp	Klon 1404 subkloniert	EcoR1 Xho1	p CMV- Tag3c
BAX 1	GAPDH	333	191 - 333	Klon 1405 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
BBE 1	unbekanntes, potentiell Protein	ub	165/Sp	Klon 1408 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
BBN 1	Snap25IP 32	266	33 - 183	Klon 1417 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
BCD 1	PCNA	261	20 - 194	Klon 1433 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
BCI 1	Ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 6	418	48 - 226	Klon 1434 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
BCP 1	Ring Finger Protein	377	23 - 141	Klon 1438 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3
BDI 1	Clathrin	248	1 - 138	Klon 1459 subkloniert	EcoR1 Apa1	p EGFP- cw3

1) Konstrukte unserer Arbeitsgruppe, vergl. Qualmann *et al.*, 1999; Qualmann & Kelly, 2000

Tabelle 2

Alignment der Rhotekine

541	-- HzH-Klon	-----	
MBFmus	-- gi:26337105	-----	
RTKN2rat	-- gi:62666053	-----	
RTKN2preChik	-- gi:55633873	-----	
RTKN2hum	-- gi:25140397, gi:26190614	-----	
RTKN2preChil	-- gi:55634959	-----	
RTKN2preGall	-- gi:50749226	-----	
RTKN2preGalk	-- gi:50749224	-----	
RTKNaHum	-- gi:33871180	-----	
RTKNcHum	-- gi:62739181	-----	
RTKNpreChi	-- gi:55596784	-----	1 MARGERRRA
RTKNbHum	-- gi:19526471, gi:17389370	-----	
RTKNpreBos	-- gi:61867132	-----	
RTKNpreMus	-- gi:51714269	-----	
RTKNmus	-- gi:41281638, gi:16975561	-----	
RTKNI2rat	-- gi:33867949	-----	
RTKNilrat	-- gi:33867947, gi:34576549	-----	
RTKNbDR	-- gi:68361096	-----	
RTKNpreSIG	-- gi:72168829	-----	
RTKNcele	-- gi:17550234	-----	
541		-----	
MBFmus		-----	
RTKN2rat		-----	
RTKN2preChik		-----	
RTKN2hum		-----	
RTKN2preChil		-----	
RTKN2preGall		-----	
RTKN2preGalk		-----	
RTKNaHum		-----	
RTKNcHum		-----	
RTKNpreChi	481	PGARRDLQRPQTPQLLSRQLGADVTGVL	SAAAGGGAAMLAPWLLRFPAALGPSRLPRPVQ 540
RTKNbHum		-----MQDRLH-----	ILEDLN 12
RTKNpreBos		-----MQDRLH-----	ILEDLN 12
RTKNpreMus		-----MQASQRPQPPAPGALGASRGNWELMSRAP	TGTADAGGA-VAPTLG 45
RTKNmus		-----MQDRLR-----	ILEDLN 12
RTKNI2rat		-----MQDRLR-----	ILEDLN 12
RTKNilrat		-----MQDRLR-----	ILEDLN 12
RTKNbDR		-----	
RTKNpreSIG		-----	MAAF 4
RTKNcele		-----	

Anhang

541	-----MEGQLLR	7
MBFmus	-----MEGQLLR	7
RTKN2rat	-----MKICRVSRRPVSADVAIQVCLLVCATVTFKDGREERMTKPLLR	44
RTKN2preChik	-----MGAPRFRNPARPVDSWLIT	20
RTKN2hum	-----MEGPSLRGPALR	12
RTKN2preChil	-----	
RTKN2preGall	-----	
RTKN2preGalk	-----MQRRGSGAAG	10
RTKNaHum	MEFKRG-----RFRLS-----LFSD	34
RTKNcHum	-----	
RTKNpreChi	LSGPRA-----PLRASRNAGWGRIREASQLALIHSPSFLDH	577
RTKNbHum	MLYIR-----QMALS-----	22
RTKNpreBos	MLYIR-----QMALS-----	22
RTKNpreMus	VLQSPRDPPATLAPRVSATCDPSLTAGAMDKARE-----	79
RTKNmus	MLYIR-----QMALS-----	22
RTKNi2rat	MLYIR-----QMALS-----	22
RTKNilrat	MLYIR-----QMALS-----	22
RTKNbDR	-----	
RTKNpreSIG	QRQFQAVRRSFRKKRDYDVVFECTPVVKRQKIGNFRPEISEELASMDVRSIAQDGSRW	64
RTKNcele	-----	
541	-----GLAAQQDCSIREKIDLEIRMREGIWKLLSLSTKKDQVLHAVKNLMVC	54
MBFmus	-----GLAAQQDCSIREKIDLEIRMREGIWKLLSLSTKKDQVLHAVKNLMVC	54
RTKN2rat	SVHSLALTFNYLPYQSDDCS IQEKIDLEIRMREGIWKLLSLSKKKDQVLHAVKNLMVC	104
RTKN2preChik	-----DLMGSTDCNIQEKIDLEIRMREGIWKLLSLSTQKDQVLHAVKNLMVC	67
RTKN2hum	-----LAGLPTQQDCNIQEKIDLEIRMREGIWKLLSLSTQKDQVLHAVKNLMVC	61
RTKN2preChil	-----	
RTKN2preGall	-----	
RTKN2preGalk	-----AAGAERERNIQEKMDFEIRIREGIRKLLTVSTQKDQLLQAVKNLMVC	57
RTKNaHum	LP-----EDTELQRKLDHEIRMREGACKLLAACSQREQALEATKSLLV	78
RTKNcHum	-----MREGACKLLAACSQREQALEATKSLLV	28
RTKNpreChi	LPSHPSLPLTSSPKLRGPDTELQRKLDHEIRMREGACKLLAACSQREQALEATKSLLV	637
RTKNbHum	-----LEDTELQRKLDHEIRMREGACKLLAACSQREQALEATKSLLV	65
RTKNpreBos	-----LEDTELQRKLDHEIRMREGACKLLAACSQREQALEATKSLLV	65
RTKNpreMus	-----GSDTELQRKLDHEIRMRDGACKLLAACSQREQALEATKSLLV	122
RTKNmus	-----LEDTELQRKLDHEIRMRDGACKLLAACSQREQALEATKSLLV	65
RTKNi2rat	-----LEDTELQRKLDHEIRMREGACKLLAACSQREQALEATKSLLV	65
RTKNilrat	-----LEDTELQRKLDHEIRMREGACKLLAACSQREQALEATKSLLV	65
RTKNbDR	-----	
RTKNpreSIG	DIIEDLDLFFYFRQLAVSLQDYDMQQKIDLEIKMREGTRKLLVACKREAQSLEAAKNLLTS	124
RTKNcele	-----MWHVEGAFRTTQNHQFLTSSMHKTKKKHLHIYLLPIVREKSSRLVCLLLSCTP	53
541	SARIQAYTAELQKSKEEIANQT---GAR-----	79
MBFmus	SARIQAYTAELQKSKEEIANQT---GAR-----	79
RTKN2rat	NARMQVYTAELQK-LEETASQT---GRRLVLSFTFALAYLGPFLPSQPQSQKPPGPRRRG	160
RTKN2preChik	NARLMAYTSELQKLEEQIANQT---GRC-----	92
RTKN2hum	NARLMAYTSELQKLEEQIANQTGRC-----	86
RTKN2preChil	-----	
RTKN2preGall	-----	
RTKN2preGalk	NARIRAYRTELQN-----	70
RTKNaHum	NSRILSYMGELORRKEAQLGK-----	100
RTKNcHum	NSRILSYMGELORRKEAQLGK-----	50
RTKNpreChi	NSRILSYMGELORRKEAQLGK-----	659
RTKNbHum	NSRILSYMGELORRKEAQLGK-----	87
RTKNpreBos	NSRILNYMGELORRKEAQLGK-----	87
RTKNpreMus	NSRILSYMGELORRKEAQLGK-----	144
RTKNmus	NSRILSYMGELORRKEAQLGK-----	87
RTKNi2rat	NSRILSYMGELORRKEAQLGK-----	87
RTKNilrat	NSRILSYMGELORRKEAQLGK-----	87
RTKNbDR	-----MWFETQRN-----	8
RTKNpreSIG	NVRVLSYMSELQRRKTAEFADR-----	146
RTKNcele	ILSKPCVYGHAHGRSNELITRG-----	75

Anhang

541	-----DSSSENKEGESCRGKIALSDIRIPLMWKDSDFHFSN	114
MBFmus	-----DSSSENKEGESCRGKIALSDIRIPLMWKDSDFHFSN	114
RTKN2rat	TGCGAGSVHSIFLHTQELPFQHRPPDASLETKEQEPCRGKIALSDIRIPLMWKDSDFHFGH	220
RTKN2preChik	-----DVKFESKERTACKGKIAISDIRIPLMWKDSDFHFSN	127
RTKN2hum	-----DVKFESKERTACKGKIAISDIRIPLMWKDSDFHFSN	121
RTKN2preChil	-----	
RTKN2preGall	-----	
RTKN2preGalk	-----	
RTKNaHum	-----TSRRPSDSGPPAERSPCRGRVCISDLRIPLMWKDTEYFKN	140
RTKNcHum	-----TSRRPSDSGPPAERSPCRGRVCISDLRIPLMWKDTEYFKN	90
RTKNpreChi	-----TSRRPSDSGPPAERSPCRGRVCISDLRIPLMWKDTEYFKN	699
RTKNbHum	-----TSRRPSDSGPPAERSPCRGRVCISDLRIPLMWKDTEYFKN	127
RTKNpreBos	-----TGRRPSDSGPPTERSPCRGRVICISDLRIPLMWKDTEYFKN	127
RTKNpreMus	-----TGRRPSDSVQPAQHSPCRGRVCISDLRIPLMWKDTEYFKN	184
RTKNmus	-----TGRRPSDSVQPAQHSPCRGRVCISDLRIPLMWKDTEYFKN	127
RTKNI2rat	-----TGRRPSDSVQPPERSPCRGRVCISDLRIPLMWKDTEYFKN	127
RTKNilrat	-----TGRRPSDSVQPPERSPCRGRVCISDLRIPLMWKDTEYFKN	127
RTKNbDR	-----FTIRG---CMDLRIPLMWKDTEYFKN	31
RTKNpreSIG	-----AASRKIKSAGSDSGVEAE	164
RTKNcele	-----IPIFNCILQYHLLYEDKIQIVK	97
541	KECTQRFAIFCLFRMGAQVFDTDMVIVDQTVTDICFENVTFIFNEAGPDFQIKIEVYSCSA	174
MBFmus	KECTQRFAIFCLFRMGAQVFDTDMVIVDQTVTDICFENVTFIFNEAGPDFQIKIEVYSCSA	174
RTKN2rat	KECTQRFAIFCLFRMGTQVFDTDMVIVDQTVTDICFENVTFIFNEAGPDFRVKIEVYSSSA	280
RTKN2preChik	KERSRRYAI FCLFKMGANVFDTDVVNVDKTITD ICFENVTFIFNEAGPDFQIKVEVYSCCT	187
RTKN2hum	KERSRRYAI FCLFKMGANVFDTDVVNVDKTITD ICFENVTFIFNEAGPDFQIKVEVYSCCT	181
RTKN2preChil	-----	
RTKN2preGall	-----MGAEVFDTDVAIVDKAITD ICFENVTFIFDEAGPDFQVKVEVYSCCM	46
RTKN2preGalk	-----QMEEPVSCRTGGWLS DAG-----	88
RTKNaHum	KGDLHRWAVFLLLQLGEHIQDTEMILVDRTLTD ISFQSNVLF AEAGPDFELRLELYGACV	200
RTKNcHum	KGDLHRWAVFLLLQLGEHIQDTEMILVDRTLTD ISFQSNVLF AEAGPDFELRLELYGACV	150
RTKNpreChi	KGDLHRWAVFLLLQLGEHIQDTEMILVDRTLTD ISFQSNVLF AEAGPDFELRLELYGACV	759
RTKNbHum	KGDLHRWAVFLLLQLGEHIQDTEMILVDRTLTD ISFQSNVLF AEAGPDFELRLELYGACV	187
RTKNpreBos	KGDLHRWAVFLLLQIGEHIQDTEMILVDRTLTD ISFQNNVLF AEAGPDFELRLELYGACV	187
RTKNpreMus	KGDLHRWAVFLLLQIGEHIQDTEMVLVDRTLTD ISFQNNVLF AEAEPDFELRLELYGACV	244
RTKNmus	KGDLHRWAVFLLLQIGEHIQDTEMVLVDRTLTD ISFQNNVLF AEAEPDFELRLELYGACV	187
RTKNI2rat	KGDLHRWAVFL-----	138
RTKNilrat	KGDLHRWAVFLLLQLGEHIQDTEMVLVDRTLTD ISFQNNVLF AEAGPDFELRLELYGACV	187
RTKNbDR	KGELHRC AVFCLLQLGGEIFD TDMVMVDRTLTD ICFDNTIVFNEAAPGFELRVELYSCCS	91
RTKNpreSIG	AGG-----DVIEPC RATVFTNSPHVERRGPYKEQRS DNVKPDFTCILEVYSYNL	213
RTKNcele	ELN-----NILPLEEEEMLP GDGLGLSPTSSRANVGLS QISLPLAWKPKARTDYG	147
541	EES-SLTNTPRKLAKKLT SISKATGRKISAA LQEE SPE-----ACLLAG-SVAGAK	224
MBFmus	EES-SLTNTPRKLAKKLT SISKATGRKISAA LQEE SPE-----ACLLAG-SVAGAK	224
RTKN2rat	EES-SITNTPKKLAKKLT SISKATGRKISAVLQEE DQE-----ASLLVS-SVAGAK	330
RTKN2preChik	EES-SITNTPKKLAKKLT SISKATGKKISSV LQEE DDE-----MCLLLS-SAVL--	235
RTKN2hum	EESITN-TPKKLAKKLT SISKATGKKISSV LQEE DDE-----MCLLLSSAVFGVK	232
RTKN2preChil	-----MKKYGAVLVRF GK-----	14
RTKN2preGall	EESLYIANTPKKL VKKLTSLSKATGKKL KATLEDDGTD-----SILLSDPDIHGAK	98
RTKN2preGalk	-----TKDRMACRAKVALS-----	102
RTKNaHum	EEEGALTGGPKRLATKLS SSSLGRSSGRRVRASLDSAGGS-----GSSPILLPTPVVGGPR	255
RTKNcHum	EEEGALTGGPKRLATKLS SSSLGRSSGRRVRASLDSAGGS-----GSSPILLPTPVVGGPR	205
RTKNpreChi	EEEGALTGGPKRLATKLS SSSLGRSSGRRVRASLDSAGGS-----GSSPILLPTPAVGGPR	814
RTKNbHum	EEEGALTGGPKRLATKLS SSSLGRSSGRRVRASLDSAGGS-----GSSPILLPTPVVGGPR	242
RTKNpreBos	EEEGALAGAPKRLATKLS SSSLGRSSGRRVRASLETAGGS-----GSSPILLPTPAVGGPR	242
RTKNpreMus	EEEGALAGAPKRLATKLS SSSLGRSSGKRVRASLDSAGAS-----GNSPVLLPTPAVGGPR	299
RTKNmus	EEEGALAGAPKRLATKLS SSSLGRSSGKRVRASLDSAGAS-----GNSPVLLPTPAVGGPR	242
RTKNI2rat	-----	
RTKNilrat	EEEGALAGAPKRLATKLS SSSLGRSSGKRVRASLDSAGGS-----GNSPILLPTPAVGGPR	242
RTKNbDR	EDDCSAGSTPRKLASKL SSSLGRSAGKKMRASLEPGAC SPTSNGGGATILLPVPSVPGPK	151
RTKNpreSIG	HNDMTI ASTPQKIRRKLSALSASVGRGSLGHRTQVNST-----SGSTEEEQNEGPR	265
RTKNcele	LENNTGGSLKSRITRSIGRKF GSSVKSQVSTPEMLKSPR-----LDQ TISGAH	195

Anhang

541	YHLLAHTTTLTLENAGDCFKTHNLSVHGDEECDFWLPLYGNVCCRLVAQPACMAADAFAGF	284
MBFmus	YHLLAHTTTLTLENAGDCFKTHNLSVHGDEECDFWLPLYGNVCCRLVAQPACMAADAFAGF	284
RTKN2rat	YHLLAHTTTLTLENAGDCFKTHNLSVHGDEECDFWLPLYGNLCCRLVAQPACMAEDAFAGF	390
RTKN2preChik	-----	
RTKN2hum	YNLLAHTTTLTLESAEDSFKTHNLSINGNEESSFWLPLYGNMCCRLVAQPACMAEDAFAGF	292
RTKN2preChil	-----ESSFWLPLYGNMCCRLVAQPACMAEDAFAGF	45
RTKN2preGall	YSLLAYTTLGLESAEDSFRTNHLTIAGNEESSFWLPLYGNMCCRLVAQPSCMARDMMAGF	158
RTKN2preGalk	-----DIRIPLMWK-----GSDHFN--	117
RTKNaHum	YHLLAHTTTLTAAVQDGFRTHDLTLASHEENPAWLPLYGSVCCRLAAQPLCMTQPTASGT	315
RTKNcHum	YHLLAHTTTLTAAVQDGFRTHDLTLASHEENPAWLPLYGSVCCRLAAQPLCMTQPTASGT	265
RTKNpreChi	YHLLAHTTTLTAAVQDGFRTHDLTLASHEENPAWLPLYGSVCCRLAAQPLCMTQPTASGT	874
RTKNbHum	YHLLAHTTTLTAAVQDGFRTHDLTLASHEENPAWLPLYGSVCCRLAAQPLCMTQPTASGT	302
RTKNpreBos	YHLLAHTTTLTAAVQDGFRTHDLTLATPEESPRAWLPLYGSMCCRLVAQPLCMTQPTASGT	302
RTKNpreMus	FHLLAHTTTLLEEVDGFRTHDLTLSHEENPAWLPLYGSVCCRLAAQPLCMIQPTASGA	359
RTKNmus	FHLLAHTTTLLEEVDGFRTHDLTLSHEENPAWLPLYGSVCCRLAAQPLCMIQPTASGA	302
RTKNi2rat	-----	
RTKNi1rat	YHLLAHTTTLTAAVQDGFRTHDLTLSHEENPAWLPLYGSMCCRLVAQPLCMTQPTASGT	302
RTKNbDR	YHLLAHTTTLNLSHVQDSFRTHDLTITGNEECYWLPLYGSVCCRLAAQPHCMTQQMMSGC	211
RTKNpreSIG	YSLVARARLRLQQVSDQVQTFDLNLTENDNTAHQLQLFGNICCRLLAAQPLCTVEESMSGY	325
RTKNcele	YNLLAKATLSIADACEEATIHNLRMSAFADLS-GPPPLYGHIICRLAIQPHSVLRPILEGV	254
541	LNEQQTGKGLVGVWRRLYCALRGGKLRFCYGPPEIEAKVEPALVVPIDK-----	332
MBFmus	LNEQQTGKGLVGVWRRLYCALRGGKLRFCYGPPEIEAKVEPALVVPIDK-----	332
RTKN2rat	LNEQQTGKGLVGVWRRLYCALRGGKLRFCYGPPEIEAKVEPTLVIPVDKVSRLMSQGVKGH	450
RTKN2preChik	-----	
RTKN2hum	LNQQQMVEGLISWRRLYCVLRGGKLYCFYSPEEIEAKVEPALVVPINK-----	340
RTKN2preChil	LNQQQMVEGLISWRRLYCVLRGGKLYCFYSPEEIEAKVEPALVVPINK-----	93
RTKN2preGall	LNQQQMIGNLTSWRRLYCVLRGGKLFYYSPEEIEAEVEPALTVSINK-----	206
RTKN2preGalk	-NKESM-----	122
RTKNaHum	LRVQQAGE-MQNWAQVHGVLKGTNLFYRQPEDADTGEPELLTIAVNK-----	362
RTKNcHum	LRVQQAGE-MQNWAQVHGVLKGTNLFYRQPEDADTGEPELLTIAVNK-----	312
RTKNpreChi	LRVQQAGE-MQNWAQVHGVLKGTNLFYRQPEDADTGEPELLTIAVNK-----	921
RTKNbHum	LRVQQAGE-MQNWAQVHGVLKGTNLFYRQPEDADTGEPELLTIAVNK-----	349
RTKNpreBos	LRVQQAGE-PRDWVQVHGVLKGTNLFYRQPEDTDTGDEPLFTIAINK-----	349
RTKNpreMus	LRVQQAGE-LQNGTLVHGVLKGTNLFYRSEDADTGOEPLFTIVINK-----	406
RTKNmus	LRVQQAGE-LQNGTLVHGVLKGTNLFYRSEDADTGOEPLFTIVINK-----	349
RTKNi2rat	-----	
RTKNi1rat	LRVQQAGE-LQSGTLVHGVLKGTNLFYRSEDADSGOEPLFTILINK-----	349
RTKNbDR	LRVKLGGE-PQGWTVNYGVLKGTNLFYHQKEDMEANVEPVLITIGINK-----	258
RTKNpreSIG	LSSQDEFQKPVSNRLWCRLQGSHLICWDDPTEGNLG-EPSMTLQLRK-----	372
RTKNcele	LSVQHVEEG-VELENTAARLQAGNLHFYSIGDIANSKNTVLIIPSS-----	301
541	-----ETRIQAVEKDSKK-MHCFSVLSTAAGRAVSHIFAADSLADFQEWMGAFRQ	381
MBFmus	-----ETRIQAVEKDSKK-MHCFSVLSTAAGRAVSHIFAADSLADFQEWMGAFRQ	381
RTKN2rat	631 PLGVRREIVEETRIQAMEKDSKK-MHCFSVLTTAAGRAVSHIFAADGLGDFQEWMDAFRQ	689
RTKN2preChik	-----	
RTKN2hum	-----ETRIRAMDKDAKKRIHNFVSVINPVPQAITQIFAVDNREDLQKWMEAFWQ	390
RTKN2preChil	-----ETRIRAMDKDAKKRIHNFVSVINPVPQAITQIFAVDNREDLQKWMEAFWQ	143
RTKN2preGall	-----ETRIRSVDKDSKRRTNFVSVINPVSGEAATQLFATDSREELHKWMEAFWQ	256
RTKN2preGalk	-----	
RTKNaHum	-----ETRVRAGELDQALGRPFTLSISNQYGDDEVTHTLQTESREALQSWMEALWQ	413
RTKNcHum	-----ETRVRAGELDQALGRPFTLSISNQYGDDEVTHTLQTESREALQSWMEALWQ	363
RTKNpreChi	-----ETRVRAGELDQALGRPFTLSISNQYGDDEVTHTLQTESREALQSWMEALWQ	972
RTKNbHum	-----ETRVRAGELDQALGRPFTLSISNQYGDDEVTHTLQTESREALQSWMEALWQ	400
RTKNpreBos	-----ETQVRAGELDQAASWPFTLSISNRYGEEVTHTLQAESRGALQSWMEALWQ	400
RTKNpreMus	-----ETRVRAGELEQAPEWPFTLSISNKYGDDEVTHTLQLESREALQNWMEALWQ	457
RTKNmus	-----ETGVRAGELEQAPEWPFTLSISNKYGDDEVTHTLQLESREALQNWMEALWQ	400
RTKNi2rat	-----RYGDDEVTHTLQVQSRDALQSWMEALWQ	166
RTKNi1rat	-----ETRVRAGELEQAPEWPFTLSISNRYGDEVTNTLQVQSRDALQSWMEALWQ	400
RTKNbDR	-----ETRIRAAEKDPQ-SKAQNICITNQYGGEEVTHTLQLESREALQSWMEALWQ	308
RTKNpreSIG	-----NSSAVRSTCCDPLSFVIGCGDNPDKRPFMAESEEELEMWLKGFQEQ	420
RTKNcele	-----RSRIVPTPSARTFLLRRTDESKEVPASSVYIVTNSDRDYEIWRRAIEI	348

Anhang

541	HFFDLS-----	387
MBFmus	HFFDLS-----	387
RTKN2rat	HRFDLITQPGSVQKMRKDLRFPFVVGALLTGRFLATAIHRATYAFIVCDFALEMGLLVT	749
RTKN2preChik	-----	
RTKN2hum	HFFDLS-----	396
RTKN2preChil	HFFDLS-----	149
RTKN2preGall	HFYDLS-----	262
RTKN2preGalk	-----	
RTKNaHum	LFFDMS-----	419
RTKNcHum	LFFDMS-----	369
RTKNpreChi	LFFDMS-----	978
RTKNbHum	LFFDMS-----	406
RTKNpreBos	LFFDMS-----	406
RTKNpreMus	LFFDMS-----	463
RTKNmus	LFFDMS-----	406
RTKNI2rat	LFLDMS-----	172
RTKNilrat	LFLDMS-----	406
RTKNbDR	QFYDMS-----	314
RTKNpreSIG	QLINIET-----	427
RTKNcele	QIYDIG-----	354
541	-----	
MBFmus	-----	
RTKN2rat	AASEPAKPRVKSQPGFHVDRTIQAHAVESLASNSDLRTLNLDCFPRLSDSDSLTSSKKPL	809
RTKN2preChik	-----	
RTKN2hum	-----	
RTKN2preChil	-----	
RTKN2preGall	-----	
RTKN2preGalk	-----	
RTKNaHum	-----	
RTKNcHum	-----	
RTKNpreChi	-----	
RTKNbHum	-----	
RTKNpreBos	-----	
RTKNpreMus	-----	
RTKNmus	-----	
RTKNI2rat	-----	
RTKNilrat	-----	
RTKNbDR	-----	
RTKNpreSIG	-----	
RTKNcele	-----	
541	-----QWKHCCEELMRIEIMSPR	405
MBFmus	-----QWKHCCEELMRIEIMSPR	405
RTKN2rat	ILRNSWQYMLYVGIITEKVAIKALVQNILVPVGPEEDPFLGHWKHCCEELMRIEIMSPR	869
RTKN2preChik	-----	
RTKN2hum	-----QWKHCCEELMKIEIMSPR	414
RTKN2preChil	-----QWKHCCEELMKIEIMSPR	167
RTKN2preGall	-----QWKHCCEELMKIEIMSPR	280
RTKN2preGalk	-----	
RTKNaHum	-----QWKQCCDEIMKIETPAPR	437
RTKNcHum	-----QWKQCCDEIMKIETPAPR	387
RTKNpreChi	-----QWKQCCDEIMKIETPAPR	996
RTKNbHum	-----QWKQCCDEIMKIETPAPR	424
RTKNpreBos	-----QWKQCCDEIMKIETPAPR	424
RTKNpreMus	-----QWRHCCDEVMKIETPAPR	481
RTKNmus	-----QWRHCCDEVMKIETPAPR	424
RTKNI2rat	-----QWKHCCDEVMKIETPAPR	190
RTKNilrat	-----QWKHCCDEVMKIETPAPR	424
RTKNbDR	-----QWRQCCDDLKMKIELPSPR	332
RTKNpreSIG	-----WSECCHQKMKIYSPFPG	444
RTKNcele	-----IWGRFATKISSLLTQKRE	372

Anhang

541	KPPLFLAKEATS--VYYDMSIDSPVKLESVTDIIQKKIGETNGQ----	FLIGRDDQSAAP	459	
MBFmus	KPPLFLAKEATS--VYYDMSIDSPVKLESVTDIIQKKIGETNRQ----	FLIGRDDQSAAP	459	
RTKN2rat	KPPLFLAKEATS--VYHDMSIDSPVKLESVTDIIQKKIGETNGQ----	FLIGREEESTTP	923	
RTKN2preChik	-----	-----	-----	
RTKN2hum	KPPLFLTKEATS--VYHDMSIDSPMKLESALTDIIQKKIETNGQ----	FLIGQHEESLPP	468	
RTKN2preChil	KPPLFLTKEATS--VYHDMSIDSPMKLESALTDIIQKKIETNGQ----	FLIGQHEESLPP	221	
RTKN2preGall	KPPLFLTKEATS--VYHDMSIDSPVKEGLADIIQRKIEKSDGE---	FLLCQQKEPASS	334	
RTKN2preGalk	-----	-----	-----	
RTKNaHum	KPPQALAKQGS---LYHEMAIEPLDDIAAVTDILTQRE-----	GARLETPP	480	
RTKNcHum	KPPQALAKQGS---LYHEMAIEPLDDIAAVTDILTQRE-----	GARLETPP	430	
RTKNpreChi	KPPQALAKQGS---LYHEMAIEPLDDIAAVTDILTQRE-----	GARLETPP	1039	
RTKNbHum	KPPQALAKQGS---LYHEMAIEPLDDIAAVTDILTQRE-----	GARLETPP	467	
RTKNpreBos	KPPQVLAKQGS---LYHEMAIEPLDDIAAVTDILAQRE-----	GARLETPP	467	
RTKNpreMus	KPPQALVKQGS---LYHEMAIEPLDDIAAVTDILAQRE-----	GTRLEPSP	524	
RTKNmus	KPPQALVKQGS---LYHEMAIEPLDDIAAVTDILAQRE-----	GTRLEPSP	467	
RTKNI2rat	KPPQALAKQGS---LYHEMAIEPLEDIAAVTDILAQRE-----	GTRLEPPP	233	
RTKNI1rat	KPPQALAKQGS---LYHEMAIEPLEDIAAVTDILAQRE-----	GTRLEPPP	467	
RTKNbDR	KPAIVTPKQGS---LYHEMVIDTSDDIGTVTDILTRMEE-----	FELRTQLGSPP	380	
RTKNpreSIG	RSDLVLAERKGS--LYDECSLVSPEREENFNDENVFQPPSDN-----	LSRKRKMS	493	
RTKNcele	DIIRETLRGTGSNLYETISIKGSIKAFGGLSLVPCDGQPHNGAATAPVKRPQVKQRA		432	
541	PWAAVFDGNHEMVIKQKVLSP-----	TGEPAPDGKRKKRRAPLPPTDQPPFCIKTQ	510	
MBFmus	PWAAVFDGNHEMVIKQKVLSP-----	IGEPAPDGKRKKRRAPLPPTDQPPFCIKTQ	510	
RTKN2rat	PWASVFDGSHEMVIKQKVLSP-----	AGKPAPDGKRKKRRAPLPMPDQPPFSVKTQ	974	
RTKN2preChik	-----	-----	-----	
RTKN2hum	PWATLFDGNHQMVIKQKVLSP-----	ASEPLHDEKGGKRQAPLPPSDKLPFSLKSQ	519	
RTKN2preChil	PWATLFDGNHQMVIKQKVPSP-----	ASEPLHDEKGGKRQAPLPPSDKLPFSLKSQ	272	
RTKN2preGall	LWASLFDGSHEMVVQKNMHTA-----	SPN---DGRGKKRRAPPPSDKPAYNAKAC	382	
RTKN2preGalk	-----	-----	-----	
RTKNaHum	PWLAMFTDQP-----	ALPNPCSPASVAPAPDWTHP--	510	
RTKNcHum	PWLAMFTDQP-----	ALPNPCSPASVAPAPDWTHP--	460	
RTKNpreChi	PWLAMFTNQP-----	ALPNPCSPASVAPAPAWTHP--	1069	
RTKNbHum	PWLAMFTDQP-----	ALPNPCSPASVAPAPDWTHP--	497	
RTKNpreBos	PWLAVFTDQP-----	ALPGPCSPASVAPAPARIHS--	497	
RTKNpreMus	PWLAMFTDQP-----	ALPSSCSPASVAPVPTWMQP--	554	
RTKNmus	PWLAMFTDQP-----	ALPSSCSPASVAPVPTWMQP--	497	
RTKNI2rat	PWLAMFTDQP-----	ALRSSCSPAS---VPTWTQP--	260	
RTKNI1rat	PWLAMFTDQP-----	ALRSSCSPAS---VPTWTQP--	494	
RTKNbDR	HWMSLFEEPPRSPLNHQRLPPRSPSPHLHGRPPRSPRLLSSNASLTSDSPPSSISPCF		440	
RTKNpreSIG	QSMAAVPSTS-----	SSSSTSSLSSSPLLPPVKRP--	522	
RTKNcele	KVIDFFQAQS-----	PKPSRKSIIHEPSSNYVIQLN	463	
541	GSANQSKDSATQAGVSGASPLPSDPRLL-----	LPTHHLQKPVAAPRKLPPARKNSS	562	
MBFmus	GRANQSKDSATQAGVSGASSPSDPRLS-----	PPTHHLQKPVAAPRKLPPARKNSS	562	
RTKN2rat	GSMGQSKDSEAQVGVSGAPS--SDRRLS-----	PPTHHLQKPVAAPRKLPPTRKSSS	1024	
RTKN2preChik	-----	-----	-----	
RTKN2hum	SNTDQLVKDNWKG-TSVSQTSSLDTKLS-----	TLMHHLQKPMAAPRKLPPARRNRL	570	
RTKN2preChil	SNTDQLVKDNWKG-TSVSQTSSLDTKLS-----	TLMHHLQKPMAAPRKLPPARRNRL	323	
RTKN2preGall	GNIAELDKENWER-PGGMSCSSVDSALS-----	TETQQLQTPIAAPHHICPCRKNSL	433	
RTKN2preGalk	-----	-----	-----	
RTKNaHum	-LPWG-----	RPRTFSLDAVPP-----	DHSP-RARSVAPLPPQR---	542
RTKNcHum	-LPWG-----	RPRTFSLDAVPP-----	DHSP-RARSVAPLPPQR---	492
RTKNpreChi	-LPWG-----	RPRTFSLDAVPP-----	DHSP-RARSVAPLPPQR---	1101
RTKNbHum	-LPWG-----	RPRTFSLDAVPP-----	DHSP-RARSVAPLPPQR---	529
RTKNpreBos	-LPWG-----	RPRTFSLDAVPS-----	DHSPGASRLVAPLPLQR---	530
RTKNpreMus	-LPWG-----	RPRTFSLDAAPA-----	DHSLGPSRSVAPLPPQR---	587
RTKNmus	-LPWG-----	RPRTFSLDAAPA-----	DHSLGPSRSVAPLPPQR---	530
RTKNI2rat	-LPWG-----	RPRTFSLDAVPA-----	DHSLGPSRSVAPLPPQR---	293
RTKNI1rat	-LPWG-----	RPRTFSLDAVPA-----	DHSLGPSRSVAPLPPQR---	527
RTKNbDR	RQAWSPDSSSSLSSRFRPRTLSDAKLSTLRGRGYGGYRCSCQPPVAGSVSPRPAQTGLS		500	
RTKNpreSIG	-----	VVLPAAESSPS-----	TSSPTSSAISSSSTQS---	549
RTKNcele	-----	IGEDVMENEYN-----	SYSPLYRMSPRPSS---	489

541	ADIG-----HTDTKTS LD AKPVPVPRQKSIRDILDPR SWL QAQV	601
MBFmus	ADIG-----HTDTKTS LD AKPVPVPRQKSIRDILDPR SWL QAQV	601
RTKN2rat	EDSG-----PTDAKTS LD GKVPVAPRQKSIRDILDPR SWL QAQV	1063
RTKN2preChik	-----	
RTKN2hum	SDGE-----HTDTKTNFEAKPVPAPRQKSIKDILDPR SWL QAQV	609
RTKN2preChil	SDGE-----HTDTKTNFEAKPVPAPRQKSIKDILDPR SWL QAQV	362
RTKN2preGall	ADHKNPI-----SLVTKTESETKPVPTPRQKRIT EVL DPR SWL QPQT	475
RTKN2preGalk	-----	
RTKNaHum	-----SPRT-----RGLCSKGQPRT TWL QSPV	563
RTKNcHum	-----SPRT-----RGLCSKGQPRT TWL QSPV	513
RTKNpreChi	-----SPRT-----RGLCSKGQPRT TWL QSPV	1122
RTKNbHum	-----SPRT-----RGLCSKGQPRT TWL QSPV	550
RTKNpreBos	-----SPRS-----RGLCSKGPPHT TWL QSPV	551
RTKNpreMus	-----SPKS-----RGFYSKSQLGP PWL QSPV	608
RTKNmus	-----SPKS-----RGFYSKSQLGP PWL QSPV	551
RTKNi2rat	-----SPQS-----RGFYSKSQLST TWL QSPV	314
RTKNi1rat	-----SPQS-----RGFYSKSQLST TWL QSPV	548
RTKNbDR	CSSSTSSSSSSEGSNSQESELGFSRPSNARRSLRNLRAK LD PR NWL QSQV	550
RTKNpreSIG	-----PPLFPFDKTVLQKETT	565
RTKNcele	-----YRHHSDDQYKVFISQM-	505

Tabelle 2: Alignment der in Datenbanken veröffentlichten Rhotekine

Die Tabelle zeigt das Alignment der verschiedenen Rhotekine, welche bis jetzt in Datenbanken publiziert sind. Bei identischen Datenbankeinträgen sind beide gi-Nummern für das entsprechende Protein angegeben. Die Abkürzungen bedeuten:

- RTKN = Rhotekin
- pre = predicted (vorhergesagte Sequenz)
- gal = Gallus gallus, Haushuhn
- hum = human
- chi = Schimpanse, Pan troglodytes
- mus = Mus musculus, Hausmaus
- rat = Rattus norvegicus, Wanderratte
- DR = Danio reio, Zebrafisch
- bos = Bos taurus, Hausrind
- SIG = Seeigel, Strongylocentrotus purpuratus
- cele = Caenorhabditis elegans, Fadenwurm
- k = kurz
- l = lang
- i = Isoform

In der vorhergesagten RTKN-Sequenz des Schimpansen und der RTKN2-Sequenz der Ratte, welche beide mit 1122 bzw. 1063 Aminosäuren erheblich länger sind als alle übrigen Sequenzen, sind je ein nicht alignender Bereich nicht gezeigt, daher sind an den entsprechenden Stellen hinter der Bezeichnung die Positionen der ersten wieder angegebenen Aminosäuren in kursiver Schrift angeführt. Die unter 3.5.1 angeführten Motive und Domänen sind jeweils für den Kandidaten 541 in der Aminosäuresequenz kenntlich gemacht, in Grün ist die HR1-Domäne, in Rot die PH-Domäne, in Blau das Syndapin-Interaktionsmotiv und unterstrichen das Kernlokalisierungssignal zu sehen. Der Vergleich der Sequenzen zeigt, daß die Rhotekine in 2 Gruppen unterteilt werden können: Rhotekin 1 umfaßt die humanen Rhotekin-Isoformen a-c, die für Schimpanse, Maus, Rind und Seeigel vorhergesagten Sequenzen, die beiden Ratten-Isoformen, sowie das Maus-, Zebrafisch- und Fadenwurm-Rhotekin. Rhotekin 2 beinhaltet alle als solche ausgewiesenen Sequenzen und MBF. Dabei können 3 Splicevarianten für Rhotekin 2 unterschieden werden (Collier et al., 2004): Eine lange Variante 1, welche vorwiegend im Gehirn exprimiert ist und sowohl die HR1- als auch die PH-Domäne umfaßt und wozu der Kandidat 541, das Rhotekin 2 der Ratte und das humane Rhotekin 2 gehören. Diese Proteine sollten daher als Rhotekin-2a-Homologe bezeichnet werden. Eine kurze Variante 2, welche nur die HR-Domäne beinhaltet und hauptsächlich in Lunge und Dickdarm exprimiert ist. Hierzu zählen das vorhergesagte, kurze Rhotekin 2 des Schimpansen (preChik) sowie das kürzere der beiden postulierten Huhnproteine (preGalk). Diese Proteine sollten also als Rhotekin-2b-Homologe angesprochen werden. Die mittlere Variante 3 schließlich besteht hauptsächlich aus der PH-Domäne und ist in erster Linie im Thymus und in der Milz zu finden. Hierzu gehören das vorhergesagte, lange Rhotekin 2 des Schimpansen A (preChil) und die lange Form des Huhnproteins (preGall). Damit sollten diese Proteine Rhotekin-2c-Homologe genannt werden. Während der C-terminale Bereich, welcher das Syndapin-SH3-Domänen-Interaktionsmotiv umfaßt, sowohl in der Splicevariante 2a als auch in der Variante 2c enthalten ist, fehlt er in der Splicevariante 2b.

Lebenslauf

Persönliches

Name	Regina Dahlhaus
Geburtstag	21.09.1975
Geburtsort	Wuppertal
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Karin Dahlhaus, geb. Schenzer, und Udo Dahlhaus

Schulbildung

1982 - 1986	Grundschule Rottsieper Höhe in Wuppertal - Croneneberg
1986 - 1995	Wilhelm-Dörpfeld-Gymnasiums in Wuppertal - Elberfeld
Mai 1995	Abitur

Studium

1995 - 2000	Studium der Biologie an der Universität Rostock
Sept. 2000	Abschluß des Biologiestudiums mit dem Diplom
2001 - 2005	Anfertigung der Dissertation am Leibniz-Institut für Neurobiologie / Magdeburg in der Abteilung Neurochemie bei Prof. E. Gundelfinger

Wissenschaftliche Publikationen

Poster und publizierte Abstracts

- Kessels, M.M., Dong, J., Dahlhaus, R., Pinyol, R., Westermann, P. and Qualmann, B. (2002) Syndapins and their binding partners, a functional interface between vesicle formation and actin cytoskeleton; GBM-Study Group Neurochemistry Annual Meeting, Magdeburg, 26.-28.09.2002, Restorative Neurology and Neuroscience Vol. 20, p. 73-74
- Dahlhaus, R., Ahuja, R., Braun, A., Kessels, M.M. and Qualmann, B. (2003) Syndapins and their interaction partners, a functional interface between endocytosis and the actin cytoskeleton; ELSO Conference Dresden, 20.-24.09.2003, ELSO Proceedings 2003, p.226
- Braun, A., Pinyol, R., Dahlhaus, R., Grant, B.D., Kessels, M.M. and Qualmann, B. (2004) Interactions of EHD-proteins with Syndapin I and II, a basis for functional connections between membrane trafficking and actin cytoskeleton; Annual Meeting of the DGZ, Berlin 24.-27.3.2004, Eur. J. Cell Biol. 83, Supplement 54, p.81
- Dahlhaus, R., Kessels, M.M. and Qualmann, B. (2005) Synbape, a novel interaction partner of Syndapins, modulates spine morphology upon overexpression; 30th Göttingen Neurobiology Conference, 17.-20.02.2005, Neuroforum Vol. 1 Supplement Nr. 276b

Referierte Originalarbeiten

- Braun, A., Pinyol, R., Dahlhaus, R., Koch, D., Fonarev, P., Grant, B.D., Kessels, M.M. and Qualmann, B. (2005) EHD Proteins Associate with Syndapin I and II and Such Interactions Play a Crucial Role in Endosomal Recycling. Mol. Biol. Cell. 8:3642-58

in Vorbereitung

- Dahlhaus, R., Inciute, A., Kessels, M.M. and Qualmann, B. (2005) Synbape, a novel interaction partner of Syndapins, translocates into the nucleus upon synaptic stimulation and Synbape-Syndapin-interactions are involved in dendritic spine morphology modulation.