

Aus dem
CC 2 - CharitéCentrum für Grundlagenmedizin
Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité Campus Mitte
Direktor: Professor Dr. Robert Nitsch

Habilitationsschrift

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zum neuralem EGF-Familienmitglied CALEB/NGC

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Anatomie und Zellbiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. physiol. Stefan Schumacher
geboren am 01.03.1968 in Mechernich

Eingereicht: Oktober 2007

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Kerstin Krieglstein, Freiburg

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Sendtner, Würzburg

Datum der Habilitation: 20.10.2008

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1	Einleitung	5
1.1	Grundlegende Aspekte der Differenzierung von Neuronen	5
1.2	Suchschema zur Identifizierung von Proteinen, die Bedeutung haben könnten für neuronale Differenzierungsvorgänge	6
1.3	CALEB/NGC ist ein neurales Mitglied der EGF-Proteinfamilie und bindet an Tenascin-C und Tenascin-R	7
2	Zusammenfassung der eigenen Arbeiten	11
2.1	CALEB/NGC bindet mit seinem sauren Peptidsegment an Tenascin-C und Tenascin-R; die Expression von CALEB/NGC wird nach Läsion des optischen Nervs dynamisch reguliert	12
	Zusammenstellung wesentlicher Publikationen – Beitrag 2.1	15
	Schumacher S , Jung M, Nörenberg U, Dorner A, Chiquet-Ehrismann R, Stuermer CAO, Rathjen FG: CALEB/NGC binds via its acidic stretch to the fibrinogen-like domain of tenascin-C or tenascin-R and its expression is dynamically regulated after optic nerve lesion. <u>J Biol Chem</u> 276: 7337-7345, 2001	
2.2	Die Bindung von Tenascin-C und Tenascin-R an CALEB/NGC wird ontogenetisch reguliert	16
	Zusammenstellung wesentlicher Publikationen – Beitrag 2.2	18
	Schumacher S , Stübe E: Regulated binding of the fibrinogen-like domains of tenascin-R and tenascin-C to the neural EGF family member CALEB/NGC. <u>J Neurochem</u> 87: 1213-1223, 2003	
2.3	CALEB/NGC interagiert mit dem Golgi-assoziierten Protein PIST	19
	Zusammenstellung wesentlicher Publikationen – Beitrag 2.3	21
	Hassel B, Schreff M, Stübe E, Blaich U, Schumacher S : CALEB/NGC interacts with the Golgi-associated protein PIST. <u>J Biol Chem</u> 278: 40136-40143, 2003	
2.4	CALEB/NGC reguliert die Komplexität von Dendritenbäumen und	22

	dendritischen Spines	
	Zusammenstellung wesentlicher Publikationen – Beitrag 2.4	26
	Brandt N, Franke K, Rašin MR, Baumgart J, Vogt J, Khrulev S, Hassel B, Pohl EE, Šestan N, Nitsch R, Schumacher S : The neural EGF family member CALEB/NGC mediates dendritic tree and spine complexity. <u>EMBO J</u> 26: 2371-2386, 2007	
2.5	B56β, eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, bindet an CALEB/NGC und inhibiert CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität	27
	Zusammenstellung wesentlicher Publikationen – Beitrag 2.5	29
	Brandt N, Franke K, Buck F, Harder S, Hassel B, Nitsch R, Schumacher S : B56β, a regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with CALEB/NGC and inhibits CALEB/NGC-mediated dendritic branching. <u>FASEB J</u> , in revision, 2007	
3	Diskussion	30
3.1	Extrazelluläre Interaktionen von CALEB/NGC	30
3.2	Intrazelluläre Interaktionen von CALEB/NGC	32
3.3	CALEB/NGC erhöht die Komplexität von Dendritenbäumen und dendritischen Spines	34
4	Zusammenfassung	38
5	Literaturverzeichnis	40
	Tierversuchsgenehmigungen	46
	Danksagungen	47
	Eidesstattliche Erklärungen	49

Abkürzungsverzeichnis

APP	Amyloid Precursor Protein
CALEB	Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein
DIV	Days in vitro
E	Embryonaltag
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FNIII	Fibronectin Typ III
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NGC	Neuroglycan C
P	Postnaltag
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PP2A	Protein Phosphatase 2A
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Short interfering RNA
Y2H	Yeast-2-hybrid

1 Einleitung

1.1 Grundlegende Aspekte der Differenzierung von Neuronen

In der Regel differenzieren Neurone dann vollständig aus, wenn sie ihren definitiven Platz im Nervensystem erreicht haben. Grundlegende Aspekte dieser Differenzierung sind die Ausbildung der jeweiligen typischen Morphologie der Neurone und die Ausprägung ihrer elektrophysiologischen Charakteristika, die zu einem nicht unbeträchtlichen Teil von der neuronalen Morphologie abhängen (1). Diese wird im Wesentlichen bestimmt durch das Axon und den Dendritenbaum. Axone unterscheiden sich morphologisch z. B. im Durchmesser, in der Anzahl der Axonkollateralen und in der Länge. Von der Axonlänge wiederum abhängig ist die Anzahl der Entscheidungen zur Weg-Ziel-Findung, die der Wachstumskegel eines Axons treffen muss. Hierfür ist ein mehr oder weniger umfangreicher Besatz mit Transmembranproteinen notwendig, die als Rezeptoren für Signalmoleküle zur Weg-Ziel-Findung fungieren (2, 3). Teilweise dieselben, doch häufig auch andere Transmembranproteine sind erforderlich, um das Auswachsen des Axons überhaupt zu ermöglichen. Dies geschieht entweder durch Erkennen von wachstumsfördernden Molekülen aus der extrazellulären Matrix oder auf der Oberfläche anderer Zellen, welche die Neurone umgeben (4).

Dendritenbäume unterscheiden sich morphologisch vor allem in ihrer Komplexität und im Ausmaß, wie sehr sie mit dendritischen Dornen, den sogenannten Spines, besetzt sind (5-7). Diese werden als die entscheidenden, wenn auch nicht ausschließlichen, postsynaptischen Kompartimente für exzitatorische Erregungsübertragung angesehen (8, 9). Die Morphologie der Spines kann sehr vielfältig sein und reicht von einer filopodienartigen Gestalt bis hin zu einem pilzartigen Erscheinungsbild. Wenn auch noch nicht bewiesen, so gibt es doch etliche Hinweise, die darauf hindeuten, dass den unterschiedlichen Gestaltungsformen der Spines unterschiedliche funktionelle Zustände entsprechen (9). Obwohl bekannt ist, dass die Komplexität von Dendritenbäumen unterschiedlicher Populationen von Neuronen sehr stark differiert (z. B. der relativ einfache Dendritenbaum eines α -Motoneurons aus dem Rückenmark und der überaus komplexe Dendritenbaum einer Purkinje-Zelle aus dem Kleinhirn), ist nur wenig darüber bekannt, wie die Komplexität von Dendritenbäumen auf molekularer Ebene reguliert wird. Auch die zur Ausgestaltung

der dendritischen Spines erforderlichen molekularen Mechanismen sind derzeit nur unzureichend bekannt (10).

Um die Steuerung der neuronalen Differenzierungsaspekte auf molekularer Ebene zu verstehen, ist es notwendig, die daran beteiligten Moleküle, zumeist Proteine, zu identifizieren und dann strukturell und funktionell zu charakterisieren. Es werden verschiedene experimentelle Ansätze herangezogen, um neue Proteine zu identifizieren, die notwendige Mitspieler im molekularen Netzwerk zur Regulation neuronaler Differenzierung sind. Einer dieser Ansätze wird im Folgenden detailliert beschrieben.

1.2 Suchschema zur Identifizierung von Proteinen, die Bedeutung haben könnten für neuronale Differenzierungsvorgänge

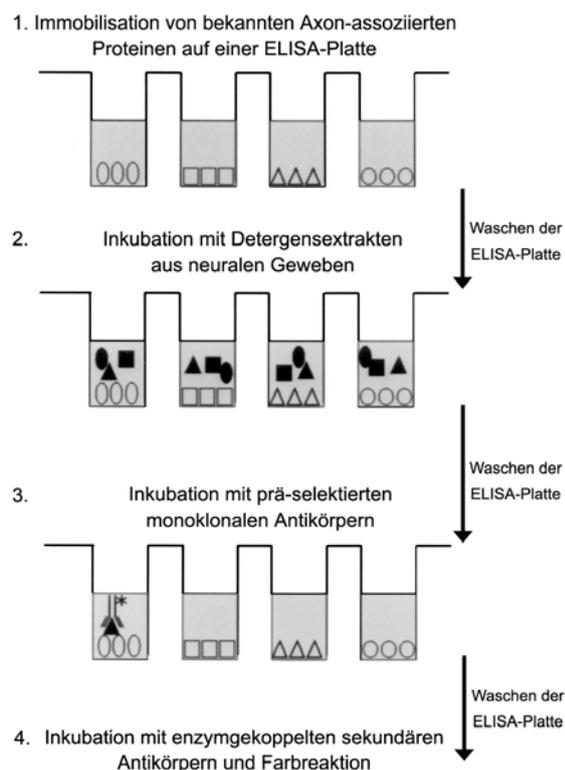


Abbildung 1. Suchschema zur Identifizierung von neuen Interaktionspartnern für bekannte Axon-assoziierte Proteine.

Der dargestellte experimentelle Ansatz ist der ELISA-Technik verwandt und beruht auf einer Interaktion von zwei Proteinen, von denen das eine auf einer Immunsorbent-Platte immobilisiert worden ist. Mit einem gegen das zweite Protein gerichteten Antikörper kann die Interaktion dann über einen enzymgekoppelten sekundären Antikörper und eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

Als die Bedeutung der ersten identifizierten neuronalen Zelladhäsionsproteine für axonale Differenzierungsprozesse wie Axonwachstum, Faszikulation und Weg-Ziel-Findung herausgearbeitet worden war und auch noch keine Daten aus einem Genomprojekt zur Verfügung standen, wurde nicht angenommen, dass die oben angesprochenen Differenzierungsprozesse durch ein überaus komplexes Netzwerk von Proteinen reguliert werden würden (11). Schon ein Jahrzehnt später war klar,

dass gerade neurale Zelladhäsionsproteine, die oft zur Immunglobulinsuperfamilie gehören, nicht nur einen, sondern häufig mehrere Interaktionspartner haben, dass sie also „bindungspromiskuitiv“ sind (4). So z. B. kann Contactin/F11, ein GPI-verankertes neurales Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie, Tenascin-C und Tenascin-R, beides Proteine aus der extrazellulären Matrix, sowie die transmembranalen Proteine NgCAM, NrCAM, Neurofascin, CASPR und RPTP β/ζ binden (12). Funktionell spielen diese Interaktionen nicht nur bei der Regulation des axonalen Wachstums eine Rolle, sondern bei vielfältigen neuronalen Differenzierungsvorgängen, wie z. B. der Ausformung der Ranvier'schen Schnürringe oder der Myelinisierung (12).

Die beschriebene Bindungspromiskuität verschiedener Axon-assoziiierter Proteine wurde dann experimentell ausgenutzt, um nach neuen Proteinen zu suchen, die möglicherweise in neuronale Differenzierungsprozesse involviert sind (13). Dabei wurde nach dem in Abbildung 1 beschriebenen Prinzip vorgegangen. Es wurden gereinigte Axon-assoziierte Proteine auf eine Immunosorbent-Platte (ELISA-Platte) immobilisiert. Nachdem nicht immobilisierte Proteine gewaschen worden waren, wurde die Platte mit Detergensextrakten verschiedener neuraler Gewebe (z. B. Gesamthirn oder Retina) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde die Platte mit prä-selektierten monoklonalen Antikörpern inkubiert. Diese waren vorher in einem umfangreichen Verfahren gegen neurale Zelloberflächenproteine mit Glykoepitopen hergestellt worden. In den Fällen, wo einer dieser monoklonalen Antikörper ein Protein aus dem Detergensextrakt, welches an ein immobilisiertes Protein gebunden hatte, erkannte, konnte dies dann durch eine Farbreaktion nach Bindung von enzymgekoppelten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht werden.

Mit Hilfe des jeweiligen monoklonalen Antikörpers konnte dann eine Durchmusterung von Expressionsbanken durchgeführt werden, um die für das entsprechende erkannte Protein kodierende cDNA zu ermitteln (13).

1.3 CALEB ist ein neurales Mitglied der EGF-Proteinfamilie und bindet an Tenascin-C und Tenascin-R

Bei experimenteller Umsetzung des oben geschilderten Suchschemas hat ein bestimmter monoklonaler Antikörper ein Protein aus einem Detergensextrakt aus neuralem Hühnergewebe erkannt, welches an Tenascin-C und Tenascin-R, zwei

Proteine aus der extrazellulären Matrix (ECM), gebunden hat. Nach Durchmusterung einer Expressionsbank mit diesem Antikörper ist eine cDNA ermittelt worden, die für ein Transmembranprotein kodiert, welches eine extrazellulär gelegene EGF-ähnliche Domäne enthält (13). Als weitere auffällige Charakteristika sind im extrazellulären Bereich dieses Proteins sowohl ein Peptidsegment, welches eine Anhäufung der Aminosäuren Leucin und Prolin aufweist, als auch ein Peptidsegment mit einer ungewöhnlichen Akkumulation der sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat zu finden. Extrazellulär sind experimentell verifizierte Glykosylierungsstellen sowie Anheftungsstellen für Glykosaminoglykane enthalten (13). Nach einer Transmembrandomäne folgt ein zytoplasmatischer Bereich, der keinerlei Ähnlichkeiten zu Peptidsegmenten aus schon bekannten Proteinen hat.

Eine schematische Darstellung dieses Proteins, welches zuerst aus neuralem Hühnergewebe isoliert worden war und aufgrund seiner Strukturmerkmale CALEB (**C**hicken **a**cidic **l**eucine-rich **E**GF-like domain containing **b**rain protein) genannt worden ist (13), ist in Abbildung 2 gezeigt.

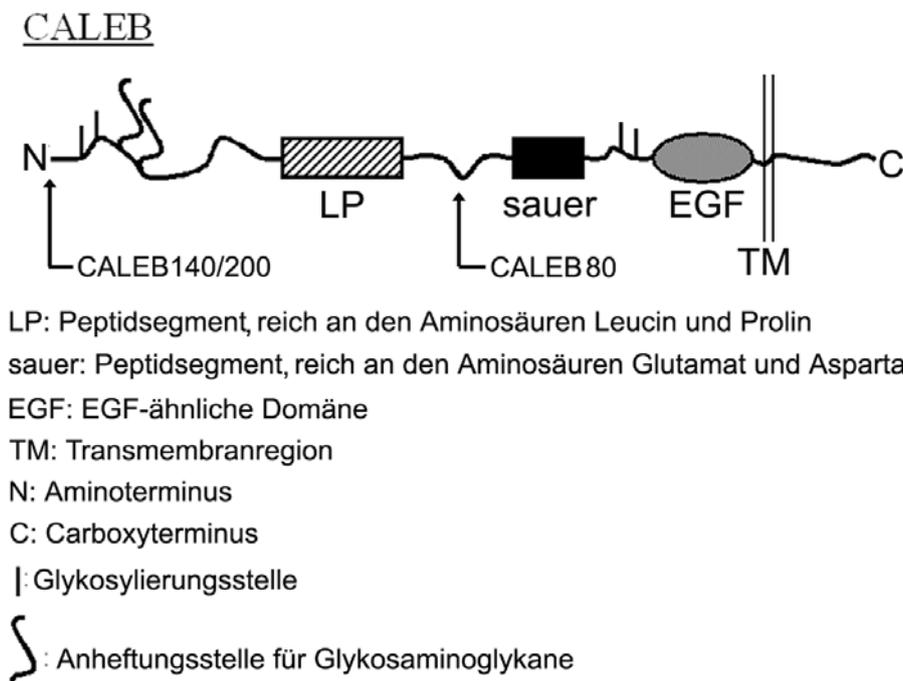


Abbildung 2. Schematische Darstellung des neuronalen Transmembranproteins CALEB (Erläuterungen im Text).

Es wurden zwei verschiedene Proteinformen von CALEB identifiziert, die sich in ihrem Aminoterminus unterscheiden. CALEB140/200 repräsentiert die längste Form

(CALEB140 ohne und CALEB200 mit Glykosaminoglykanen), CALEB80 hingegen fehlt der aminoternale Molekülbereich mit dem Leucin-reichen Peptidsegment (13). Im gleichen Zeitraum wie die oben ausgeführten Untersuchungen ist ein Protein aus der Ratte mit dem Namen Neuroglycan C (NGC) publiziert worden, welches CALEB sehr ähnlich ist, jedoch statt eines Peptidsegmentes mit einer Akkumulation saurer Aminosäuren ein Peptidsegment mit einer Akkumulation basischer Aminosäuren enthalten sollte (14). Die Aminosäuresequenz für Neuroglycan C ist jedoch aufgrund von Sequenzfehlern nachträglich derart korrigiert worden, dass Neuroglycan C wie CALEB tatsächlich auch ein Peptidsegment mit Akkumulation saurer Aminosäuren enthält (15). Es handelt sich bei CALEB und Neuroglycan C also um Spezieshomologe. Daher wird im Folgenden der Name CALEB/NGC verwendet.

Der Molekülbereich von CALEB/NGC, welcher aufgrund der Primärstruktur am ehesten eine Eingruppierung dieses Proteins in eine Familie zulässt, ist die EGF-ähnliche Domäne. Bei genauem Sequenzvergleich hat diese Domäne die höchste Ähnlichkeit zu den EGF-ähnlichen Domänen von Proteinen aus der EGF-Familie der transmembranalen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (16). Erstes Mitglied dieser Familie war der epidermale Wachstumsfaktor EGF (epidermal growth factor) selbst. Weitere wichtige Vertreter dieser Familie im Nervensystem sind z. B. die Neureguline (17-19). Neben den Sequenzähnlichkeiten ist auch die Lage der EGF-ähnlichen Domäne von CALEB/NGC (extrazellulär direkt vor der Transmembranregion liegend) und die genomische Organisation der für diese Domäne kodierenden Sequenz gleich denen der anderen Mitglieder der EGF-Familie der transmembranalen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Deshalb kann CALEB/NGC strukturell als weiteres Mitglied dieser Proteinfamilie aufgefasst werden. Es ist jedoch derzeit noch unklar, ob CALEB/NGC auch funktionell zu dieser Familie zählt (die EGF-ähnlichen Domänen von Mitgliedern dieser Proteinfamilie wirken als Liganden für Rezeptortyrosinkinasen aus der ErbB-Proteinfamilie).

CALEB/NGC wird nahezu ausschließlich im Nervensystem exprimiert (13, 14, 20). Das Protein wird dort überwiegend in Arealen gefunden, die reich an Axonen, Dendriten und Synapsen sind. Den Höhepunkt der Expression zeigt CALEB/NGC in dem ontogenetischen Zeitfenster, in dem Dendritogenese, Spinogenese und Synaptogenese stattfinden (13, 14). Aufgrund dieses Expressionsmusters sind erste funktionelle Untersuchungen zu CALEB/NGC durchgeführt worden. Dabei hat sich gezeigt, dass Fab-Fragmente von gegen CALEB/NGC gerichteten Antikörpern das

Neuritenwachstum von Tectumneuronen aus Hühnergehirnen auf unterschiedlichen Wachstumssubstraten inhibieren (13). Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass CALEB/NGC Bedeutung für Neuritenwachstum haben könnte.

CALEB/NGC ist in dem unter 1.2 beschriebenen experimentellen Verfahren als potentieller Interaktionspartner von Tenascin-C und Tenascin-R gefunden worden. Diese Interaktionen konnten mit anderen Testverfahren bestätigt werden (13). Sowohl Tenascin-C als auch Tenascin-R sind in verschiedene biologische Funktionszusammenhänge im Nervensystem eingebunden (21-51). Diese umfassen u. a. Regulation von Zelladhäsion und axonalem Wachstum, Entwicklung der kortikalen Schichtenbildung und hippocampale synaptische Plastizität.

Welche biologischen Funktionen hat CALEB/NGC? Sind diese in ähnlichen funktionellen Zusammenhängen zu finden wie bei den mit CALEB/NGC interagierenden Tenascin-C und Tenascin-R? Um diese Fragen zu beantworten wurden verschiedene strukturelle und funktionelle Untersuchungen zu CALEB/NGC durchgeführt. Dabei war das erste Ziel, die Bindung von CALEB/NGC an Tenascin-C und Tenascin-R möglichst präzise zu analysieren. Das zweite Ziel war, zusätzlich zu diesen Bindungsproteinen weitere Interaktionspartner von CALEB/NGC zu identifizieren, um dadurch möglichst genau das molekulare Netzwerk, in das CALEB/NGC eingebunden ist, zu charakterisieren. Das dritte Ziel war, in Zellkulturexperimenten mit primären Neuronen Einblicke in die Funktion von CALEB/NGC zu gewinnen. Das vierte Ziel war dann, basierend auf den gewonnenen Ergebnissen aus den Zellkulturexperimenten, funktionelle Studien zu CALEB/NGC *in vivo* durchzuführen.

2 Zusammenfassung der eigenen Arbeiten

Die hier zusammengefassten Publikationen geben die Ergebnisse von überwiegend strukturellen ([Beiträge 2.1, 2.2 und 2.3](#)) oder funktionellen ([Beiträge 2.4 und 2.5](#)) Untersuchungen zu CALEB/NGC wieder. Sie befassen sich mit:

- 1) der Interaktion zwischen CALEB/NGC und Tenascin-C sowie Tenascin-R ([Beiträge 2.1 und 2.2](#)).
- 2) der Analyse von verschiedenen Isoformen von CALEB/NGC ([Beiträge 2.1 und 2.2](#)).
- 3) der Expressionsanalyse von CALEB/NGC in einem Modellsystem für Nervendegeneration und Nervenregeneration ([Beitrag 2.1](#)).
- 4) der Bindung des PDZ-Domänenproteins PIST an CALEB/NGC ([Beitrag 2.3](#)).
- 5) dem funktionellen Einfluss von CALEB/NGC auf die Komplexität von Dendritenbäumen und dendritischen Spines ([Beitrag 2.4](#)).
- 6) der funktionellen Charakterisierung der Interaktion zwischen CALEB/NGC und B56 β , einer regulatorischen Untereinheit der Proteinphosphatase 2A ([Beitrag 2.5](#)).

Die durch diese Studien gewonnenen Ergebnisse tragen wesentlich zum Verständnis der biologischen Funktion von CALEB/NGC bei und beleuchten das molekulare Netzwerk, in das CALEB/NGC eingebunden ist. Sie liefern auch neue Erkenntnisse darüber, wie Zellmembranproteine durch einen Wechsel der Spezifität der Anbindung an Signaltransduktionswege in verschiedenen ontogenetischen Differenzierungsphasen unterschiedliche Effekte auf die Funktionszustände von Neuronen haben können. Insgesamt tragen die Resultate dieser Untersuchungen dazu bei, die Differenzierung von Dendritenbäumen und dendritischen Spines besser zu verstehen.

2.1 CALEB/NGC bindet mit seinem sauren Peptidsegment an Tenascin-C und Tenascin-R; die Expression von CALEB/NGC wird nach Läsion des optischen Nervs dynamisch reguliert

Die in der Einleitung geschilderten Studien zu CALEB/NGC haben neben der Aufklärung der Primärstruktur des Proteins im Wesentlichen zwei Ergebnisse hervorgebracht: 1) CALEB/NGC bindet an Tenascin-C sowie Tenascin-R und 2) CALEB/NGC, welches in axon- und dendritenreichen Arealen des Nervensystems exprimiert wird, scheint von Bedeutung für Neuritenwachstum zu sein (13). Aufbauend auf diesen Daten wurde dann einerseits die Bindung der Tenascine an CALEB/NGC näher charakterisiert und andererseits in einem Modellsystem für Nervendegeneration und Nervenregeneration die Expression von CALEB/NGC analysiert.

Zur Charakterisierung der Bindung von Tenascin-C und Tenascin-R an CALEB/NGC mussten die beteiligten Proteine produziert werden. Tenascin-C und Tenascin-R sowie davon abgeleitete rekombinante Konstrukte wurden in eukaryotischer Zellkultur produziert und aufgereinigt. Die gereinigten Proteine wurden dann an rot fluoreszierende Mikrosphären gekoppelt und in dieser Form für die Bindungsstudien eingesetzt. Die zu untersuchenden von CALEB/NGC abgeleiteten Konstrukte hingegen wurden in Zellkultur von COS7 Zellen produziert und an der Plasmamembran der COS7 Zellen durch einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker lokalisiert (52). Damit die unterschiedlich langen Konstrukte nicht an der Plasmamembran aufgrund von sterischen Effekten unterschiedlich stark in ihrer Bindung an CALEB/NGC behindert wurden, wurde ein Abstandhalter bestehend aus den CH2 und CH3 Domänen von humanem Immunglobulin G1 (IgG1) eingebaut. Antikörper gegen diese Domänen konnten nun zur Kontrolle der quantitativ gleichen Expression der von CALEB/NGC abgeleiteten und von den COS7 Zellen produzierten Konstrukte eingesetzt werden. Die Bindung der Tenascin-Proteine an die mit CALEB/NGC-Konstrukten transfizierten COS7 Zellen konnte durch die rote Fluoreszenz der Mikrosphären verfolgt werden.

Als Ergebnis dieser Bindungsstudien zeigte sich eindeutig, dass das saure Peptidsegment von CALEB/NGC für die Bindung an Tenascin-C und Tenascin-R notwendig war ([Beitrag 2.1](#)). Nur von CALEB/NGC abgeleitete Konstrukte, die dieses Peptidsegment enthalten, konnten an die Tenascine binden. Tenascin-C und Tenascin-R sind aus zahlreichen Modulen zusammengesetzt. Darunter befinden sich

EGF-ähnliche, Fibronectin-TypIII (FNIII)-ähnliche und je eine Fibrinogen-ähnliche Domäne. Mit Hilfe verschiedener rekombinanter Konstrukte von Tenascin-C und Tenascin-R wurde gezeigt, dass die carboxyterminalen Fibrinogen-ähnlichen Domänen beider Proteine die Bindung an CALEB/NGC vermitteln ([Beitrag 2.1](#)).

Die bisher beschriebenen Bindungsstudien sind mit CALEB/NGC-Konstrukten durchgeführt worden, die sich von der Hühnersequenz herleiten (13). Um zu überprüfen, ob die Interaktion auch über die Speziesgrenzen hinweg Bedeutung haben könnte, wurden die gleichen Bindungsstudien auch mit CALEB/NGC-Konstrukten, die sich von der Mausequenz ableiten, durchgeführt. Bei der Klonierung der Mausequenz von CALEB/NGC wurden dann noch zwei unterschiedliche Isoformen beschrieben, die sich im intrazellulären Proteinbereich unterscheiden ([Beitrag 2.1](#)). Zudem stellte sich heraus, dass der aminoterminal Bereich des CALEB/NGC-Proteins, der in der Spezies Huhn das leucinreiche Peptidsegment umfasst, zwischen den Spezies Huhn und Maus (auch Ratte und Mensch) verschieden ist ([Beitrag 2.1](#)). Zwischen den Spezies stark konserviert geblieben sind hingegen die Sequenzabschnitte, die für das saure Peptidsegment, die EGF-ähnliche Domäne, die Transmembranregion und den intrazellulären Proteinbereich kodieren. Bei fortgeführten Bindungsstudien stellte sich heraus, dass auch das saure Peptidsegment, welches sich von der Mausequenz von CALEB/NGC herleitet, an die Fibrinogen-ähnliche Domäne von Tenascin-R (und auch Tenascin-C) binden kann ([Beitrag 2.1](#)).

Blockierungsexperimente mit Fab-Fragmenten von gegen CALEB/NGC gerichteten polyklonalen Antikörpern in Zellkultur hatten Hinweise geliefert, dass CALEB/NGC notwendig für Neuritenwachstum ist (13). Es wurde daher die Expression von CALEB/NGC in einem Modellsystem zur Nervendegeneration und Nervenregeneration analysiert (53-58). Dabei wurde die Anzahl der retinalen Ganglienneurone, die CALEB/NGC exprimieren, vor und nach Quetschung des optischen Nerven in Ratten bestimmt (Degenerationsmodell). Nervenregeneration im Zentralnervensystem, zu dem der optische Nerv gehört, findet nicht statt, im Unterschied zum peripheren Nervensystem. Daher wurde das regenerative Wachstum von Axonen retinaler Ganglienneurone gefördert, indem ein Transplantat aus dem Nervus ischiadicus in den gequetschten optischen Nerven eingesetzt wurde. Unter diesen Umständen können Axone von ca. 5% der Ganglienneurone

durch das Transplantat aussprossen (54, 55). Auch hier (Regenerationsmodell) wurde die Anzahl der Ganglienneurone bestimmt, die CALEB/NGC exprimieren.

Das Resultat dieser Studien im Degenerationsmodell zeigte, dass innerhalb der ersten 5 Tage nach Quetschung des optischen Nerven die Anzahl der retinalen Ganglienneurone, die CALEB/NGC exprimieren, stark abnimmt, um dann jedoch im folgenden Zeitabschnitt bis zu 4 Wochen nach Läsion konstant zu bleiben. Die Ergebnisse aus dem Regenerationsmodell zeigten, dass von den Ganglienneuronen, deren Axone in das Transplantat auswachsen können, ca. 40% CALEB/NGC exprimieren ([Beitrag 2.1](#)).

In diesem Modellsystem der Läsion des optischen Nerven wurde also ein dynamischer Verlauf der Expression von CALEB/NGC festgestellt.

Zusammenstellung wesentlicher Originalarbeiten

Beitrag 2.1

Schumacher S, Jung M, Nörenberg U, Dorner A, Chiquet-Ehrismann R, Stuermer CAO, Rathjen FG:

CALEB/NGC binds via its acidic stretch to the fibrinogen-like domain of tenascin-C or tenascin-R and its expression is dynamically regulated after optic nerve lesion.

J Biol Chem 276: 7337-7345, 2001

2.2 Die Bindung von Tenascin-C und Tenascin-R an CALEB/NGC wird ontogenetisch reguliert

Bisher wurde gezeigt, dass das saure Peptidsegment von CALEB/NGC notwendig für die Bindung an Tenascin-C und Tenascin-R ist. Es war jedoch nicht klar, ob es auch hinreichend für die Bindung ist. Alle bisher untersuchten Konstrukte von CALEB/NGC enthielten zusätzlich zum sauren Peptidsegment auch die EGF-ähnliche Domäne. Spielt die EGF-ähnliche Domäne bei der Interaktion zu den Tenascinen eine Rolle oder hat sie ganz andere Interaktionspartner? Eine weitere Frage war, ob es auch noch andere Transmembranproteine gibt, die ein saures Peptidsegment ähnlich dem von CALEB/NGC haben und mittels diesem an Tenascine binden können. Den Resultaten der Datenbankrecherche zufolge gibt es nur sehr wenige Transmembranproteine mit einem derartigen sauren Peptidsegment. Eines dieser Proteine ist das Amyloid-Vorläuferprotein (APP), welches enorme Bedeutung für die Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung hat (59). Kann APP auch an Tenascine binden? Mit der methodischen Herangehensweise, wie sie im Abschnitt 2.1 beschrieben worden ist, wurden diese Fragen beantwortet.

Durch die Analyse etlicher CALEB/NGC-abgeleiteter Konstrukte in den Bindungsstudien zu Tenascin-C und Tenascin-R wurde gezeigt, dass ein kurzes Peptid mit der Aminosäuresequenz „G/DLEDE“ am carboxyterminalen Ende des sauren Peptidsegmentes von CALEB/NGC die Bindung an die Tenascine vermittelt. Die EGF-ähnliche Domäne von CALEB/NGC spielt bei dieser Bindung keine Rolle ([Beitrag 2.2](#)). Da APP zwar ein saures Peptidsegment hat, dieses jedoch nicht die Aminosäureabfolge „G/DLEDE“ beinhaltet, war zu vermuten, dass APP nicht an die Tenascine binden kann. Diese Vermutung wurde experimentell bestätigt ([Beitrag 2.2](#)). In der Einleitung war ausgeführt worden, dass es von CALEB/NGC aus Huhn mehrere Proteinvarianten gibt, die sich in ihrem Aminoterminus unterscheiden, nämlich CALEB140/200 und CALEB80 (Abbildung 2). Beide Proteinvarianten zeigen einen unterschiedlichen Expressionsverlauf (untersucht in der Retina). Während die Expression von CALEB140/200 im Verlauf der Embryonalentwicklung immer weiter zunimmt, steigt die Expression von CALEB80 zu einem Maximum in dem Zeitfenster an, wo u. a. Dendritogenese und Synaptogenese stattfinden, um danach wieder deutlich abzufallen (13). Wenn jeweils eine dieser beiden Proteinvarianten auf der Zelloberfläche von COS7 Zellen exprimiert wurde, konnte interessanterweise nur

CALEB80, nicht aber CALEB140/200 an Tenascin-C oder Tenascin-R binden (Beitrag 2.2). Wurden die verschiedenen Proteinvarianten von CALEB/NGC jedoch aus der Membran herausgelöst, so konnten sowohl CALEB80 als auch CALEB140/200 an die Tenascine binden (Beitrag 2.2). Diese Beobachtung erhält eine besondere Bedeutung durch die Tatsache, dass ein proteolytisches *Shedding* von Teilen des extrazellulären Bereiches von CALEB/NGC inklusive saurem Peptidsegment beschrieben worden ist (60). Es wurde zudem gefunden, dass die Bindung von Tenascin-C und Tenascin-R an CALEB/NGC durch EDTA inhibiert werden konnte, demnach abhängig von divalenten Ionen war.

Die Bindung von CALEB/NGC an Tenascin-C und Tenascin-R wird also ontogenetisch reguliert (CALEB80 versus CALEB140/200) und sie ist davon abhängig, ob CALEB/NGC in die Plasmamembran integriert ist oder aus dieser freigesetzt wird.

Zusammenstellung wesentlicher Originalarbeiten

Beitrag 2.2

Schumacher S, Stübe E:

Regulated binding of the fibrinogen-like domains of tenascin-R and tenascin-C to the neural EGF family member CALEB.

J Neurochem 87: 1213-1223, 2003

2.3 CALEB/NGC interagiert mit dem Golgi-assoziierten Protein PIST

Bisher waren nur zwei extrazelluläre Interaktionspartner für CALEB/NGC bekannt, nämlich Tenascin-C und Tenascin-R. Um das Verständnis des molekularen Netzwerkes, in das CALEB/NGC eingebunden ist, zu erweitern, wurde nach intrazellulären Bindungsproteinen für CALEB/NGC gesucht. Methodisch wurde hier das Hefe-2 Hybridsystem (Y2H) benutzt.

Es wurden zwei potentielle Interaktionspartner für CALEB/NGC mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems gefunden ([Beitrag 2.3](#)). Auf den einen, bei dem es sich um eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (PP2A) handelt, wird in einem späteren Kapitel (2.5) eingegangen. Bei dem anderen handelt es sich um das PDZ-Domänenprotein PIST (PDZ domain protein interacting specifically with IC10), auch GOPC (Golgi-associated PDZ and coiled coil motif-containing protein), FIG (fused in glioblastoma) oder CAL (CFTR-associated ligand) genannt (61-64). PIST ist über eine Bindung an Syntaxin-6 sehr stark assoziiert mit dem Golgi-Apparat. Es ist für den Transport verschiedener Proteine, z. B. des CFTRs (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), des Chloridkanals CIC-3B und der Zellmembranproteine frizzled 5 und frizzled 8 zur Plasmamembran von Bedeutung (61-64). Die Interaktion zwischen CALEB/NGC und PIST konnte durch verschiedene experimentelle Verfahren bestätigt werden ([Beitrag 2.3](#)). Die Bindungsstelle von PIST an CALEB/NGC wurde bestimmt und liegt in einem intrazellulären Peptidsegment von etwa 20 Aminosäuren, welches der Transmembranregion unmittelbar folgt ([Beitrag 2.3](#)). Mit diesem Peptid (chemisch synthetisiert), immobilisiert an Sepharose, konnte PIST sowohl aus transfizierten HEK293 Zellen als auch aus nativen primären Neuronen isoliert werden ([Beitrag 2.3](#)). Eine Assoziation von CALEB/NGC und PIST im Golgi-Apparat konnte gezeigt werden ([Beitrag 2.3](#)). Eine Kolo-kalisation von endogenem CALEB/NGC und PIST in Neuronen wurde nur während einer frühen Differenzierungsphase und dann im Golgi-Apparat und in vesikulären Strukturen in den Neuriten gefunden ([Beitrag 2.3](#)). Abgeleitet von publizierten Ergebnissen, die zeigen, dass PIST am Transport einiger Proteine zur Plasmamembran beteiligt ist (63, 64), wurde untersucht, ob PIST möglicherweise am Transport von CALEB/NGC in Neuriten beteiligt sein könnte. Dazu wurde die Lokalisation von CALEB/NGC und PIST in Neuronen von Colchicin-behandelten Ratten mit der Lokalisation in Neuronen von Kontrolltieren verglichen.

Bei Kontrolltieren wurde in den Zellkörpern ausgereifter Purkinje-Zellen im Kleinhirn zwar PIST, aber kein CALEB/NGC gefunden ([Beitrag 2.3](#)). Dieses war sehr effizient in die Fortsätze (Dendriten und Axone) transportiert worden. Wurde *in vivo* der Mikrotubuli-abhängige Transport von Proteinen in die neuronalen Fortsätze durch Colchicin inhibiert (65, 66), fand man dann eine starke Kolo-kalisation von CALEB/NGC und PIST in vesikulären Strukturen in den Somata ([Beitrag 2.3](#)).

Das Golgi-assoziierte Protein PIST kann also an ein intrazelluläres Peptidsegment von CALEB/NGC binden. Es gibt experimentelle Hinweise, dass PIST am Transport von CALEB/NGC in neuronale Fortsätze beteiligt sein könnte.

Zusammenstellung wesentlicher Originalarbeiten

Beitrag 2.3

Hassel B, Schreff M, Stübe E, Blaich U, **Schumacher S**:

CALEB/NGC interacts with the Golgi-associated protein PIST.

J Biol Chem 278: 40136-40143, 2003

2.4 CALEB/NGC reguliert die Komplexität von Dendritenbäumen und dendritischen Spines

Die ersten zellbiologischen Untersuchungen zur Funktion von CALEB/NGC haben Hinweise erbracht, dass dieses Protein Bedeutung für Neuritenwachstum hat (13). Diese Untersuchungen, nämlich Interferenzexperimente mit Fab-Fragmenten von gegen CALEB/NGC gerichteten polyklonalen Antikörpern in einem Neuritenwachstumsmodell (siehe Einleitung), lassen jedoch keine Differenzierung zu, ob Axone und/oder Dendriten durch CALEB/NGC beeinflusst werden. Sie erlauben auch keine detaillierten Aussagen, welche Wirkungen genau CALEB/NGC auf Axone und/oder Dendriten hat. Um präzisere Aussagen zur Funktion von CALEB/NGC auf die Differenzierung von neuronalen Fortsätzen zu machen, wurde folgendes Zellkulturmodellsystem etabliert:

Primäre Hippocampusneurone, die aus den Gehirnen von embryonalen Ratten (Embryonaltage E17–E19) gewonnen wurden, wurden nach der Präparation als Einzelzellen kultiviert. Diese wurden dann zu verschiedenen Zeitpunkten auf unterschiedliche Art manipuliert und darauffolgend einige Tage später untersucht. Als Manipulationen wurden entweder Expressionsplasmide, shRNA-Konstrukte oder chemisch synthetisierte siRNAs transfiziert, oder die Neurone wurden mit verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren behandelt. Es wurden zwei verschiedene Untersuchungszeiträume gewählt. Entweder die Neurone wurden zwischen DIV (*days in vitro*) 7 und DIV12 manipuliert und dann 2 Tage später analysiert oder sie wurden zwischen DIV 12 und DIV 13 manipuliert und 4 Tage später untersucht. Diese Experimentalzeiträume sind bewusst so gewählt worden, weil während dieser Zeit in ganz besonderem Maße Dendritogenese und Spinogenese stattfinden ([Beitrag 2.4](#)). Gerade diese beiden Entwicklungsprozesse sollten genauer beleuchtet werden, da immunzytochemische Untersuchungen an Hippocampusneuronen in Kultur mit CALEB/NGC-spezifischen Antikörpern gezeigt haben, dass dieses Protein sehr stark in Dendriten und dendritischen Spines lokalisiert ist ([Beitrag 2.4](#)). Um einen Einfluss von CALEB/NGC auf die Differenzierung der Dendritenbäume und Spines möglichst präzise zu beschreiben, wurden als Parameter die Anzahl der dendritischen Endausläufer (*end tips*) sowie die Anzahl, Länge und Verzweigung der dendritischen Spines bestimmt. Zusätzlich wurde eine Sholl-Analyse des Dendritenbaumes durchgeführt (67). Bei dieser Analyse werden um einen neuronalen Zellkörper herum konzentrische Kreise mit

immer größer werdendem Radius gezogen und dann die Anzahl der Schnittpunkte dieser Kreise mit von diesem Neuron ausgehenden Dendriten in Abhängigkeit vom Radius der Kreise bestimmt. Die Sholl-Analyse erlaubt eine sehr präzise Aussage über die Komplexität von Dendritenbäumen ([Beitrag 2.4](#)).

Um ein möglichst genaues Bild über eine potentielle Funktion von CALEB/NGC bei Dendritogenese und Spinogenese zu erhalten, wurden drei experimentelle Ansätze gewählt: 1) Überexpression von CALEB/NGC, 2) Herabregulation der endogenen Expression von CALEB/NGC mittels siRNA und shRNA und 3) Überexpression des CALEB/NGC-abgeleiteten Konstruktes „396“, welches möglicherweise dominant-negative Eigenschaften hat, da es zwar den gesamten extrazellulären Bereich und die Transmembranregion von CALEB/NGC hat, ihm jedoch der gesamte intrazelluläre Bereich fehlt.

Die Ergebnisse aus diesen drei Ansätzen sind konsistent und lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: CALEB/NGC erhöhte bei Überexpression die Komplexität von Dendritenbäumen, indem es die Verzweigung von Dendriten, insbesondere von Dendriten der apikalen Dendritenbäume, förderte. Auch die Komplexität der dendritischen Spines wurde größer, deren Anzahl, Länge und Verzweigung nahm zu ([Beitrag 2.4](#)). Wenn die endogene Expression von CALEB/NGC durch siRNA oder shRNA herabreguliert wurde, konnte eine Reduktion der Komplexität des Dendritenbaumes und der Spines beobachtet werden. Auch eine Überexpression des Konstruktes „396“ in hippocampalen Neuronen führte zu einer Reduktion der Komplexität der Dendritenbäume ([Beitrag 2.4](#)).

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob diese Ergebnisse aus der Einzelzellkultur sich auch auf die *in vivo*-Situation übertragen lassen. Vermittelt CALEB/NGC also auch Komplexität von Dendritenbäumen und Spines im Gehirn? Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Technik der *in-utero-Elektroporation* eingesetzt (68, 69). Bei dieser Technik wird zuerst ein Uterus von tragenden Mäusen exponiert, dann werden durch die Uteruswand hindurch die Reagenzien, z. B. Expressionsplasmide oder shRNA-Konstrukte, in je einen Seitenventrikel von Gehirnen embryonaler Mäuse (z. B. am Embryonaltag E14) mikroinjiziert. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden dann die Plasmide aus dem Ventrikel in die Ventrikularzone in die sich dort entwickelnden Neurone getrieben. Nach Ablauf der Operation der tragenden Mäuse werden die dann nach einigen Tagen geworfenen Jungtiere in bestimmten postnatalen Stadien (z. B. Postnataltag P7 oder

P14) untersucht. Da als Marker für die elektroporierten Neurone stets GFP mit elektroporiert worden ist, können diese Neurone mit ihren Dendritenbäumen und Spines leicht sichtbar gemacht werden ([Beitrag 2.4](#)).

Die Analyse der Dendritenbäume und Spines von Neuronen aus den kortikalen Schichten II und III von Mäusen, die *in utero* elektroporiert worden sind, bestätigte die an Einzelzellen in Kultur gewonnenen Ergebnisse. Bei der *in-utero-Elektroporation* sind die gleichen von CALEB/NGC abgeleiteten Konstrukte eingesetzt worden wie in den Experimenten in Einzelzellkultur. Auch bei den Experimenten *in vivo* führte die Überexpression von CALEB/NGC zu einer Erhöhung, die Herabregulation der endogenen CALEB/NGC-Expression oder die Überexpression des Konstruktes „396“ zu einer Reduktion der Komplexität der Dendritenbäume und Spines ([Beitrag 2.4](#)).

Nach der Beschreibung des funktionellen Effektes von CALEB/NGC auf Dendritenbäume und Spines wurde im Folgenden versucht, eine Kartierung der funktionell wichtigen Molekülbereiche von CALEB/NGC durchzuführen. Dazu wurden etliche Deletions- und Mutationskonstrukte von CALEB/NGC hergestellt und in dem oben beschriebenen Zellkulturmodellsystem untersucht. Es stellte sich heraus, dass extrazellulär die EGF-ähnliche Domäne von CALEB/NGC notwendig und hinreichend war, um sowohl Dendritenverzweigung zu induzieren als auch die Morphogenese der Spines ähnlich wie CALEB/NGC selbst zu beeinflussen. Es wurde weiterhin ermittelt, dass die Hälfte des intrazellulären Bereiches von CALEB/NGC, die der Transmembranregion folgt, notwendig und hinreichend ist zur Weiterleitung des Signals zur Induktion von Dendritenverzweigung ([Beitrag 2.4](#)).

Um einen Einblick zu gewinnen über die Signalwege in Neuronen, die wichtig sind für CALEB/NGC-vermittelte Dendritenverzweigung, wurde der Einfluss von Inhibitoren für bestimmte Enzyme untersucht. Über diese Enzyme ist aus der Literatur bekannt, dass sie in Signalwege eingebettet sind, die Bedeutung haben für Dendritendifferenzierung (70-73). Diese Studien erbrachten das Ergebnis, dass Hemmung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR)-Signalweges, sei es durch Inhibition der PI3K, von Akt oder mTOR, zu einer signifikanten Reduktion der CALEB/NGC-vermittelten Dendritenverzweigung führt ([Beitrag 2.4](#)). Im Gegensatz dazu hatte Hemmung der PI3K keinen Effekt auf CALEB/NGC-vermittelte Spine-Morphogenese. Inhibition von Protein Kinase C (PKC) hingegen führte zum Verlust sowohl von CALEB/NGC-

vermittelter Dendritenverzweigung als auch Spine-Morphogenese ([Beitrag 2.4](#)). Aus der Literatur ist bekannt, dass endogene neuronale Aktivität eine große Bedeutung hat für die Entwicklung von Dendritenbäumen (74-78). Ionenkanäle, die den Effekt der neuronalen Aktivität vermitteln, sind N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren und spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-Typ. Es wurde daher mit Hilfe von Blockern dieser Ionenkanäle auch untersucht, ob der Effekt von CALEB/NGC auf die Differenzierung von Dendritenbäumen abhängig oder unabhängig von neuronaler Aktivität ist. Als Ergebnis wurde gefunden, dass CALEB/NGC Dendritenverzweigung auch bei Blockade von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren und spannungsabhängigen Calciumkanälen induziert. Sein Effekt auf Dendritenbäume ist also, wenigstens teilweise, unabhängig von neuronaler Aktivität, die über diese beiden Ionenkanäle vermittelt wird ([Beitrag 2.4](#)).

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass CALEB/NGC in primärer neuronaler Einzelzellkultur und auch *in vivo* im nativen Gehirn die Komplexität von Dendritenbäumen und Spines erhöht. Die Effekte auf Dendritenverzweigung und Spine-Morphogenese werden beide vermittelt durch die EGF-ähnliche Domäne von CALEB/NGC. Es sind jedoch unterschiedliche Signalwege innerhalb der Neurone für beide Wirkungen von CALEB/NGC von Bedeutung.

Zusammenstellung wesentlicher Originalarbeiten

Beitrag 2.4

Brandt N, Franke K, Rašin, MR, Baumgart J, Vogt J, Khrulev S, Hassel B, Pohl EE, Šestan N, Nitsch R, **Schumacher S**:

The neural EGF family member CALEB/NGC mediates dendritic tree and spine complexity.

EMBO J 26: 2371-2386, 2007

2.5 B56 β , eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, bindet an CALEB/NGC und inhibiert CALEB/NGC-vermittelte Dendritenverzweigung

Bei der unter 2.3 beschriebenen Suche nach intrazellulären Interaktionspartnern für CALEB/NGC mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems ist neben PIST auch B56 β , eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (PP2A), gefunden worden ([Beitrag 2.5](#)). Diese Bindung von B56 β an CALEB/NGC wurde im Folgenden experimentell abgesichert durch Blot-Overlay-Studien, durch Koimmunpräzipitationen und durch Kolokalisationsanalysen in primären Neuronen. Bei der Kartierung der Bindungsstelle wurde gefunden, dass B56 β , ähnlich PIST, seine Bindungsstelle in dem der Transmembranregion unmittelbar intrazellulär folgenden Peptidsegment von CALEB/NGC hat ([Beitrag 2.5](#)). PP2A ist ein Trimer, aufgebaut aus einer strukturellen A-Untereinheit, einer katalytischen C-Untereinheit und einer von mehreren möglichen regulatorischen B-Untereinheiten (79). Die B56-Familie ist dabei eine von vier möglichen Familien von regulatorischen B-Untereinheiten (80-82). Mit einem kombinierten experimentellen Ansatz aus Affinitätschromatographie und Massenspektroskopie wurde gezeigt, dass nicht nur B56-Familienmitglieder an CALEB/NGC binden können, sondern das ganze PP2A Trimer ([Beitrag 2.5](#)).

Über B56 β -abhängige PP2A ist aus der Literatur bekannt, dass sie Akt inhibieren kann (83). Da aktives Akt wichtig ist für CALEB/NGC-vermittelte Dendritenverzweigung ([Beitrag 2.5](#)), wurde untersucht, ob diese gehemmt werden kann durch B56 β . Tatsächlich ist CALEB/NGC bei Koexpression von B56 β nicht mehr in der Lage, Dendritenverzweigung zu induzieren ([Beitrag 2.5](#)). Unter 2.4 war ausgeführt worden, dass CALEB/NGC-induzierte Spine-Morphogenese unabhängig ist von aktiver PI3K. Es wurde nun untersucht, ob jene auch unabhängig ist von aktivem Akt. Tatsächlich ist CALEB/NGC in der Lage, auch bei Inhibition von Akt Spine-Morphogenese zu induzieren ([Beitrag 2.5](#)). Im letzten Schritt wurde überprüft, ob B56 β in der Lage ist, bei Koexpression mit CALEB/NGC die von diesem vermittelte Spine-Morphogenese zu hemmen. Im Unterschied zu CALEB/NGC-induzierter Dendritenverzweigung kann jedoch die durch CALEB/NGC stimulierte Morphogenese von dendritischen Spines nicht durch B56 β inhibiert werden ([Beitrag 2.5](#)).

Somit ist mit B56 β ein direkter Interaktionspartner für CALEB/NGC gefunden worden, der das ganze PP2A-Trimer rekrutieren und die zur Induktion von CALEB/NGC-

vermittelter Dendritenverzweigung notwendige Signaltransduktion hemmen kann.

Zusammenstellung wesentlicher Originalarbeiten

Beitrag 2.5

Brandt N, Franke K, Buck F, Harder S, Hassel B, Nitsch R, **Schumacher S**:

B56 β , a regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with CALEB/NGC and inhibits CALEB/NGC-mediated dendritic branching.

FASEB J, *in revision*, 2007

3 Diskussion

In den vergangenen Jahren haben wir strukturelle und funktionelle Untersuchungen zum neuronalen EGF-Familienmitglied CALEB/NGC durchgeführt. Das Ziel dieser Untersuchungen war es, einerseits Teile des molekularen Netzwerkes, in welches CALEB/NGC eingebunden ist, zu entschlüsseln und andererseits tragfähige Aussagen zur biologischen Funktion von CALEB/NGC zu ermöglichen.

Bei diesen Untersuchungen wurden die extrazellulären Interaktionen von CALEB/NGC mit Tenascin-C und Tenascin-R ([Beiträge 2.1 und 2.2](#)) sowie die intrazellulären Interaktionen mit PIST und B56 β ([Beiträge 2.3 und 2.5](#)) charakterisiert. In den funktionellen Studien wurde insbesondere die Bedeutung von CALEB/NGC für die Differenzierung von Dendritenbäumen und dendritischen Spines herausgearbeitet ([Beitrag 2.4](#)). Es konnte auch gezeigt werden, wie sich die strukturellen und funktionellen Untersuchungen sinnvoll ergänzen ([Beitrag 2.5](#)).

Durch unsere Studien wurde ein Beitrag geleistet zum generellen Verständnis der Differenzierung von neuronalen Fortsätzen. Es wurde auch gezeigt, wie ein Wechsel in der Spezifität von Signalsystemen zur verschiedenartigen Differenzierung neuronaler Fortsätze (Dendriten und Spines) in aufeinander folgenden Entwicklungsabschnitten führen kann.

3.1 Extrazelluläre Interaktionen von CALEB/NGC

Der Bereich des sauren Peptidsegmentes von CALEB/NGC, der die Aminosäuresequenz „G/DLEDE“ enthält, kann an die Fibrinogen-ähnlichen Domänen von Tenascin-C oder Tenascin-R binden ([Beiträge 2.1 und 2.2](#)). Es ist allerdings so, dass im Huhn nur CALEB80, nicht aber CALEB140/200 in seiner membrangebundenen Form an diese Tenascine binden kann. Wie wird CALEB80 hergestellt? Untersuchungen aus unserem Labor (Daten hier nicht präsentiert) zur genomischen Sequenz von CALEB/NGC zeigen eindeutig, dass dies nicht durch alternatives Spleißen geschehen kann. Andere Möglichkeiten wären ein alternativer Translationsstart oder eine regulierte Proteolyse. Die Frage der unterschiedlichen Bindungspotenz von CALEB140/200 und CALEB80 an Tenascin-C und Tenascin-R ist deshalb so interessant, weil CALEB80 und CALEB140/200 ein völlig anderes

Expressionsprofil zeigen. Im Unterschied zu CALEB140/200 wird CALEB80 genau in dem Zeitfenster besonders stark exprimiert, wenn (u. a.) Dendritogenese, Spinogenese und Synaptogenese stattfinden (13). Von diesem Expressionsprofil ausgehend kann man die Hypothese ableiten, dass die Interaktionen von CALEB/NGC mit Tenascin-C oder Tenascin-R von Bedeutung sein könnten für die genannten Differenzierungsaspekte von Dendritenbäumen. CALEB/NGC hat tatsächlich einen erheblichen funktionellen Einfluss auf die Differenzierung von Dendritenbäumen und Spines ([Beitrag 2.4](#)). Allerdings haben die Kartierungsexperimente eindeutig gezeigt, dass für diese Funktion von CALEB/NGC extrazellulär nur die EGF-ähnliche Domäne wichtig ist, nicht jedoch das saure Peptidsegment ([Beitrag 2.4](#)). Daher muss die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Interaktion zwischen CALEB/NGC und Tenascin-C wie Tenascin-R eine zusätzliche, noch nicht bekannte funktionelle Bedeutung im Kontext von Dendritogenese, Spinogenese oder Synaptogenese hat.

Zur weiteren Verwirrung bei der Interpretation dieser beschriebenen Interaktion trägt der Sachverhalt bei, dass es in den Spezies Maus, Ratte und Mensch zwar ein Homologes zu CALEB140/200 gibt, bisher jedoch in diesen Spezies kein Äquivalent zu CALEB80 bekannt ist ([Beitrag 2.1](#), 14, 15, 20). Allerdings unterscheidet sich der aminoternale Bereich von CALEB/NGC zwischen der Spezies Huhn und den anderen erwähnten Spezies ohnehin beträchtlich. Es fehlt bei CALEB/NGC aus Maus, Ratte oder Mensch das Leucin-reiche Peptidsegment ([Beitrag 2.1](#)). Dafür wird in diesen Spezies eine quantitativ bedeutendere Menge der Proteoglykan-Variante von CALEB/NGC gefunden (84). Diese mit Glykosaminoglykanen versehene Variante von CALEB/NGC hat ein ähnliches Expressionsprofil in Nagern wie CALEB80 im Huhn. Möglicherweise hat die Natur im Laufe der Evolution zwei unterschiedliche Proteinvarianten geschaffen, um die Bindung von CALEB/NGC an Tenascin-C und Tenascin-R zu regulieren.

In allen untersuchten Spezies kann jedoch CALEB/NGC, welches aus seiner Bindung an die Plasmamembran befreit ist, an Tenascin-C und Tenascin-R binden ([Beitrag 2.1](#)). Gibt es derartige aus der Membran herausgelöste Formen von CALEB/NGC in der Natur? Aus der Literatur ist bekannt, dass extrazelluläre Proteinbereiche von CALEB/NGC proteolytisch freigesetzt werden können (60). Obwohl noch nicht eindeutig geklärt ist, wo genau die Proteolyseschnittstellen innerhalb von CALEB/NGC liegen, gibt es gute Hinweise zu der These, dass das

saure Peptidsegment von CALEB/NGC bei der Proteolyse mit freigesetzt wird (60). Nach erfolgter Proteolyse könnte dann der abgespaltene Teil von CALEB/NGC über Bindung an Tenascin-C oder Tenascin-R in der extrazellulären Matrix immobilisiert werden. Ein derartiger Mechanismus der proteolytischen Freisetzung und Immobilisation ist in der Literatur auch schon beschrieben worden bei einem anderen Mitglied der EGF-Proteinfamilie. Bestimmte Isoformen der Neureguline können nach Proteolyse in der ECM immobilisiert werden (85). Über diese Bindung an die ECM wird dann der Zugang der ebenfalls mit proteolysierten EGF-ähnlichen Domäne zu deren Rezeptor, einem Mitglied der ErbB-Familie von Rezeptortyrosinkinasen, reguliert. Ein derartiges funktionelles Prinzip wäre auch bei CALEB/NGC vorstellbar. In diesem Falle hätten dann die Tenascine keine Bedeutung als Liganden für transmembranales CALEB/NGC als Rezeptor. Sie würden stattdessen den Zugang von dem proteolytisch freigesetzten Proteinanteil von CALEB/NGC zu seinem (noch unbekanntem) Rezeptor regulieren.

Es wird spannend sein, in zukünftigen Arbeiten herauszufinden, ob die Interaktion zwischen CALEB/NGC und Tenascin-C sowie Tenascin-R funktionelle Bedeutung bei Prozessen der synaptischen Plastizität hat. Von den hier diskutierten Mitgliedern der Tenascin-Familie ist deren Beteiligung an Prozessen der synaptischen Plastizität in der Literatur bereits dokumentiert.

3.2 Intrazelluläre Interaktionen von CALEB/NGC

Bisher konnten zwei intrazelluläre Interaktionspartner von CALEB/NGC charakterisiert werden. Beide, PIST und B56 β , binden an das der Transmembranregion von CALEB/NGC benachbarte intrazelluläre Peptidsegment ([Beiträge 2.3 und 2.5](#)). Während B56 β besonders stark im Nervensystem exprimiert wird (81), kann PIST in beinahe allen untersuchten Geweben gefunden werden (61-64). Die funktionelle Bedeutung der Bindung von PIST an CALEB/NGC ist nicht einfach zu ergründen. Interessanterweise findet man eine zelluläre Kolo­kalisierung von CALEB/NGC und PIST nur während der frühen Zelldifferenzierung. In diesem Zeitabschnitt kolo­kalisiert CALEB/NGC mit PIST in Arealen des Golgi-Apparates und in vesikulären Strukturen, die sich in den ausdifferenzierenden neuronalen Fortsätzen befinden ([Beitrag 2.3](#)). Wird der Mikrotubuli-abhängige Transport von Proteinen in die neuronalen Fortsätze *in vivo* mit Colchicin inhibiert, so findet man

eine starke Kolo­kalisierung von CALEB/NGC und PIST in vesikulären Strukturen in den neuronalen Somata ([Beitrag 2.3](#)). Aus der Literatur geht zudem hervor, dass PIST am Transport einiger Transmembranproteine hin zur Plasmamembran beteiligt ist (63, 64). Obwohl nicht beweisend, können diese Informationen doch in der Weise interpretiert werden, dass PIST möglicherweise für den Transport von CALEB/NGC in die neuronalen Fortsätze von Bedeutung ist. In zukünftigen Beiträgen zu dieser Fragestellung könnte die endogene Lokalisation von CALEB/NGC in PIST-defizienten Mäusen untersucht werden.

Eine Kolo­kalisierung von CALEB/NGC und B56β wird ebenfalls nur in sehr begrenzten zellulären Kompartimenten gefunden. Beide Proteine kolo­kalisieren in größeren Dendriten, nicht aber in dendritischen Spines ([Beitrag 2.5](#)). Die Daten zur Kolo­kalisierung dieser beiden Proteine sind in Übereinstimmung mit den ermittelten funktionellen Daten, die zeigen, dass B56β die durch CALEB/NGC hervorgerufene Dendritenverzweigung, nicht aber die vermittelte Morphogenese der Spines zu inhibieren vermag ([Beitrag 2.5](#)). Der genaue Mechanismus, wie B56β-abhängige PP2A die durch CALEB/NGC induzierte Dendritenverzweigung inhibiert, ist noch nicht geklärt. Folgende Modelle sind vorstellbar: Es ist bekannt, dass B56β-abhängige PP2A Akt inhibieren kann. Aktives Akt ist aber wichtig für CALEB/NGC-induzierte Dendritenverzweigung. Es könnte sein, dass CALEB/NGC B56β von Akt räumlich fernhält und so B56β-abhängige PP2A Akt nicht mehr inhibieren kann. Ein alternativer Mechanismus bezieht die zahlreichen potentiellen Serin- und Threoninphosphorylierungsstellen in dem intrazellulären Bereich von CALEB/NGC mit ein, der als wichtig für die Signalweiterleitung hin zu induzierter Dendritenverzweigung ermittelt worden ist ([Beitrag 2.4](#)). Es könnte sein, dass Phosphorylierungen an einem oder mehreren dieser Serine und/oder Threonine notwendig sind, damit eine Signalweiterleitung vom Transmembranprotein CALEB/NGC ins Zellinnere möglich wird. B56β-abhängige PP2A würde dann CALEB/NGC-induzierte Dendritenverzweigung dadurch inhibieren, dass es die zur Signaltransduktion erforderlichen phosphorylierten Aminosäuren im intrazellulären Bereich von CALEB/NGC dephosphoryliert. Zur genaueren Analyse des Mechanismus, wie B56β durch CALEB/NGC hervorgerufene Dendritenverzweigung inhibieren kann, werden gegenwärtig in unserem Labor systematisch Konstrukte von CALEB/NGC mit Punktmutationen in den potentiellen Phosphorylierungsstellen hergestellt. Diese Konstrukte sollen dann in der etablierten Einzelzellkultur auf ihre

Fähigkeit, Dendritenverzweigung zu induzieren, überprüft werden. Sollte B56 β -abhängige PP2A durch Dephosphorylierung von CALEB/NGC arbeiten, müssten nicht-phosphorylierbare Punktmutanten gefunden werden können, die nicht in der Lage sind, Dendritenverzweigung zu induzieren. Auf der anderen Seite sollten dann Punktmutanten mit Aminosäuren, die ein Phospho-Serin oder Phospho-Threonin simulieren (Glutamat) befähigt sein, Dendritenverzweigung zu induzieren, die nicht B56 β -abhängig inhibiert werden kann.

3.3 CALEB/NGC erhöht die Komplexität von Dendritenbäumen und dendritischen Spines

Sowohl in Experimenten in hippocampaler Einzelzellkultur als auch *in vivo* im nativen Gehirn konnte gezeigt werden, dass CALEB/NGC die Komplexität von Dendritenbäumen und dendritischen Spines erhöht ([Beitrag 2.4](#)). Dabei stimuliert CALEB/NGC Dendritenverzweigung und verändert die Morphologie der Spines derart, dass sie zahlreicher, länger und verzweigter werden ([Beitrag 2.4](#)). Soweit aus der Literatur bekannt, gibt es bisher kein anderes Transmembranprotein, welches eine solche Kombination von Effekten auf Dendritenbäume hat (5-10). Durch die Wahl des verwendeten *in-vivo*-Modells, der *in-utero-Elektroporation*, kann ein indirekter präsynaptischer Effekt von CALEB/NGC auf Dendritenbäume ausgeschlossen werden ([Beitrag 2.4](#), 87, 88). Da bei dieser Technik stets nur ein sehr kleiner Anteil der Neurone genetisch verändert wird, ist statistisch davon auszugehen, dass die Dendriten dieser Neurone weitaus überwiegend normale präsynaptische Eingänge haben. Dieser Fakt ist nicht unwesentlich vor dem Hintergrund, dass bei der elektrophysiologischen Erstbeschreibung einer CALEB/NGC-defizienten Maus ein präsynaptischer Phänotyp gefunden worden ist (60). Die Autoren interpretieren diesen Phänotyp als Veränderung der Wahrscheinlichkeit der präsynaptischen Neurotransmitterfreisetzung. Es ergibt sich demnach die Frage, ob CALEB/NGC sowohl einen Effekt auf das axonale als auch auf das dendritische Kompartiment hat oder ob der präsynaptische Phänotyp der CALEB/NGC-defizienten Maus indirekt durch einen Effekt auf dendritischer Seite hervorgerufen werden könnte. Um diese Frage in zukünftigen Arbeiten beantworten zu können, erscheinen elektrophysiologische Analysen von *in utero* elektroporierten Mäusen sinnvoll zu sein.

Welche Bedeutung hat die durch CALEB/NGC vermittelte Erhöhung der Dendritenkomplexität und Spinekomplexität? Bei der Ausbildung der neuronalen Verschaltungen ist es erforderlich, dass Dendriten und Axone einander begegnen. Diese Begegnung wird um so wahrscheinlicher, je komplexer ein Dendritenbaum ausgebildet ist. Je komplexer ein Dendritenbaum inklusive seiner dendritischen Spines ist, desto größer sind seine Chancen, Haftstellen zu Axonen herzustellen, aus denen sich dann Synapsen ausdifferenzieren. Möglicherweise trägt CALEB/NGC genau dazu bei. Indem es auch die Verzweigung von dendritischen Spines erhöht, könnte CALEB/NGC die Ausbildung mehrerer postsynaptischer Haftstellen für dasselbe Axon ermöglichen. In zukünftigen Arbeiten sollen durch *live-imaging*-Experimente weitere Evidenzen für diese Arbeitshypothesen erbracht werden.

Bei den durchgeführten Studien zum Mechanismus, wie CALEB/NGC die Komplexität von Dendritenbäumen und Spines erhöht, konnte eine zentrale Bedeutung der EGF-ähnlichen Domäne von CALEB/NGC ermittelt werden ([Beitrag 2.4](#)). Die gegenwärtige Arbeitshypothese geht davon aus, dass ein noch unbekannter Ligand an die EGF-ähnliche Domäne von CALEB/NGC bindet und eine Signaltransduktion auslöst, die zur Induktion von Dendritenverzweigung führt. Entweder derselbe oder ein anderer Ligand für dieselbe EGF-ähnliche Domäne stimuliert dann eine Signaltransduktion, die eine Erhöhung der Komplexität der Spines bewirkt. Die Ergebnisse der durchgeführten Studien zur Signaltransduktion zeigen eindeutig, dass die notwendigen Signalwege, die zur Erhöhung der Dendritenkomplexität führen, sich wesentlich unterscheiden von denen, die eine Erhöhung der Spinekomplexität hervorrufen ([Beitrag 2.4](#)). Eine zentrale Bedeutung des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges für CALEB/NGC-vermittelte Dendritenverzweigung wurde dokumentiert ([Beitrag 2.4](#)). Über diesen Signalweg ist aus der Literatur bereits bekannt, dass er eingebunden ist in die Kontrolle von Dendritenverzweigung und synaptischer Plastizität (70, 71, 89-96). Es ist jedoch gegenwärtig noch nicht klar, ob dieser Signalweg, der vorrangig zur Kontrolle von Translationsprozessen führt, nur notwendig für CALEB/NGC-induzierte Dendritenverzweigung ist oder ob er durch CALEB/NGC stimuliert wird. Studien zu dieser Frage setzen die Kenntnis des Liganden der EGF-ähnlichen Domäne von CALEB/NGC voraus. Daher wird es ein wesentliches zukünftiges Ziel der Arbeiten sein, diesen Liganden zu identifizieren.

Obwohl ebenfalls die EGF-ähnliche Domäne von CALEB/NGC der Ausgangspunkt für eine Signaltransduktion ist, die zur Erhöhung der Komplexität von dendritischen Spines führt, sind offenbar ganz andere intrazelluläre Signalproteine involviert als aktive PI3K, Akt oder mTOR (Beitrag 2.4). Laufende Arbeiten in unserem Labor versuchen daher, andere Proteine zu identifizieren, die an dieser Signaltransduktion beteiligt sind. Wir haben bei diesen aktuellen Studien erste Hinweise darauf erhalten, dass für die CALEB/NGC-vermittelte Spine-Morphogenese nicht der intrazelluläre Bereich, der der Transmembranregion folgt, sondern das carboxyterminale Peptidsegment von Bedeutung für die Signalweiterleitung von der extrazellulären EGF-ähnlichen Domäne ins Zellinnere ist.

Alle bisher vorhandenen Daten sprechen also dafür, dass die EGF-ähnliche Domäne von CALEB/NGC unterschiedliche Signalwege stimulieren kann oder dass der von dieser Domäne ausgehende Signalfluss andere intrazelluläre Signalwege benötigt. Gemeinsames Bindeglied für beide Signalwege ist die Abhängigkeit von aktiver Proteinkinase C (Beitrag 2.4).

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse der Studien zu CALEB/NGC-vermittelter Dendriten- und Spinekomplexität in folgendem Schaubild zusammenfassen:

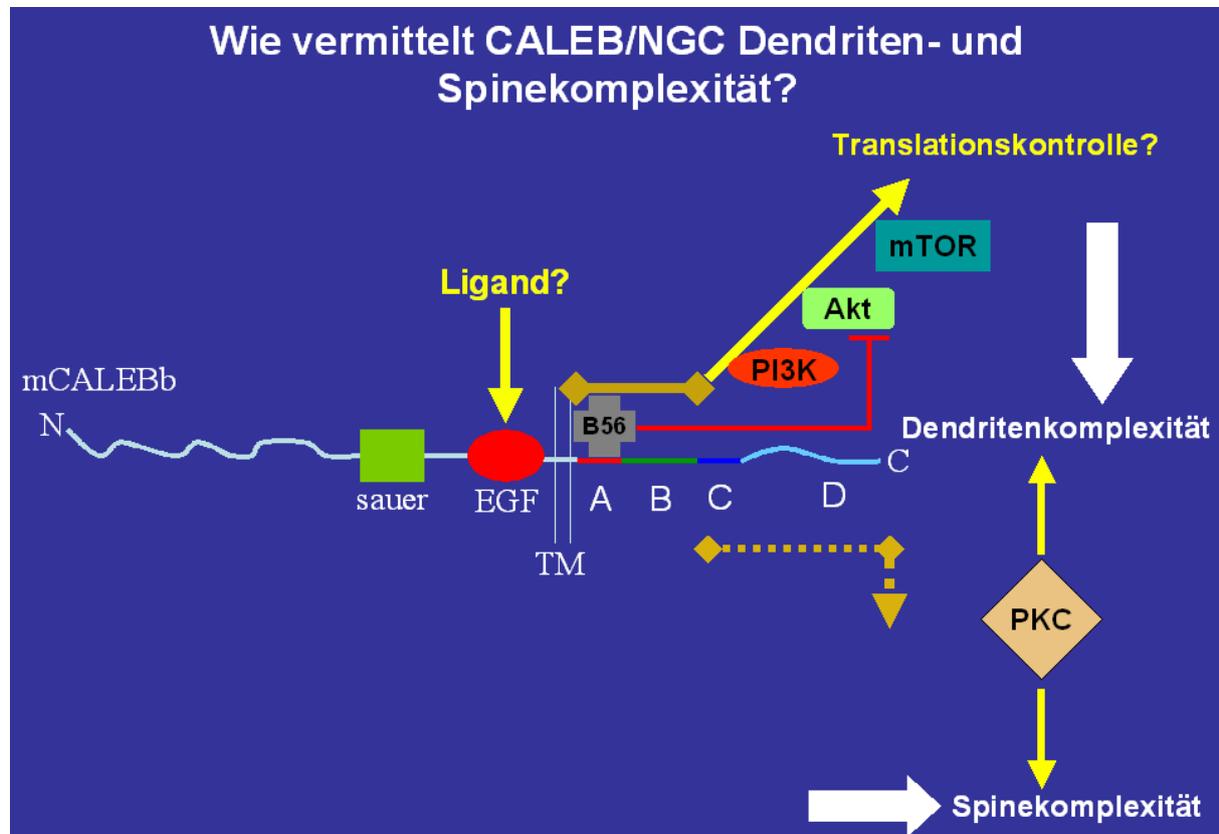


Abbildung 3: Beteiligte Proteine an CALEB/NGC-vermittelter Erhöhung von Dendriten- und Spinekomplexität. In diesem Schaubild wird für die Isoform mCALEBb gezeigt, welche Proteine involviert sind in die Prozesse von CALEB/NGC-vermittelter Dendriten- und Spinekomplexität. In beiden Fällen wird das Signal an der extrazellulär gelegenden EGF-ähnlichen Domäne (EGF) generiert. Andere extrazelluläre Proteinbereiche wie z. B. das saure Peptidsegment (sauer), an welches Tenascin-C und Tenascin-R binden können, spielen offenbar dabei keine Rolle. Der Signalfluss hin zu erhöhter Dendritenkomplexität setzt einen aktiven PI3K-Akt-mTOR-Signalweg voraus. Er wird in der Zelle weitergeleitet durch die Peptidsegmente A und B von CALEB/NGC und er kann durch B56-abhängige PP2A inhibiert werden. B56 bindet an das Peptidsegment A. Der Signalfluss, der zur erhöhten Spinekomplexität führt, nimmt seinen Ausgang zwar auch von der extrazellulär gelegenen EGF-ähnlichen Domäne, er ist aber intrazellulär unabhängig von all den bisher erwähnten Proteinen. Es gibt z. Z. starke Hinweise darauf, dass in diesem Falle zur Signalweiterleitung die intrazellulären Peptidsegmente C und/oder D von Bedeutung sind. Beide Signalwege, hin zu Dendriten- oder Spinekomplexität, setzen aktive Proteinkinase C (PKC) voraus. TM, Transmembranregion.

Die in diesen Studien durchgeführten Untersuchungen haben auf die funktionelle Bedeutung von CALEB/NGC für die Differenzierung von Dendriten und Spines fokussiert. CALEB/NGC wird jedoch nicht nur in Dendriten und Spines gefunden, sondern auch in Axonen ([Beitrag 2.4](#)). Es bleibt die Frage offen, welchen funktionellen Einfluss CALEB/NGC auf die Differenzierung von Axonen hat. Die durchgeführten Untersuchungen, die als Modellsystem für Nervendegeneration und Nervenregeneration die Quetschung des optischen Nerven mit anschließendem Einbringen eines Ischiadicustransplantates benutzt haben, geben darüber bisher keine verlässliche Auskunft ([Beitrag 2.1](#)). Sie sind allerdings sehr interessant vor dem Hintergrund des Verlaufs der Expression von CALEB/NGC nach Läsion des optischen Nerven. Hier hat sich gezeigt, dass die Anzahl der retinalen Ganglienneurone, die CALEB/NGC exprimieren, in den ersten 5 Tagen nach Läsion steil abfällt, in den darauffolgenden 3 Wochen jedoch konstant bleibt. In den ersten 5 Tagen nach Läsion ist kaum Zelltod bei den Ganglienneuronen zu finden. Danach allerdings kann ein massiver Zelluntergang von retinalen Ganglienneuronen durch Apoptose beobachtet werden (53-58). Wenn aber trotzdem die Anzahl der Neurone, die CALEB/NGC exprimieren, gleich bleibt, so kann dies nur bedeuten, dass entweder nun Neurone CALEB/NGC exprimieren, die vorher keines hergestellt haben oder dass die Neurone, die CALEB/NGC exprimieren, besser vor Apoptose geschützt sind. Dieser Aspekt soll in Zukunft weiter untersucht werden, insbesondere aufgrund des in dieser Arbeit gezeigten funktionellen Zusammenhanges zwischen CALEB/NGC und Akt ([Beitrag 2.4](#), 97-100).

4 Zusammenfassung

In den hier vorgestellten Studien wurde gezeigt, dass das neurale EGF-Familienmitglied CALEB/NGC sowohl in Einzellzellkultur als auch *in vivo* im nativen Gehirn Dendritenverzweigung induziert und die Morphogenese von dendritischen Spines fördert, indem es deren Anzahl, Länge und Verzweigung erhöht. Für beide Vorgänge spielt extrazellulär die EGF-ähnliche Domäne von CALEB/NGC die entscheidende Rolle. Intrazellulär ist aktive Proteinkinase C für beide Prozesse wichtig. Für die Signalweiterleitung, die zur Induktion von Dendritenverzweigung führt, ist der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-mammalian target of rapamycin-Signalweg von großer Bedeutung. CALEB/NGC-vermittelte Komplexität von Spines ist jedoch unabhängig von diesem Signalweg.

Bei strukturellen Untersuchungen wurde die Bindung von CALEB/NGC zu Tenascin-C und Tenascin-R, zwei Proteinen aus der extrazellulären Matrix, genau charakterisiert. Dabei wurde die Bindungsstelle innerhalb des sauren Peptidsegmentes von CALEB/NGC lokalisiert. Es wurde gezeigt, dass die Fibrinogen-ähnlichen Domänen von Tenascin-C und Tenascin-R die Bindung an CALEB/NGC vermitteln. Es wurde zudem gezeigt, dass die Bindung von CALEB/NGC an Tenascin-C und Tenascin-R reguliert werden kann. Obwohl Tenascin-C und Tenascin-R als Liganden zur Induktion von CALEB/NGC-vermittelter Dendriten- und Spinekomplexität ausscheiden, gibt es Hinweise, dass diese Interaktionen Bedeutung haben könnten für andere Prozesse im Rahmen von Dendritogenese und Synaptogenese.

Zwei intrazelluläre Interaktionspartner für CALEB/NGC konnten bisher ermittelt und deren Bindungsstelle im intrazellulären Bereich von CALEB/NGC bestimmt werden. Das Golgi-assoziierte PDZ-Domänenprotein PIST bindet an das der Transmembranregion von CALEB/NGC unmittelbar folgende Peptidsegment. Die Bedeutung dieser Interaktion könnte in der Regulation des Transportes von CALEB/NGC in die neuronalen Fortsätze liegen. B56 β , eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (PP2A), bindet ebenfalls an das der Transmembranregion folgende Peptidsegment. Über Bindung an B56 β kann das ganze PP2A-Trimer rekrutiert werden. B56 β ist in der Lage, CALEB/NGC-induzierte Dendritenkomplexität, nicht jedoch CALEB/NGC-vermittelte Spinekomplexität zu inhibieren.

Mit dieser Arbeit wurde ein Beitrag geleistet zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Dendritendifferenzierung und der Morphogenese von dendritischen Spines.

5 Literaturverzeichnis

1. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds). (2000) *Principles Of Neural Science*. New York: McGraw-Hill
2. Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**: 1123-1133
3. Goodman CS (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Ann Rev Neurosci* **19**: 341-377
4. Brummendorf, T. and Rathjen, F.G. (1996) Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 584-593.
5. Scott EK, Luo L (2001) How do dendrites take their shape? *Nat Neurosci* **4**: 359-365
6. Whitford KL, Dijkhuizen P, Polleux F, Ghosh A (2002) Molecular control of cortical dendrite development. *Annu Rev Neurosci* **25**: 127-149
7. Jan YN, Jan LY (2003) The control of dendrite development. *Neuron* **40**: 229-242
8. Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* **2**: 880-888
9. Yuste R, Bonhoeffer T (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* **5**: 24-34
10. Ethell IM, Pasquale EB (2005) Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol* **75**: 161-205
11. Rutishauser U (1985) Influences of the neural cell adhesion molecule on axon growth and guidance. *J Neurosci Res* **13**:123-31
12. Falk J, Bonnon C, Girault JA, Faivre-Sarrailh C (2002) F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination. *Biol Cell* **94**: 327-334
13. Schumacher, S., Volkmer, H., Buck, F., Otto, A., Tarnok, A., Roth, S. and Rathjen, F.G. (1997) Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein (CALEB), a neural member of the EGF family of differentiation factors, is implicated in neurite formation. *J Cell Biol*, **136**, 895-906.
14. Watanabe, E., Maeda, N., Matsui, F., Kushima, Y., Noda, M. and Oohira, A. (1995) Neuroglycan C, a novel membrane-spanning chondroitin sulfate Proteoglykan that is restricted to the brain. *J Biol Chem*, **270**, 26876-26882.
15. Yasuda, Y., Tokita, Y., Aono, S., Matsui, F., Ono, T., Sonta, S., Watanabe, E., Nakanishi, Y. and Oohira, A. (1998) Cloning and chromosomal mapping of the human gene of neuroglycan C (NGC), a neural transmembrane chondroitin sulfate Proteoglykan with an EGF module. *Neurosci Res*, **32**, 313-322.
16. Massague, J. and Pandiella, A. (1993) Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem*, **62**, 515-541.
17. Gassmann, M. and Lemke, G. (1997) Neuregulins and neuregulin receptors in neural development. *Curr Opin Neurobiol*, **7**, 87-92.
18. Riese, D.J., 2nd and Stern, D.F. (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays*, **20**, 41-48.
19. Britsch S (2007) The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **190**: 1-65
20. Aono, S., Keino, H., Ono, T., Yasuda, Y., Tokita, Y., Matsui, F., Taniguchi, M., Sonta, S. and Oohira, A. (2000) Genomic organization and expression pattern of mouse neuroglycan C in the cerebellar development. *J Biol Chem*, **275**, 337-342.

-
21. Apostolova, I., Irintchev, A. and Schachner, M. (2006) Tenascin-R restricts posttraumatic remodeling of motoneuron innervation and functional recovery after spinal cord injury in adult mice. *J Neurosci*, **26**, 7849-7859.
 22. Aspegren, A., Miura, R., Bourdoulous, S., Shimonaka, M., Heinegard, D., Schachner, M., Ruoslahti, E. and Yamaguchi, Y. (1997) The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate Proteoglykans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10116-10121.
 23. Becker, T., Anliker, B., Becker, C.G., Taylor, J., Schachner, M., Meyer, R.L. and Bartsch, U. (2000) Tenascin-R inhibits regrowth of optic fibers in vitro and persists in the optic nerve of mice after injury. *Glia*, **29**, 330-346.
 24. Bukalo, O., Schachner, M. and Dityatev, A. (2007) Hippocampal metaplasticity induced by deficiency in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *J Neurosci*, **27**, 6019-6028.
 25. Chiquet-Ehrismann, R. (1995) Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia*, **51**, 853-862.
 26. Chiquet-Ehrismann, R. (2004) Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 986-990.
 27. Chiquet-Ehrismann, R., Hagios, C. and Schenk, S. (1995) The complexity in regulating the expression of tenascins. *Bioessays*, **17**, 873-878.
 28. Chung, C.Y. and Erickson, H.P. (1994) Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C. *J Cell Biol*, **126**, 539-548.
 29. D'Alessandri, L., Ranscht, B., Winterhalter, K.H. and Vaughan, L. (1995) Contactin/F11 and tenascin-C co-expression in the chick retina correlates with formation of the synaptic plexiform layers. *Curr Eye Res*, **14**, 911-926.
 30. Evers, M.R., Salmen, B., Bukalo, O., Rollenhagen, A., Bosl, M.R., Morellini, F., Bartsch, U., Dityatev, A. and Schachner, M. (2002) Impairment of L-type Ca²⁺ channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. *J Neurosci*, **22**, 7177-7194.
 31. Faissner, A. (1997) The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res*, **290**, 331-341.
 32. Fischer, D., Brown-Ludi, M., Schulthess, T. and Chiquet-Ehrismann, R. (1997) Concerted action of tenascin-C domains in cell adhesion, anti-adhesion and promotion of neurite outgrowth. *J Cell Sci*, **110 (Pt 13)**, 1513-1522.
 33. Fischer, D., Chiquet-Ehrismann, R., Bernasconi, C. and Chiquet, M. (1995) A single heparin binding region within the fibrinogen-like domain is functional in chick tenascin-C. *J Biol Chem*, **270**, 3378-3384.
 34. Garcion, E., Faissner, A. and French-Constant, C. (2001) Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development*, **128**, 2485-2496.
 35. Irintchev, A., Rollenhagen, A., Troncoso, E., Kiss, J.Z. and Schachner, M. (2005) Structural and functional aberrations in the cerebral cortex of tenascin-C deficient mice. *Cereb Cortex*, **15**, 950-962.
 36. Joester, A. and Faissner, A. (2001) The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol*, **20**, 13-22.
 37. Jones, F.S. and Jones, P.L. (2000) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*, **218**, 235-259.

-
38. Meiners, S., Nur-e-Kamal, M.S. and Mercado, M.L. (2001) Identification of a neurite outgrowth-promoting motif within the alternatively spliced region of human tenascin-C. *J Neurosci*, **21**, 7215-7225.
 39. Milev, P., Chiba, A., Haring, M., Rauvala, H., Schachner, M., Ranscht, B., Margolis, R.K. and Margolis, R.U. (1998) High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta with tenascin-R, amphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule. *J Biol Chem*, **273**, 6998-7005.
 40. Milev, P., Fischer, D., Haring, M., Schulthess, T., Margolis, R.K., Chiquet-Ehrismann, R. and Margolis, R.U. (1997) The fibrinogen-like globe of tenascin-C mediates its interactions with neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta. *J Biol Chem*, **272**, 15501-15509.
 41. Rigato, F., Garwood, J., Calco, V., Heck, N., Faivre-Sarrailh, C. and Faissner, A. (2002) Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced Fibronectin type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/contactin. *J Neurosci*, **22**, 6596-6609.
 42. Saghatelian, A.K., Dityatev, A., Schmidt, S., Schuster, T., Bartsch, U. and Schachner, M. (2001) Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Mol Cell Neurosci*, **17**, 226-240.
 43. Sriramarao, P., Mendler, M. and Bourdon, M.A. (1993) Endothelial cell attachment and spreading on human tenascin is mediated by alpha 2 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Cell Sci*, **105 (Pt 4)**, 1001-1012.
 44. Tucker, R.P. (2001) Abnormal neural crest cell migration after the in vivo knockdown of tenascin-C expression with morpholino antisense oligonucleotides. *Dev Dyn*, **222**, 115-119.
 45. Varnum-Finney, B., Venstrom, K., Muller, U., Kypta, R., Backus, C., Chiquet, M. and Reichardt, L.F. (1995) The integrin receptor alpha 8 beta 1 mediates interactions of embryonic chick motor and sensory neurons with tenascin-C. *Neuron*, **14**, 1213-1222.
 46. Volkmer, H., Zacharias, U., Norenberg, U. and Rathjen, F.G. (1998) Dissection of complex molecular interactions of neurofascin with axonin-1, F11, and tenascin-R, which promote attachment and neurite formation of tectal cells. *J Cell Biol*, **142**, 1083-1093.
 47. Weber, P., Bartsch, U., Rasband, M.N., Czaniera, R., Lang, Y., Bluethmann, H., Margolis, R.U., Levinson, S.R., Shrager, P., Montag, D. and Schachner, M. (1999) Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci*, **19**, 4245-4262.
 48. Xiao, Z.C., Ragsdale, D.S., Malhotra, J.D., Mattei, L.N., Braun, P.E., Schachner, M. and Isom, L.L. (1999) Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *J Biol Chem*, **274**, 26511-26517.
 49. Zacharias, U., Leuschner, R., Norenberg, U. and Rathjen, F.G. (2002) Tenascin-R induces actin-rich microprocesses and branches along neurite shafts. *Mol Cell Neurosci*, **21**, 626-633.
 50. Zacharias, U., Norenberg, U. and Rathjen, F.G. (1999) Functional interactions of the immunoglobulin superfamily member F11 are differentially regulated by the extracellular matrix proteins tenascin-R and tenascin-C. *J Biol Chem*, **274**, 24357-24365.

-
51. Zisch, A.H., D'Alessandri, L., Ranscht, B., Falchetto, R., Winterhalter, K.H. and Vaughan, L. (1992) Neuronal cell adhesion molecule contactin/F11 binds to tenascin via its immunoglobulin-like domains. *J Cell Biol*, **119**, 203-213.
 52. Brummendorf, T., Plagge, A. and Treubert, U. (1996) Epitope mapping on extracellular domains of cell-surface proteins using exonuclease III. *Methods Mol Biol*, **66**, 319-342.
 53. Bahr, M. and Bonhoeffer, F. (1994) Perspectives on axonal regeneration in the mammalian CNS. *Trends Neurosci*, **17**, 473-479.
 54. Kermer, P., Klocker, N., Labes, M. and Bahr, M. (1998) Inhibition of CPP32-like proteases rescues axotomized retinal ganglion cells from secondary cell death in vivo. *J Neurosci*, **18**, 4656-4662.
 55. Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Bray, G.M. and Aguayo, A.J. (1988) Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci*, **8**, 265-280.
 56. Schaden, H., Stuermer, C.A. and Bahr, M. (1994) GAP-43 immunoreactivity and axon regeneration in retinal ganglion cells of the rat. *J Neurobiol*, **25**, 1570-1578.
 57. Petrasch, B., Jung, M., Leppert, C.A. and Stuermer, C.A. (2000) Lesion-induced regulation of netrin receptors and modification of netrin-1 expression in the retina of fish and grafted rats. *Mol Cell Neurosci*, **16**, 350-364.
 58. Jung, M., Petrasch, B. and Stuermer, C.A. (1997) Axon-regenerating retinal ganglion cells in adult rats synthesize the cell adhesion molecule L1 but not TAG-1 or SC-1. *Mol Cell Neurosci*, **9**, 116-131.
 59. Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, **325**, 733-736.
 60. Juttner, R., More, M.I., Das, D., Babich, A., Meier, J., Henning, M., Erdmann, B., Mu Ller, E.C., Otto, A., Grantyn, R. and Rathjen, F.G. (2005) Impaired synapse function during postnatal development in the absence of CALEB, an EGF-like protein processed by neuronal activity. *Neuron*, **46**, 233-245.
 61. Neudauer, C.L., Joberty, G. and Macara, I.G. (2001) PIST: a novel PDZ/coiled-coil domain binding partner for the rho-family GTPase TC10. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 541-547.
 62. Charest, A., Lane, K., McMahon, K. and Housman, D.E. (2001) Association of a novel PDZ domain-containing peripheral Golgi protein with the Q-SNARE (Q-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptor) protein syntaxin 6. *J Biol Chem*, **276**, 29456-29465.
 63. Yao, R., Maeda, T., Takada, S. and Noda, T. (2001) Identification of a PDZ domain containing Golgi protein, GOPC, as an interaction partner of frizzled. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**, 771-778.
 64. Cheng, J., Moyer, B.D., Milewski, M., Loffing, J., Ikeda, M., Mickle, J.E., Cutting, G.R., Li, M., Stanton, B.A. and Guggino, W.B. (2002) A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J Biol Chem*, **277**, 3520-3529.
 65. Conner, J.M. and Varon, S. (1992) Distribution of nerve growth factor-like immunoreactive neurons in the adult rat brain following colchicine treatment. *J Comp Neurol*, **326**, 347-362.
 66. Thyberg, J. and Moskalewski, S. (1985) Microtubules and the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res*, **159**, 1-16.

-
67. Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* **87**: 387-406
 68. Saito T, Nakatsuji N (2001) Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using *in vivo* electroporation. *Dev Biol* **240**: 237-246
 69. Chen JG, Rašin MR, Kwan KY, Šestan N (2005) Zfp312 is required for subcortical axonal projections and dendritic morphology of deep-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 17792-17797
 70. Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY (2005) Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* **25**: 11288-11299
 71. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M (2005) Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* **25**: 11300-11312
 72. Nakanishi K, Aono S, Hirano K, Kuroda Y, Ida M, Tokita Y, Matsui F, Oohira A (2006) Identification of neurite outgrowth-promoting domains of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, and involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C signaling pathways in neuritogenesis. *J Biol Chem* **281**: 24970-24978
 73. Leemhuis J, Boutillier S, Barth H, Feuerstein TJ, Brock C, Nurnberg B, Aktories K, Meyer DK (2004) Rho GTPases and phosphoinositide 3-kinase organize formation of branched dendrites. *J Biol Chem* **279**: 585-596
 74. Yu X, Malenka RC (2003) β -catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci* **6**: 1169-1177
 75. McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1996) Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* **17**: 1057-1064
 76. Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* **283**: 1923-1927
 77. Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R (2003) Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci* **23**: 7129-7142
 78. Tolias KF, Bikoff JB, Burette A, Paradis S, Harrar D, Tavazoie S, Weinberg RJ, Greenberg ME (2005) The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron* **45**: 525-538
 79. Janssens, V. and Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, **353**, 417-439.
 80. McCright, B., Rivers, A.M., Audlin, S. and Virshup, D.M. (1996) The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem*, **271**, 22081-22089.
 81. McCright, B. and Virshup, D.M. (1995) Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits. *J Biol Chem*, **270**, 26123-26128.
 82. Zolnierowicz, S., Van Hoof, C., Andjelkovic, N., Cron, P., Stevens, I., Merlevede, W., Goris, J. and Hemmings, B.A. (1996) The variable subunit associated with protein phosphatase 2A0 defines a novel multimember family of regulatory subunits. *Biochem J*, **317 (Pt 1)**, 187-194.

-
83. Rocher, G., Letourneux, C., Lenormand, P. and Porteu, F. (2007) Inhibition of B56-containing protein phosphatase 2As by the early response gene IEX-1 leads to control of Akt activity. *J Biol Chem*, **282**, 5468-5477.
 84. Inatani, M., Tanihara, H., Oohira, A., Otori, Y., Nishida, A., Honjo, M., Kido, N. and Honda, Y. (2000) Neuroglycan C, a neural tissue-specific transmembrane chondroitin sulfate Proteoglykan, in retinal neural network formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**, 4338-4346.
 85. Loeb, J.A. and Fischbach, G.D. (1995) ARIA can be released from extracellular matrix through cleavage of a heparin-binding domain. *J Cell Biol*, **130**, 127-135.
 86. Gölz, G., et al., *The cytokine/neurotrophin axis in peripheral axon outgrowth*. Eur J Neurosci, im Druck, 2006.
 87. Koizumi H, Tanaka T, Gleeson JG (2006) *Doublecortin-like kinase* functions with *doublecortin* to mediate fiber tract decussation and neuronal migration. *Neuron* **49**: 55-66
 88. Deuel TAS, Liu JS, Corbo JC, Yoo SY, Rorke-Adams LB, Walsh CA (2006) Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron* **49**: 41-53
 89. Hou L, Klann E (2004) Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* **24**: 6352-6361
 90. Sanna PP, Cammalleri M, Berton F, Simpson C, Lutjens R, Bloom FE, Francesconi W (2002) Phosphatidylinositide 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurosci* **22**: 3359-3365
 91. Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 467-472
 92. Tsokas P, Ma T, Iyengar R, Landau EM, Blitzer RD (2007) Mitogen-activated protein kinase upregulates the dendritic translation machinery in long-term potentiation by controlling the mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* **27**: 5885-5894
 93. Lenz G, Avruch J (2005) Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons. *J Biol Chem* **280**: 38121-38124
 94. Qin Y, Zhu Y, Baumgart JP, Stornetta RL, Seidenman K, Mack V, van Aelst L, Zhu JJ (2005) State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. *Genes Dev* **19**: 2000-2019
 95. van der Heide LP, Kamal A, Artola A, Gispen WH, Ramakers GM (2005) *J Neurochem* **94**: 1158-1166
 96. Sweatt JD (2001) Protooncogenes subserve memory formation in the adult CNS. *Neuron* **31**: 671-674
 97. Frebel K, Wiese S (2006) Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochem Soc Trans* **34**:1287-1290
 98. van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP (2006) Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol* **79**: 205-221
 99. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 297-305
 100. Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**: 1261-1274

Tierversuchsgenehmigungen

Zur Durchführung der Tierversuche an der Charité-Universitätsmedizin lagen die Genehmigungen der lokalen Behörden durch den Projektleiter Prof. Dr. Robert Nitsch vor.

Für die Tierversuche, die in Kooperation durchgeführt wurden, lag eine Genehmigung des jeweiligen Kooperationspartners vor.

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Nitsch, in dessen Institut ein Großteil der hier präsentierten Arbeiten durchgeführt worden ist. Er hat durch großzügige und umfassende Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Studien beigetragen. Neben der Bereitstellung exzellenter Arbeitsbedingungen waren für mich besonders wertvoll seine wissenschaftlichen Anregungen (z. B. der Anstoß zur Technik der *in-utero-Elektroporation*) und seine Ermutigungen in Talphasen der Projekte.

Herrn Prof. Dr. Dietmar Richter, Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, möchte ich für die große Unterstützung meiner Arbeitsgruppe in seinem Institut danken. Hier wurden unter sehr guten Arbeitsbedingungen die ersten Ergebnisse zu den hier dargestellten Studien gewonnen.

Ich danke den Mitgliedern meiner ehemaligen Arbeitsgruppe am Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Ganz besonders erwähnen möchte ich Frau Eva-Maria Stübe und Herrn Dr. Burkhard Hassel. Ebenso danken möchte ich den anderen MitarbeiterInnen dieses Institutes für ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität. Hier möchte ich ganz besonders erwähnen die Herren Sönke Harder, Dr. Friedrich Buck und Dr. Hansjürgen Kreienkamp.

Den Herren Drs Nenad Šestan und Mladen-Roko Rašin, Yale University School of Medicine, Dept. Neurobiology, danke ich für ihre Hilfe beim Erlernen der Technik der *in-utero-Elektroporation*. Die gemeinsame Zeit bei ihnen in Yale war wissenschaftlich enorm stimulierend und menschlich sehr wertvoll.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe am Institut für Zellbiologie und Neurobiologie am Centrum für Anatomie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Nicola Brandt, Kristin Franke, Monika Dulinski, Magda Marszalek, Wolfgang Otto, Sascha Johannes, es ist eine große Freude, mit euch zu arbeiten und Wissenschaft zu machen.

Ich danke auch den anderen MitarbeiterInnen des Instituts für Zellbiologie und Neurobiologie am Centrum Anatomie der Charité – Universitätsmedizin Berlin für ihre

Hilfestellungen und Kollegialität. Für ihre geduldigen Hilfestellungen rund um die anatomische Lehre danke ich besonders den Herren Prof. Dr. Gottfried Bogusch und Dr. Andreas Winkelmann.

Mein Dank geht außerdem an die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn, die meine Forschungsprojekte im Rahmen des SFB 545-A12 (Hamburg), SFB 665-A2 (Berlin) und des Graduiertenkollegs 255 (Hamburg) gefördert hat oder noch fördert.

Ich danke meinen Eltern, Rudolf und Alice Schumacher, für ihre Unterstützung und ihre Anteil nehmende Begleitung.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, meiner Frau Bettina und unseren Söhnen Jakob und Moritz Schumacher. Ihr seid ein großer und sehr schöner Rückhalt in meinem Leben.

Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- **weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,**
- **welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,**
- **die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.**
- **mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.**