

**Lokalisation, proteolytische Umwandlung von CALEB und seine  
Funktion bei der Reifung neuronaler Verschaltungen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Rogério B. Craveiro**  
aus Sao Paulo

Berlin  
August 2009

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2005 bis August 2009 im Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Forschungsgruppe Entwicklungsneurobiologie - Berlin-Buch und unter der Leitung von Prof. Dr. Fritz G. Rathjen angefertigt.

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Fritz G. Rathjen

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Carmen Birchmeier-Kohler

Disputation am: 02.12.09

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>i</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>v</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>vii</b>
<b>Summary</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Die Bedeutung der Synapse.....	1
1.2. Synaptogenese.....	2
1.3. Aufbau der Dendritenbäume.....	4
1.4. Intrinsische und extrazelluläre Faktoren, die an der Regulation der Dendritenbaumkomplexität beteiligt sind.....	6
1.5. Molekulare Charekterisierung von <u>C</u> hicken <u>a</u> cidic <u>l</u> eucine-rich <u>E</u> GF-like domain containing <u>b</u> rain protein (CALEB).....	9
1.6. Interaktionspartner von CALEB.....	11
1.7. Posttranslationale Modifikation von CALEB.....	12
1.8. Aufgabenstellung der Arbeit.....	14
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1. Material.....	15
2.1.1. Allgemeines.....	15
2.1.2. Chemikalien.....	15
2.1.3. Enzyme.....	16
2.1.4. Kits.....	17
2.1.5. Pharmakologische Substanzen.....	17
2.1.6. Primer/Oligonukleotide.....	17
2.1.7. Verwendete Antikörper.....	18
2.1.7.1. Primäre Antikörper.....	18
2.1.7.2. Sekundäre Antikörper.....	19
2.1.8. Plasmide.....	20
2.1.9. Verwendete Programme und Datenbanken.....	20
2.1.10. Eukaryontische Zelllinien.....	20
2.1.11. Versuchstiere.....	20
2.1.12. Geräte.....	21
<b>2.2. Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.2. Quantitative Real-Time-PCR und semi-Quantitative-PCR.....	22

2.2.2.1. RNA-Aufreinigung mittels TRIzol-Reagenz .....	22
2.2.2.2. Konzentrationsbestimmung von RNA .....	23
2.2.2.3. Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	23
2.2.2.4. cDNA-Quantifizierung über Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	24
2.2.3. Genotypisierung .....	25
2.2.3.1. Isolierung genomischer DNA .....	25
2.2.3.2. PCR .....	26
2.2.4. Isolierung von DNA-Fragmenten .....	26
2.2.5. Transformation.....	26
2.2.5.1. Chemokompetente <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ .....	26
2.2.5.2. Transformation von DH5 $\alpha$ .....	26
2.2.5.3. Gewinnung der Plasmid-DNA aus transformierten <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	27
2.2.5.4. Plasmid-DNA Präparation .....	27
2.2.5.5. Sequenzierung der Plasmid-DNA.....	27
2.2.6. Proteinexpression in eukaryontischen Zellen durch Transfektion mit Lipofectamine 2000...	27
2.3. Zellkulturtechniken .....	28
2.3.1. Präparation und Kultivierung primärer Neuronen .....	28
2.3.2. Proteinexpression von kultivierten Neuronen durch Transfektion mit Effectene .....	29
2.4. Biochemische Methoden.....	30
2.4.1. Gewinnung von Proteinextrakten aus Geweben .....	30
2.4.2. Gewinnung von Proteinextrakten aus der Zellkultur .....	31
2.4.3. Subzelluläre Fraktionierung von Nervengewebe zur Gewinnung von Synaptosomen, synaptischen Vesikeln und der postsynaptischen Fraktion .....	31
2.4.3.1 Gewinnung der postsynaptischen Fraktion (PSD) .....	31
2.4.3.2. Gewinnung der synaptosomalen Fraktion und synaptischen Vesikeln.....	33
2.4.3.3. Gewinnung von „Lipid Rafts“ durch differenzielle Zentrifugation .....	35
2.4.3.4. Affinitätsreinigung von CALEB aus Plasmamembranen von embryonalen Hühneraugen .	35
2.5. Immunpräzipitation.....	36
2.6. Untersuchung einer Interaktion der EGF Domäne von CALEB mit Mammakarzinomzellen ..	37
2.7. Konzentrationsbestimmungen von Proteinen .....	37
2.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot .....	37
2.9. Dokumentation und Quantifizierung der Blots .....	38
2.10. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen.....	38
2.11. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blue.....	39
2.12. Immunfluoreszenz Methoden .....	39
2.12.1. Fluoreszenzmikroskopie .....	39
2.12.2 Konfokale Mikroskopie .....	40

2.12.3 Fixierung von Neuronenkulturen .....	41
2.12.4. Methanol-Fixierung .....	41
2.12.5. Paraformaldehyd-Fixierung .....	41
2.13. Immuncytochemie.....	42
2.13.1. Lebendfärbung (Zelloberflächenfärbung).....	42
2.14. Auswertung/Statistik.....	42
2.14.1. Datenanalyse .....	42
2.14.2. Fast Sholl Analyse von Neuronen.....	42
2.14.3. Kolokalisation .....	43
2.15. Histologische Methoden .....	43
2.15.1. Beschichtung von Objektträgern mit Gelatine .....	43
2.15.2. Anfertigung von Gewebeschnitten.....	43
2.15.3. Immunhistochemie an Gewebeschnitten.....	43
2.15.4. Golgi-Färbung.....	44
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1. Untersuchung zur Verteilung von CALEB in der Maus .....	45
3.1.1. Expression von CALEB in verschiedenen Geweben der Maus .....	45
3.2. Expressionsmuster von CALEB in unterschiedlichen Geweben während der Entwicklung....	47
3.3. Vorhandensein von CALEB auf Glia Zellen .....	49
3.4. Untersuchung zur subzellulären Verteilung von CALEB.....	49
3.4.1 Die Lokalisation von CALEB in „Lipid Rafts“ .....	50
3.4.2 Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von CALEB durch biochemische Methoden..	53
3.4.3. Immunzytologische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von CALEB .....	55
3.4.5. Untersuchungen zur synaptischen Lokalisation von CALEB.....	61
3.5 Analyse des Dendritenbaumes in CALEB -/- Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen...	63
3.5.1 Analyse des Dendritenbaumes nach Immunfärbung.....	63
3.5.2 Analyse des Dendritenbaumes nach Transfektion mit einer für EGFP kodierenden cDNA ..	65
3.5.3. Etablierung einer Methode zur Analyse des Dendritenbaumes in CALEB -/- Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen in kortikalen Hirnschnitten .....	66
3.5.4. Analyse der Anzahl von Synapsen in CALEB -/- Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen.....	69
3.6. Untersuchungen zur Phosphorylierung von CALEB.....	71
3.7. Untersuchung zur Prozessierung von CALEB.....	74
3.8. Untersuchung zur Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren durch die EGF-Domäne von CALEB .....	78
3.9. Mit CALEB ko-isolierende Komponenten .....	83
3.10. Analyse der Genexpression in CALEB-defizienten Mäusen.....	84

3.11. Expression von CALEB bei kortikaler „Spreading Depression“ .....	87
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>88</b>
4.1. Expression und Lokalisation von CALEB im Nervensystem.....	89
4.2. Untersuchung der subzellulären Verteilung von CALEB.....	91
4.3. Untersuchungen zur synaptischen Lokalisation von CALEB.....	93
4.4. Analyse des Dendritenbaumes in CALEB -/- Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen ..	94
4.5. Analyse der Anzahl von Synapsen in CALEB -/- Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen .....	96
4.6. Proteolytische Umwandlung von CALEB.....	98
4.7. Glykosylierung von CALEB.....	100
4.8. Untersuchungen zur Phosphorylierung von CALEB.....	1001
4.9. Untersuchung zur Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren durch die EGF-Domäne von CALEB .....	102
4.10. Molekulare Grundlagen der veränderten Neurotransmitter-Freisetzungswahrscheinlichkeit in der CALEB-defizienten Maus .....	104
4.11. Ausblick.....	105
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>106</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>113</b>
<b>7. Lebenslauf.....</b>	<b>114</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>116</b>
<b>9. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>117</b>

## Abkürzungsverzeichnis

-/-	homozygot bzgl. der <u>Abwesenheit eines</u> Genabschnittes im Genom
2H3	mAb gegen Neurofilament
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
CALEB	<u>ch</u> icken <u>a</u> cidic <u>l</u> euclin-rich <u>E</u> GF-like domain containing <u>b</u> rain protein
ch	aus dem Huhn stammend ( <i>Gallus gallus</i> )
COS 7-Zellen	Nierengewebe von Grünen Meerkatzen ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )-Zellen
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Cy3	Indocarbocyanin
cyt	zytoplasmatisch
Da	Dalton
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
dNTP	„desoxyribonucleosid triphosphat“
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“)
et al.	et alii, und andere
extra	extrazellulär
FCS	Fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
g	Erdbeschleunigung ( $m/s^2$ )
GFP	„green fluorescent protein“
G $\alpha$ M	Ziege-anti-Maus („goat-anti-mouse“)
h	Stunde
hu	„human“
IP	Immunpräzipitation
m	aus dem Maus stammend ( <i>Mus musculus</i> )
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NGC	Neuroglycan C
P	Postnaltag
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	“ <u>p</u> hosphat <u>b</u> uffered <u>s</u> aline”
PCR	“ <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction”
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	peripheres Nervensystem
r	aus dem Ratte stammend ( <i>Rattus norvegicus</i> )
Rb	Kaninchen (“rabbit”)
RT	Raumtemperatur
SDS	„sodium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate“
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle

TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethydiamin
TGF $\alpha$	Transformierender Wachstumsfaktor („transforming growth factor“)
Tris	Tris (hydroxymethylaminomethan)
TS	Transkriptionsfaktor
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
ZNS	Zentralnervensystem

## Zusammenfassung

Zur Charakterisierung der molekularen Vorgänge bei der Bildung und Regulation synaptischer Verbindungen wurde in der Arbeitsgruppe Rathjen das Zelloberflächenprotein CALEB identifiziert. CALEB ist ein Transmembranprotein, das auf der extrazellulären Seite eine charakteristische EGF-ähnliche Domäne enthält. Ziel der Doktorarbeit war es, die genaue Expression in verschiedenen Hirngeweben, die subzelluläre Lokalisation, die proteolytische Umwandlung und die zellbiologischen Funktionen von CALEB zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass CALEB auf das zentrale Nervensystem beschränkt ist und im peripheren Nervensystem nicht vorkommt. Interessanterweise wird CALEB in verschiedenen Formen exprimiert. Während Perioden der Synaptogenese ist CALEB in einigen Hirngeweben zunächst stark glykosyliert und in späteren Stadien nur wenig oder gar nicht glykosyliert. Während der Entwicklung der Maus hat CALEB in einigen Hirngeweben eine maximale Expression zwischen dem 10. und 20. postnatalen Tag. Danach nimmt die Expression ab, besteht aber im adulten Nervensystem fort. Mittels biochemischer und immunzytochemischer Methoden kann gezeigt werden, dass CALEB nicht auf Synapsen beschränkt ist, sondern vorwiegend eine somato-dendritische Lokalisation aufweist. Axone sind negativ für CALEB. In biochemischen Fraktionierungen wie PSD-, Vesikel- oder „Lipid-Raft“-Präparationen verhält sich CALEB wie ein typisches Transmembranprotein, das sich in der Synaptosomenfraktion anreichert.

In der Analyse des Dendritenbaumes nach 4, 8 und 14 Tagen *in vitro* von sowohl Hippocampus- als auch Kortex-Neuronen konnte in CALEB-defizienten Neuronen eine signifikant verringerte Komplexität im Vergleich zu Wildtyp Neuronen beobachtet werden. Hingegen konnte kein Unterschied in der Anzahl von GABA-ergen und glutamatergen Synapsen mittels Immunfärbungen in der kortikalen Wildtyp und CALEB-defizienten Kultur festgestellt werden. Parallel durchgeführte elektrophysiologische Untersuchungen zeigen jedoch eine Veränderung in der synaptischen Transmission, was durch eine veränderte Morphologie der CALEB-defizienten kortikalen Kulturen erklärt werden könnte.

Die Umwandlung von CALEB, von einer Vorläuferform in eine verkürzte Form, wurde sowohl beim Huhn als auch bei der Maus nachgewiesen (Jüttner et al., 2005). Um die Umwandlung von CALEB zu erklären, wurde an akuten, kortikalen Hirnschnitten ein neues Versuchmodell etabliert. Die Western Blotting Analysen zeigen, dass die Umwandlung von CALEB  $\text{Ca}^{2+}$  - und zeitabhängig ist und eine Cystein/Serin-Protease erforderlich macht,

wobei die Hemmung von Glutamat-NMDA-Rezeptoren die Prozessierung von CALEB in eine kurze membranständige Form vermindert.

Phosphorylierung ist ein entscheidender Schritt in der Signaltransduktion und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von vielen zellulären Prozessen. Aus diesem Grund wurden die potentiellen Phosphorylierungsstellen von CALEB mittels Phosphomotiv-Antikörper analysiert. Eine Phosphorylierung von CALEB konnte mittels Akt oder PKC Phosphomotiv-Antikörpern nicht nachgewiesen werden.

Ausgehend von früher durchgeführten mRNA-Expressionsanalysen (Affymetrix-Gene-Chip-Analyse im Colliculus superior von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu CALEB Knockout-Mäusen) führte ich eine „real-time-PCR“-Analyse von einer Reihe veränderter Kandidatengene durch. Unter ihnen sind insbesondere Untereinheiten spannungsabhängiger Calciumkanäle und die AP2-associated-kinase 1 von Interesse, da sie in Ihrer Expression in der CALEB-defizienten Mäusen vermindert erscheinen. Mit der „real-time-PCR“ konnte jedoch kein signifikanter Unterschied für die mRNA Expression dieser Gene zwischen Wildtyp und Knock-out gefunden werden.

Zusammenfassend weisen das Expressionsprofil, sowie die Lokalisation von CALEB und die veränderte neuronale Morphologie in Abwesenheit von CALEB darauf hin, dass CALEB eine Funktion bei der Entwicklung von neuronalen Verschaltungen ausübt.

## Summary

In order to characterize the molecular components which affect the formation and regulation of synaptic connections, Rathjen's group identified a transmembrane protein termed CALEB. CALEB is a transmembrane protein containing a characteristic EGF-like domain close to its plasma membrane spanning region suggesting that it is a member of the EGF family of differentiation factors.

The aims of this work were to analyse the specific expression of CALEB in different brain tissues, its subcellular localisation, processing, as well as its cellular function. This work shows for the first time that CALEB is restricted to the central nervous system and it is not present in the peripheral nervous system. Interestingly, during early phases of development CALEB is highly glycosylated in specific brain regions, while this posttranslational modification is reduced at later stages. CALEB expression differs between brain regions, reaching a maximum between postnatal days 10 and 20. Its expression can also be seen in the adult nervous system. By using biochemical and immunocytochemical methods I reveal a somato-dendritical localisation of CALEB. It is not restricted to synapses nor is it present on axons. In biochemical fractionations such as PSD, vesicle or lipid rafts preparations CALEB behaves as typical transmembrane protein and is especially rich in the synaptosomal fractions. Analysis of the dendritic tree morphology of cultivated neurons revealed a significant reduction in dendritic tree complexity after 4, 8 and 14 days in culture in the absence of CALEB. This difference was observed both in hippocampal and cortical neuron culture. Immunostaining experiments performed in cortical cultures show that the absence of CALEB does not influence the number of GABAergic and glutamatergic synapses when compared with wild type controls. In this respect, it is interesting to mention that parallel electrophysiological studies from our laboratory showed a change in the synaptic transmission.

In an attempt to study the conversion of CALEB, a new assay was developed, which allowed us to use acute mouse brain cortical slices instead of previously used cell cultures (Jüttner et al., 2005). Our experiments show that CALEB processing is time and  $Ca^{2+}$  dependent. Blocking of the NMDA glutamate receptors impairs the proteolytic processing of CALEB. Most probably, the processing of CALEB involves serine and/or cysteine proteases.

Potential phosphorylation sites of CALEB were analyzed by Akt and PKC specific phosphomotif antibodies by which no phosphorylation of CALEB could be observed.

It has been shown that the absence of CALEB during postnatal development impairs synaptic function (Jüttner et al., 2005). To further investigate which molecules might be affected by CALEB deficiency, a series of candidate genes previously shown to be changed in the Affymetrix gene chip analysis were tested by using real time PCR. The selected genes (different voltage-dependent calcium channel subunits, AP2 associated kinase 1, etc) showed no difference between wild type and CALEB deficient mice.

In summary, the developmentally regulated expression pattern and localization of CALEB as well the and neuronal morphology in the absence of CALEB suggest that CALEB is implicated in the development, especially during early phases of synaptogenesis.

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Bedeutung der Synapse

Die Gehirne und Nervensysteme der Tiere und des Menschen sind die wohl erstaunlichsten Organe, die beim Menschen vermutlich aus etwa 100 Milliarden Nervenzellen bestehen. Nervenzellen werden durch Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) gestützt und ernährt. Eine einzelne Nervenzelle ist hierbei über elektrische und chemische Synapsen mit einer Vielzahl anderer Nervenzellen zu komplexen Netzwerken verbunden. Neurone bekommen gewöhnlich Informationen von Hunderten bis Tausenden ihresgleichen, und sie übertragen Signale an andere Neurone an spezialisierten Stellen, den so genannten Synapsen. Chemische Synapsen erzeugen elektrische Signale, die sich längs der Nervenfasern in Form von Aktionspotentialen fortpflanzen und sich an den Enden der Nervenfasern an präsynaptischen Neuritenendigungen (in den Synapsen) durch die Freisetzung von Überträgersubstanzen (den Neurotransmittern) anderen Nervenzellen mitteilen. Diese chemischen Signale erzeugen wieder elektrische Signale in postsynaptischen Neuronen (Garner et al., 2002).

Die postsynaptische Plasmamembran ist ultrastrukturell durch ein spezialisiertes Zytoskeletts charakterisiert. Dieses besteht aus regulatorischen Zytoskelett-Proteinen und dient der Organisation der Signaltransduktionsmaschinerie an der postsynaptischen Membran, der so genannten postsynaptischen Dichte („postsynaptic density“, PSD). Diese ist grundlegend in Aggregation und Verankerung von postsynaptischen Rezeptoren und Ionenkanälen involviert (Scannevin and Haganir, 2000; Sheng, 2001).

Molekulare, biochemische und morphologische Untersuchungen zeigen, dass das präsynaptische Netz und die PSD mittels biochemischer Methoden gereinigt werden können. Diese Anreicherung von strukturellen Proteinen gibt Auskunft über die Struktur und Organisation von der prä- und postsynaptischen Membran (Dresbach et al., 2001; Fernandez-Chacon and Sudhof, 1999; Garner et al., 2000; Scannevin and Haganir, 2000).

Unterschieden werden Synapsen, die eine erregende (exzitatorische) oder eine hemmende (inhibitorische) Wirkung haben können.

Nur wenn mehrere erregende, exzitatorisch-postsynaptische Potentiale (EPSP) an verschiedenen Stellen (räumliche Summation) oder in ausreichend schneller zeitlicher Abfolge (zeitliche Summation) an einem Neuron eintreffen, entsteht in diesem ein Aktionspotential. Die Aktivierung hemmender Synapsen führt zur Hyperpolarisation der

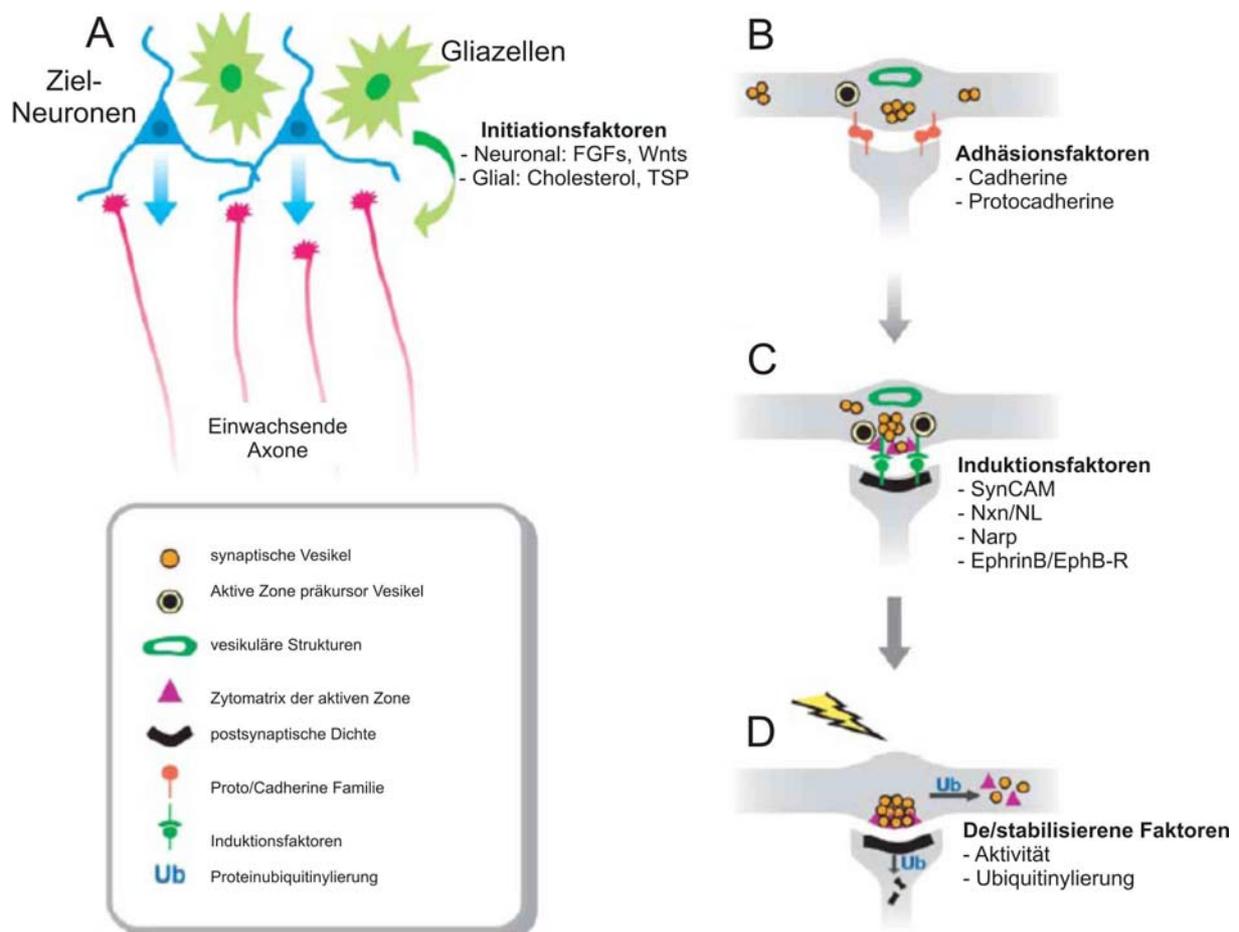
Nervenzelle, einer Absenkung des Membranpotentials, wodurch die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotentials erhöht wird. EPSP führen zur Depolarisation.

Eine grundlegende Frage in der Neurobiologie ist die Synaptogenese: Welche molekularen Mechanismen führen zur spezifischen Anordnung von Synapsen an verschiedenen Zelltypen? Welche molekularen Mechanismen bewirken eine Eliminierung der Synapsen?

## 1.2. Synaptogenese

Als Synaptogenese wird die Entstehung oder Bildung neuer Synapsen an einer Nervenzelle oder Muskelzelle bezeichnet. Die Ausbildung neuronaler Verschaltungen erfolgt in mehreren zeitlich und räumlich koordinierten Phasen der Entwicklung.

Dabei lassen sich aktivitätsunabhängige und -abhängige Mechanismen der Synaptogenese unterscheiden. Axone werden vielfach über beträchtliche Distanzen mittels Wegfindungsfaktoren zu ihren Zielgebieten geleitet und bilden dort die initialen synaptischen Kontakte mit ihren Zielzellen. Während der grundlegende Bauplan neuronaler Verbindungen zunächst aktivitätsunabhängig angelegt wird, folgt eine Phase, in der dieses Grundgerüst in Abhängigkeit von den verschiedenen Formen der elektrischen Aktivität der Neurone moduliert und präzisiert wird (Berardi et al., 2003; Goodman and Shatz, 1993; Jüttner and Rathjen, 2005; Katz and Crowley, 2002). In der frühen Phase der Entwicklung tritt neuronale Aktivität spontan auf, wie beispielsweise die in der Retina beobachteten Aktivitätswellen zeigen (Feller, 1999; McCormick, 1999). Später steuern sensorische Informationen die neuronale Aktivität. Obwohl die Synapsenbildung *per se* nicht von der synaptischen Transmission abhängig zu sein scheint (Verhage et al., 2000), so wird doch generell angenommen, dass neuronale Aktivität für die Feinjustierung der Verschaltungen und der Synapsen essentiell ist (Goda and Davis, 2003).



**Abb. 1: Regulation der Synaptogenese in Vertebraten**

Synaptogenese ist ein mehrstufiger Prozess, gesteuert durch eine Vielzahl von Molekülen. (A) Initialreaktionsfaktoren, (B) Adhäsionsfaktoren, (C) Induktionsfaktoren und (D) De/stabilisierende Faktoren. Modifiziert nach Waites et al. (2005).

Die Synapsenbildung kann durch axo-dendritische, axo-somatische oder axo-axonale Kontakte ausgelöst werden (Garner et al., 2002). Nach Waites und Kollegen (2005) kann dieser Prozess in vier Schritte unterteilt werden:

**A. Initiationsfaktoren:** Im ersten Schritt werden vor der Synapsenbildung eine Reihe von Molekülen zur Weg- und Zielfindung der Axone gebildet. Diese Moleküle sind z.B. Netrine und Semaphorine. Anziehende oder repulsive Wegfindungsmoleküle werden von Zielneuronen und Gliazellen in ihrer lokalen Umgebung sezerniert. Moleküle wie z.B. Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGFs), Wnts, Cholesterol und Thrombospondin (TSP) fördern die axonale und dendritische Reifung und sind in dem frühen Prozess der Synapsenformation involviert.

**B. Adhäsionsfaktoren:** Zell-Adhäsionsmoleküle („cell adhesion molecules“, CAMs) wie z.B. Cadherine und Protocadherine ermöglichen die Ausbildung von Kontakten zwischen den in dem Zielgebiet eingewachsenen Axon und der entsprechenden Zielzelle.

C. Induktionsfaktoren: Dies sind Faktoren einer zweiten Klasse von CAMs, wie z.B. SynCAM und Neurologin, die die Bildung von präsynaptischen aktiven Zonen einleiten. In diesem Schritt wirken Adhäsions- und Induktionsfaktoren zusammen, um die entstehenden synaptischen Verbindungen („synaptic junction“) zu stabilisieren.

D. De/stabilisierende Faktoren: Diese regulieren die synaptische Stabilisation und spielen eine Rolle bei der neuronalen Aktivität und Ubiquitynylierung. Neuronale Aktivität ist nicht entscheidend für die Synapsenbildung, scheint aber eine wichtige Rolle bei der Regulation der synaptischen Stabilisation zu spielen. Ubiquitynylierung von synaptischen Proteinen reguliert dabei nicht nur den Turnover von synaptischen Komponenten, sondern auch die Eliminierung von Synapsen. Diese Phase der Synaptogenese ist auch charakterisiert durch eine Stärkung von Adhäsionskontakten bei entstehenden Synapsen (Cline and Haas, 2008). Dies ist elektrophysiologisch durch die Anwesenheit von postsynaptischen NMDA-Rezeptoren gekennzeichnet, während AMPA-Rezeptoren fehlen. NMDA-Rezeptoren sind häufig in extrasynaptischen Plasmamembranen lokalisiert (Thomas et al., 2006). Ihre laterale Bewegung innerhalb der Membran wird durch EphrinB-EphB-Interaktionen gesteuert (Dalva et al., 2000). In der nächsten Phase der Synaptogenese entstehen die AMPA-Rezeptoren und andere Komponenten der postsynaptischen Dichte („postsynaptic density“). Die fortschreitende synaptische Reifung lässt sich auch elektrophysiologisch charakterisieren. So wird eine Erhöhung der Amplitude der AMPA-Rezeptoren-vermittelten synaptischen Transmission und eine Änderung in der Zusammensetzung der Untereinheiten der NMDA-Rezeptoren beobachtet (Bellone and Nicoll, 2007; Carmignoto and Vicini, 1992; Hestrin, 1992).

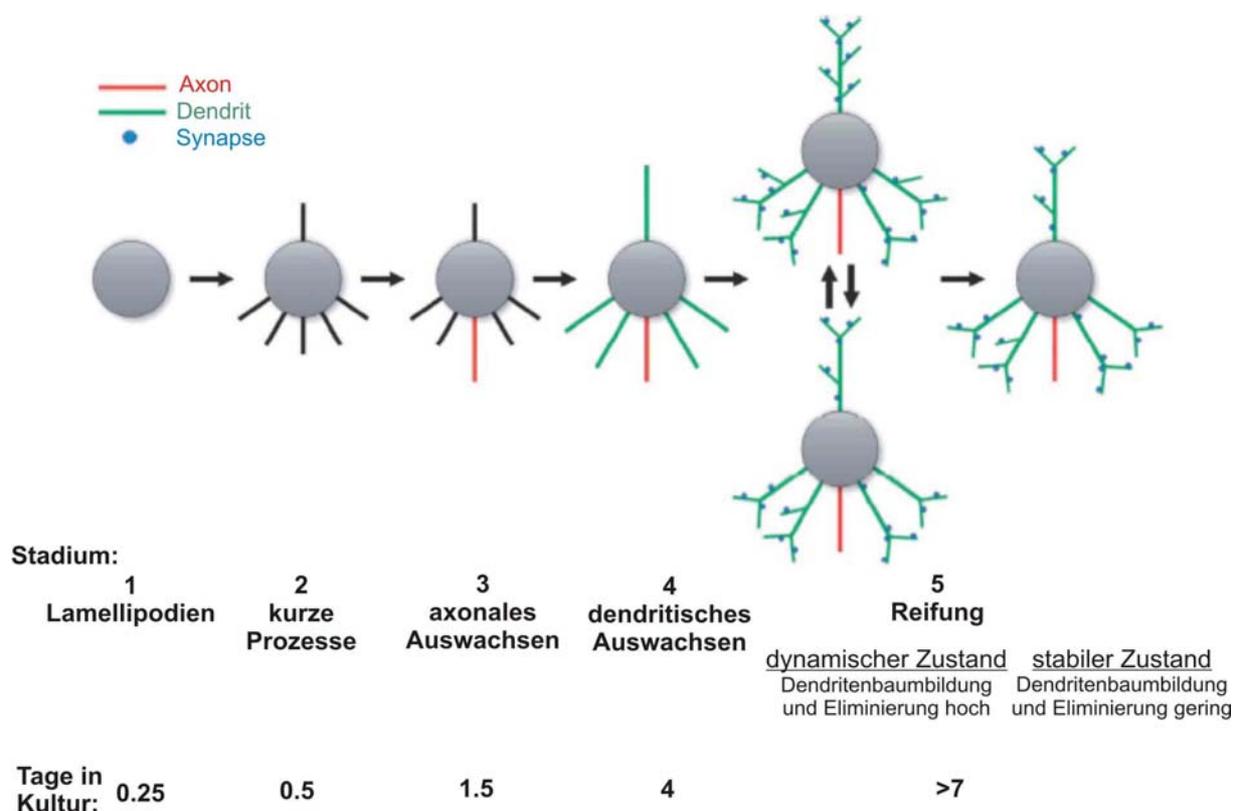
### **1.3. Aufbau der Dendritenbäume**

Dendriten sind die Hauptstelle des Informationseingangs (input) in Neuronen, enthalten also sehr viele Synapsen. Verschiedene Typen von Neuronen haben ausgeprägte und charakteristische dendritische Verzweigungsprofile (Urbanska et al., 2008).

Obwohl in den letzten 20 Jahren die Kenntnisse über die zellulären, molekularen Mechanismen des axonalen Wachstums und der Weg- und Zielfindung durch zahlreiche Studien erweitert wurden, ist bis jetzt relativ wenig über die Signale, die zum dendritischen Wachstum führen, bekannt. In den letzten Jahren wurde angenommen, dass die Dendriten intrinsisch determiniert sind und als passive Elemente bei der Bildung der synaptischen Konnektivität im Nervensystem wirken. Besonders durch die Entwicklung neuer mikroskopischer Aufnahmemethoden war es möglich zu zeigen, dass dendritisches Wachstum

eher dynamisch als passiv ist. Weiterhin werden Dendritenbäume mittels der synaptischen Aktivität und anderer Signal-Moleküle dezentral reguliert (McAllister, 2000). Der Fortschritt in der Beurteilung der neuronalen Polarität und der Regulation des Dendritenwachstums (Jan and Jan, 2003; McAllister, 2000; Scott and Luo, 2001; Urbanska et al., 2008; Whitford et al., 2002) konnte nur durch die Entwicklung von Zellkultur-Methoden für biologische Untersuchungen stattfinden. Insbesondere die dissoziierte hippocampale Zellkultur weist viele Vorteile auf, wie die Kontrolle der Umgebung der lebenden Zellen auf (Dotti et al., 1988). Diese dissoziierten Zellkulturen aus dem ZNS unterscheiden sich von den bisherigen Untersuchungen mit Zellen des peripheren Nervensystem (PNS) zum axonalen Auswachsen und der Weg- und Zielfindung, weil im ZNS distinkte Klassen von Prozessen, Axone und Dendriten existieren, die in Form und Funktion unterschiedlich sind (zur Übersicht siehe Craig and Banker, 1994).

Die Entwicklung der Dendritenbäume ist ein komplexer und multipler Prozess, der von verschiedenen Autoren klassifiziert wurde (Craig and Banker, 1994; Dotti et al., 1988; Scott and Luo, 2001). Gemäß Dotti und Kollegen (1988) gibt es in einer primären hippocampalen Neuronenkultur verschiedene Entwicklungsstadien (Abb. 2).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Stadien neuronaler Entwicklung *in vitro*.**

Die Entwicklung des Dendritenbaumes ist ein komplexer Prozess, der in fünf Entwicklungsstadien beschrieben werden kann. Modifiziert nach Urbanska et al. (2008) und Dotti et al. (1988).

Zu Beginn dieses Prozesses erfolgt die Anheftung der dissoziierten embryonalen hippocampalen Neurone in Kultur auf einem geeigneten Substrat, danach entwickeln sich motile Lamellipodien an der Zellperipherie. Vergleichbare Strukturen wurden im Lauf der neuronalen Entwicklung *in vivo* bisher nicht beobachtet, von daher ist das Vorkommen von Lamellipodien noch unklar (Stadium 1). Das zweite Stadium, nach etwa 12 h, ist charakterisiert durch die Umwandlung der Lamellipodien in distinkte Fortsätze. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen noch unpolarisiert und bei den erkennbaren kleinen Fortsätzen kann noch nicht zwischen Axon oder Dendrit morphologisch unterschieden werden. Das dritte Stadium, das durch die Bildung und das Wachstum der Axone gekennzeichnet ist, findet nach ca. 1,5 Tagen statt. Es ist durch ein starkes Wachstum der Axone geprägt. Zu diesem Zeitpunkt werden die Zellen auch polarisiert. Das dendritische Auswachsen nach einer Kultivierungsdauer von etwa 4 Tagen charakterisiert das vierte Stadium. Das fünfte und letzte Stadium kennzeichnet die kontinuierliche Reifung sowohl der Dendriten als auch der Axone. Diese Phase wird durch die Synaptogenese begleitet.

In diesem Abschnitt der Entwicklung erhalten Dendriten Informationen von anderen Neuronen und die charakteristischen Verzweigungsmuster der unterschiedlichen neuronalen Zelltypen entstehen. Diese Periode ist entscheidend für die neuronale Reifung und die Ausbildung des neuronalen Netzwerks.

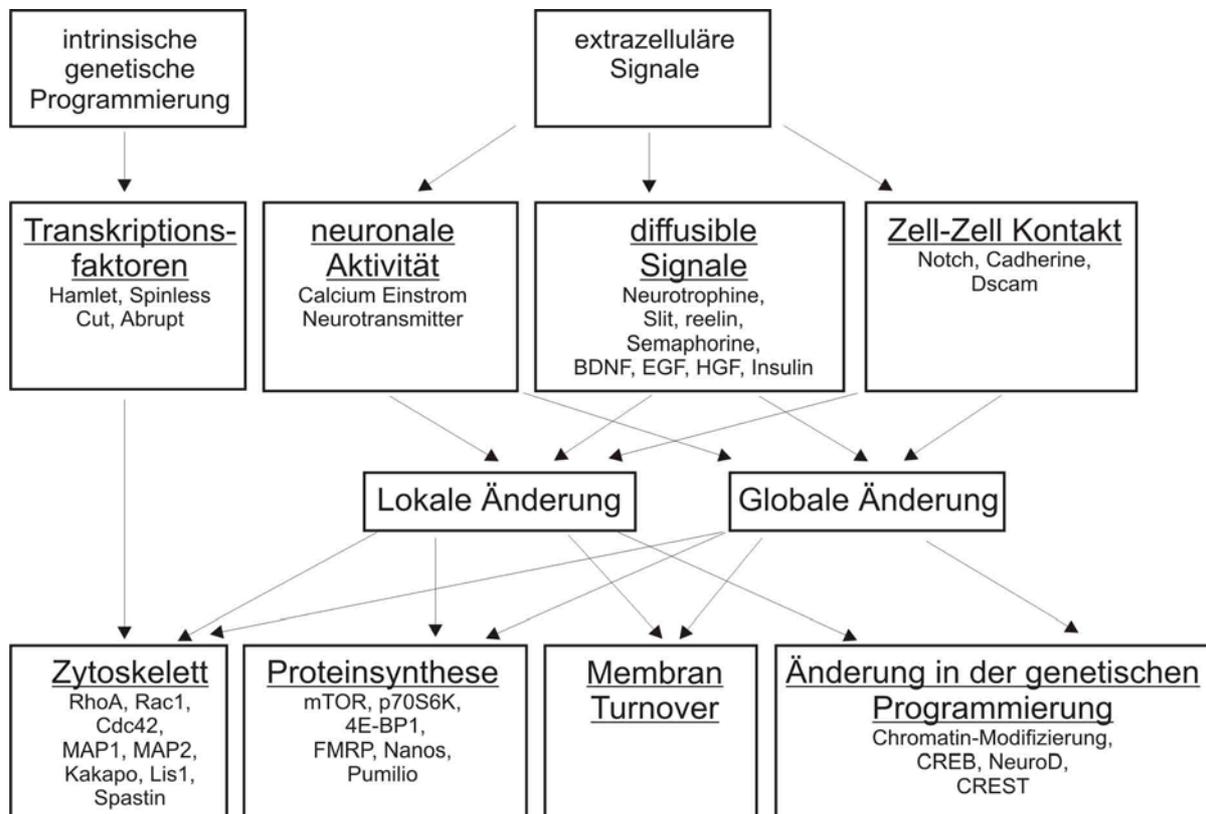
Abbildung 3 gibt einen kurzen Überblick über die molekularen Faktoren, die die Morphogenese der Dendritenbäume beeinflussen können (zur Übersicht siehe Scott and Luo, 2001; Urbanska et al., 2008).

Der komplexe Prozess der Dendritenbaumentwicklung und -stabilisation wird durch eine intrinsische genetische Programmierung und durch extrazelluläre Signale aus der Umgebung reguliert, entweder global auf Zellniveau oder lokal als dendritische Regulation.

#### **1.4. Intrinsische und extrazelluläre Faktoren, die an der Regulation der Dendritenbaumkomplexität beteiligt sind**

Intrinsische Faktoren bzw. genetische Programme spielen eine sehr wichtige Rolle für die Dendritenbaumkomplexität. Ein anschauliches Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor (TF) Hamlet. Wenn dieses Molekül im Laufe der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* im PNS exprimiert wird, entsteht ein Neuron mit einem einzelnen Dendriten. Ein „Knockdown“ von Hamlet führt zu einer Änderung der Morphologie dieser Klasse von Neuronen zu einem komplexen Dendritenbaum (Moore et al., 2002). Ein weiteres Beispiel ist

die kombinierte Expression von Spinless, Cut und Abrupt, die zu verschiedenen Klassen von Neuronen infolge der Expression dieser TF führen (Parrish et al., 2007).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Dendritogenese**

Die Dendritogenese ist ein Prozess, der durch die Kombination intrinsischer genetischer Programme, extrazellulärer Signale, durch das Zytoskelett, und Membranturnover reguliert wird. Änderungen kommen entweder global oder nur lokal vor. Modifiziert nach Urbanska et al. (2008).

Neben intrinsischen Faktoren spielen extrazelluläre Signale eine bedeutende Rolle bei der Dendritogenese. Abhängig vom Entwicklungsstadium ist die Kombination diffusibler Signale, neuronaler Aktivität und Zell-Kontakte sehr wichtig für die Dendritenbaum-Organisation, Plastizität und Stabilität (Jan and Jan, 2003; McAllister, 2000; Parrish et al., 2007; Wong and Ghosh, 2002).

Es gibt unzählige diffusible Signale wie z.B. Agrin, BDNF („brain derived neurotrophic factor“), Mitglieder der BMP-Superfamilie („bone morphogenetic protein“), cpg15, Reelin, Semaphorine, oder Slit, die Einfluss auf die Entwicklung des Dendritenbaumes nehmen. (zur Übersicht siehe Urbanska et al. 2008)

Die Zelladhäsionsproteine sind ergänzende Faktoren, die das dendritische Wachstum beschleunigen oder hemmen und die Verzweigung beeinflussen können, dazu gehören z.B. Contactin, Delta und Notch, EphrinB und EphB, das Zell-Adhäsionsmolekül L1, N-Cadherin,

Flamingo, Celsr2 und Celsr3, Dscam sowie Neuroglian (Nrg) und andere Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF).

Ein weiteres Signal, das die Entwicklung des Dendritenbaumes beeinflussen kann, ist die neuronale Aktivität. Interessante Beispiele dazu sind die Hemmungen von AMPA- und NMDA-Rezeptoren, die die glutamaterge Transmission vermittelten (McAllister, 2000; Sin et al., 2002; Wu et al., 2007), die Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen (VGCCs) (Wu et al., 2007), sowie die Zunahme der Dendritenbaumkomplexität durch Zugabe von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) (Gascon et al., 2006). (Zur Übersicht über neuronale Aktivität und Dendritenbaummorphologie siehe Konur and Ghosh, 2005; Redmond and Ghosh, 2005).

Extrazelluläre Faktoren brauchen intrazelluläre Komponenten, um die Dendritenbaum-Entwicklung zu regulieren. Die etablierten intrazellulären Signalkaskaden, die bei der Regulation des Dendritenbaumes, eine wichtige Rolle spielen, sind: Ras-PI3K-Akt-mTOR und Ras-MAPK (Kumar et al., 2005), PI3K-Akt-mTOR (Jaworski et al., 2005), CaMKII (Fink et al., 2003; Gaudilliere et al., 2004; Hoogenraad et al., 2007; Wu and Cline, 1998), BDNF via PI3K und MAPK (Dijkhuizen and Ghosh, 2005), JNK1-MAP2 (Bjorkblom et al., 2005).

Das Zytoskelett unterstützt durch Aktinfilamente und Mikrotubuli die Dendritenbaummorphologie und gewährleistet die mechanische Stabilisierung der Zelle. Die bekanntesten Regulatoren des Zytoskeletts sind in diesem Zusammenhang die kleinen GTPasen aus der RhoA Familie (RhoA, Rac1 und Cdc42) (Burrige and Wennerberg, 2004; da Silva and Dotti, 2002; Jaffe and Hall, 2005).

Die Genexpression ist bedeutsam für die intrinsische (auf dem genetischen Programm basierende) Verzweigung des Dendritenbaumes (Urbanska et al., 2008). In Neuronen von Säugetieren werden Transkriptionsfaktoren, Cofaktoren und Chromatin-modifizierende Proteine hauptsächlich im Zusammenhang mit der Dendritenentwicklung untersucht. Diese Dendritenentwicklung wird durch extrazelluläre Faktoren induziert. Während der neuronalen Aktivität zeigen z.B. AF53b (Wu et al., 2007), „CREB-binding protein“ (CBP) (Redmond et al., 2002), NeuroD (Gaudilliere et al., 2004) und das „immediate early“ Gen c-fos (Zhang et al., 2006) einen deutlichen Einfluss auf die Dendritenbaummorphologie.

### **1.5. Molekulare Charakterisierung von Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein (CALEB)**

Um die molekularen Vorgänge bei der Bildung und der Regulation der synaptischen Verbindungen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das Zelloberflächenprotein CALEB analysiert.

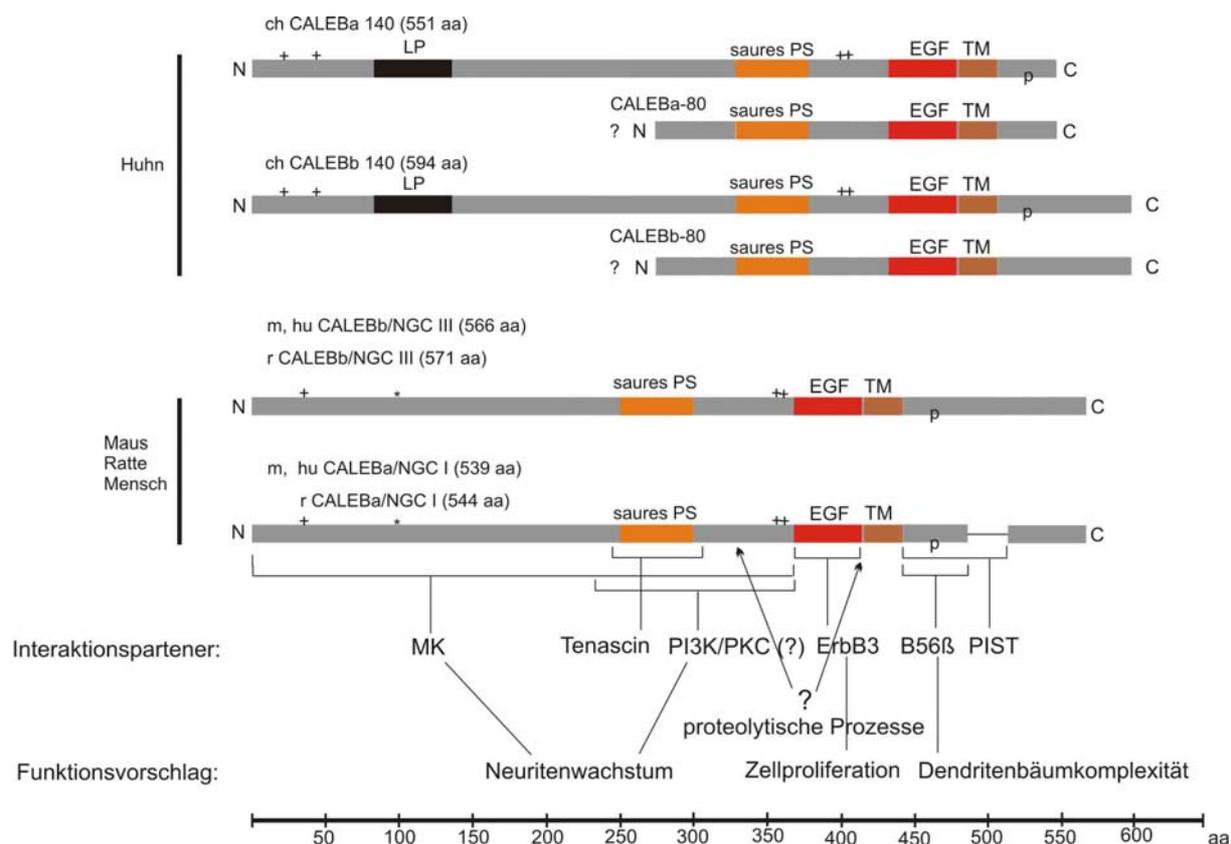
CALEB wurde erstmalig durch die Arbeitsgruppe Rathjen mittels immunologischer Screens mit monoklonalen Antikörpern gegen axon-assoziierte Glycoproteinfraktionen durch Fusionierung von Milzzellen mit Hybrid-Myelom-Zellen im Nervensystem des Huhns charakterisiert (Schumacher et al., 1997). Parallel zu dieser Entdeckung wurde Neuroglycan C (NGC) durch Screens mit einem monoklonalen Antikörper gegen membrangebundene Proteoglykane im Nervensystem der Ratte beschrieben (Watanabe et al., 1995).

Nach der Analyse der humanen NGC Sequenz wurde die zuvor beschriebene Sequenz der Ratte für NGC korrigiert (Yasuda et al., 1998). Die Autoren stellten fest, dass die publizierte Sequenz von der Ratte ein einzelnes Nukleotid C in der Position 807 zusätzlich enthält und dass ein Nukleotid C in der Position 959 zuviel war. Damit wurde auch festgestellt, dass CALEB und NGC ähnliche Sequenzen und Domänen-Strukturen enthalten.

CALEB/NGC kommt in verschiedenen Wirbeltieren sowie beim Menschen vor. Zwischen Mensch und Ratte besteht eine 86 %ige Identität auf der Ebene der Aminosäuresequenz (Yasuda et al., 1998).

CALEB ist ein Transmembranprotein mit einer Multidomänenstruktur. Die CALEB Struktur von Maus, Ratte und Menschen enthalten fünf Domänen: eine potentielle Glykosylierungsstelle für Glykosaminoglykane (GAG), ein saures Peptidsegment, eine EGF-ähnliche Domäne, ein Transmembrandomäne und ein zytoplasmatisches Segment. Huhn CALEB (chCALEB) enthält zusätzlich ein Segment, das reich an den Aminosäuren Leucin und Prolin, ein sogenanntes LP-Motiv, im N-terminalen Bereich der extrazellulären Region (siehe die schematische Darstellung Abb. 4).

In dieser Arbeit wird CALEB/NGC aus Maus, Ratte, Huhn und Mensch verwendet und entsprechend als "m-, r-, hu-, chCALEB" bezeichnet.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der CALEB-Domänenstruktur.**

Dargestellt sind die verschiedenen Isoformen von CALEB beim Huhn (ch), Maus (m), Ratte (r) und Menschen (hu). Die Struktur und Sequenz von m, r und hu CALEB sind fast identisch. Sie unterscheiden sich nur in einigen Aminosäuren. CALEBa und CALEBb von Maus, Ratte und Mensch unterscheiden sich durch eine Spleißvariante von 27 aa. Das chCALEB enthält einen kurzen zytoplasmatischen Bereich C-Terminal im Vergleich mit den anderen Organismen und hat zusätzlich im extrazellulären Bereich ein Leucin- und Prolinreiches Segment (LP). Sternchen und Kreuz markieren potentielle Glykosylierungsstellen von Oligosacchariden oder Glykosaminoglykan-Ketten. **TM**: Transmembrandomäne, **EGF**: EGF-ähnliche Domäne, **saures PS**: saures Peptidsegment, **MK**: Midkine. Adaptiert nach Schumacher et al., 1997; Yasuda et al., 1998 und NCBI-Datenbank.

Die extrazelluläre Region von CALEB enthält drei unterschiedliche Domänen, mehrere potentielle Glycosylierungsstellen für Chondroitinsulfatketten und N-Glykosylierung, ein Peptidsegment mit stark sauren Aminosäuren und eine EGF-ähnliche Domäne von CALEB. Diese EGF-ähnliche Domäne hat eine konservierte Aminosäuresequenz, die Ähnlichkeiten zu EGF-Domänen von Neuregulin, TGF $\alpha$  und EGF hat (Massague and Pandiella, 1993). Aus diesem Grund kann CALEB als ein Mitglied der EGF-Familie transmembranaler Wachstums- und Differenzierungsfaktoren klassifiziert werden.

Die zytoplasmatische Domäne enthält verschiedene potentielle Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen, die keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen aufweisen (Schumacher et al., 1997).

Das CALEB Gen wurde in der Bande 9F1 im Chromosom der Maus und in 3p21.3 des Chromosoms des Menschen lokalisiert. Das CALEB Gen hat eine Größe von ungefähr 17

Kilobasen mit 6 Exons (Aono et al., 2000; Yasuda et al., 1998). Das humane CALEB/NGC-Gen wird Chondroitinsulfat-Proteoglykan 5 (*CSPG5*) genannt.

CALEB tritt in allen bislang untersuchten Wirbeltieren in zwei Isoformen auf: CALEBa und CALEBb. Diese unterscheiden sich durch eine Spleißvariante, ein zusätzliches 27 aa langes Peptid im weiteren zytoplasmatischen Bereich (Aono et al., 2000; Schumacher et al., 1997). Zwei andere Isoformen von CALEB werden auf Grund von mRNA Analysen vermutet. Ein Nachweis der entsprechenden translatierten Proteine wurde jedoch nicht erbracht (Aono et al., 2000; Aono et al., 2006).

### **1.6. Interaktionspartner von CALEB**

Die Interaktionspartner eines Proteins erlauben Hinweise über eine mögliche Funktion dieses Proteins und bieten Ansatzpunkte für weitere funktionelle Analysen. Einige extrazelluläre und intrazelluläre Interaktionspartner von CALEB wurden bisher identifiziert. Die genaue zellbiologische Funktion von CALEB ist jedoch im Detail zur Zeit noch unklar.

CALEB wurde mittels eines Versuchsansatzes zu Protein-Protein-Interaktionen und durch immunologische Screens gegen Axon-assoziierte-Glycoproteine entdeckt. Dabei wurden auch die ersten Liganden von CALEB beschrieben: Tenascin-C und -R (Schumacher et al., 1997). Diese Interaktion findet zwischen dem extrazellulären sauren Peptidsegment von CALEB und dem Fibrinogen-ähnlichen Modul von Tenascin-C bzw -R statt (Schumacher et al., 2001; Schumacher and Stube, 2003). Diese Interaktion beeinflusst möglicherweise das Neuritenwachstum, vermittelt durch andere Faktoren.

PIST (PDZ domain protein interacting specifically with TC10) wurde als erster intrazellulärer Interaktionspartner von CALEB in einem „yeast-two-hybrid-Screen“ entdeckt (Hassel et al., 2003). PIST ist in Autophagie sowie Neurodegenerationsprozesse involviert und reguliert den Transport mehrerer Transmembranproteine zur Plasmamembran. Ko-Lokalisationsstudien in hippocampalen-Neuronen und Purkinje-Zellen von Colchicin-behandelten Ratten wurden als *in vivo* Modellsystem für Mikrotubuli-abhängige Transportprozesse verwendet, die eine Beteiligung von PIST am Transport von CALEB nahelegen.

Mitglieder der EGF-Proteinfamilie können als Liganden an Rezeptortyrosinkinasen binden (Schumacher et al., 1997; Watanabe et al., 1995). Aus diesem Grund haben (Kinugasa et al., 2004) diese Interaktion in Karzinomzelllinien, die Tyrosinkinaserezeptoren enthalten, untersucht. Sie beschrieben, dass die EGF-ähnliche Domäne von CALEB direkt mit dem ErbB3-Rezeptor interagiert und den ErbB2-Rezeptor transaktiviert. Weiterhin sind die Autoren der Ansicht, dass CALEB ein neues Mitglied der Neuregulin-Familie ist.

Midkine (MK), ein Heparin-Bindungswachstumsfaktor, wurde als ein weiterer extrazellulärer Interaktionspartner von CALEB präsentiert (Ichihara-Tanaka et al., 2006). Midkine ist ein Wachstumsfaktor, der Zelladhäsion und Zellfortsätze in undifferenziert bipolaren CG-4 Zellen (eine Oligodendrozyten-Vorläuferzelllinie) fördert. Diese extrazelluläre Bindung wurde für zwei Regionen von CALEB, die Chondroitinsulfat-Region und die saure Peptidsequenz, postuliert. CALEB ist in diesen Zelllinien nicht glykosyliert. CALEB wurde als eine neue Komponente des MK-Rezeptors gefunden, der die Verlängerung von Zellfortsätzen veranlasst.

Weitere Untersuchungen über Bindungen von CALEB (Brandt et al., 2008) zeigen, dass B56 $\beta$ , eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase A, ein neuer Interaktionspartner für die zytoplasmatische Domäne von CALEB ist, welche an der negativen Regulation der CALEB-vermittelten Dendritenbaumkomplexität beteiligt ist.

### **1.7. Posttranslationale Modifikation von CALEB**

Posttranslationale Proteinmodifikationen sind Veränderungen von Proteinen, die nach der Translation stattfinden. Die meisten werden durch den Organismus oder durch die Zellen selbst ausgelöst. Zellen besitzen eine Vielzahl von Möglichkeiten, ihre Proteine zu bearbeiten und zu verändern. Proteinmodifikationsprozesse können konstitutiv ablaufen oder aber durch die Umwelt beeinflusst werden. Dazu konnte man drei interessante posttranslationale Modifikationen in CALEB beobachten, die wichtige Regulationen von biologischen Prozessen in der Zelle darstellen: Glykosylierung, Phosphorylierung und Proteolyse.

Es gibt verschiedene Formen von CALEB, die sich sowohl in den molekularen Massen als auch in der Proteinsequenz [(chCALEB (140 und 80 kDa), m, r und huCALEB (150 und 120 kDa)] als auch in der Glykosylierung unterscheiden. CALEB hat mehrere potenzielle Glykosylierungsstellen für die Anheftung von Chondroitinsulfatketten und für N-Glykosylierungen (Aono et al., 2004; Schumacher et al., 1997; Watanabe et al., 1995; Yasuda et al., 1998), kann aber nicht als gewöhnliches Proteoglykan wie z.B. Brevican, Aggrecan, Neurocan, Phosphacan betrachtet werden, sondern als ein „part-time“-Proteoglykan (Aono et al., 2004; Sugahara and Mikami, 2007). Die Glykosaminoglycan-Kette (GAG) kommt nur in einem bestimmten Entwicklungsstadium vor. Die Glykosylierung dient sehr unterschiedlichen Funktionen. Zum einen erhöht sie die Stabilität von manchen Proteinen und schützt vor proteolytischem Abbau. Viele Proteine falten sich auch nicht korrekt, wenn sie nicht zuvor glykosyliert wurden und auch die Affinität für Bindungspartner wird verändert. Die Glykosylierung reguliert die Bewegung von

Molekülen durch die Matrix (Bülow and Hobert, 2006; Kleene and Schachner, 2004; Oohira et al., 2000b; Sugahara and Mikami, 2007).

Nach (Jüttner et al., 2005) ist CALEB ein modular aufgebautes Transmembranprotein, das im extrazellulären Teil in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran eine EGF-Domäne aufweist, die strukturell denen von TGF $\alpha$  und Neuregulin-1 ähnlich ist (Schumacher et al., 1997). Depolarisation durch erhöhte Kaliumkonzentrationen im Kulturmedium oder durch Glutamatrezeptoragonisten induzieren proteolytische Prozesse von der Transmembranvorläuferform von CALEB, so dass eine Transmembranvariante von CALEB entsteht, die extrazellulär nur noch die EGF-Domäne enthält. Bei dieser Umwandlung entsteht eine N-terminal verkürzte CALEB-Form, bei der die EGF-Domäne frei zugänglich erscheint. So konnte gezeigt werden, dass CALEB an der Regulation früher synaptischer Verbindungen beteiligt ist (Jüttner et al., 2005). Die Proteolyse ist eine posttranslationale Regulation der Proteinfunktion. Sie kann ein Protein in einen aktiven oder inaktiven Zustand überführen. Obwohl der Grundmechanismus der Umwandlung der Vorläuferform von CALEB in eine verkürzte Form verstanden zu sein scheint, sind doch noch eine Reihe von interessanten biochemischen Fragen hinsichtlich dieses Mechanismus zu klären, da die Abspaltung einer Ektodomäne von einem Protein an der Zelloberfläche normalerweise ein regulierter Prozess ist (Blobel, 2000).

Phosphorylierung ist ein reversibles Anhängen einer Phosphatgruppe an ein organisches Molekül, insbesondere von Proteinen. Kinasen katalysieren die Übertragung von einer Phosphatgruppe kovalent an einen Aminosäurerest. Die Phosphatasen, können diesen Prozess umkehren, d.h. die Phosphatgruppe wird vom Protein entfernt (Voet and Voet, 1992). Proteinkinasen und -phosphatasen sind dabei in der Regel sehr spezifisch und können ebenfalls in ihrer Aktivität gezielt kontrolliert werden. (Cohen, 2002; Kennelly and Krebs, 1991; Nestler and Greengard, 1983; Roach, 1991; Winder and Sweatt, 2001).

Die Phosphorylierung von CALEB wurde in verschiedenen Untersuchungen (Brandt et al., 2008; Kinugasa et al., 2004; Yamauchi et al., 2002) analysiert. Gemäß Yamauchi und Kollegen (2002) findet die Phosphorylierung von CALEB im intrazellulären und perizellulären Bereich statt. CALEB wurde dabei von einer Kinase ähnlich der Casein Kinase II in der Ektodomäne phosphoryliert.

In einer anderen Studie wurde vorgeschlagen, dass eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase A (B56 $\beta$ ) mit dem intrazellulären Bereich von CALEB interagiert und dephosphoryliert (Brandt et al., 2008). Diese Interaktion reguliert auch die Dendritenbäumkomplexität.

### **1.8. Aufgabenstellung der Arbeit**

Zur Charakterisierung molekularer Vorgänge bei der Bildung und Regulation synaptischer Verbindungen wurden in der Arbeitsgruppe Rathjen Zelloberflächenproteine im Nervensystem des Huhns untersucht. Untersuchungen zeigen, dass CALEB an der Regulation früher synaptischer Verbindungen beteiligt ist (Jüttner et al., 2005).

Ausgehend von den hier dargestellten Untersuchungen über CALEB soll die vorliegende Arbeit einige weitere Aspekte der Rolle von CALEB während der Entwicklung des Nervensystems klären, speziell während der Phase der Synaptogenese.

Um die Rolle vom CALEB besser verstehen zu können, sollen in dieser Arbeit daher folgende Schwerpunkte bearbeitet werden:

- A) Das Expressionsprofil von CALEB in verschiedenen Gehirnregionen und seine subzelluläre Lokalisation soll untersucht werden.
- B) Die Analyse der Morphologie in CALEB  $-/-$  Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen.
- C) Untersuchungen zur Prozessierung von CALEB
- D) Untersuchungen zur Phosphorylierung von CALEB und seiner Beteiligung an intrazellulären Signalkaskaden.
- E) Analyse der Genexpression in CALEB-defizienten Mäusen.
- F) Untersuchung zur Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren durch die EGF-Domäne von CALEB.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Allgemeines

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien analysenrein von den Firmen Merck, Roth und Sigma bezogen.

Die eingesetzten Enzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas, Roche Molecular Biochemicals und New England Biolabs bezogen.

Verwendetes Plastikmaterial für das Labor sowie die Zellkultur stammten von den Firmen Nunc, Greiner, Millipore und Costar.

#### 2.1.2. Chemikalien

Acrylamid	Bio-Rad, München, Deutschland
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Gibco)
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	GE Healthcare, München, Deutschland
B27-Supplement	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Gibco)
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R250	Bio-Rad, München, Deutschland
Diethylamin Hydrochlorid (DEA)	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid-dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
dNTP-Mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DEPC	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
DMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Gibco)
Essigsäure	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Ether	Hedinger, Stuttgart, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
FCS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Gibco)
D-Glucose	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Glycin	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Kalium-dihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Kanamycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Gibco)
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Magnesiumsulfat-heptyhydrat	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Mowiol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Neurobasalmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Gibco)
O.C.T TissueTec	Sakura Finetec, USA
Oligo(dT) <sub>13, 15, 18</sub>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Gibco)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Gibco)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
PBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Gibco)
Pferdeserum	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Gibco)
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Saccharose	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Salzsäure	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Tris	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
TriZol Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
X-Gal	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.3. Enzyme

DNase (TypIV)	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Pfu-Polymerase	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Trypsin TypII-S (aus Rinderpankreas)	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Trypsin-Inhibitor Typ I (aus Sojabohne)	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Takara LA Taq	TAKARA BIO INC, Japan
Superscript™ II Reverse	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Power SYBR® Green PCR Master Mix -	Applied Biosystems
ChondroitinaseABC	Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf, Deutschland

### 2.1.4. Kits

High Pure PCR Template Preparation Kit	ROCHE, Mannheim, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Pierce, Rockford, USA
Gel Extraction Kit (Plasmid-Isolation aus Agarose)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plasmid Maxi Kit; Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 2.1.5. Pharmakologische Substanzen

	Lösung	Endkonzentration	Bezug/Firma
Leupeptin	5 mM (d. Wasser)	(10-100 uM)	Roche
Aprotinin	1 mM (d. Wasser)	( $2 \cdot 10^{-3}$ U / 0.3 uM)	Roche
PMSF	100 mM (Methanol)	0.1-1 mM	Sigma
Pepstatin	5 mM (9:1 Methanol:Essigsäure)	10 µM	Roche
Benzamidin	100 mM (d. Wasser)	0.5-4 mM	Roche
E-64	100 mM (d. Wasser)	(1.4-28 µM)	Roche
iPA-STOP	1 mM (d. Wasser)	2 uM	American Diagnostica
TAPI 1	50 mM (DMSO)	100 µM	Peptides International
TAPI 2	5 mM (DMSO)	100 µM	Peptides International
1,10 phenanthroline	1 mM (Methanol / DMSO)	(1-10 mM)	Sigma
NMDA	25 mM (d. Wasser)	100 µM	Toocris
APV	5 mM (d. Wasser)	100 µM	Toocris
PMA	1 mg/ml (DMSO)	50 ng/ml	Calbiochem
GF 109203X	5 mM(DMSO)	4 µM	MERCK
BDNF	0,1 mM (d. Wasser)	20 ng/ml	PeproTech Inc.
LY294002	50 mM (d. Wasser)	50 µM	Cell Signalling

### 2.1.6. Primer/Oligonukleotide

#### Real-time PCR

Gen	Primer- Bezeichnung	Primer-Sequenz (5'-3'-Richtung)	Produktgröße in bp (Sequenzabschnitt)
<i>CSPG5r</i>	RT-rCALEB_F	GATGACTGTGTTCTTTGCCA	146 (1290-1436)
	RT-mCALEB_R	TGGTGGAGAGGGAGAAGTTG	
<i>CSPG5m</i>	RT-mCALEB_F	TCTCGTGCTTCTCCTCCTGT	146 (1290-1436)
	RT-mCALEB_R	TGGTGGAGAGGGAGAAGTTG	
<i>GAPDH</i>	GAPDH_F	CCAGTATGACTCCACTCACG	318 (195-513)
	GAPDH_R	GTGCAGGATGCATTGCTGAC	
<i>β-Aktin</i>	βact_F	TACAATGAGCTGCGTGTG	146 (348-494)
	βact_R	CACAGCCTGGATGGCTAC	
<i>MBP</i>	MBP_F	GGCCTCAGAGGACAGTGATG	
	MBP_R	TTCTTTGGGTCTGCTGTGTG	
<i>Cacng4</i>	Cacng4_F	AGTACCTCCTCCGCATTGTG	
	Cacng4_R	TTCTTGCGGCTGTAGATCCT	
<i>Cacnb1</i>	Cacnb1_F	TGCAGAAAGCGTTGTTTGAC	
	Cacnb1_R	ATGTGTTTGCTGGGGTTGTT	
<i>Cacna2d2</i>	Cacna2d2_F	CGTCCGTCTGTGAGATGCTA	
	Cacna2d2_R	TGCACAGCTTCCTTGAACAC	
<i>Cacna1b</i>	Cacna1b_F	CCTGCTTTTCCTCTTCATCG	
	Cacna1b_R	TACGGCATTCCAATCCTCTC	
<i>Cacng4</i>	Cacng4_F	AGTACCTCCTCCGCATTGTG	
	Cacng4_R	TTCTTGCGGCTGTAGATCCT	

*Semi Quantitative PCR*

Gen	Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5'-3'-Richtung)	Produktgröße in bp (Sequenzabschnitt)
AP2	AAK1F	ACTTTGGAAGTGCCACCAAC	
	AAK1R	TGCGATTGAAGTCTCTGTGG	
NRXN	NxAF	ATT ACA CCA TGC TGG GGT CT	
	NxAR	CGC GAT AAT TCC AGC CTT AC	
NRXN	NxABF	GAT TCG GGA GTC CAG CAG TA	
	NxABR	CTT GTT TTT GTT GGC GCT TT	
CSPG5 m	mCALEB_F	GGGCTGCGCGCAATGGGCCGAGCTG	
	mCALEB_R	TCAGGTTAGGTTATTCTGCAGA	
CSPG5 r	mCALEB_F	GGGCTGCGCGCAATGGGCCGAGCTG	
	rCALEB_R	TCATCAGGTCAGGTTATTCTGGAGA	

*Genotypisierung CALEB*

Gen	Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5'-3'-Richtung)
CSPG5m	MIMO1	GGAGACCTGGAAGATGAAAA
CSPG5m	MIMO75	GTGCCTGGCTCTTAGCAAACCTGG
CSPG5m	MIMO76	GACGGCGAGGATCTCGTCGTCACC

*Klonierung (APtag5, pcDNA6Hismyc)*

Gen	Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5'-3'-Richtung)	Klone- Abschnitt
CSPG5 m	EGF-Fa	ATTGATATCCGGTCAGTCTGTGACCTC	(EcoRV)
	EGF-Fb	ATAGATATCACAGAGTGCCGAGTTGGCT	(EcoRV)
	EGF-R	ATCTCGAGCGATGGACTCACAGCGCAT	(XhoI)
CSPG5 ch	APtagF	ATTGGAATTCTATGGAGACAGACACTC	(EcoRI)
	APtagR	ATTGATATCGGCCCGCTCACCAGTGGA	(EcoRV)

**2.1.7. Verwendete Antikörper****2.1.7.1. Primäre Antikörper**

Antikörper	Konzentration		Bezug/Firma
	(WB)-Western Blot; (IH)-Immunhistochemie; (IC)- Immunzytologie (WH)- „Whole-mount“		
Maus anti CALEB 3-2G10/C8 (aa. 475-486) SLSTIAEGSHPN (m, ch; a und b Form)	0,2 µg/ml (WH, WB)	1 µg/ml (IC, IH)	AG Rathjen
Maus anti CALEB 4-1C5 (aa. 280-285) GTAEP (Hühnchen)	0,1 µg/ml (WH)	0,5-1 µg/ml (IH, IC)	AG Rathjen
Maus anti CALEB 8-1B8/D4 (aa. 480-489) AEGSHPNDP (m-a; c)	0,5-1 µg/ml (IC)	0,5 µg/ml (WH)	AG Rathjen
Maus anti CALEB 5-F12 (aa. 508-535) SFNIQNSMSPKLEGGKGDQDDLGVNCLQ (m-ab)	0,2 µg/ml (WB)		AG Rathjen
Kaninchen anti CALEB Rb55 (aa. 475-486) SLSTIAEGSHPN (m-ab; c)	1: 600 (WB)	1:100 (IC)	AG Rathjen
Kaninchen anti CALEB Rb78 (m-ab)	0,5 µg/ml (WB)	3 µg/ml (IC)	AG Rathjen

Maus anti MAP2ab (Kl AP20)	1:300 (IC)	Fa. Abcam
Maus anti PSD95 (Kl 7E3-1B8)	1:200 (IC) 1:2000 (WB)	Fa Affinity BioReagents
Maus anti Synapsin 1	1:2000 (IC)	Fa. Synaptic Systems
Maus anti Synaptophysin 1	1:1000 (IC)	Fa. Synaptic Systems
Maus anti Gephyrin (Kl mAb7a)	1:500 (IC)	Fa. Synaptic Systems
Meerschwein anti VGlut1	1:600 (IH)	Fa. Synaptic Systems
Meerschwein anti VGlut2	1:200 (IH)	Fa. Synaptic Systems
Kaninchen anti Kaninchen VGAT	1:1000 (IH)	Fa. Synaptic Systems
Maus anti 2H3, (165 kD Neurofilament-Protein)	0,1 µg/ml (WH) 5 µg/ml (IC)	Dev. Studies Hybridoma Bank, Iowa
Kaninchen anti Phospho-(Ser/Thr)Akt Substrate (R/K)X(R/K)XX(T*/S*)	1:1000 (WB)	Fa. Cell Signalling
Kaninchen anti Phospho-Akt Substrate (RXXRXXS*/T*)	1:1000 (WB)	Fa. Cell Signalling
Kaninchen anti Phospho-(Ser)PKC Substrate	1:500 (WB)	Fa. Cell Signalling
Maus anti Phosphotyrosin (Kl 4G10)	0,2 µg/ml (WB)	Fa. UPSTATE
Maus anti c-myc (Kl9E10)	2 µg/ml (WB)	Fa Sigma
Penta His-tag HRP conjugate	1:2000	QIAGEN
Maus anti SNAP23	1:1000	Fa. Synaptic Systems
Kaninchen anti Calretinin	1:2000 (WB)	Fa. Chemicon
Kaninchen anti Calbindin	1:2000 (IH)	Fa. Chemicon
Kaninchen anti GluR2 (AMPA)	1:100 (IH), 0.2 µg/µl	Fa. Chemicon
Kaninchen anti Maus L1	3 µg/ml (WB)	AG Rathjen
Maus anti β actin	1:5000 (WB) 1:1000 (IC)	Fa. Sigma
Maus anti γ-tubulin	1:10000 (WB)	Fa. Sigma
Cholera Toxin Subunit B (CT-B) Alexa Fluor 594 conjugated	1µg/ml	Molecular Probes

### 2.1.7.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konzentration		Bezug/Firma
	(WB)-Western Blot (IH)- Immunhistochemie (IC)- Immunzytologie (WH)- „Whole-mount“		
Ziege anti Kaninchen -Cy3	1:400 (IH), 1:200 (IC)		Dianova
Ziege anti Maus -Cy3	1:400 (IC)		Dianova
Ziege anti Kaninchen -HRP	1:25000 (WB), 1:400 (WH)		Dianova
Ziege anti Maus - HRP	1:25000 (WB)		Dianova
Ziege anti Kaninchen-AP	1:3500 (WB)		Dianova

Ziege anti Maus- AP	1:3500 (WB)	Dianova
Ziege anti Maus Alexa 488	1:200 (IC)	Molecular Probes
Ziege anti Kaninchen Alexa 488	1:200 (IC)	Molecular Probes
Esel anti Meerschwein – Cy3	1:200 (IC)	Dianova
Esel anti Meerschwein – Cy5	1:200 (IC)	Dianova

### 2.1.8. Plasmide

pcDNA6mycHisC (Invitrogen)

Aptag-5 (Wak-Chemie Medical GmbH)

pEGFP-N1 (Invitrogen)

### 2.1.9. Verwendete Programme und Datenbanken

Folgende Computerprogramme und Datenbanken wurden für die Erstellung der vorliegenden Arbeit genutzt:

- Microsoft Word und Microsoft Excel (Microsoft)
- Adobe Photoshop 7,0 (Adobe)
- CorelDraw X3 (Corel, Ottawa, Kanada)
- DNASTAR (Lasergene, Madison, USA)
- Origin 7 (Originlab, Northampton, USA)
- Axio-Vision 4 (Zeiss, Jena) (Zeiss, Jena, Deutschland)
- LaserPix 4.0, Laser Sharp 2000 (Bio-Rad)
- MetaMorph (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland)
- Reference Manager 10 (ISI ResearchSoft)
- ImageJ <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Primer 3 <http://frodo.wi.mit.edu/>
- PubMed, BLAST, Prosite, OMIM von NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- SwissProt, Prosite und Compute pI/Mw <http://www.expasy.org/>

### 2.1.10. Eukaryontische Zelllinien

- COS-7 ATCC/LGC, Wesel
- MDA-MD 231, MDA-MD 453, T47D ATCC/LGC, Wesel

### 2.1.11. Versuchstiere

Tiere folgender Mäusestämme wurden zu Versuchen in der vorliegenden Arbeit genutzt:

- CALEB „Knock-out“ Maus (CALEB -/-) (AG Rathjen)
- Tissue plasminogen activator „Knock-out“ Maus (tPA-/-) (erhalten von AG Carmeliet, K.U. Leuven)
- $\beta$ -Secretase „Knock-out“ Maus (BACE1 -/-) (erhalten von AG Garrett/AG C. Birchmeier, MDC-Berlin)
- thy1-M-GFP (erhalten von AG Sanes, Washington Univ. )

- C57Bl/6 (Hauszucht; Charles River; Tierzucht Berlin-Schönwalde)

Hühnerembryonen (*Gallus gallus*) wurden aus befruchteten Bruteiern gewonnen (Fa. Lohmann Tierzucht). Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37° C und 55% Luftfeuchtigkeit.

### 2.1.12. Geräte

Fluoreszenzmikroskopie:

Systemmikroskop Axiovert 200M                      Zeiss, Jena, Deutschland  
Systemmikroskop BX 51                                  Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Deutschland  
Filter: - U-MSP101v1 MFISH FITC Filter  
          U-MSP102v1 MFISH Cy3 Filter  
          U-MSP104v1 MFISH Cy5 Filter  
Objektive: UPLFLN40xPH/0.75 UPlan Semi Apo Phase, 40x Phasenkontrastobjektiv  
              UPlanApo 40x/1.00 Ölimmersionsobjektiv  
Kamera: 14bit-CCD-Kamerasystem, Spot PURSIUT  
Lampe: X-Cite-120W Metallhalidlampe

Konfokales Mikroskop:

Laser-Scanning Mikroskop,  
Leica DM TCS SP2                                      Leica, Solms, Deutschland  
HCX PL APO 40x Oil, 1.25                            (Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland)  
Laser-Scanning Mikroskop,  
Bio-Rad MRC 1024                                      Bio-Rad  
Plan NEOFLUAR 63x Ölobjektiv, numerische Apertur 1.25 (Zeiss)  
Plan NEOFLUAR 100x Ölobjektiv, numerische Apertur 1.25 (Zeiss)  
Laser-Scanning Mikroskop,  
LSM 510 NLO Meta                                      Zeiss, Deutschland  
LD LCI Plan-Apochromat 25x/0,8 DIC Oil/Glyc./Water  
488 nm / Filter: BP500-550  
2P-Laser 750-1050 nm (3.5 W) / Filter: BP520-555

Kryostat:

Kryostat JUNG GM 3000                                Leica, Solms, Deutschland  
Vibratom VT1000S                                      Leica, Solms, Deutschland  
Superfrost Plus Objektträger                        Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland

Molekular- und Mikrobiologie:

BioPhotometer    Eppendorf, Deutschland  
Mastercycler gradient                                 Eppendorf, Deutschland

Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus (Thermo Fisher Scientific, Inc.), Deutschland
Zentrifuge Sorvall RC5B	Du Pont Instrument
Zentrifuge Sorvall WX Ultra 80	Thermo Electron Corporation
Zentrifuge Sorvall RC M150 gx	Thermo Electron Corporation

### Zellkulturmaterialien:

Glasplättchen 13 / 15 mm, Assistent	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sandheim, Deutschland
Inkubator	Heraeus (Thermo Fisher Scientific, Inc.), Deutschland
Kulturschalen 60mm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Kulturflaschen T25	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
12 / 24-Lochplatten	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Objektträger	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wie z.B. Medienherstellung, Agaraosegelelektrophorese, Restriktionsenzymverdau, Klonierung und Ligation wurden nach den von Sambrook und Kollegen beschriebenen Protokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

### 2.2.2. Quantitative Real-Time-PCR und semi-Quantitative-PCR

#### 2.2.2.1. RNA-Aufreinigung mittels TRIzol-Reagenz

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem TRIzol-Reagenz (Sigma) entsprechend den Herstellerangaben nach der Einzelschrittmethod von (Chomczynski and Sacchi, 1987).

TRIzol, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinthiocyanat, wird verwendet, um die Zellen aufzulösen und gleichzeitig die Ribonukleinsäuren zu stabilisieren.

Die verwendeten Gewebe wurden aus Mäusen präpariert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um Kontakt mit RNAsen und sonstigen Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle zur RNA-Aufreinigung verwendeten Geräte autoklaviert, ddH<sub>2</sub>O wurde im vornhinein mit DEPC behandelt und ebenfalls autoklaviert.

Die Gewebe wurden in je 0,5 ml TRIzol mittels eines autoklavierten Glashomogenisators homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml Chloroform wurden die Proben ca. 15 s per Hand geschüttelt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und die Zentrifugationen bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die

15-minütige Zentrifugation bei 12000 g bewirkte eine Phasentrennung. Die untere rote Phenol-Chloroform-Phase enthielt die Proteine, die weiße Interphase die DNA und in der oberen farblosen wässrigen Phase war die RNA gelöst. Die wässrige Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen transferiert, die RNA mit 250 µl Isopropanol präzipitiert und der Fällungsansatz nach 10 min Inkubation bei 12000 g zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes war die RNA als sehr helles, geliges Pellet sichtbar und wurde mit 0,5 ml 75% Ethanol (in DEPC-ddH<sub>2</sub>O) gewaschen und 5 Minuten bei 7500 g erneut pelletiert. Zur vollständigen Entfernung des Ethanols wurde das Pellet für ca. 5 min luftgetrocknet und anschließend in 50 µl RNase freiem DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.2.2.2. Konzentrationsbestimmung von RNA**

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die isolierte Gesamt-RNA mit DEPC-ddH<sub>2</sub>O 1:10 verdünnt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

Die ermittelten Konzentrationen wurden in einem 1%igen Agarosegel überprüft. Der TAE-Puffer für den Gellauf und das Gel selbst wurden mit DEPC-ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Die RNA-Proben wurden anschließend bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **2.2.2.3. Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Bei der reversen Transkription wird, ausgehend von einer RNA-Matrize, die entsprechende einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Für eine Quantifizierung kann diese in einer nachfolgenden Real-Time-PCR amplifiziert werden. Bei der reversen Transkription können Oligo(dT)-Primer, die an den Poly-A<sup>+</sup>-Schwanz am 3'-Ende der mRNA gebunden sind, als Startpunkt für die Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, dienen. Es wurde eine sogenannte „Two Step RT-PCR“ durchgeführt, bei der zunächst die Umschreibung der mRNA in cDNA anhand der Reversen Transkriptase stattfindet und anschließend eine von dieser Reaktion unabhängigen Vervielfältigung der cDNA über eine Real-Time-PCR oder semi quantitative-PCR durchgeführt wird.

Für die reverse Transkription wurden jeweils 2 µg der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Zunächst wurden die jeweilige RNA, die Oligo(dT)-Primer und dNTPs zum Auflösen möglicher Sekundärstrukturen für 5 min auf 65 °C erhitzt (Ansatz A, siehe unten) und anschließend schnell auf Eis überführt (zum Erhalten der linearisierten Struktur), um den Ansatz B (siehe unten) hinzuzufügen.

Ansatz A der reversen Transkription

RNA (2 µg)	X µl
Oligo(dT)-Primer (500µg/ml)	1 µl
dNTP-Mix (10mM/dNTP)	2 µl
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	Y µl /12 µl Gesamtvolumen

Ansatz B der reversen Transkription

5X first strand buffer	4 µl
0.1 M DTT (Dithiothreitol)	2 µl
RNAse Out	1 µl

Für die Anlagerung der Oligo(dT)-Primer an die linearisierte RNA wurden die 19 µl - Ansätze für 2 min auf 42 °C erhitzt. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 1 µl (= 200 U) reverse Transkriptase (SuperScript™ II RT) pipettiert. Die RT-Reaktion erfolgte für 45 min bei 42 °C und ein anschließendes Erhitzen über 15 min auf 70 °C inaktivierte die reverse Transkriptase. Die RT-Reaktion wurde automatisiert im Mastercycler gradient (Eppendorf) durchgeführt. Die Ansätze, die nun die gesamte cDNA enthielten, wurden über Nacht bei -20 °C gelagert.

**2.2.2.4. cDNA-Quantifizierung über Real-Time-PCR (qRT-PCR)**

Zur Quantifizierung der Expression von mRNA wurde eine Real-Time-PCR durchgeführt. Der hierbei verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Power SYBR® Green PCR Master Mix -Applied Biosystems) interkaliert in die kleinen Furchen doppelsträngiger DNA. Nach Anregung bei 497 nm emittiert der in die DNA eingelagerte Farbstoff Licht der Wellenlänge 520 nm. Das Fluoreszenzsignal wird jeweils am Ende der Elongationsphasen gemessen, wenn in jedem Zyklus die maximal amplifizierte Menge an doppelsträngiger DNA vorliegt.

Da die Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals von der Menge an doppelsträngiger DNA abhängt, wird bei einer Probe mit hoher Ausgangsmenge an cDNA ein bestimmter Signal-Schwellenwert (Ct-Wert) eher erreicht als bei einer Probe mit geringerer DNA-Menge. Parallel zu den cDNA-Proben wurde die cDNA des konstitutiv exprimierten „house-keeping“ Gens für β-Actin oder GAPDH als Vergleichswert (interner Standard) gemessen. Durch Vergleich des Ct-Wert der unbekannt Probe mit den Ct-Wert der Standardreihe kann somit die relative cDNA-Menge bestimmt werden.

Da SYBR® Green unspezifisch in dsDNA interkaliert, ist es besonders wichtig, die Bildung von Primer-Dimeren so weit wie möglich auszuschließen, deshalb wurde darauf geachtet, dass die Sequenzen der Primer nicht komplementär sind.

Die Primer wurden so entworfen, dass sie in zwei durch mindestens ein Intron getrennten Exons liegen, wodurch auf Grund der Länge des polymerisierten Bereiches genomische Kontaminationen eliminiert werden. Die Kontrolle der Produktspezifität der Real-Time-PCR erfolgt im Anschluss an jede PCR über eine Schmelztemperaturanalyse (52-95 °C). Hierbei wird das Amplifikat (dsDNA) über eine kontinuierliche Temperaturerhöhung aufgeschmolzen. Die Schmelztemperatur hängt von der Länge der Sequenz und dem GC-Gehalt der dsDNA ab. Zeigt die Schmelztemperaturkurve (Melting curve) mehr als einen Gipfel, meist mit geringerer Temperatur als das des Zielgens, so wurden unspezifische Produkte oder Primer-Dimere amplifiziert und die PCR-Bedingungen müssen optimiert bzw. neue Primer entworfen werden.

Für jede cDNA-Probe wurden wiedergegebene Komponenten zusammengefügt und dem im abgebildeten PCR-Programm unterzogen. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der statt der cDNA eines Entwicklungsstadiums 5 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O enthielt.

Zur Amplifikation der cDNA wurden die Primer (F = forward) und (R = reverse) verwendet.

Real-Time-PCR-Ansätze: Die Polymerase und cDNA wurden den Ansätzen als letztes hinzugefügt.

Power SYBR Green PCR Master Mix (2x)	10 µl
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	6 µl
cDNA (1:10, 1:100 oder 1:1000)	1 µl
Forward – Primer	1 µl
Reverse – Primer	1 µl

Real-Time-PCR-Bedingungen:

<i>Phase</i>	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Dauer (s.)</i>	<i>Wiederholungen</i>
initiale Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	10	40
Annealing + Elongation	60	40	40
Melting curve	52 – 95	40	1

Zur quantitativen Auswertung der Messdaten wurden die Ct-Werte der mRNA anhand der Ct-Werte von β-Actin oder GAPDH mRNA normalisiert.

### 2.2.3. Genotypisierung

#### 2.2.3.1. Isolierung genomischer DNA

Für die Genotypisierung von Mäusen wurde die genomische DNA (gDNA) mit dem „High Pure PCR Isolation Kit“ (Roche Molecular Biochemicals) nach Angaben des Herstellers isoliert. Als Ausgangsmaterial diente Gewebe vom Schwanz bzw. Embryonalhüllen.

### 2.2.3.2. PCR

#### 50 µl Reaktionsansatz für CALEB:

- 5 µl 10x LA PCR Puffer (TaKaRa Bio Inc.)
- 5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 8 µl dNTP Mischung
- 1 µl Primer MIMO1 (25 mM) oder Primer MIMO76 (25 mM)
- 1 µl Primer MIMO76 (25 mM)
- x µl gDNA (unverdünnt) + y µl H<sub>2</sub>O
- 0.25 µl TaKaRa LA Taq Polymerase (5 units/µl)

#### PCR Protokoll für CALEB:

- 94 °C/10min
- 94 °C/30s, 68 °C (-0,5)/45 s, 20 Zyklen
- 72 °C/1min
- 94 °C/30s, 58 °C /45 s, 20 Zyklen
- 72 °C/10 min
- 4 °C/∞

Die PCR wurde mit der PCR Maschine „Mastercycler Gradient“ (Eppendorf) durchgeführt, die PCR-Produkte anschließend in einem 1.5 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe der „ChemiDoc“ (Biorad) dokumentiert.

### 2.2.4. Isolierung von DNA-Fragmenten

DNA- Fragmente wurden nach deren gelelektrophoretischer Auftrennung unter Verwendung des Kits „QiaQuick“ (Qiagen) isoliert.

### 2.2.5. Transformation

#### 2.2.5.1. Chemokompetente *E.coli* DH5α

Die Erzeugung chemokompetenter Bakterien erfolgte nach der “Frozen Storage III” Methode (Hanahan, 1985).

#### 2.2.5.2. Transformation von DH5α

100 µl der kompetenten DH5α Bakterien (AG Rathjen) wurden auf Eis aufgetaut, dann mit 10 µl (1 µl DNA-Plasmid +9 µl H<sub>2</sub>O) des Ansatzes vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2 minütigen Hitzeschock bei 42 °C wurde der Ansatz 90 s auf Eis abgekühlt, anschließend mit 390 µl vorgewärmten LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. 50 µl des Ansatzes wurden danach auf eine LB-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

- **LB Medium:** 10 g/l Trypton (BD-Bioscience Clontech), 5 g/l Hefeextrakt (BD-Bioscience Clontech), 10 g/l NaCl (Merck); pH 7.0; 15 min bei 121 °C autoklaviert

- **LB Agar:** LB Medium mit 1,5 % Agar Agar (Roth) mit 100 µg/ml Ampicilin (Sigma)

### 2.2.5.3. Gewinnung der Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* DH5α

Jeweils eine Bakterienkolonie wurde mit 3 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicilin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers und wurde in 50 µl EB Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.5.4. Plasmid-DNA Präparation

Die Präparation von Plasmid DNA erfolgte mit dem „Plasmid Mini Kit“ bzw. „Plasmid Midi oder Maxi Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.5.5. Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Firma MWG, Ebersberg durchgeführt.

### 2.2.6. Proteinexpression in eukaryontischen Zellen durch Transfektion mit Lipofectamine 2000

Für die Expression der rekombinanten Maus EGF-Domäne (mEGF) und der Huhn EGF-Domäne (chEGF) von CALEB in COS-7 Zellen wurde ein DNA-Abschnitt mit den Primern „EGF\_Fa / EGF\_R“, „EGF\_Fb / EGF\_R“ und „APtagF/APtagR“ amplifiziert, der für die zwei verschiedenen Regionen der EGF-Domäne von CALEB kodiert. Der DNA-Abschnitt wurde in die eukaryontische Expressionsplasmide pcDNA6mycHisC für mEGF und APtag5tagmycHis für chEGF über die Restriktionsschnittstellen EcoRV und XhoI und EcoRV und XhoI kloniert. Dieses Plasmid kodiert für die Mäuse EGF-Domäne mycHis-Abschnitt und chEGF-Domäne mycHis-Abschnitt, der in Fusion mit dem entsprechenden Protein exprimiert wird.

Die EGF-Konstrukte wurden in COS-7 Zellen mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) transfiziert und einen Tag nach der Transfektion für vier Tage in DMEM / 1 % FCS kultiviert. Das Lipofectamine 2000 (Invitrogen) wurde gevortext und pro Transfektionsansatz 8 µl zu 200 µl OptiMEM gegeben, gemischt und 5 min inkubiert. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 2 µg der zu transfizierenden DNA zu 200 µl OptiMEM gegeben und ebenfalls gemischt. Anschließend wurden beide verdünnten Ansätze zusammengegeben und vermischt. Nach einer 20 minütigen Inkubationszeit wurde der Ansatz zu 90-95 % konfluenten Zellen in OptiMEM gegeben (6 cm Schalen) und gleichmäßig verteilt. Nach 4 h Inkubation im 37 °C Inkubator wurde das Medium gegen DMEM mit 10 % FCS ausgetauscht.

Nach dieser Zeit wurde der Zellkulturüberstand und Zelllysat abgenommen. Der Zellkulturüberstand wurde für 20 min bei 4 °C und 1.000 g (Heraeus-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in der Sorval RC5-B Zentrifuge mit dem Rotor SS-34 bei 20.000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zelllysat wurde zweimal mit kaltem PBS in PBS gewaschen und danach in Lysis-Puffer resuspendiert. Dann wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und in Flüssigstickstoff gefroren. Anschließend wurde das Lysat mit Hilfe einer feinen 18-Injektionsnadel homogenisiert. Das homogenisierte Lysat wurde mit NiNTA Magnetic Agarose Beads für 2 Stunden inkubiert und dann auf eine NiNTA-Säule aufgetragen. Diese wurde vierfach mit 8 ml NW-Puffer gewaschen. Die Elution wurde mit NE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde das eluierte Fusionsprotein über SDS-PAGE analysiert.

- **Lysis-Puffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, 0,05% (v/v) Tween 20, Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin), pH 8
- **NB-Puffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 8
- **NW-Puffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 8
- **NE-Puffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 8

### Verwendete Plasmide:

- pcDNA6mycHisC-EGF/CALEBa
- pcDNA6mycHisC-EGF/CALEBb
- chAptag5-EGF/CALEBmycHis

## 2.3. Zellkulturtechniken

### 2.3.1. Präparation und Kultivierung primärer Neuronen

Die primären Neuronenkulturen wurden von embryonalen (E16) oder neugeborenen (P1), cortice und Hippocampi angelegt. Dafür wurden aus CALEB -/- (AG Rathjen) und Wildtyp-Embryonen (C57Bl/6) (Charles Rivers) präpariert.

Sämtliche Arbeitsschritte der Präparation, Kultivierung und Behandlung der Zellen wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Benötigte Medien und Medien-Zusätze wurden unter Verwendung von Einmalsterilfiltern (0,2 µm) sterilfiltriert. Die 15 mm Glasplättchen (Assistent) wurden in einer 12-Lochplatte mit einer 0,01 % Poly-D-Lysin-Lösung über Nacht bei 37 °C beschichtet. Das Poly-D-Lysin wurde am Präparationstag abgesaugt und die Glasplättchen mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden diese in NB-Medium für 30-90 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das stark positiv geladene

Poly-D-Lysin dient zusammen mit den Serumproteinen der Anhaftung der Neurone auf der Glasoberfläche.

Trächtige Mäuse wurden mit Ether betäubt und ausschließlich durch zervikale Dislokation getötet. Die Bauchdecke wurde geöffnet, der Uterus entnommen und in ein mit PBS-Lösung gefülltes Becherglas (auf Eis) überführt. Die Uterushülle wurde geöffnet, der Embryo von der Plazenta befreit und in eine saubere Petrischale übergeführt. Anschließend wurden die Embryonen mit einer Schere dekapitiert, der Kopf in eine neue Schale übergeführt und die Schädeldecke entfernt. Die Gehirne wurden entnommen und auf Eis gesammelt. Unter dem Mikroskop wurde der Hirnstamm entfernt und das Hirn in seine zwei Kortexhälften zerlegt. Der Thalamus und Pia mater wurden entfernt und die Kortexhälfte oder die Hippocampi herauspräpariert. Das Gewebe wurde in HBSS-Medium auf Eis gesammelt, der Überstand verworfen. In Trypsin-Lösung wurde das Gewebe für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, anschließend Trypsin-Lösung abgenommen und verworfen. Nach der Inkubation wurde das Gewebe in DNase-Lösung gewaschen, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Gewebe wurde mit einer verengten Pasteurpipette schonend in NB-Medium vereinzelt (je 20 x). Dann wurden die Zellen für 5 min bei 800 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert und das Zellpellet in NB-Medium resuspendiert. Für die Zählung der Zellen wurde ein Aliquot des Überstands abgenommen und die Zählung erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer. Die Kultivierung erfolgte in 12 oder 24 Lochplatten, wobei 1 ml NB-Medium pro Loch verwendet wurde. Die Neurone wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Kultivierungsdauer und Dichte der ausgesäten Zellen wurden dem jeweiligen Zweck des Versuchs angepasst (60.000 bis 100.000 Zell/cm<sup>2</sup>).

- **Poly-D-Lysine-Lösung:** 0,01% poly-D-lysine hydrobromide (P6407 Sigma)
- **HBSS-Medium:** HBSS-Medium (Invitrogen),
- **Trypsin-Lösung:** 0,05 % Trypsin (Roche); 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen); HBSS-Medium (Invitrogen)
- **DNase-Lösung:** NB-Medium (Invitrogen); 1380 U/ml DNase Type IV (Sigma); 0,01 mM Ovomucoide / Trypsin-Inhibitor (Roche); 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)
- **NB-Medium:** β-Mercaptoethanol (50 mM) 25 μM; L-Glutamin (200 mM) 0,25 mM; B27-Supplement 2 %; Penicillin/Streptomycin (5 %) 0,05 % ; FCS 1 %.

### 2.3.2. Proteinexpression von kultivierten Neuronen durch Transfektion mit Effectene

Die Transfektion der primären neuronalen Zellkultur mit einem GFP Konstrukt erfolgte am sechsten und zwölften Tag *in vitro* (DIV = *days in vitro*). Hierzu wurde das Effectene-Transfektionsreagenz (Qiagen) verwendet.

300 ng der zu transfizierenden DNA wurden mit 60 µl EC-Puffer und 1.6 µl Enhancer kurz gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wird die DNA durch Interaktion mit dem Enhancer inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Effectene und kurzem Vortexen entsteht in der anschließenden 15-minütigen Inkubationszeit ein Komplex aus kondensierter DNA und Effectene. Das Effectene Reagenz formt spontan Micellenstrukturen, in denen der DNA-Komplex eingeschlossen ist.

Die auf Glasplättchen kultivierten Neurone wurden in der Zwischenzeit in 500 µl vorgewärmtem NB-Medium ohne FCS und B27 in eine neue 12-Lochplatte überführt.

Anschließend wurde der DNA-Effectene-Komplex mit 200 µl NB-Medium vermengt und 270 µl davon auf die in NB-Medium befindlichen Zellen getropft. Die Transfektionszeit betrug 2 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Zur Proteinexpression wurden die Glasplättchen anschließend in Kultivierungsmedium (NB-Medium B27/FCS) überführt; die Expressionszeit betrug zwei Tage vor der Fixierung am achten und vierzehnten Tag *in vitro*.

- **NB-Medium:** β-Mercaptoethanol (50 mM) 25 µM; L-Glutamin (200 mM) 0,25 mM; Penicillin/Streptomycin (5 %) 0,05 %.
- **NB-MediumB27/FCS:** β-Mercaptoethanol (50 mM) 25 µM; L-Glutamin (200 mM) 0,25 mM; B27-Supplement 2 %; Penicillin/Streptomycin (5 %) 0,05 % ; FCS 1 %.
- **EGFP-N1:** 300 ng/Lochplatte

### 2.4. Biochemische Methoden

#### 2.4.1. Gewinnung von Proteinextrakten aus Geweben

Nach Betäubung mit Ether wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet.

Zur Untersuchung eines Expressionsprofils von CALEB in verschiedenen Hirnteilen und Entwicklungsstadien, wurde das Gewebe von den jeweiligen C57Bl/6 Wildtyp-Mäusen präpariert und gewogen. Pro mg Nassgewicht Gewebe wurden 5 µl des Homogenisationspuffers zugegeben und mit Eppendorf-Homogenisatoren homogenisiert. Das Homogenisat wurde zunächst für 20 min, bei 4 °C und 13000 g in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde photometrisch vermessen (280 nm), mit Laemmli-Puffer versetzt, aufgekocht und bis zur Auftrennung mittels SDS-PAGE bei -20 °C aufbewahrt.

- **Homogenisationspuffer:** 1 % CHAPS, 40 U/ml Aprotinin; 10 µM Pepstatin; 10 µM Leupeptin; 200 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in PBS, pH-Wert 7,4
- **5x Laemmli-Puffer:** 60 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 1,5 % Bromphenolblau

Zur Untersuchung der Prozessierung von CALEB wurden akute, kortikale Hirnschnitte (1 mm dick) unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert. Die inkubierten Hirnschnitte wurden 10 min bis 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Begasung (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % O<sub>2</sub>) in ACSF-Lösung gehalten und unter unterschiedlichen pharmakologischen Bedingungen behandelt.

- **ACSF-Lsg:** 120 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM Glucose, pH-Wert 7,3

### 2.4.2. Gewinnung von Proteinextrakten aus der Zellkultur

Die konfluenten Zelllinien oder primäre Neuronenkulturen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in PBS, danach in Lysislösung resuspendiert. Die Lysislösung enthält Proteaseinhibitoren, Phosphataseinhibitoren und CHAPS. Das zwitterionische Detergenz CHAPS löst hydrophobe Proteine und minimiert Proteinaggregationen (Perdew et al., 1983). Dann wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt, mit einer feinen Kanüle (Ø 0,4 mm) homogenisiert und 20 min bei 4 °C und 13000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Laemmli-Puffer versetzt und aufgekocht und bis zur Verwendung in der SDS-PAGE bei -20 °C aufbewahrt.

- **Lysislösung:** 1 % CHAPS (Sigma), Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin) und Phosphataseinhibitoren (PhosphoSTOP)

### 2.4.3. Subzelluläre Fraktionierung von Nervengewebe zur Gewinnung von Synaptosomen, synaptischen Vesikeln und der postsynaptischen Fraktion

#### 2.4.3.1 Gewinnung der postsynaptischen Fraktion (PSD)

Ein Protokoll von (Carlin et al., 1980) wurde mit einigen Modifizierungen verwendet (siehe Schema unten Abb. i). Das Experiment erfolgte mit neugeborenem Mäusegehirn C56Bl/6 P20. Das Gehirn wurde aus dem Mausschädel entnommen und in eiskalten Puffer A gelegt. Die weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Zur Aufarbeitung der postsynaptischen Fraktionen wurden die Gehirne in Puffer-A mit einem Douncer/Homogenisator 10x bei 900 rpm homogenisiert. Mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation wurde das Gewebehomogenat bzw. die nachfolgend hergestellten Fraktionen jeweils in eine schwere Pelletfraktion (P) und in eine leichtere Fraktion (S) getrennt.

Das gewonnene Homogenat wurde in einer Sorvall RC5B Zentrifuge mit dem Rotor SS-34 bei 1.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet P1 aus unlysierten

Zellen, Zellbruchstücken und Zellkernen wurde wieder in Puffer A mit einem Douncer/Homogenisator 10x bei 900 rpm homogenisiert und zentrifugiert. Das resultierende Pellet P1` wurde verworfen. Der postnukleare Überstand (postnuclear supernatant- S1+S1`) wurde abgenommen und in der Sorvall RC5B Zentrifuge mit dem Rotor SS-34 bei 12.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet enthält die grobe Membranfraktion (P2). Um die gereinigte Synaptosomenfraktion zu erhalten, wurde die grob aufgearbeitete P2-Fraktion in 6-7 ml in Homogenisationspuffer B resuspendiert und auf einen Saccharosegradient geladen. Der Stufengradient besteht aus 0,85 M, 1 M und 1,2 M Saccharose. Der Gradient wurde in der Ultrazentrifuge (UZ) WX Ultra 80 mit dem Rotor AH-629 bei 85.000 g für 2 Stunden bei 4 °C zentrifugiert. Die Synaptosomenfraktion, als Trübung an der Trennlinie zwischen der 1,2 M und 1 M Saccharoseschicht erkennbar, wurde mit einer gebogenen Pasteurpipette abgenommen und einem hypoosmotischen Schock unterzogen. Hierzu wurde diese Fraktion mit dem fünffachen Volumen eines niedermolaren Tris-Puffers, 5 mM Tris/HCl mit 1 mM DTT, für 30 min auf Eis versetzt. Nach dieser Behandlung wurde die Lösung in der Sorvall RC5B Zentrifuge mit dem Rotor SS-34 bei 33.000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet enthält die gereinigten synaptosomalen Membranen (P3). Diese Fraktion wurde in 6-7 ml 5 mM Tris/HCl homogenisiert und auf einen Saccharosegradient aus 1 M, 1,5 M und 2 M Saccharose geladen. Der Gradient wurde in der Ultrazentrifuge (UZ) WX Ultra 80 mit dem Rotor AH-629 bei 85.000 g für 2 Stunden bei 4 °C zentrifugiert. Die Fraktion der „synaptic junctions“ (SJ) erscheint an der Trennlinie zwischen der 1,5 und 2 M Saccharoseschicht. Die SJ-Fraktion wurde mit 30 ml Puffer-B und 30 ml Puffer-C mit 2 mM DTT (60 ml/10 g Startmaterial) für 15 min bei 0 °C inkubiert. Um die postsynaptischen Fraktion zu erhalten, wurde die SJ in der Sorvall RC5B Zentrifuge mit dem Rotor SS-34 bei 33.000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet enthält die postsynaptische Fraktion (PSD). Diese wurde in Puffer-B resuspendiert und die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Lowry Methode.

- **Puffer A:** 0,32 M Saccharose, Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin), pH 7,4
- **Puffer B:** 0,32 M Saccharose, 5 mM Tris/HCl, Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin), pH 8,1
- **Puffer C:** 0,32 M Saccharose, 12 mM Tris/HCl, Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin), pH 8,1
- **Sacchrosegredient:** 0,85; 1; 1,2; 1,5, 2 M Saccharose, 5 mM Tris/HCl, pH 8,1

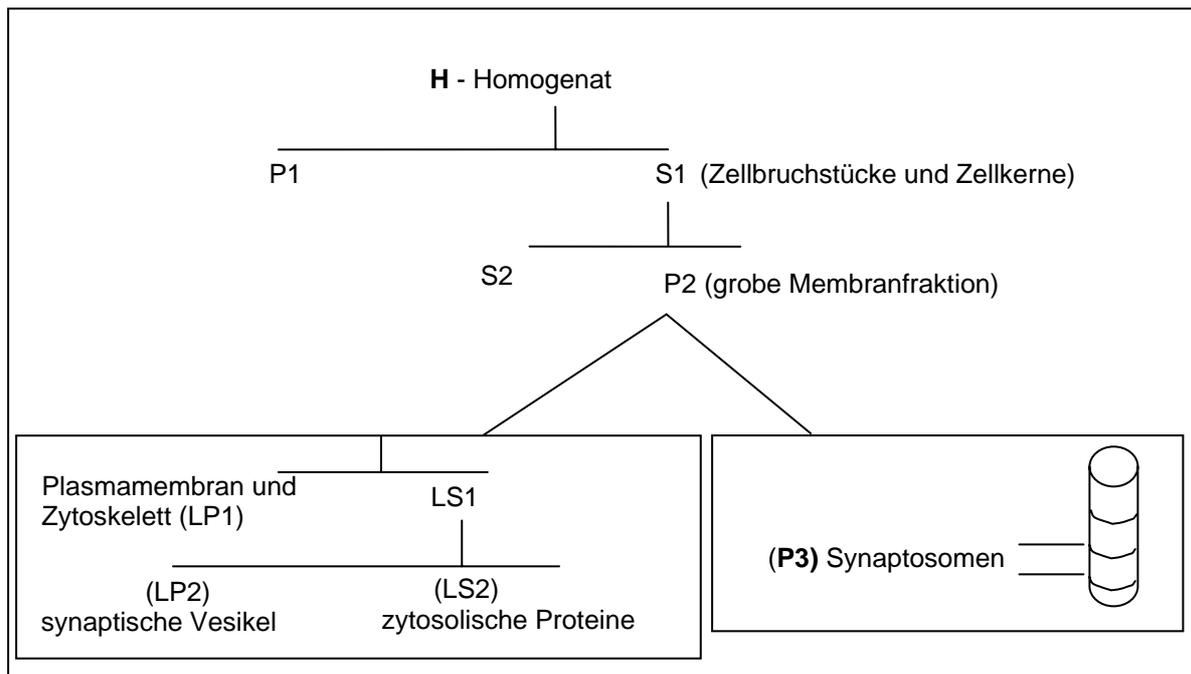


Das gewonnene Homogenat wurde in einer Sorvall RC5B Zentrifuge mit dem Rotor SS-34 bei 1.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet P1` wurde verworfen. Der postnukleare Überstand (S1) wurde abgenommen und in der Sorvall RC5B Zentrifuge mit dem Rotor SS-34 bei 13.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet enthält die grob gereinigten Synaptosomen (P2).

Um die gereinigte Synaptosomenfraktion zu erhalten, wurde die grob aufgearbeitete P2-Fraktion in Homogenisationspuffer-B resuspendiert und auf einen Saccharosegradienten (0.85 M, 1.0 M und 1.2 M) geladen. Der Gradient wurde in der Ultrazentrifuge (UZ) WX Ultra 80 mit dem Rotor AH-629 bei 85.000 g für 2 Stunden bei 4 °C zentrifugiert. Die Synaptosomenfraktion, die an der Trennlinie zwischen der 1 und 1.2 M Saccharoseschicht erscheint, wurde mit einer gebogenen Pasteurpipette abgenommen und in eine Natrium-Lösung hinzugefügt. Diese wurde mit dem Rotor SS-34 bei 15.000 g für 12 min bei 4 °C zentrifugiert, um eine geeignete Synaptosomenfraktion (P3) zu bekommen.

Um die gereinigten synaptischen Vesikeln zu erhalten, wurde die grob aufgearbeitete P2-Fraktion mit eiskaltem dest. Wasser plus Proteaseinhibitoren 1:10 verdünnt, für 30 min bei 0 °C inkubiert und danach homogenisiert. Diese wurde mit dem Rotor SS-34 bei 30.000 g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet enthält die Plasmamembran und unlösliche Anteile des Zytoskellets (LP1). Um die leichten synaptischen Vesikel (LP2) und zytosolischen Proteine (LS2) zu erhalten, wurde der Überstand (LS1) in der Mini-Ultrazentrifuge (M-UZ) RC M150gx mit dem Rotor RP100-AT4 bei 300.000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das LP2 Pellet wurde in Homogenisationspuffer-A resuspendiert.

- **Homogenisationspuffer-A:** 0.32 M Saccharose, 4 mM Hepes, Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin), pH 7.4
- **Homogenisationspuffer-B:** 10 mM Tris, 10 mM Hepes, Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin), pH 7.4
- **Natrium-Lösung:** 10 mM Saccharose, 5 mM KCl, 140 mM NaCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM Hepes, pH 7.4



**Abb. i:** Schematische Darstellung der Gewinnung der synaptosomalen Fraktion und synaptischen Vesikeln

#### 2.4.3.3. Gewinnung von „Lipid Rafts“ durch differenzielle Zentrifugation

Um die „Lipid Rafts“ zu gewinnen, wurde das Protokoll von (Brown and Rose, 1992; Parton and Simons, 1995) mit einigen Modifizierungen verwendet. Zunächst wurden postnatale Mäuse C56Bl/6 (P15) durch Dekapitierung getötet. Das Gehirn wurde in 10-fachen Volumen (300 mg in 3 ml) eiskaltem MBS-Puffer homogenisiert. Das Homogenat wurde abgenommen und in der Sorvall RC5B Zentrifuge mit dem Rotor SS-34 bei 1.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4 °C für 30 min gerührt und in ein Volumen 80 % Saccharose resuspendiert. Diese wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (5, 30, 40 % in Wasser gelöst) geladen. Der Gradient wurde in der Ultrazentrifuge (UZ) WX Ultra 80 mit dem Rotor TH641 bei 168.000 g über Nacht bei 4 °C zentrifugiert. Die Fraktionen wurden von oben nach unten vorsichtig abgenommen.

- **MBS-Puffer:** 25 mM MES, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, pH 6,5

#### 2.4.3.4. Affinitätsreinigung von CALEB aus Plasmamembranen von embryonalen Hühneraugen

Die Aufreinigung von CALEB erfolgte aus Membranpräparationen von embryonalen (E15) Hühneraugen. Die Augen wurden entnommen und in eine eiskalte Saccharose-Lösung gelegt. Die weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Zur Aufarbeitung der Plasmamembranen wurden die Augen in Lösung A mit einem Ultra Turax/Homogenisator homogenisiert. Mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation wurde das Gewebehomogenat bzw. die nachfolgend hergestellten Fraktionen jeweils in eine schwere Pelletfraktion (P) und in eine leichtere Fraktion (S) getrennt.

Das gewonnene Homogenat wurde in einer Sorvall RC5B Zentrifuge mit dem Rotor SS-34 bei 20.000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert.

Das resultierende Pellet wurde in 0,8 M Saccharose mit einem Dounce/Homogenisator homogenisiert und auf einen Saccharosegradienten geladen (0,8 M, und 2,25 M Saccharose). Der Gradient wurde in der Ultrazentrifuge (UZ) WX Ultra 80 mit dem Rotor AH-629 bei 85.000 g für 1,5 Stunden bei 4 °C zentrifugiert. Die Plasmamembranfraktion erscheint an der Trennlinie zwischen der 0,8 und 2,25 M Sacchroseschicht. Die Plasmamembranen wurde in Lösung A resuspendiert und bei 20.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in Lösung B homogenisiert und mit dem Rotor AH-629 bei 100.000 g für 1 Stunde bei 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde zunächst auf eine Sepharose 4B-Säule geladen, um unspezifisch bindende Proteine abzureichern. Der Durchlauf wurde daraufhin auf zwei mit einander verbundenen CNBr-aktivierte Sepharose-4B-Säule geladen, an die zuvor der monoklonale anti-CALEB Antikörper (4-1C5) und der monoklonale anti-CALEB Antikörper (81B8) gekoppelt wurden. Diese Schritt wurde über Nacht durchgeführt. Danach wurde die Säule mit 60 ml Lösung B und 200 ml PBS gewaschen und mit 20 ml Elutionspuffer eluiert. Dem Eluat wurden zur Neutralisation 2 ml 1M Tris (pH 6,8) zugegeben. Letztlich wurde das neutralisierte Eluat bei 4 °C über Nacht gegen PBS dialysiert. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration nach der Bradford Methode bestimmt.

- **Lösung A:** PBS, Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin), pH 7,4
- **Lösung B:** TBS, 1% Triton X100, Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin), pH 7,4
- **Elutionspuffer:** 0,1 M DEA (Diethylamin hydrochlorid), pH 11,5

### 2.5. Immunpräzipitation

Kortikale Zellkultur-Lysate (siehe 2.4.2) wurden mit Gamma Bind Plus Sepharose (Amersham Biosciences) 1 h bei 4 °C präinkubiert und bei 2.000 g für 1 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde mit dem monoklonalen anti-CALEB Antikörper 8-1B8 für 3 h inkubiert. Zur Immunpräzipitation (IP) wurde „Gamma Bind Plus

Sepharose“ zu gegeben. Die Gamma Bind Plus Sepharose bindet an die FC-Region des IgG-Antikörpers (8-1B8). Nach 3 h Inkubationszeit bei 4 °C wurde der Zellysate-Überstand in eine Ultrafree MC Säule gegeben und bei 4°C für 1 min bei 800 g zentrifugiert. Die Präzipitate wurden in je 30 µl Laemmli-Puffer resuspendiert und bei 95 °C für 5 min aufgekocht. Die Proben wurden anschließend bei 1000 g für 5 min zentrifugiert und die Analyse des Eluates erfolgte mittels SDS-PAGE, die Detektion der CALEB-Präzipitate im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen CALEB (3-2G10).

### **2.6. Untersuchung einer Interaktion der EGF Domäne von CALEB mit Mammakarzinomzellen**

Um die Bindung von CALEB und die Phosphorylierung der ErbB-Rezeptoren zu testen, wurden die hergestellten EGF CALEB Domänen und natives chCALEB zu verschiedenen Karzinomzelllinien (MDA-MD 231, MDA-MD 453, T47D) gegeben. Alle verwendeten Zelllinien enthalten Tyrosinkinaserzeptoren des ErbB-Familie (ErbB1, 2, 3 oder 4).

### **2.7. Konzentrationsbestimmungen von Proteinen**

Die Proteinbestimmung des Überstandes erfolgte mit dem Bradford BioRad Protein Assay nach Angaben des Herstellers oder durch Messung der Absorption der Proteinlösung (OD) bei einer Wellenlänge von 280 nm.

### **2.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot**

Für die immunologische Detektion von Proteinen wurden diese mit Laemmli-Puffer versetzt und durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einer „Mini Protean II“-Apparatur (BioRad) bei 180 mV aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die apparenten Massen der aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines Massenstandards (BioRad) ermittelt. Mittels Western Blot wurden die Proteine mit der „Mini Transblot-Apparatur“ (Biorad) auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, BioScience GmbH) transferiert (340 mA, 4 °C). Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer geschüttelt. Die Inkubation mit dem in Blockierungspuffer verdünnten primären Antikörpern, erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach fünf Waschschritten (je 5 min), wurde die Membran mit einem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper bzw. alternativ, mit einem sekundären, AP-gekoppelten Antikörper für 2 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde wie zuvor gewaschen, gefolgt von einem zehnmütigen Waschschriff in PBS bzw. in AP-Puffer. Bei Verwendung eines HRP-gekoppelten Antikörpers erfolgte die Detektion mit dem „SuperSignal West Dura

Extended Duration Substrate“ (Pierce) nach Angaben des Herstellers auf „Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film“ (Roche) mit Hilfe einer Fotoentwicklermaschine Curix 60 (Agfa). Bei Verwendung eines AP-gekoppelten Antikörpers wurde die Membran in AP-Puffer mit 165 µg/ml NBT-Lösung und 82,5 µg/ml BCIP-Lösung entwickelt.

- **5x Laemmli-Puffer:** 60 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 1,5 % Bromphenolblau
- **Polvacrylamidgel:** 1 M Tris/HCl (pH 8,8 und pH 6,8), dest. H<sub>2</sub>O, 30 % Acrylamid und 0,8 % PDA, 10 % Ammoniumpersulfat, TEMED
- **Laufpuffer:** 25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 190 mM Glycin; 0,1 % SDS
- **Transferpuffer:** 25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 190 mM Glycin, 20 % Methanol
- **Blockierungspuffer:** 4 % Magermilchpulver, 1x PBS, 0,5 % Tween 20
- **Waschpuffer:** 1x PBS mit 0,5 % Tween 20
- **AP-Puffer:** 100 mM Tris/HCl pH 9,7; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01 mM ZnCl<sub>2</sub>
- **NBT- Lsg.:** 50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid (DMF)
- **BCIP- Lsg.:** 50 mg/ml in 100 % DMF

### 2.9. Dokumentation und Quantifizierung der Blots

Die entwickelten Filme bzw. Nitrocellulosemembranen wurden mit einem Flachbettscanner Arcus 1200 (Agfa) mit Hilfe der Software Agfa Foto Look 3.5 gescannt (16 bit, 600 dpi) und als TIF Datei gespeichert. Die Quantifizierung der Banden erfolgte anschließend mit dem Programm ImageJ (NIH).

### 2.10. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung wurde modifiziert nach (Ansorge, 1985) durchgeführt. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für 20 min in Fixierungslösung fixiert, anschließend in Lösung W für 10 min gewaschen und für 10 min in KMnO<sub>4</sub>-Lösung geschüttelt. Danach wurde erneut zweimal für je 5 min mit Lösung W gewaschen. Anschließend wurden das Gel in 10 % Ethanol, ddH<sub>2</sub>O und Silbernitrat-Lösung für jeweils 10 min geschwenkt. Das Gel wurde für 20 s mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 1 min in 10% (w/v) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> geschüttelt. Das Entwickeln erfolgte in Entwickler-Lösung so lange bis Protein-Banden ausreichend stark angefärbt erschienen. Zur Beendigung der Entwicklung wurde das Gel für 10 min in Lösung W geschüttelt, um dann in ddH<sub>2</sub>O transferiert zu werden.

- **Fixierungslösung:** 50 % (v/v) Metanol, 12 % TCA, 2 % (w/v) CuCl<sub>2</sub>
- **KMnO<sub>4</sub>-Lösung:** 0,01 % (w/v) KMnO<sub>4</sub>
- **Färbelösung:** 0,2 % (w/v) AgNO<sub>3</sub>
- **Entwickler-Lösung:** 2 % (w/v) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.01 % (v/v) Formaldehyd

- **Lösung W:** 10 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Essigsäure

### 2.11. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau

Die Coomassie-Blau Färbung wurde leicht modifiziert nach (Neuhoff et al., 1988) durchgeführt. Das Gel wurde für mindestens eine Stunde fixiert und zweimal für je 10 min mit Aqua dest. gewaschen. Die Färbung erfolgte über Nacht. Anschließend wurde das Gel mehrmals mit Aqua dest. gewaschen und dann dokumentiert.

- **Fixierlösung:** 50 % Ethanol, 10 % Essigsäure
- **Colloidale Coomassie Stocklösung:** 5 g Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva) / 100 ml H<sub>2</sub>O dest., Lagerung bei 4°C
- **Färbelösung:** 10 ml Colloidal Coomassie Stocklösung; 50 g (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> ; 6 ml 85 % Ortho-Phosphorsäure; auf 500 ml mit H<sub>2</sub>O dest. auffüllen plus 125 ml Methanol

### 2.12. Immunfluoreszenz Methoden

#### 2.12.1. Fluoreszenzmikroskopie

Grundlage der Fluoreszenzmikroskopie ist die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome). Fluorochrome absorbieren Licht innerhalb eines bestimmten Wellenlängenbereichs und werden dadurch angeregt. Ein Teil der absorbierten Energie wird bei längerwelligeren Bereichen wieder als Fluoreszenz emittiert. Diesen Effekt macht man sich bei der Fluoreszenzmikroskopie zunutze. Die Detektion der emittierten Fluoreszenz erfolgt mit spezifischen Filtern, die entsprechend nur für den entsprechenden längerwelligeren Bereich durchlässig sind.

Die Fluoreszenzmikroskopie wird u. a. eingesetzt, um Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen.

Bei der Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgt die Detektion der Zielproteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Bei einer direkten Fluoreszenzmarkierung ist der für das Epitop/Zielprotein spezifische Antikörper direkt an das Fluorochrom gekoppelt. Bei der indirekten Fluoreszenzmarkierung ist der sekundäre Antikörper, der spezifisch gegen den nicht fluoreszierenden primären Antikörper gerichtet ist, mit dem Fluorochrom versehen. Durch die Verwendung eines sekundären Antikörpers wird das zu detektierende Signal verstärkt, da mehrere sekundäre an einen primären Antikörper binden können.

Im Fluoreszenzmikroskop wird das Licht einer externen Lichtquelle durch einen für einen bestimmten Wellenlängenbereich spezifischen Anregungsfilter auf einen dichroischen

(halbdurchlässigen) Spiegel geleitet, der das Licht wiederum durch das Objektiv auf das Objekt leitet.

Die entsprechenden Fluorochrome werden angeregt und emittieren in längerwelligeren Bereichen; diese Strahlung kann den dichroischen Spiegel direkt passieren und wird nicht reflektiert. Zur Detektion des emittierten Lichts wurde eine 14-bit CCD-Kamera verwendet.

Werden die Filter so gewählt, dass sich die jeweiligen Absorptions- und Emissionsspektren der Fluorochrome Wellenlängenbereiche kaum bzw. nicht überschneiden, ist die Detektion von mehreren unterschiedlichen Zielproteinen/Epitopen in einem Präparat möglich (Mehrfachfärbung).

Neurone wurden mit einem 63x oder 100x Ölimmersionsobjektiv bzw. einem 40x Phasenkontrast-tauglichen Objektiv betrachtet. Zur Bildakquisition und Nachbearbeitung wurde das Programm Axio-Vision 4.1 (Zeiss, Jena) und MetaMorph verwendet. Für Mehrfachfärbungen wurden monoklonale und polyklonale Antikörper kombiniert. Zur Detektion der primären Antikörper wurden FITC (Fluoresceinisothiosyanat)-, Cy3 bzw. Cy5 (Carboxymethylindocyanin)- und Alexa 488-konjugierte sekundäre Antikörper verwendet.

### **2.12.2 Konfokale Mikroskopie**

Die Neuronenkulturen und Kryoschnitte wurden mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.

Bei der konfokalen Mikroskopie erfolgt die Anregung der Fluorochrome durch einen oder mehrere Laser, die Licht einer bestimmten Wellenlänge erzeugen. Wie bei der Fluoreszenzmikroskopie wird das Licht über einen dichroischen Spiegel bzw. einen AOTF (acousto-optical beam-splitter) fokussiert. Das von den Fluorochromen emittierte Licht wird auf eine variable Lochblende (Pinhole) geleitet und vom dahinter befindlichen Detektor (Photomultiplier) registriert. Die Lochblende und die Fokusebene sind konfokal (d.h. sie befinden sich in konjugierten Ebenen zueinander), daher kann nur Licht aus dem Fokuspunkt die Blende passieren. Weil die Anregung punktgenau erfolgt, sind störende Signale (Streulicht) jeweils oberhalb und unterhalb des Zielproteins (Z-Ebene) kaum existent.

Da nur mit einer Wellenlänge angeregt wird, ist die Anregung spezifisch für ein bestimmtes Fluorochrom; das Auftreten von Wechselwirkungen zweier Fluorochrome (Crosstalk), hervorgerufen durch überlappende Absorptions- und Emissionsspektren der Fluorochrome, ist vernachlässigbar.

Zur Bildakquisition kamen das konfokale Laser-Scanning Mikroskop Leica DM TCS SP2, Bio-Rad MRC 1024 und das LSM 510 NLO Meta zum Einsatz. Die Aufnahmen wurden sequentiell mit folgenden Lasern akquiriert: Argon-Laser (488 nm), zwei Helium-Neon-Laser

(543 nm und 633 nm) oder 2 Photonen (890 nm). Jedes Bild wurde durch Scannen des gewählten Ausschnitts bei gleichzeitiger Mittelung des Signals mit Hilfe des Programms LCS (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Deutschland), Laser Sharp 2000 (Bio-Rad Microscience Ltd) und LSM Image Browser (Zeiss, Deutschland) aufgenommen.

### 2.12.3 Fixierung von Neuronenkulturen

#### 2.12.4. Methanol-Fixierung

Die Neuronenkultur wurden bei -20 °C mit einem Gemisch aus Methanol/Eisessig 10 min lang fixiert. Die Glasplättchen wurden anschließend in PBS auf Parafilm in eine feuchte Kammer überführt, dreimal mit PBS gewaschen und mit PBS-BSA geblockt.

- **Methanol Fixierung:** 95 % Methanol / 5 % Eisessig (v/v)
- **PBS-BSA:** 1 % BSA in 1x PBS (w/v)

#### 2.12.5. Paraformaldehyd-Fixierung

Für die Formaldehyd (FA)-Fixierung wurden die Glasplättchen mit den darauf kultivierten Zellen 15 min in einer 4%igen PFA-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. FA fixiert Zellen, indem es sich kovalent zwischen Aminogruppen der Proteine einlagert; dadurch werden Aminosäuren quervernetzt und bei längerer Fixierungsdauer dementsprechend schlechter von Antikörpern erkannt. Nachfolgende Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Glasplättchen wurden anschließend in PBS auf Parafilm in eine feuchte Kammer überführt und dreimal mit PBS gewaschen. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit mit 50 mM Ammoniumchlorid erfolgte zweimaliges Waschen mit PBS sowie anschließendes Blocken (5-10 min) mit PBS/BSA. Die Inkubation mit Ammoniumchlorid dient dem Abbau von residualem PFA, wodurch der Hintergrund des Fluoreszenzsignals insbesondere im Bereich des grünfarbigen Lichts reduziert wird.

Darauf folgte eine vierminütige Inkubationszeit mit 0.1 % Triton X-100, wodurch die Zellen permeabilisiert werden. Dadurch werden Epitope zugänglich, die sich im Inneren der Zelle befinden. Schließlich folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS-BSA.

- **PFA Fixierung:** 4 % PFA, in 1x PBS (w/w)
- **Ammoniumchlorid:** 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in 1x PBS (w/v)
- **Permeabilisierung:** 0.1 % Triton X-100 in 0.1 % PBS-BSA (v/w)

### 2.13. Immunzytochemie

Zum Blocken (5-10 min) wurde PBS-BSA verwendet. BSA lagert sich unspezifisch an freie zugängliche Proteinepitope an, verringert dadurch unspezifische Bindungen des primären Antikörpers an die spezifisch zu erkennenden Proteinepitope und reduziert somit gleichzeitig das Hintergrundsignal des Antikörpers.

Die Inkubation des primären Antikörpers (in PBS-BSA verdünnt) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Verwendete Antikörper sowie die eingesetzten Antikörperkonzentrationen sind Tabelle I zu entnehmen.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Gelatine erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in PBS-BSA gelöst für 45 min bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde dreimal mit PBS-BSA und zweimal mit PBS gewaschen. Letzteres soll BSA entfernen, welches die ebenso wie PFA das Fluoreszenzhintergrundsignal erhöhen kann. Die Zellen wurden kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich mit Mowiol eingedeckelt.

- **10 % Mowiol:** 2,4 g Mowiol (Calbiochem); 15,6 ml H<sub>2</sub>O; 2,4 ml 1 M Tris pH 8,5 (über Nacht lösen lassen und 6 ml Glycerin zugeben, aliquotieren und bei -20 °C lagern)

#### 2.13.1. Lebendfärbung (Zelloberflächenfärbung)

Für die Lebendfärbung wurden die entsprechenden Antikörper in Medium verdünnt und auf lebende Zellen, die sich auf dem Glasplättchen befinden, appliziert. Die 5-minütige Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach wiederholtem Waschen mit Medium wurden die Zellen fixiert (PFA oder Methanol).

### 2.14. Auswertung/Statistik

#### 2.14.1. Datenanalyse

In Abbildungen wurden die Mittelwert und Standardfehler angegeben. Zur statistischen Analyse wurde ein ungepaarter Student t-Test benutzt. Die Berechnungen wurden mit dem Excel Programm (Microsoft Office 2003) durchgeführt. Für signifikante Unterschiede wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 festgelegt.

#### 2.14.2. Fast Sholl Analyse von Neuronen

Um die Morphologie des Dendritenbaumes in der hippocampalen und in der kortikalen Zellkulturen von Wild-Typ und CALEB -/- Neuronen zu analysieren, wurden Immunfärbungen gegen MAP2ab oder EGFP Transfektionen (pEGFP-N1 Konstrukt) zum

sichtbar machen verwendet, anschließend wurde der Dendritenbaum mit Hilfe der Fast-Sholl-Analyse analysiert (Gutierrez and Davies, 2007).

### **2.14.3. Ko-Lokalisation**

Für die Auswertung von Ko-Lokalisation von prä- und postsynaptischen Terminalien wurde ein Bereich mit einem Durchmesser von 100 µm herangezogen. Das Soma der betrachteten Zelle lag im Zentrum dieses Bereichs.

### **2.15. Histologische Methoden**

#### **2.15.1. Beschichtung von Objektträgern mit Gelatine**

5 g Blattgelatine (Merck) wurden in 1 l Aqua dest. über Nacht bei Raumtemperatur und anschließend für ca. 30 min bei 60 °C gelöst. Dann wurde 0,5 g  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (Merck) zugegeben und gut gerührt.

Die Glasobjektträger wurden über Nacht mit verdünntem Spülmittel (Extran) inkubiert und danach mehrmals mit heißem und kaltem Wasser gespült. Anschließend wurden sie kurz in eine 10 % ige HCl Lösung getaucht und erneut mit Wasser gewaschen. Danach wurden die Objektträger kurz in die Gelatinelösung getaucht, bei 37°C über Nacht getrocknet und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

#### **2.15.2. Anfertigung von Gewebeschnitten**

Das präparierte Gewebe wurde in PBS mit 4 % Formaldehyd, 0.32 M Saccharose je nach Gewebetyp 4-5 h oder über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler fixiert und anschließend unter gleichen Bedingungen in 30 % Saccharose in PBS inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe auf Trockeneis in Tissue Tek (Sakura) eingebettet.

Von den Präparaten wurden mit einem C-Messer serielle Schnitte (16-18 µm Schnittdicke) mittels eines Gefriermikrotoms der Firma Jung (CM 3000, Leica) angefertigt, diese auf Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und bei -20 °C gelagert.

#### **2.15.3. Immunhistochemie an Gewebeschnitten**

Die Schnitte wurden zunächst aufgetaut und für 1-2 Stunden getrocknet. Zur Reduktion einer unspezifischen Färbung wurde mit 10 % Ziegen Serum (Invitrogen) in PBS mit 0,1 % Tween 20 (Sigma Ultra) eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgte für 2 h oder über Nacht bei 4°C die Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in 5 % Ziegen Serum in PBS; 0,1 % Tween 20). Nach drei Waschschritten (je 5 min) in PBS mit

0,1 % Tween 20 wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in 5 % Ziegen Serum in PBS mit 0,1 % Tween 20) oder über Nacht inkubiert und schließlich in 10 % Mowiol eingedeckelt. Bei Verwendung eines HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers wurden die Schnitte nach dem Waschen in Permount (Fisher Scientific) eingedeckelt. Die Auswertung und fotografische Dokumentation erfolgte am konfokalen Mikroskop MRC 1000 (BioRad) bzw. am Axiovert 135 mit der Kamera AxioCam HRC (Zeiss).

- **Waschpuffer:** PBS (Biochrom AG) mit 0.1 % Tween 20 (Sigma Ultra)
- **10 % Mowiol:** 2.4 g Mowiol (Calbiochem); 15.6 ml H<sub>2</sub>O; 2.4 ml 1 M Tris pH 8.5  
über Nacht lösen lassen und 6 ml Glycerin zugeben, aliquotieren und bei -20 °C lagern.

### 2.15.4. Golgi-Färbung

Die Golgi-Färbung erfolgte ausschließlich mit dem „FD rapid GolgiStain Kit“ nach den Herstellerangaben von FD Neuro Technologies. Die Hirnschnitte (150 – 200 µm) wurden vier Wochen in Lösung A+B (Imprägnation) und eine Woche in Lösung C inkubiert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Untersuchung zur Verteilung von CALEB in der Maus

#### 3.1.1. Expression von CALEB in verschiedenen Geweben der Maus

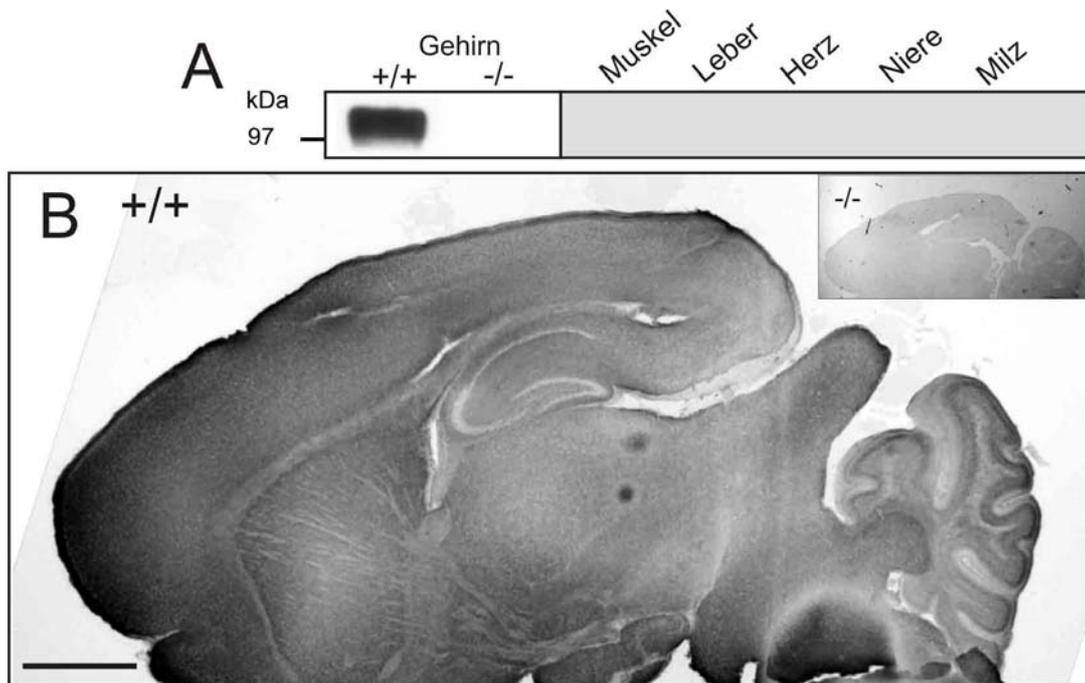
Die genaue Kenntnis über das Vorhandensein von CALEB in einzelnen Geweben, sowie über die entwicklungsabhängige Expression, erlauben Schlussfolgerungen über eine mögliche Funktion dieses Proteins und bieten Ansatzpunkte für weitere Studien und funktionelle Analysen.

Zunächst wurde die Expression von CALEB durch Western Blotting und immunhistochemische Methoden unter Verwendung verschiedener anti-CALEB Antikörper untersucht.

Um einen Überblick über das Vorhandensein von CALEB zu erhalten, wurden verschiedene Gewebe von Mäusen präpariert. Gewebelysate von Gehirn, Muskel, Leber, Herz, Niere und Milz wurden im postnatalen Alter 10 (P10) präpariert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen CALEB analysiert (Abb. 5A). CALEB wurde ausschließlich im Hirngewebe detektiert. In Muskeln, Leber, Herz, Niere und Milz wurde CALEB nicht nachgewiesen.

Um einen Überblick über die Expression von CALEB im gesamten Gehirn zu erhalten, wurde die Verteilung von CALEB in Sagittalschnitten von Mäuse-Gehirnen mittels einer Immunfärbung genauer untersucht (Abb. 5B).

Im Maus (P10) findet man eine relativ uniforme Verteilung von CALEB in Sagittalschnitten und einige bestimmte Gehirnregionen mit starker Expression, z.B. im Kortex, Colliculus superior und im Cerebellum. Die Expression z.B. im Hippocampus und Mittelhirn ist wesentlich schwächer. Als Negativkontrolle dienten Hirnschnitte von CALEB  $-/-$  Mäusen, in denen keine Immunfärbung zu sehen ist (Abb. 5B).



**Abb. 5: Analyse der Verteilung von CALEB in der Maus.**

**A:** Lysate verschiedener Organe der Wild-Typ Maus (P10) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und der Blot mit dem CALEB-Antikörper (3-2G10) entwickelt. CALEB wurde ausschließlich im Hirngewebe detektiert, nicht jedoch im Muskel, Leber, Herz, Niere und Milz. Der Blot mit dem Muskel, Leber, Herz, Niere oder Milzgewebe wurde doppelt so lang wie der Blot mit dem Gehirngewebe exponiert. **B:** Sagittalschnitt des Gehirns der Wild-Typ Maus und CALEB  $-/-$  Maus im P10. Die Kryostatschnitte wurden mit einem Antikörper gegen CALEB (Rb78) und einem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper gefärbt. CALEB zeigt eine relativ uniforme Verteilung. Maßbalken: 1 mm.

Um zu klären, ob CALEB auch im peripheren Nervensystem (PNS) vorkommt, wurden Spinalganglien auf das Vorhandensein von CALEB mittels Immunblotting und Immunfärbung untersucht (Abb. 6).

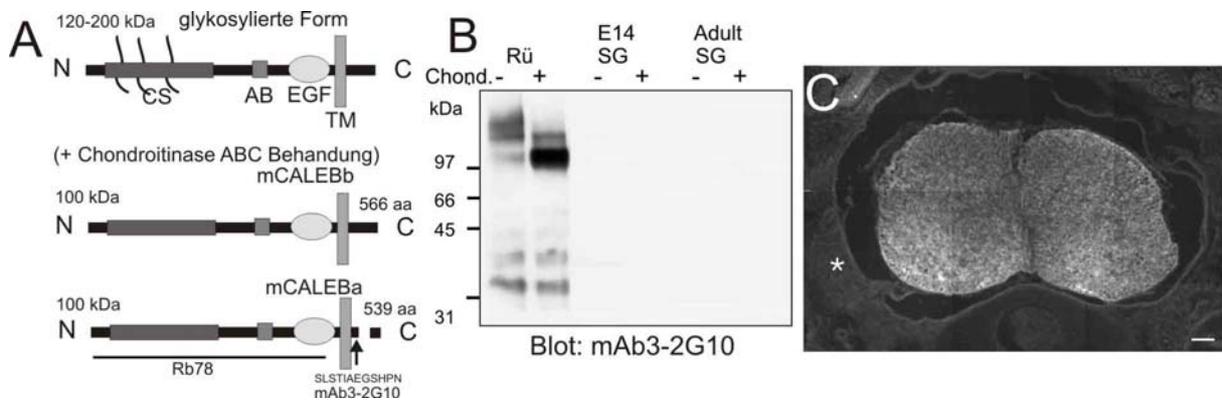
Dazu wurden Homogenate aus Spinalganglien von embryonalen (E14) und erwachsenen Mäusen sowie vom Rückenmark (P5) präpariert, über die SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen CALEB (3-2G10) analysiert (Abb. 6B). CALEB wurde ausschließlich im Rückenmark gefunden, nicht jedoch in den Spinalganglien. Auch in Kryostatschnitten (E15) wurde CALEB nur im Rückenmark detektiert (Abb. 6C).

Abschließend lässt sich feststellen, dass das Protein CALEB nur im ZNS vorkommt, nicht jedoch im PNS, d.h. in den Spinalganglien.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse verschiedener Formen von CALEB durch Western Blotting unter Verwendung eines monoklonalen anti-CALEB Antikörpers (3-2G10), welcher die zytoplasmatische Domäne von CALEB erkennt und durch die Immunfärbung unter Verwendung eines polyklonalen anti-CALEB Antikörper (Rb78) (Abb. 6 A).

Der monoklonale Antikörper 3-2G10 detektiert Banden mit der Größe von 120-200 kDa und einige kleinere Komponenten mit Molekularmasse zwischen 35 und 45 kDa, die eventuell der

prozessierten Form von CALEB entsprechen. Nach der Chondroitinase ABC Behandlung ist eine Hauptbande bei etwa 120 kDa zu sehen (Abb. 6 B).



**Abb. 6: Expression von CALEB im zentralen Nervensystem.**

**A:** Schematische Darstellung und Nomenklatur der verschiedenen Formen von CALEB und Antikörper, hergestellt in der Arbeitsgruppe Rathjen. **B:** Die Lysate von Rückenmark (P5), Spinalganglien (E14) und adulten Mäusen wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und der Blot mit dem CALEB-Antikörper (3-2G10) und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper entwickelt. Das Vorhandensein von CALEB wurde nach (+) und ohne (-) Chondroitinase ABC Behandlung analysiert. CALEB wird nur im Rückenmark und nicht in Spinalganglien detektiert. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der linken Seite des Blots angegeben. **C:** Im Rückenmark-Transversalschnitt im Entwicklungsstadium E15 wurde CALEB mit einem CALEB Antikörper (Rb78) und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper gefärbt. Der Stern markiert ein Spinalganglion, welches nicht immunpositiv ist. **N:** N – Terminal, **CS:** Chondroitinsulfatkette, N- und O-Glykosylierung, **AB:** saure Box („acidic box“), **EGF:** EGF-ähnliche Domäne („epidermal growth factor“), **TM:** Transmembran-Domäne, **C:** C-Terminal, **Rü:** Rückenmark, **SG:** Spinalganglien; Maßbalken: 100  $\mu$ m.

### 3.2. Expressionsmuster von CALEB in unterschiedlichen Geweben während der Entwicklung

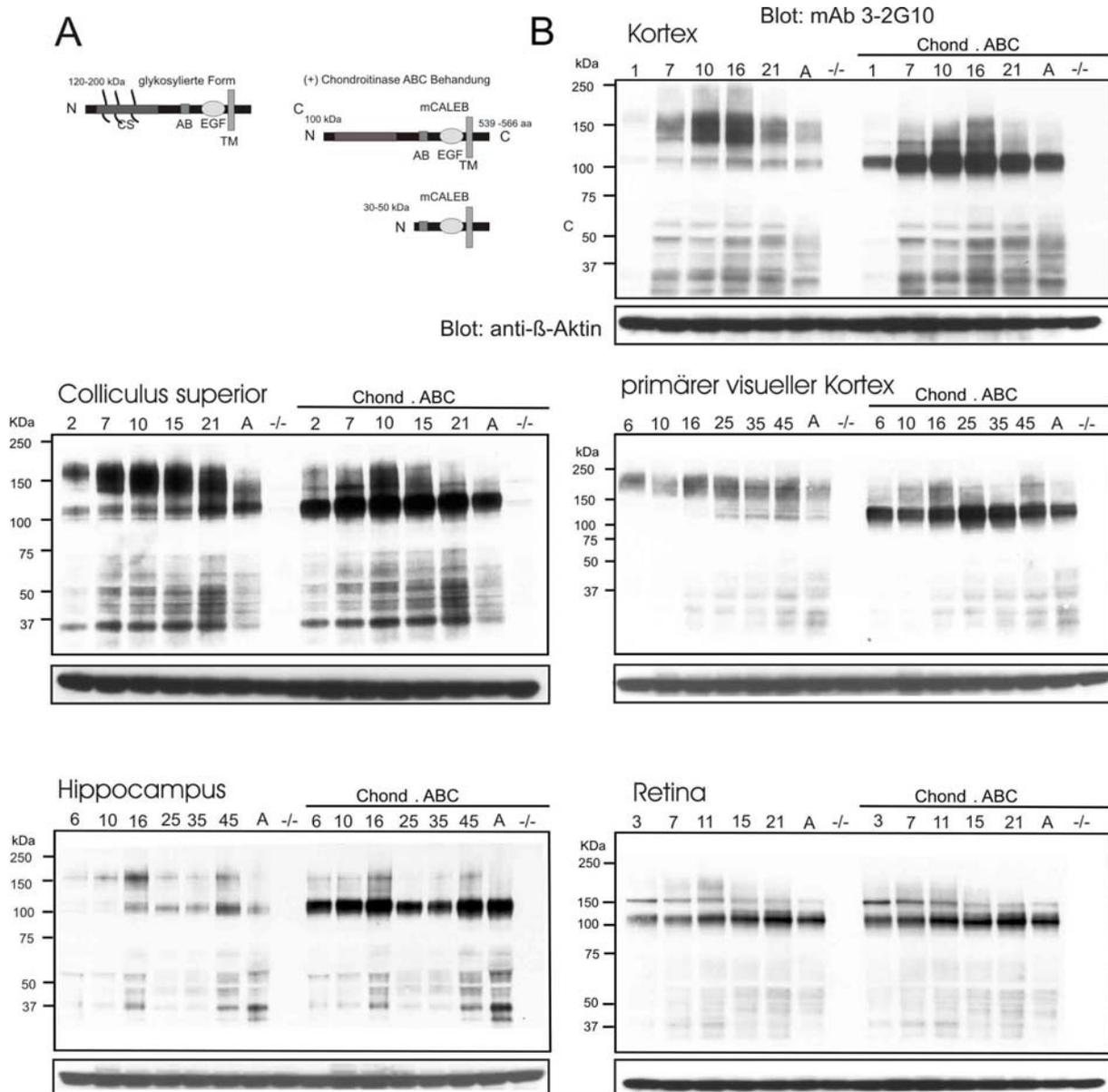
Auf Grund der relativ uniformen Verteilung von CALEB im Gehirn (Abb. 5B) wurde das Expressionsprofil von CALEB in unterschiedlichen Hirnregionen zu verschiedenen Entwicklungsstadien der Maus analysiert.

Zur Untersuchung der zeitlichen Expression von CALEB wurden gleiche Proteinmengen von Lysaten verschiedener Gewebe hergestellt, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen CALEB untersucht (Abb. 7).

Im Kortex und Colliculus superior sieht man die stärkste Expression, während die Expression in anderen Hirnregionen wie im Hippocampus und Retina wesentlich schwächer ist. In den Hirnregionen, in denen CALEB stark exprimiert wird, zeigen die Profile eine maximale Expression zwischen dem 10. und 20. postnatalen Tagen, danach nimmt die relative Menge von CALEB wieder ab. Die Expressionsprofile zeigen auch, dass CALEB in frühen Phasen der Entwicklung zunächst stark glykosyliert vorliegt, in späteren Stadien dann wenig bis nicht glykosyliert auftritt.

In den Hirnregionen, wo CALEB schwächer exprimiert wird, zeigten die Expressionsprofile eine relativ uniforme Expression und keine besondere Glykosylierung.

Weiterhin sieht man interessanterweise einige Banden in der Größe von 30 bis 50 kDa, welche vermutlich die prozessierten Formen von CALEB darstellen.



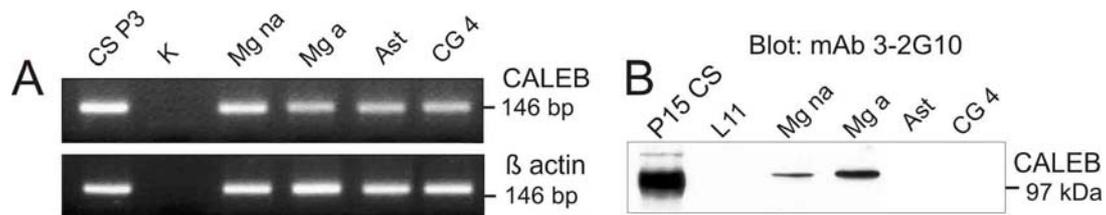
**Abb. 7: Expressionsprofil von CALEB in unterschiedlichen Geweben während der Entwicklung**

**A:** Schematische Darstellung von verschiedenen Formen von CALEB. **B:** Gleiche Proteinmengen von Lysaten verschiedener Hirnregionen postnataler Mäuse wurden in einer 4 – 15 %ige SDS-PAGE aufgetrennt und der Blot mit dem CALEB-Antikörper (3-2G10) und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper entwickelt. Das Vorhandensein von CALEB Protein wurde nach (+) und ohne (-) Chondroitinase ABC Behandlung analysiert. Die Banden zwischen 120 und 200 kDa stellen die glycosylierten Formen von CALEB dar. Nach Behandlung mit Chondroitinase ABC, zur Beseitigung der Chondroitinsulfat-Ketten, erscheint das Kernprotein von CALEB in einer Größe von 100 kDa. Die Banden zwischen 30 und 50 kDa stellen vermutlich die prozessierten Formen von CALEB dar.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der linken Seite des Blots angegeben. **N:** N – Terminal, **CS:** Chondroitinsulfatkette, N- und O-Glykosylierung, **AB:** saure Box („acidic box“), **EGF:** EGF-ähnliche Domäne („epidermal growth factor“), **TM:** Transmembran-Domäne, **C:** C-Terminus.

### 3.3. Vorhandensein von CALEB auf Glia Zellen

Ausgehend von der Beobachtung, dass CALEB auf retinalen Müller-Glia-Zellen vorhanden ist (Schumacher et al., 1997), wurde geprüft, ob CALEB auch auf anderen Glia-Zellen exprimiert wird.

Mit Hilfe der RT-PCR wurde das Vorhandensein von CALEB in Mikroglia (passive und aktive) und Astrozyten von primären Zellkulturen und Oligodendrozyten Zelllinien (CG-4) geprüft (Abb. 8). Die Mikroglia wurden durch eine Inkubation von 24 Stunden mit Lypopolysaccharid (LPS, 100 ng/ml, gewonnen aus äußeren Membranen gramnegativer Bakterien) aktiviert. Die mRNA von CALEB wurde in allen getesteten Glia-Zellen gefunden (Abb. 8 A), jedoch konnte CALEB auf der Proteinebene mit Immunblotting in Astrozyten und Oligodendrozyten-Zelllinien (CG4) nicht nachgewiesen werden. Dies könnte jedoch auch daran liegen, dass die Expression von CALEB in Oligodendrozyten-Zelllinien (CG4) sehr gering ist (Ichihara-Tanaka et al., 2006).



**Abb. 8: Vorhandensein von CALEB auf Glia-Zellen**

**A:** Die Gesamt-mRNA vom Colliculus superior P3, Mikroglia (passive und aktive) und Astrozyten von primären Zellkulturen und Oligodendrozyten-Zelllinien (CG-4) wurde mit RT-PCR analysiert. Mikroglia und Astrozyten Zellkulturen wurden am Tag 2 nach Ausplattierung untersucht. Für die PCR wurden spezifische CALEB Primer erstellt, um die Fragmente von CALEB zwischen Exon 3 und 4 zu amplifizieren.  $\beta$ -Actin wurde als Kontrolle verwendet. **B:** Lysate vom Colliculus superior, L11 und Glia Zellkulturen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der Blot mit dem CALEB-Antikörper (3-2G10) und einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper entwickelt. Die Expression in Mikroglia ist sehr gering im Vergleich zu Colliculus superior (P3). **CS P3:** Colliculus superior (P3), **K:** Kontrolle, **MG na:** Mikroglia nicht aktiviert, **MG a:** Mikroglia aktiviert, **Ast:** Astrozyten, **CG4:** Oligodendrozyten-Zelllinie (CG4), **L11:** L11- Zelllinie, als Kontrolle.

### 3.4. Untersuchung zur subzellulären Verteilung von CALEB

Die Kenntnis der subzellulären Lokalisation eines Proteins ermöglicht eine Aussage über dessen physiologische Funktion, welche dann durch funktionelle Experimente überprüft werden kann.

### 3.4.1 Die Lokalisation von CALEB in „Lipid Rafts“

Es wird angenommen, dass „Lipid Rafts“, d.h. Mikrodomänen reich an Sphingolipiden und Cholesterol, Regionen darstellen, welche für die Auslösung von Signaltransduktionsmechanismen wichtig sind (Rajendran and Simons, 2005; Simons and Ikonen, 1997; Tsui-Pierchala et al., 2002). Die besondere Organisation der Lipide führt dazu, dass die in „Lipid Rafts“ enthaltenen Proteine sich nicht durch nicht-ionische Detergenzien auflösen lassen und somit auf der oberen Schicht eines Saccharose-Gradienten schwimmen. Sie haben in Neuronen eine besondere Bedeutung, weil diese eine Plattform für die Signaltransduktion, z.B. durch Neurotransmitter und Rezeptoren, darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die „Lipid Rafts“-Fraktionen durch differentielle Zentrifugation in Saccharose-Gradienten angereichert und anschließend durch immunzytochemische Methoden auf das Vorhandensein auf CALEB untersucht.

Die „Lipid Rafts“ Fraktionen wurden von postnatalen Mäusen (P15) durch diskontinuierliche Saccharose-Gradienten-Zentrifugation isoliert (Abb. 9). Die verschiedenen Fraktionen der Gradienten wurden von der oberen bis zur unteren Fraktion über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen CALEB, Flotilin (Marker von „Lipid Rafts“), PSD95 (Marker für postsynaptische Fraktionen), Synaptophysin (Marker für präsynaptische Vesikel), SNAP23 (Synaptosomal-assoziiertes Protein) und L1 (IgSF-Transmembranprotein) analysiert (Abb. 9 A).

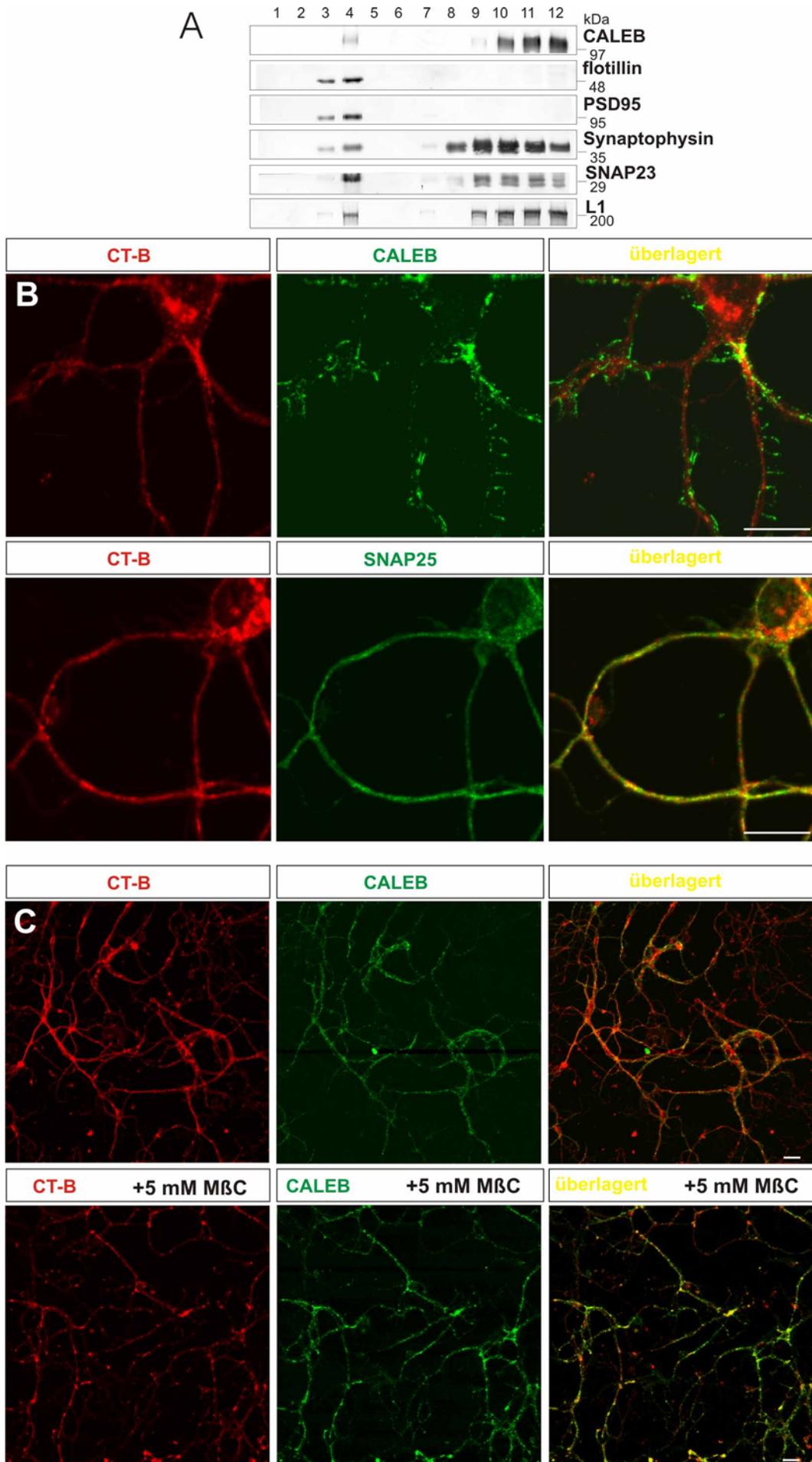
CALEB wurde zum kleineren Anteil in denselben Fraktionen wie Flotilin und PSD95 gefunden. Der größte Teil von CALEB wurde jedoch in den Synaptophysin-reichen Fraktionen nachgewiesen.

Um diese Beobachtung weiter zu belegen, wurden Zellkulturen durch Doppel-Immunfärbung gegen CALEB und ein Marker von „Lipid Rafts“ [(Cholera Toxin-B (CT-B), Gangliosid GM1)] untersucht (Abb. 9 B). Hierzu wurde anti-Cholera Toxin-B (CT-B) Antikörper als Marker von „Lipid Rafts“ verwendet, weil sich anti-Flotilin Antikörper für Immunfärbungen als nicht geeignet erwies.

CALEB zeigt einen relativ niedrigen Anteil an Kolo-kalisation mit Cholera Toxin-B (CT-B). Als Kontrolle diente die Immunfärbung von CT-B und SNAP25, welche eine deutliche Kolo-kalisation zeigen (Chamberlain et al., 2001). Weiterhin wurden Perturbationsversuche an „Lipid Rafts“ durchgeführt, um die Lokalisation von CALEB auf „Lipid Rafts“ zu analysieren (Abb. 9 C). Kortikale Zellkulturen (DIV 12) wurden mit (+) und ohne (-) Methyl- $\beta$ -cyclodextrin behandelt und anschließend mit CALEB und CT-B Antikörpern gefärbt. Die „Lipid Rafts“ wurden durch Entfernung von Cholesterol mittels Methyl- $\beta$ -cyclodextrin

aufgelöst. (Toomre et al., 2000). Die Zellen zeigten nach dieser Cholesterol Depletion keine deutliche Veränderung im CALEB Färbungsmuster. Die CT-B immun-positive Färbung hingegen hat sich in ein fleckenartiges Muster umgewandelt.

Mit beiden Methoden konnten eine teilweise CALEB Lokalisation in „Lipid Rafts“ nachgewiesen werden.



**Abb. 9: CALEB kolokalisiert teilweise in „Lipid Rafts“**

**A:** Fraktionen von „Lipid Rafts“ wurden durch eine diskontinuierliche differentielle-Zentrifugation in Saccharose-Gradienten isoliert. Das Homogenat von Mäusegehirnen wurde durch nicht-ionische Detergenzien (Triton X100) solubilisiert und auf einen diskontinuierlichen Gradienten von Saccharose geladen. Die unlösliche Detergenz-Fraktion, die auf der obersten Schicht des Saccharose-Gradienten schwimmt, enthält „Lipid Rafts“. Es wurden gleiche Volumina der jeweiligen Fraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt. Die oberste Fraktion des Gradienten entspricht der Fraktion 1 und die unterste Fraktion, entspricht der Fraktion 12. Diese Fraktionen wurden mit Antikörpern gegen CALEB (3-2G10), Flotilin, PSD95, Synaptophysin, SNAP23 und L1 analysiert. „Lipid Rafts“ reichern sich in der Fraktion 3 und 4 an. CALEB wurde zu einem kleinen Anteil in denselben Fraktionen gefunden, wo Flotilin und PSD95 nachgewiesen wurden. Der größte Teil von CALEB wurde in der Synaptophysin-reichen Fraktion gefunden, in denen auch das Transmembranprotein L1 detektiert wurde. **B:** Kortikale Zellkulturen (DIV 12) wurden mit CALEB Antikörpern und Antikörpern gegen die Cholera Toxin Untereinheit B (CT-B, ein Gangliosid GM1, „Lipid Raft“ Marker) gefärbt. Die Immunfluoreszenzen zeigen eine teilweise Kolokalisation von CALEB auf „Lipid Rafts“. **C:** Perturbationsexperiment von „Lipid Rafts“ in Zellkultur. Kortikale Zellkulturen (DIV 12) wurden mit (+) und ohne (-) Methyl- $\beta$ -cyclodextrin Behandlung gegen CALEB und CT-B gefärbt. „Lipid Rafts“ werden durch Methyl- $\beta$ -cyclodextrin aufgelöst. Maßbalken: 15  $\mu$ m.

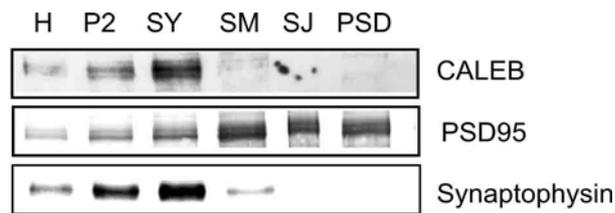
**3.4.2 Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von CALEB durch biochemische****Methoden**

Um die subzelluläre Verteilung von CALEB zu untersuchen, wurden verschiedene biochemische Methoden eingesetzt: eine PSD Präparation, eine Synaptosomen Präparation und die Aufreinigung synaptischer Vesikel.

Die PSD Präparation wurde mit Gehirnen aus postnatalen Mäusen durchgeführt (Carlin et al., 1980). Hierzu wurden Hirnhomogenate mittels Sedimentation durch diskontinuierliche Saccharose-Gradienten-Zentrifugation in verschiedene Kompartimente fraktioniert. Dies führte zu einer sequentiellen Anreicherung postsynaptischer Proteine. Die isolierten Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit verschiedenen Antikörpern analysiert (Abb. 10).

In diesem Experiment wurden prä- und postsynaptische Marker zum Vergleich verwendet: Synaptophysin, ein integrales Membranprotein, als Marker für präsynaptische Vesikel, und PSD95, ein Ankerprotein für postsynaptische Komponenten.

CALEB wurde in der Synaptosomen-Fraktion (SY), der Fraktion für synaptosomale Membranen (SM) und der Plasmamembran-Fraktion nachgewiesen, welche auch reich an Synaptophysin sind. Das Protein PSD95 wurde in der Fraktion mit synaptosomalen Membranen (SM), in der Fraktion mit „synaptic junctions“ (SJ) und der PSD Fraktion gefunden, nicht jedoch CALEB.



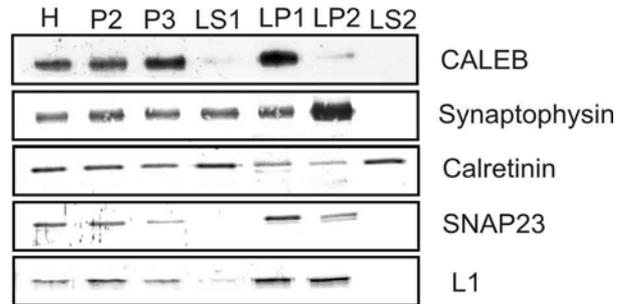
**Abb. 10: Untersuchung zur Verteilung von CALEB in subzellulären Fraktionen des ZNS postnataler Mäuse**

Es wurden 5 µg Protein der jeweiligen Fraktionen geladen und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Der Blot wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen CALEB (mAb 3-2G10), PSD95 und Synaptophysin und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper entwickelt. Synaptophysin und CALEB reichern sich besonders in den Fraktionen P2, SY und SM an. In den postsynaptischen Fraktionen PSD wird weder CALEB, noch der präsynaptische Marker Synaptophysin nachgewiesen. **H:** Homogenat, **P2:** Plasmamembran-Fraktion, **SY:** Synaptosomen, **SM:** synaptosomale Membranen, **SJ:** synaptische Verbindung „synaptic junctions“, **PSD:** postsynaptische Fraktion „postsynaptic density“

Weiterhin wurde die subzelluläre Verteilung von CALEB im ZNS von postnatalen Mäusen durch Synaptosomen- und synaptische Vesikel-Präparation untersucht (Abb. 11). Hierzu wurden Hirnhomogenate mittels Sedimentation durch Zentrifugation in verschiedene Kompartimente fraktioniert. Dies führte zu einer sequentiellen Anreicherung der Plasmamembranen und unlöslicher Anteile des Zytoskelletts (LP1), zytosolischer Proteine und Zellkompartimente der lysierten Neurone (LS2), leichter Membranfragmente und synaptischer Vesikel (LP2) und Synaptosomen (P3). Die isolierten Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit verschiedenen Antikörpern analysiert.

CALEB wurde in dem Homogenat (H), in der groben Membranfraktion (P2), in der Synaptosomen-Fraktion (P3) und in der Fraktion der Plasmamembranen (LP1) besonders stark angereichert. Synaptophysin, ein präsynaptisches Vesikelprotein, wurde nicht in der Fraktion zusammen mit CALEB detektiert, sondern in der Fraktion synaptischer Vesikel (LP2). Calretinin, ein Marker für zytosolische Proteine, wurde in allen Fraktionen nachgewiesen, insbesondere in den LS1 und LS2 Fraktionen. SNAP23, ein synaptosomal-assoziiertes Protein, wurde in der LP1 Fraktion stark angereichert. L1, ein Transmembranprotein, wurde in den Fraktionen für Plasmamembranen (LP1) und in der synaptischen Vesikel-Fraktion (LP2) angereicht.

Die Ergebnisse der angewendeten biochemischen Methoden lassen den Schluß zu, dass CALEB besonders stark in der Synaptosomen Fraktion und in der Fraktion der Zellmembranen angereichert ist, nicht jedoch in der Fraktion der synaptischen Vesikel (LP2) (Abb. 10 und 11), was eine nicht präsynaptische Lokalisation vermuten lässt.

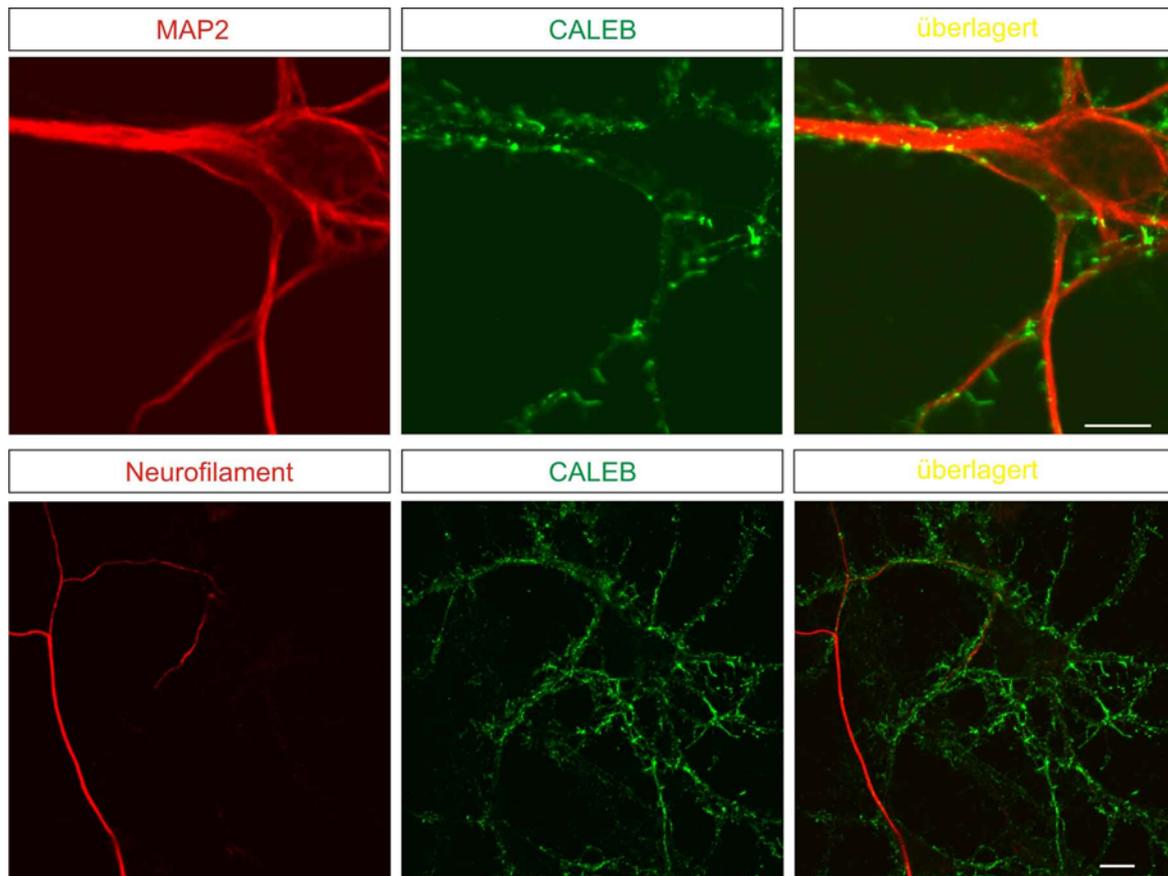


**Abb. 11: Untersuchung der Verteilung von CALEB bei einer Synaptosomen- und synaptischen Vesikel Präparation aus dem Gehirn postnataler Mäuse**

Es wurden 20 µg Protein pro Spur der jeweiligen Fraktion der Synaptosomen- und synaptischen Vesikel Präparation geladen und mit SDS-PAGE aufgetrennt. Der Blot wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen CALEB (3-2G10), Synaptophysin, Calretinin, SNAP23 und L1 Antikörpern entwickelt. CALEB reichert sich besonders stark in der Fraktion der Synaptosomen (P3) und in der Fraktion für Plasmamembranen und Zytoskelett-Proteine (LP1) an. In der synaptischen Vesikel Fraktion wird CALEB nicht nachgewiesen. **H:** Homegenat, **P2:** grobe Membran Fraktion, **P3:** Synaptosomen, **LS1:** Überstand der groben Membran-Fraktion, **LP1:** Plasmamembran und Zytoskelett-Protein, **LP2:** synaptische Vesikel, **LS2:** zytosolische Proteine.

### 3.4.3. Immunzytologische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von CALEB

In den vorangegangenen Experimenten wurde eine Anreicherung von CALEB in der Synaptosomen Fraktion und in der Fraktion der Plasmamembranen nachgewiesen. Um die Lokalisation weiter zu analysieren, wurden in kortikalen Zellkulturen Doppel-Immunfärbungen mit CALEB-Antikörpern und verschiedenen Antikörpern gegen dendritische und axonale Marker durchgeführt.



**Abb. 12: CALEB erscheint überwiegend in der Plasmamembran von Dendritenbäumen und im Zellkörper**

Primärkulturen kortikaler Neurone (DIV 10) wurden mit Antikörpern gegen CALEB (Rb78), MAP2 und Neurofilament (2H3) gefärbt. Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale für CALEB und MAP2 deutet auf eine dendritische Lokalisation von CALEB hin. CALEB zeigt eine punktförmige Verteilung auf dem Zellkörper und auf Dendritenbäumen. Für Neurofilament wurde keine Kolokalisation mit CALEB beobachtet. Maßbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

Nach einer Kultivierungsdauer von 10 Tagen (DIV 10) wurde die Verteilung von CALEB im Vergleich zu MAP2 und Neurofilament (2H3) Protein untersucht (Abb. 12). MAP2 ist ein neurales, zytoskelett-assoziiertes Protein, das im Zellkörper und in den Dendriten exprimiert wird. Es dient als Differenzierungsmarker für neuronale Kulturen (Caceres and Dotti, 1984). Neurofilament ist ebenfalls ein Zytoskelett-assoziiertes Protein, das meist reichlich in den fibrillären Komponenten der Axone exprimiert wird (Alberts et al., 2002). 2H3 ist ein monoklonaler Antikörper gegen das 165 kD Neurofilament-Protein.

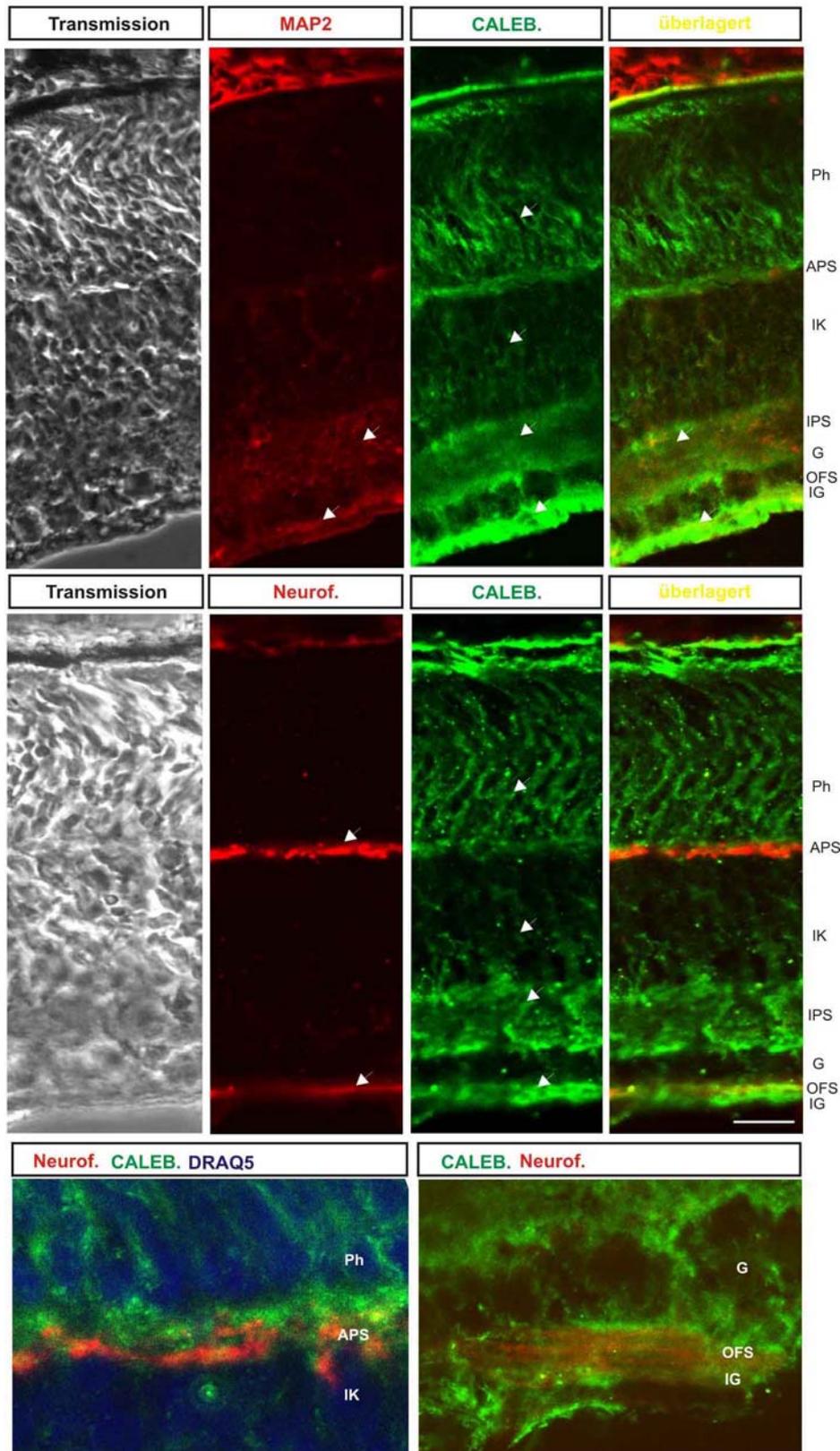
Die immunzytologische Untersuchung der Kulturen zeigt, dass CALEB vorrangig eine punktförmige Verteilung auf dem Zellkörper und auf Dendritenbäumen aufweist. Darüber hinaus wurde eine überlappende Expression von CALEB und MAP2 auf den Dendritenbäumen detektiert. Jedoch wurde keine Kolokalisation von CALEB mit Neurofilament nachgewiesen.

Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis für eine soma-dendritische Lokalisation von CALEB.

Um diese beobachtete subzelluläre Verteilung von CALEB zu bestätigen, wurden Retina-Schnitte von früh postnatalen Mäusen (P15) immunhistochemisch untersucht. Die Retina stellt aufgrund ihrer charakteristischen Schichtung ein ideales Modell zur Analyse der Lokalisation von Proteinen dar.

Retina-Schnitte wurden mit CALEB, MAP2 und Neurofilament-Antikörpern gefärbt (Abb. 13).

CALEB wurde in der Photorezeptorschicht (Ph), der inneren Körnerzellschicht (IK), der inneren plexiformen Schicht (IPS) und der inneren Gliagrenzmembran (IG) detektiert. CALEB kolokalisiert in der IPS und der IG mit MAP2. Neurofilament wurde dagegen nur in der äußeren plexiformen Schicht (APS) und der optischen Faserschicht (OFS) detektiert, eine Kolokalisation mit CALEB konnte aber nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 13: Immunhistologische Untersuchung zur Verteilung von CALEB in der Retina der Maus.**

Dargestellt sind Retinaschnitte der postnatalen Maus P15, gefärbt mit Antikörpern gegen CALEB, Neurofilament (2H3) und MAP2. Die Photorezeptorschicht, innere Körnerzellschicht, innere plexiforme Schicht und innere Gliagrenzmembran waren immunpositiv für CALEB (Rb78), in der IPS und der IG wurde eine Kolokalisation mit MAP2 festgestellt. Neurofilament wurde in der äußeren plexiformen Schicht und optischer Faserschicht gefunden. **Ph**: Photorezeptorschicht, **APS**: äußere plexiforme Schicht, **IK**: innere Körnerzellschicht, **IPS**: innere plexiforme Schicht, **G**: Ganglienzellschicht, **OFS**: optische Faserschicht, **IG**: innere Gliagrenzmembran; Maßbalken: 50 µm

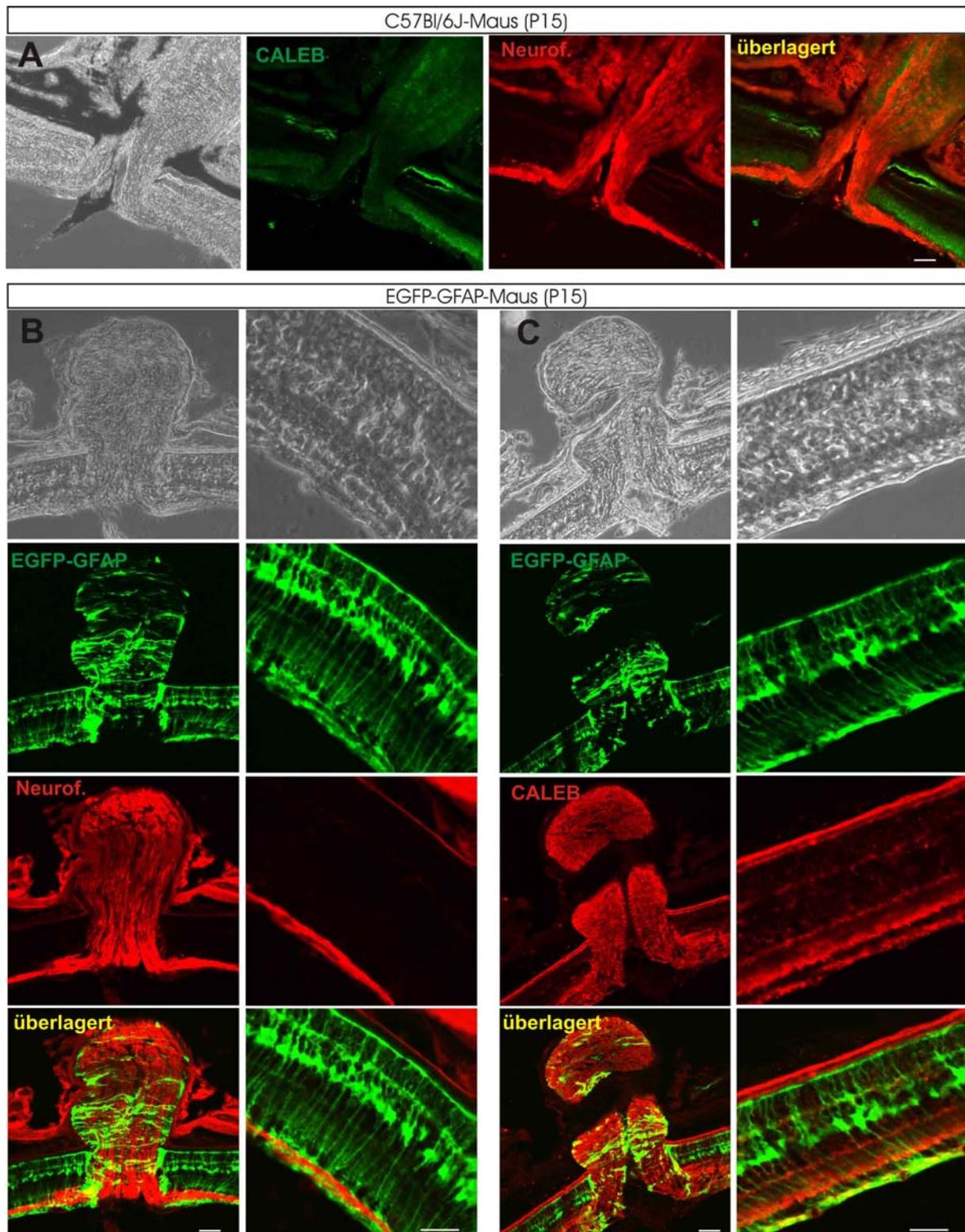
Auch im Austrittspunkt des Sehnervs (*Nervus opticus*) konnte keine überlagerte Fluoreszenz von CALEB und Neurofilament beobachtet werden (Abb 14 A).

Ausgehend von der Beobachtung, dass CALEB auf retinalen Müller-Glia-Zellen vorhanden ist (Schumacher et al., 1997), wurde hier die Verteilung von CALEB in Glia-Zellen geprüft.

Um eine Kolokalisation von CALEB auf Müller-Gliazellen detailliert zu untersuchen, wurde eine EGFP-GFAP Maus verwendet, bei der Gliazellen das grün fluoreszente Protein (*EGFP*) unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors exprimieren (Abb. 14).

Auch in der Retina von EGFP-GFAP-Mäusen sieht man keine Überlagerung von Gliazellen mit Neurofilament (Abb. 14 B), jedoch bestätigt sich eine teilweise Überlagerung von CALEB mit Gliazellen in der inneren Gliagrenzmembran (Abb. 14 C)

Durch Färbungen in der Retina wurde bestätigt dass CALEB nicht axonal lokalisiert ist, was besonders deutlich durch Färbungen an der Austrittsöffnung des optischen Sehnervs gezeigt werden konnte.



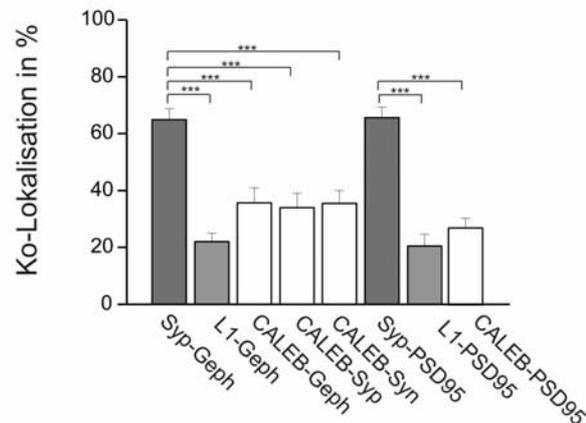
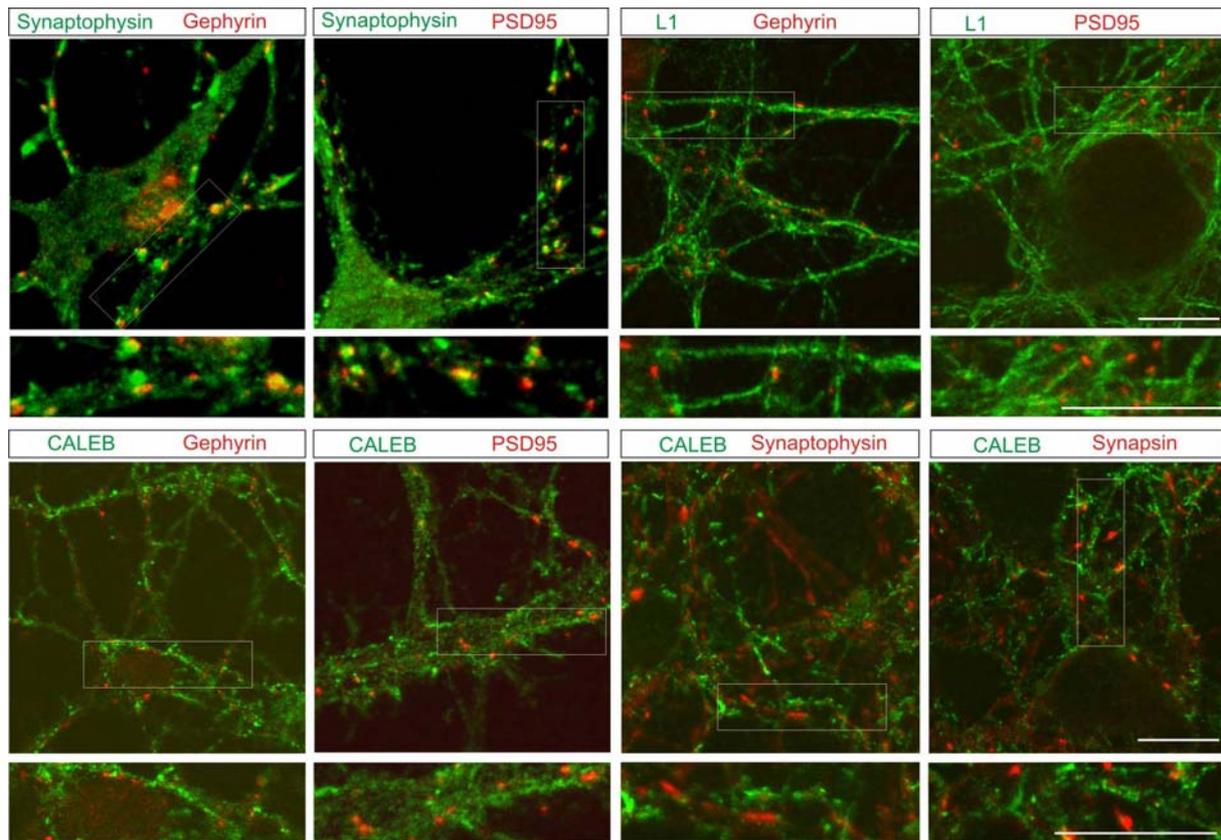
**Abb. 14: Immunhistologische Untersuchung zur Lokalisation von CALEB in der Retina der Maus.**

Dargestellt sind Retinaschnitte der postnatalen Maus (C57Bl/6J) und EGFP-GFAP-Maus (P15) gefärbt mit Antikörpern gegen CALEB und Neurofilament (2H3). **A:** Das Neurofilament Protein kommt in der optischen Faserschicht vor und kolokalisiert nicht mit CALEB. **B:** Neurofilament zeigt keine Kolokalisation mit Gliazellen in der Retina von EGFP-GFAP-Mäusen. **C:** Das CALEB Protein kolokalisiert teilweise mit Glia-Zellen in der optischen Faserschicht und inneren Gliagrenzmembran. Maßbalken: 100  $\mu\text{m}$

### **3.4.5. Untersuchungen zur synaptischen Lokalisation von CALEB**

Um zu klären, ob CALEB in Synapsen lokalisiert ist, wurden in kortikalen Zellkulturen (DIV 10) Doppel-Immunfärbungen gegen prä- und postsynaptische Proteine und CALEB durchgeführt. Als präsynaptische Marker wurden Synaptophysin und Synapsin, und als postsynaptische Marker Gephyrin und PSD95 verwendet. Eine Kontrollfärbung erfolgte mit L1, einem Transmembranprotein (Abb. 15).

Synaptophysin/Gephyrin und Synaptophysin/PSD95 zeigten einen relativ hohen Anteil an Ko-Lokalisation in Vergleich zu CALEB und L1 mit den verwendeten synaptischen Markern. Die Färbungen zeigten, dass CALEB zum Teil mit synaptischen Markern ko-lokalisiert, jedoch nicht auf Synapsen beschränkt ist.



### Abb. 15: Untersuchungen zur synaptischen Lokalisation von CALEB

Primärkulturen kortikaler Neurone (DIV 10) wurden durch Doppel-Immunfärbungen gegen prä- und postsynaptische Proteine (Synaptophysin, Synapsin, Gephyrin und PSD95) sowie gegen L1 und CALEB analysiert. Die prä- und postsynaptischen Proteine Synaptophysin und Gephyrin, sowie Synaptophysin und PSD95 zeigen einen relativen hohen Anteil an Kolokalisation im Vergleich zu CALEB und L1 mit synaptischen Markern. Dieses Experiment wurde in 3 verschiedenen Zellkulturen durchgeführt, und die Auswertung der Kolokalisation wurde in einem Feld von  $200 \mu\text{m}^2$  analysiert. Anzahl ko-lokalisierter Punkte/Gesamtzahl der Punkte des synaptischen Markers (ko-lokalisiert + nicht ko-lokalisiert), z.B. [(Syn+Geph.)/gesamt Geph. ko-lokalisiert + nicht ko-lokalisiert] $\times 100$  ( $n = 30$ ). **Syp**: Synaptophysin, **Geph**: Gephyrin, **Syn**: Synapsin. Für signifikante Unterschiede wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  und \*\*\*  $P < 0,001$  festgelegt. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Maßbalken:  $10 \mu\text{m}$ .

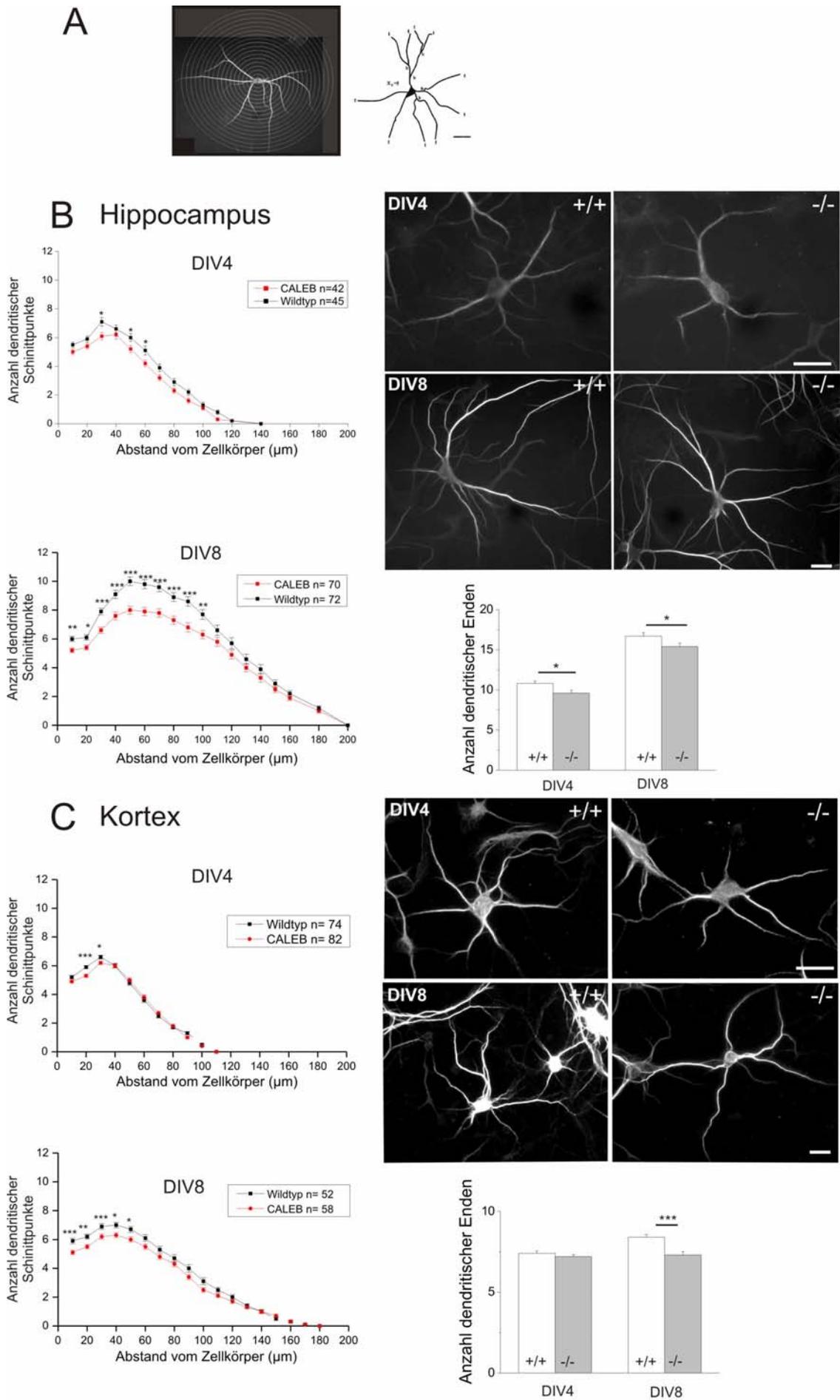
### **3.5 Analyse des Dendritenbaumes in CALEB -/- Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen**

#### **3.5.1 Analyse des Dendritenbaumes nach Immunfärbung**

Ausgehend von der Beobachtung, dass eine Überexpression von CALEB in Hippocampus-Zellkulturen zu einer erhöhten Komplexität des Dendritenbaumes und zur verstärkten Spine-Bildung führt (Brandt et al., 2007), sowie durch die in dieser Arbeit gemachten Beobachtung, dass CALEB somato-dendritisch lokalisiert ist, sollte untersucht werden, ob auch in CALEB -/- Neuronen die Dendritenmorphologie verändert ist.

Um dies zu prüfen, wurden die Dendritenbäume in Hippocampus- und in Kortex-Zellkulturen von Wildtyp und CALEB -/- Neuronen analysiert. Der Dendritenbaum wurde mit Hilfe der Immunfärbung gegen das dendritisch-lokalisierte Protein MAP2 (microtubulule-associated protein) sichtbar gemacht und mit der Fast-Sholl-Analyse ausgewertet (Abb. 16). Dazu wird die Anzahl dendritischer Schnittpunkte in Abhängigkeit zur Entfernung von Zellkörper und die Anzahl der dendritischen Endpunkte bestimmt (Abb. 16 A). Die Analyse erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung (DIV4 + DIV8).

Aus der Analyse des Dendritenbaumes bei DIV 4 und 8 sowohl in Hippocampus- als in Kortex-Zellkulturen ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Komplexität (Abb. 16 B-C), wobei sich in CALEB -/- Neuronen eine signifikant verringerte Komplexität im Vergleich zu Wildtyp Neuronen zeigte.

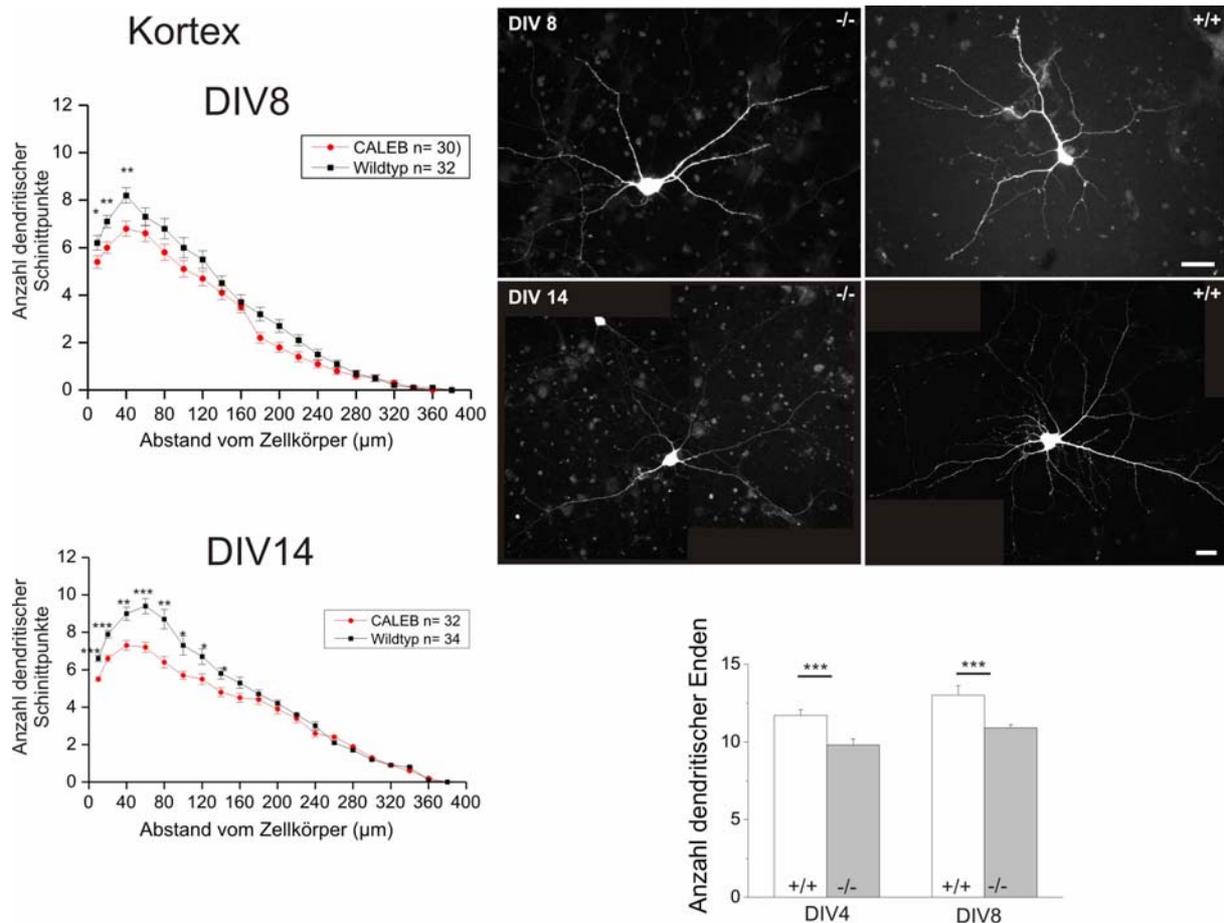


**Abb. 16: Analyse des Dendritenbaumes.**

**A:** Schematische Darstellung der Sholl Analyse modifiziert nach Gutierrez und Davies, 2007. Die Anzahl von Schnittpunkten von Dendriten mit konzentrischen Kreisen im Abstand von 10  $\mu\text{m}$  wird nach anti-MAP2 bestimmt. Des Weiteren werden die dendritischen Endpunkte (+) ermittelt. **B:** Primärkulturen hippocampaler Neurone (DIV 4 und 8) wurden mit Antikörpern gegen MAP2 gefärbt. Aus der Analyse des Dendritenbaumes ergibt sich in Hippokampus-Zellkulturen ein signifikanter Unterschied in der Komplexität. CALEB  $-/-$  Neurone zeigten eine signifikant verringerte Komplexität im Vergleich zu Wildtyp Neuronen. **C:** Primärkulturen kortikaler Neurone (DIV 4 und 8) wurden mit Antikörpern gegen MAP2 gefärbt. Auch in kortikalen Kulturen zeigen die CALEB  $-/-$  Neurone eine reduzierte Komplexität im Vergleich zu Wildtyp Neuronen. 3 verschiedenen Zellkulturen wurden verwendet. Die Analyse des Dendritenbaumes erfolgte ohne Kenntnis des Genotyps. Für signifikante Unterschiede wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  und \*\*\*  $P < 0,001$  festgelegt. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Maßbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

**3.5.2 Analyse des Dendritenbaumes nach Transfektion mit einer für EGFP kodierenden cDNA**

Da eine Analyse der Dendritenbäume in älteren Kulturen nach MAP2 Färbungen aufgrund starker Überlagerungen von Dendritenbäumen nicht möglich ist, wurden die Neurone mit einem EGFP-Expressionsvektor (pEGFP-N1, Invitrogen) transfiziert. Durch Transfektion mit EGFP ist es möglich, die Dendritenbaumstruktur auch in dichten Kulturen zu analysieren, da nur wenige Neurone EGFP-positiv sind. Weiterhin werden bei Verwendung dieser Methode auch die kleinen sekundären Verzweigungen sichtbar. Ein Nachteil besteht darin, dass nicht nur Dendriten, sondern auch Axone gefärbt sind und die Expression von einem nicht endogenen Protein den Stoffwechsel und die Morphologie der Neuronen beeinflussen könnte. Aus der Analyse des Dendritenbaumes der kortikalen Zellkultur (DIV 8 und 14) nach EGFP-Transfektion konnte eine signifikante Reduktion der Komplexität in CALEB  $-/-$  Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp Neuronen bestätigt werden (Abb. 17).



**Abb. 17: Analyse des Dendritenbaumes nach EGFP Transfektion.**

**A:** Primärkulturen kortikaler Neurone (DIV 6 und 12) wurden mit EGFP-Vektor transfiziert und 2 Tage später analysiert. CALEB  $-/-$  Neuronen zeigten eine signifikant verringerte Komplexität im Vergleich zu Wildtyp Neuronen. 3 verschiedenen Zellkulturen wurden verwendet. Die Analyse des Dendritenbaumes erfolgte ohne Kenntnis des Genotyps. Für signifikante Unterschiede wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  und \*\*\*  $P < 0,001$  festgelegt. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Maßbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

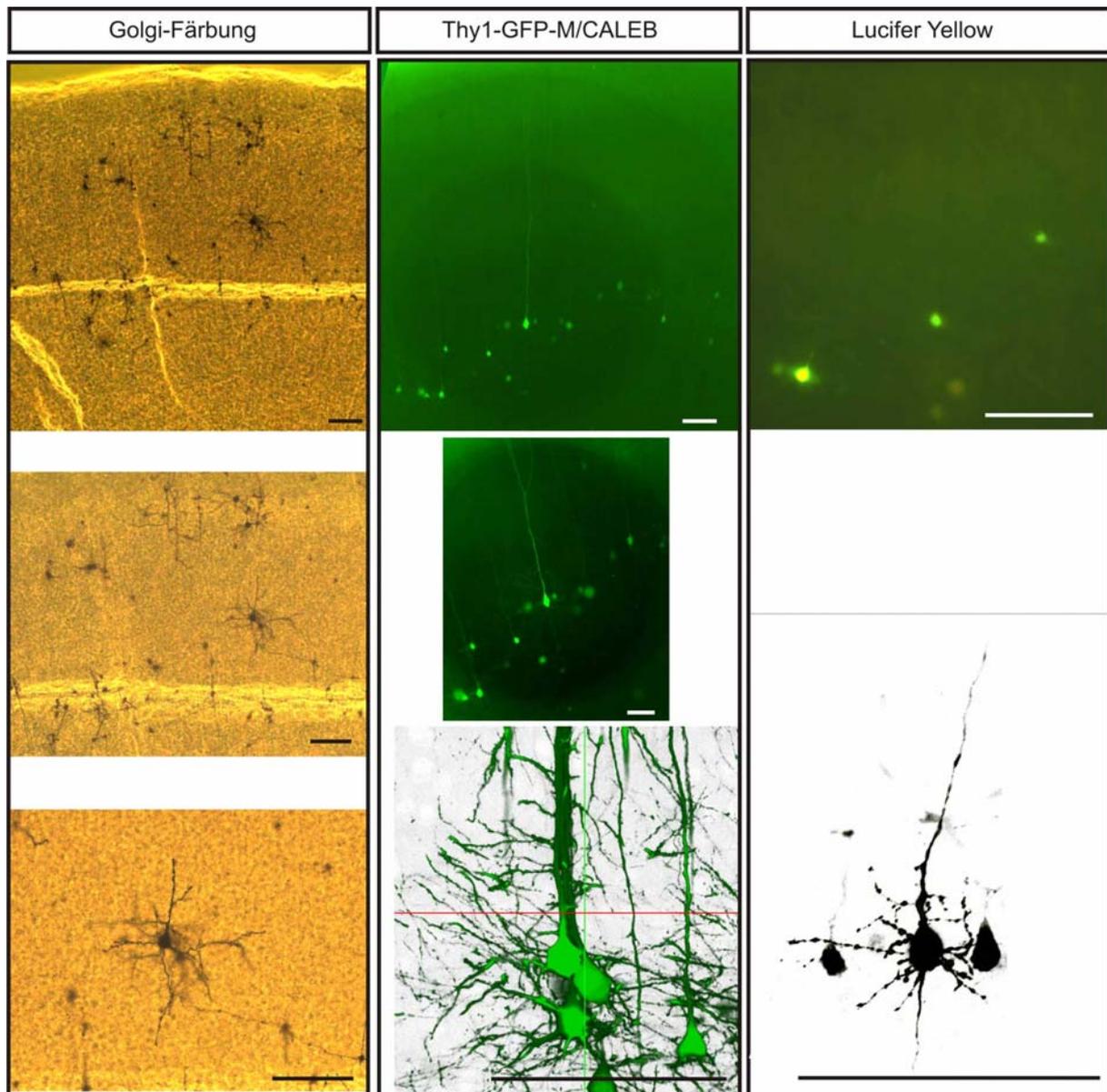
### 3.5.3. Etablierung einer Methode zur Analyse des Dendritenbaumes in CALEB $-/-$ Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen in kortikalen Hirnschnitten

Um zu prüfen, ob auch *in vivo* Veränderungen des Dendritenbaums bei Abwesenheit von CALEB vorliegen, sollten kortikale Hirnschnitte untersucht werden. Die Analyse des Dendritenbaumes soll nach Aufnahme von Bildern im konfokalen Mikroskop durch eine 3D Rekonstruktion und unter Verwendung der Fast-Sholl-Analyse erfolgen.

Aufgabe war es zunächst, eine geeignete Methode zur Darstellung des Dendritenbaums zu etablieren.

Um Neurone sichtbar zu machen, wurden drei verschiedene Methoden verglichen: Golgi-Färbung, eine transgene Mauslinie (Thy1-EGF-M) und Lucifer Yellow-Injektion (Abb. 18).

Mittels Golgi-Färbung konnten nur sehr selten einzelne Zellen abgebildet werden, da es zu Überlagerung sogar verschiedener Zelltypen kommt. Durch Kreuzung der CALEB <sup>-/-</sup> Maus mit der Thy1-GFP-M-Mauselinie (Feng et al., 2000) wurde die Thy1-EGF-M/CALEB <sup>-/-</sup> Maus erzeugt. In der transgenen Mauslinie (Thy1-EGF-M) wird EGFP unter der Kontrolle des Thy1-Gen Promoters zur Expression gebracht. Obwohl selektiv Neurone durch EGFP Expression sichtbar wurden, zeigte sich bei der Aufnahme von Bildern im konfokalen Mikroskop ebenfalls eine starke Überlagerung der Dendritenbäume sowie eine hohe Variabilität der gefärbten Zellen sogar von Tieren aus demselben Wurf. Durch die Lucifer Yellow-Injektionen (Kooperation mit Dr. Jüttner, AG Rathjen) werden auch verschiedene Zelltypen markiert, jedoch liegen die Zellen in den Aufnahmen im konfokalen Mikroskop meist einzeln vor. Somit stellt diese Methode sich als besonders geeignet dar.



**Abb. 18: Etablierung einer Methode zur Analyse des Dendritenbaumes in kortikalen Hirnschnitten.**

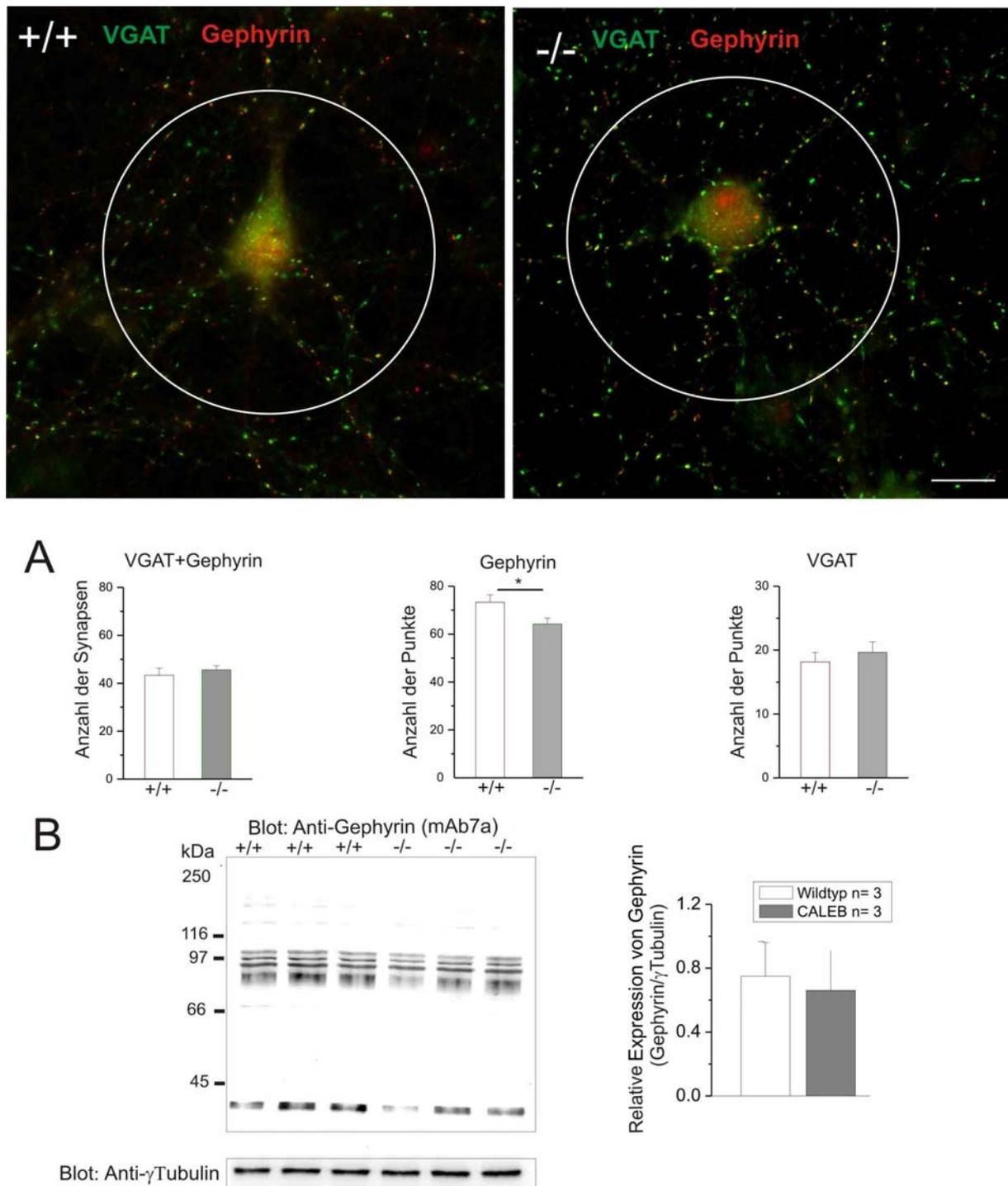
Drei verschiedene Methoden, um Neurone sichtbar zu machen, wurden verwendet: Golgi-Färbung, eine transgene Mauslinie (Thy1-EGF-M) und Lucifer Yellow-Injektion. Zunächst wurden kortikale Hirnschnitte mittels eines Vibratoms (VT1000S, Leica) gewonnen (130 – 200  $\mu\text{m}$ ) und anschließend fixiert. Die Golgi-Färbung erfolgt ausschließlich nach Herstellerangaben (FD rapid GolgiStain Kit, FD Neuro Technologies). Die Übersicht-Aufnahmen wurden am Lichtmikroskop und Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Achromplan 10x/20x 0,25 Ph, Metall-Halid-Lamp HXP120) gemacht. Die Fluoreszenzpräparate wurden an dem Mikroskop Axio Observer Z1 (Zeiss) bzw. an dem konfokalen Mikroskop Zeiss LSM 510 NLO Meta (LD LCI Plan-Apochromat 25x/0,8 Oil, zoom 2, Bildauflösung 1024x1024, z-stacks 1,5  $\mu\text{m}$  Abstand; Thy1GFP-M: Anregung durch Argonlaser bei 488 nm, BP500-550 Filter; Lucifer Yellow: Zwei-Photonen 890 nm, BP520-555 Filter) fotografiert. Die 3D Rekonstruktion wurde mittels LSM Image Browser Software (Zeiss) durchgeführt. Maßbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

#### **3.5.4. Analyse der Anzahl von Synapsen in CALEB -/- Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen**

Ausgehend von einer teilweisen Kolo-kalisation von CALEB mit synaptischen Markern und Veränderungen in der synaptischen Konnektivität (Kooperation mit Dr. Jüttner, AG Rathjen), sollte geprüft werden, ob die Anzahl der Synapsen in CALEB-defiziente Mäuse verändert ist. Es wurden Doppel-Immunfärbungen gegen prä- und postsynaptische Proteine aus GABAergen Synapsen (VGAT und Gephyrin) und glutamatergen Synapsen (VGlut1+2 und GluR2) durchgeführt (Abb. 19 - 20). Die Anzahl der ermittelten Synapsen kann man in Relation zu den elektrophysiologischen Ergebnissen diskutieren.

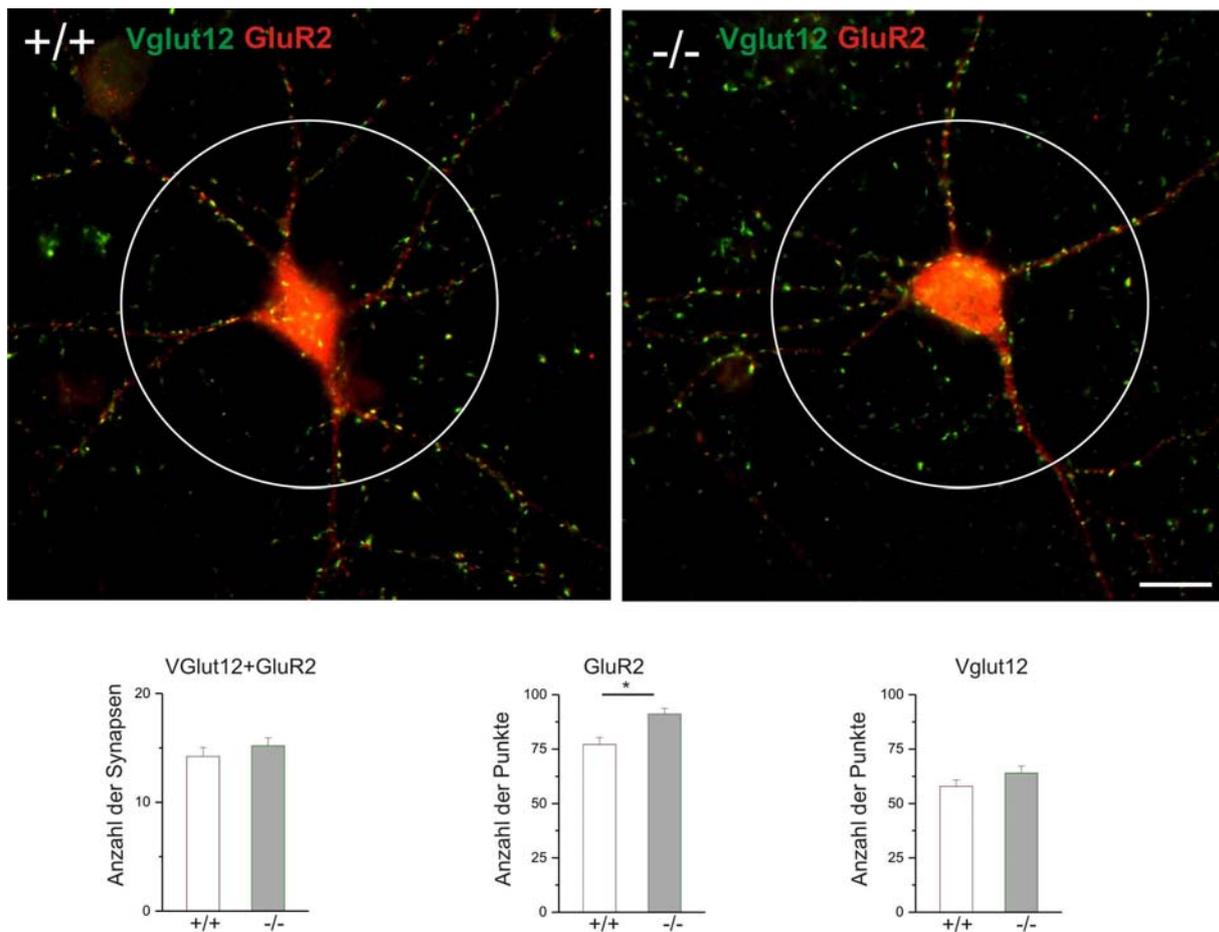
Die Doppel-Immunfärbungen GABA-erger Synapsen (VGAT und Gephyrin) in kortikalen Wildtyp und CALEB -/- Kulturen (DIV 14) zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl von GABAergen Synapsen. Auch die Anzahl der Punkte präsynaptischer Marker (VGAT) ist unverändert, jedoch konnte eine reduzierte Anzahl der Punkte postsynaptischer Marker (Gephyrin) in CALEB -/- Kulturen festgestellt werden (Abb. 19). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Gesamt-Gephyrin in CALEB -/- niedriger ist, aber nicht das in Synapsen lokalisierte Gephyrin, d.h. der in Synapsen lokalisierte Anteil von Gephyrin ist in der CALEB -/- Kultur höher als in der Wildtyp Kultur. Zusätzlich konnte durch Western Blotting eine tendenziell reduzierte Menge von Gephyrin in CALEB -/- beobachtet, jedoch stat nicht signifikant (Abb. 19 B).

Glutamaterge Synapsen wurden gegen VGlut1+2 und AMPA-Rezeptoren gefärbt. Auch bei den glutamatergen Synapsen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl. Die Anzahl von Punkten des postsynaptischen Markers (AMPA) ist in CALEB -/- Kulturen höher als in Wildtyp Kulturen (Abb. 20). Da die Anzahl der Synapsen unverändert ist, die AMPA-positiven Punkte aber erhöht sind, ist anzunehmen, dass mehr AMPA-Rezeptoren außerhalb von Synapsen in CALEB -/- Kulturen vorhanden sind (Abb. 20).



**Abb. 19: Analyse der Anzahl von GABAergen Synapsen in CALEB  $-/-$  Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen**

**A:** Primärkulturen kortikaler Neurone (DIV 14) wurden mit Antikörpern gegen VGAT (präsynaptischer Marker) und Gephyrin (postsynaptische Marker) gefärbt. Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl von GABAergen Synapsen und des präsynaptischen Markers, jedoch ist die Anzahl des postsynaptischen Markers (Gephyrin) in CALEB  $-/-$  Kulturen niedriger im Vergleich zu Wildtyp Kulturen. Dieses Experiment wurde in 3 verschiedenen Zellkulturen ohne Kenntnis des Genotyps durchgeführt (WT n= 26, CALEB  $-/-$  n= 31). **B:** Die Lysate des Kortex von Mäusen (P15) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und der Blot mit dem Gephyrin-Antikörper (mAb7a) und einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper entwickelt. Die Intensität der Gephyrin-Banden wurde mit der  $\gamma$ -Tubulin-Bande normalisiert. In CALEB  $-/-$  Lysaten zeigte sich eine tendenziell, jedoch nicht signifikant verringerte Bande. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der linken Seite des Blots angegeben. Für die Auswertung von Ko-Lokalisation von prä- und postsynaptischen Terminalien wurde ein Bereich mit einem Durchmesser von 100  $\mu$ m herangezogen. Das Soma der betrachteten Zelle lag im Zentrum dieses Bereichs. Maßbalken: 20  $\mu$ m.



**Abb. 20: Analyse der Anzahl von glutamatergen Synapsen in CALEB  $-/-$  Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen.**

**A:** Primärkulturen kortikaler Neurone (DIV 14) wurden mit Antikörpern gegen VGlut1+2, einem präsynaptischen Marker, und AMPA (GluR2 Untereinheit), einem postsynaptischen Marker, gefärbt. Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl von glutamatergen Synapsen. Auch die Anzahl des präsynaptischen Markers war unverändert, jedoch zeigte sich eine Erhöhung in der Anzahl von Punkten des postsynaptischen Markers (AMPA) in CALEB  $-/-$  Kulturen im Vergleich zu Wildtyp Kulturen. Dieses Experiment wurde in 3 verschiedenen Zellkulturen ohne Kenntnis des Genotyps durchgeführt. (WT  $n=50$ , CALEB  $-/-$   $n=45$ ). Für die Auswertung von Ko-Lokalisation von prä- und postsynaptischen Terminalien wurde ein Bereich mit einem Durchmesser von  $100\ \mu\text{m}$  herangezogen. Das Soma der betrachteten Zelle lag im Zentrum dieses Bereichs. Maßbalken:  $20\ \mu\text{m}$ .

### 3.6. Untersuchungen zur Phosphorylierung von CALEB

Ausgehend von der Annahme, dass CALEB die Komplexität des Dendritenbaumes über die PI3K-Akt-mTOR und PKC Signalkaskade beeinflusst (Brandt et al., 2007; Nakanishi et al., 2006), wurde geprüft, ob dieser Mechanismus durch eine Phosphorylierung von CALEB vermittelt wird.

In unserem Labor konnte bereits eine zytoplasmatische Phosphorylierungsstelle von CALEB durch Aufreinigung des Proteins und anschließende Proteinsequenzierung identifiziert werden (Prof. Rathjen, unpubliziert). Ausgehend von diesem Ergebnis wurden verschiedene

Phosphomotiv-Antikörper gegen die Phosphorylierungsmotive von PKC (R/K)X(R/K)(S\*)(Hyd)(R/K) und Akt (R/K)X(R/K)XX(T\*/S\*) verwendet (Abb. 21).

Die Phosphorylierungsstelle der zytoplasmatischen Domäne von CALEB enthält dieselben Phosphorylierungsmotive von Akt und PKC. Aufgrund dieser besonderen Bedeutung wurden Lysate von kortikalen Zellkulturen DIV 30 Wildtyp und CALEB *-/-* analysiert. Aus dem Lysat von behandelten und unbehandelten Kulturen (Aktivatoren: BDNF und PMA; und Inhibitoren: LY29002 und GF109203X von Akt und PKC) wurden sowohl das Gesamtprotein, als auch das immunpräzipitierte Protein von Wildtyp und CALEB *-/-* Zellkulturen in einem Gel aufgetragen.

**Abb. 21: Untersuchungen zur funktionellen Phosphorylierung von CALEB und Beteiligung an intrazellulären Signalkaskaden**

**A:** Aminosäuresequenz des zytoplasmatischen Segments von mCALEBa. Die Phosphorylierungsstelle des Serins an Position 467 (\*) wurde durch Massenspektrometrie in der Arbeitsgruppe Rathjen identifiziert. Eine weitere putative Phosphorylierungsstelle eines Threoninrestes an Position 460 ist durch ein (\*) gekennzeichnet (die potentiellen Phosphorylierungsstellen der zytoplasmatischen Domäne von CALEB für Akt und PKC).

**(B-C): Zur** Untersuchung der Phosphorylierung von CALEB durch Akt und PKC wurde in Lysaten von kortikalen Zellkulturen DIV 30 Wildtyp und CALEB *-/-* analysiert. Die Lysate von behandelten und unbehandelten Kulturen [(BDNF – 20 ng/ml, 20 min, oder PMA – 50 ng/ml, 20 min) oder den Inhibitoren (LY29002 – 50 µM, 1 h und GF109203X – 50 ng/ml 1h)] wurden in der SDS-PAGE (4 – 15 %) aufgetrennt, transferiert und mit dem Phosphomotiv-Antikörper gegen die Phosphorylierungsmotive von PKC (R/K)X(R/K)(S\*)(Hyd)(R/K), Akt (R/K)X(R/K)XX(T\*/S\*) und CALEB-Antikörper (3-2G10) analysiert. Die Immunpräzipitation von CALEB erfolgt mit mAb8-1B8, um zu testen, ob das CALEB Protein phosphoryliert wird. Im selben Blot wurden die CALEB-Banden mit den Banden unterschiedlicher phosphorylierter Proteine verglichen. Der gleiche Vorgang wurde für Akt und PKC durchgeführt. Unter Verwendung spezifischer Phosphomotiv-Antikörper kann keine Bande als phosphoryliertes CALEB erkannt werden. Das Vorhandensein von CALEB Protein wurde nach Chondroitinase ABC Behandlung analysiert. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der rechten Seite des Blots angegeben. (\*\*) deuten die schwere und leichte Kette des Antikörpers an.

A

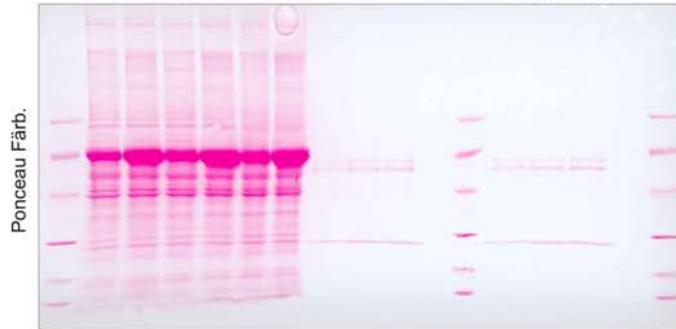
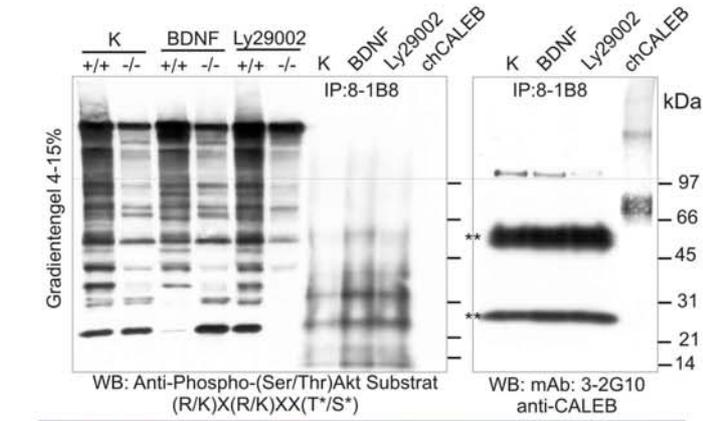
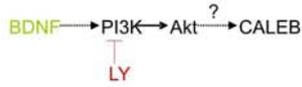
**CALEB Maus zytoplasmatische Domäne**

(447) LYLL KTENTKLRRT NKFRTPSELH NDNFSLSTIA EGSHPNVRKF CDTPRVSSPH (500)

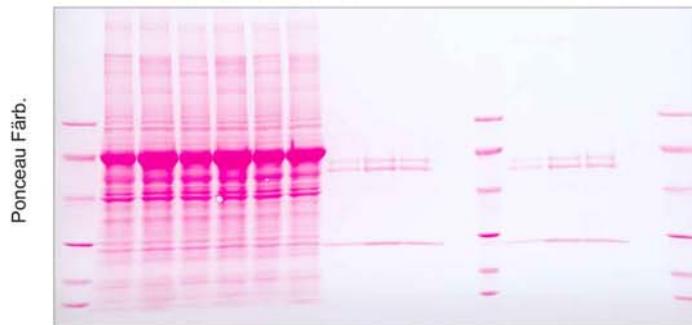
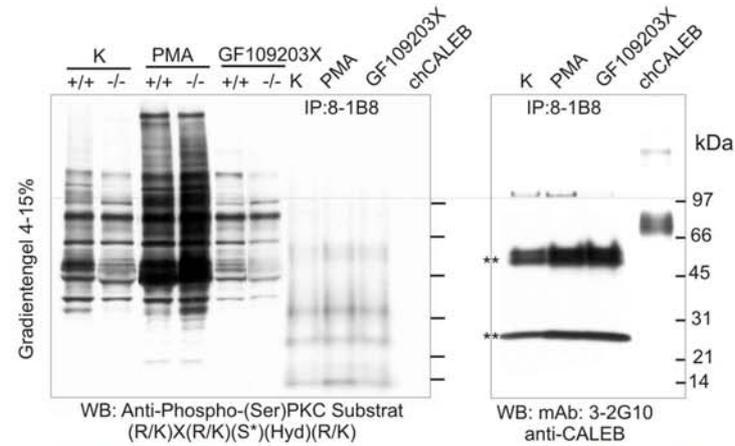
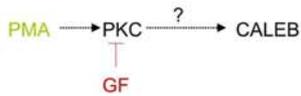
\* \* \*

ARALAHYDNI VCQDDPSAPH KIQDPLKSRL KEEESFNIQN SMPKLEGGK GDQDDLGVNC LQNNLT (566)

B



C



Unter Verwendung spezifischer Phosphomotiv-Antikörper konnte jedoch bisher keine Bande als phosphoryliertes CALEB erkannt werden. Schlußfolgernd lässt sich sagen, dass entweder die Phosphomotiv-Antikörper die Phosphorylierungsstelle von CALEB nicht erkennen (d.h. der Antikörper ist nicht genügend sensitiv), oder dass CALEB durch eine andere Kinase phosphoryliert wird.

### 3.7. Untersuchung zur Prozessierung von CALEB

Ausgehend von der Beobachtung, dass nicht-glycosyliertes CALEB aus einer ca. 120 kDa großen Form in eine kürzere, membranständige Form (ca. 38 kDa) mit einer frei zugänglichen EGF Domäne umgewandelt wird (Jüttner et al., 2005), wurde im folgenden Experiment ein Versuchmodell etabliert, um diese Umwandlung zu untersuchen.

Die Kenntnisse über die verantwortliche Protease und den Mechanismus der Umwandlung ermöglichen Schlussfolgerungen über den Einfluss neuronaler Aktivität auf die Struktur von CALEB.

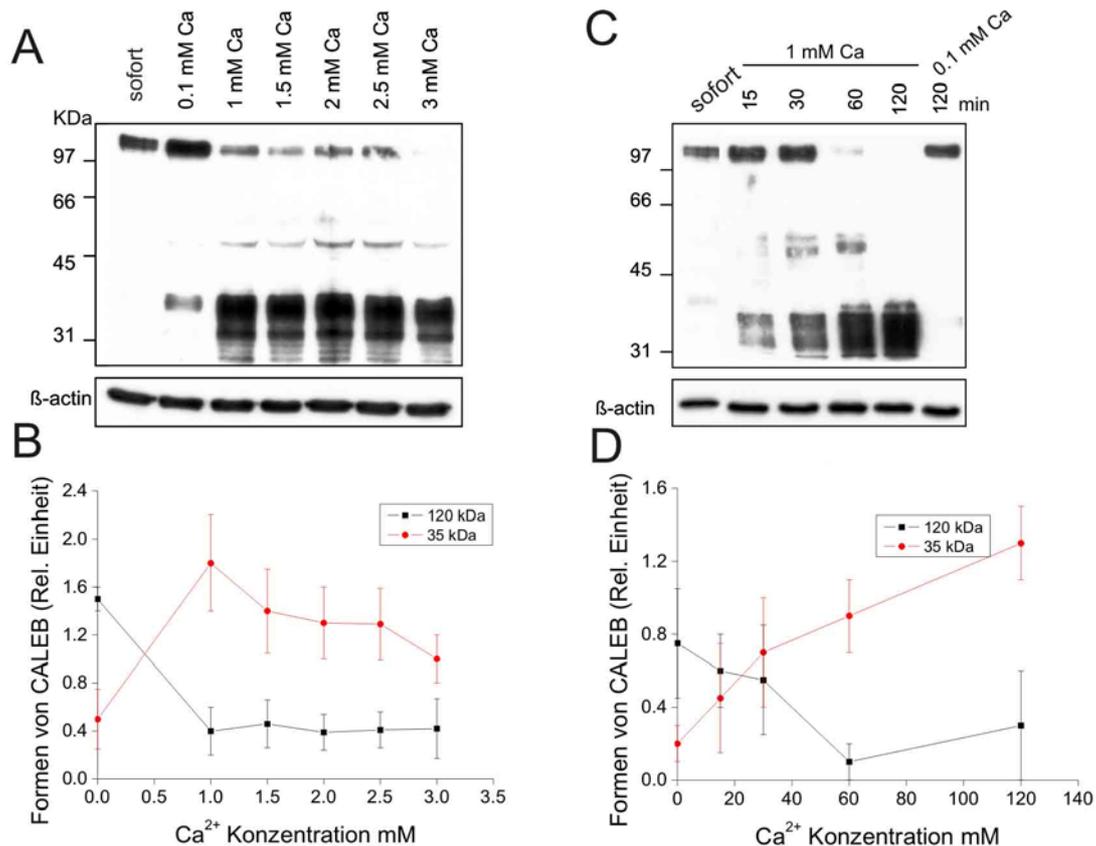
Um die Frage zu klären, welche Protease für die Prozessierung von CALEB verantwortlich ist, wurde ein neuer Versuchsaufbau gewählt, bei dem die Untersuchungen nicht wie bisher an neuronalen Zellkulturen (Jüttner et al., 2005), sondern an akuten, kortikalen Hirnschnitten durchgeführt werden. Hierbei wurden akute Hirnschnitte (1 mm dick) entweder sofort auf das Vorhandensein verschiedener Formen von CALEB analysiert oder 10 min bis 2 Stunden unter verschiedenen Bedingungen inkubiert.

Die Analyse verschiedener Formen von CALEB erfolgte durch Western Blotting unter Verwendung eines monoklonalen anti-CALEB Antikörpers, welcher die zytoplasmatische Domäne von CALEB erkennt (Abb 22).

Um dieses Versuchmodell zu testen, wurde zunächst die Umwandlung von CALEB in Abhängigkeit zur Inkubationszeit und der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration untersucht (Abb. 22).

Die WB-Analyse von kortikalen Hirnschnitten zeigt, dass die Prozessierung von CALEB ab 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  sehr deutlich festgestellt werden kann, d.h. die große Form von CALEB (ca. 120 kDa) nimmt ab und eine Bande von ca. 38 kDa entsteht (Abb. 22 A-B). Diese Prozessierung nimmt mit der Inkubationszeit zu (Abb 22 C-D).

Berücksichtigend, dass die Prozessierung von CALEB  $\text{Ca}^{2+}$ - und Zeit-abhängig ist, wurde die proteolytische Umwandlung in Anwesenheit verschiedenener Protease-Inhibitoren durchgeführt (Abb. 23). Die hier getesteten Protease-Inhibitoren blockieren alle Familien von Proteasen: Serin-Proteasen, Cystein-Proteasen, Aspartat-Proteasen und Metallo-Proteasen.

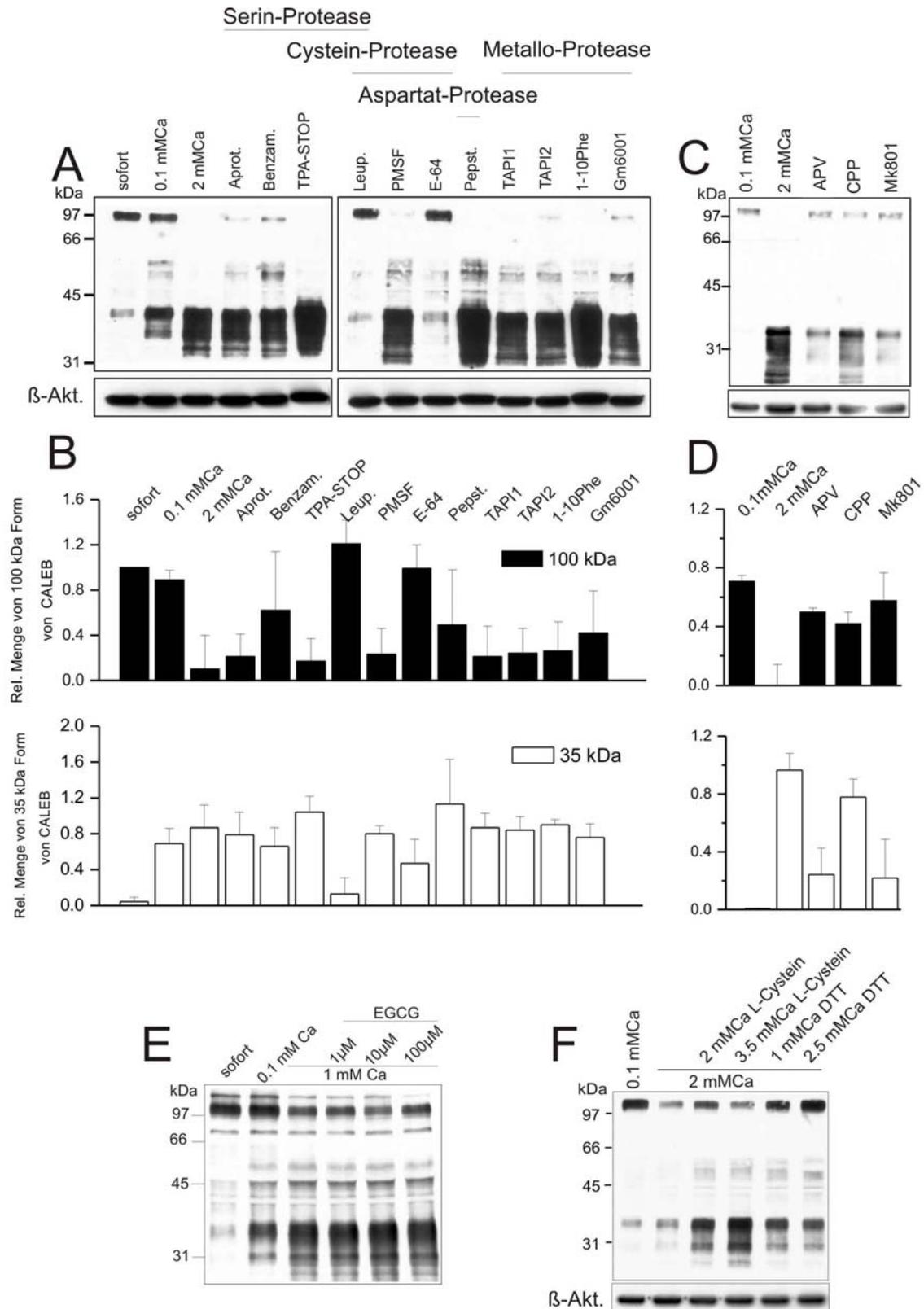


**Abb. 22: Untersuchung zur Prozessierung von CALEB**

Lysate von akuten Kortex-Schnitten (1 mm dick) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels WB-Analyse (CALEB-Antikörper 3-2G10) untersucht. **A-B:** mit Steigerung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ist eine Abnahme der großen Form (ca. 120 kDa) und eine Zunahme der kürzeren Form von CALEB (ca. 38 kDa) zu erkennen. **C-D:** Mit fortschreitender Inkubationszeit nimmt die Umwandlung zu. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Das Vorhandensein von CALEB wurde nach Chondroitinase ABC Behandlung analysiert. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der linken Seite des Blots angegeben

Bei kortikalen Hirnschnitten konnte durch Zugabe verschiedener Protease-Inhibitoren der Kandidatenkreis der verantwortlichen Proteasen auf eine Cystein/Serin-Protease eingengt werden. Besonders effektiv konnte die Umwandlung von CALEB durch Leupeptin, ein Cystein/Serin Protease Inhibitor, und E64, ein Cystein Protease-Inhibitor, verhindert werden (Abb. 23 A). Weiterhin konnte durch Zugabe von L-Cystein eine Abnahme der großen Form (ca. 120 kDa) und eine Zunahme der kürzeren Form von CALEB (ca. 38 kDa) festgestellt (Abb. 23 F). L-Cystein ist ein Aktivator von Cystein Proteasen.

Um den Einfluss neuronaler Aktivität auf die Struktur von CALEB zu ergründen, wurden verschiedene Blocker gegen Glutamat-Rezeptoren getestet (Abb. 23 C-D). Durch diese Hemmung (APV, CPP und Mk801) wurde die Umwandlung von CALEB in eine kurze membranständige Form verhindert.



**Abb. 23: Untersuchung zur Prozessierung von CALEB durch verschiedene Protease-Inhibitoren**

Lysate von akuten Kortex-Schnitten (1 mm dick) wurden mittels SDS-PAGE und WB (CALEB-Antikörper 3-2G10) untersucht. Die Inkubation erfolgte durch Begasung bei Raumtemperatur für 2 Stunden. **A-B:** Durch Verwendung von verschiedenen Protease-Inhibitoren ist zu erkennen, dass Leupeptin und E-64 die proteolytische Umwandlung von CALEB verhindern können. **C-D:** mit Hemmung von Glutamat-Rezeptoren durch APV, CPP und Mk801 wurde die Umwandlung von CALEB in eine kurze membranständige Form verhindert. **E:** (-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG), ein Metalloprotease-Inhibitor, wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, um die Umwandlung von CALEB zu analysieren. Dieser Inhibitor kann nicht die Prozessierung von CALEB verhindern. **F:** mit Steigerung der L-Cystein Konzentration ist eine Abnahme der

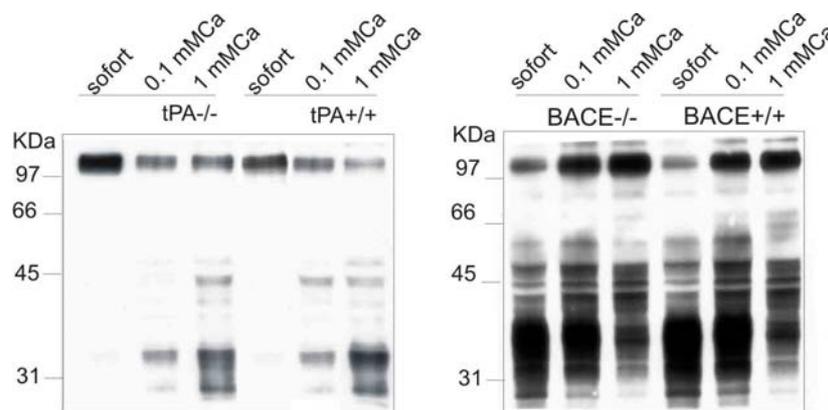
großen Form (ca. 120 kDa) und eine Zunahme der kürzeren Form von CALEB (ca. 38 kDa) zu erkennen. L-Cystein und DTT sind Aktivatoren von Cystein Proteasen. Die Inkubation erfolgte durch Begasung bei Raumtemperatur für 30 min. Das Vorhandensein von CALEB wurde nach Chondroitinase ABC Behandlung analysiert. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der linken Seite des Blots angegeben.

Mit diesem Modell konnte gezeigt werden, dass eine Cystein oder Serinprotease für die Umwandlung verantwortlich ist (Abb. 23 A-B.), wobei eine Hemmung von Glutamat-Rezeptoren die Prozessierung von CALEB in eine kurze membranständige Form partiell verhindert (Abb. 23).

Um Metallo-Proteasen als Möglichkeit auszuschließen, wurde EGCG ((-)-Epigallocatechin Gallate), ein Metallo-Protease Inhibitor getestet (Abb. 23). Dieser Inhibitor kann nicht die Prozessierung von CALEB verhindern.

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen kann angenommen werden, dass auch Tissue-Plasminogen-Activator (tPA), eine Serin-Protease, welche Plasmin aus Plasminogen spaltet, die Umwandlung von CALEB fördert. Als Versuchsmodell wurden hier tPA-defiziente Mäuse verwendet (Abb 24). Aus den Untersuchungen geht hervor, dass tPA jedoch nicht an der Umwandlung von CALEB beteiligt ist, da in der tPA Knockout Maus, welche keine aktive tPA Protease enthält, alle Formen von CALEB auftreten.

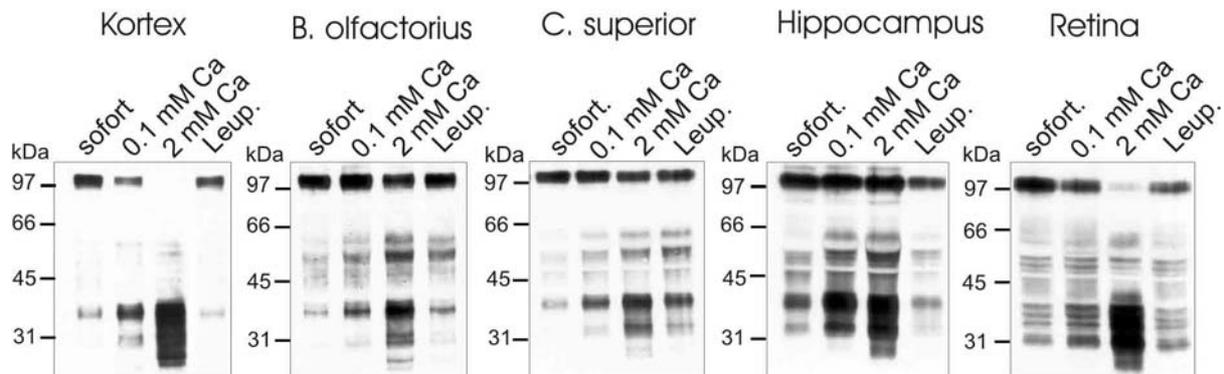
Als weiterer Kandidat für die Umwandlung von CALEB wurde BACE1 (beta-site-amyloid precursor protein-cleaving enzyme1), eine  $\beta$ -Secretase, getestet. Diese Aspartat-Peptidase prozessiert Neureguline, zu deren Gruppe auch CALEB zählt (Willem et al., 2006). Für diese Untersuchungen wurden BACE1-defiziente Mäuse verwendet (Abb 24). Unsere Ergebnisse zeigen, dass auch BACE nicht an der Umwandlung von CALEB beteiligt ist.



**Abb. 24: Untersuchung zur Prozessierung von CALEB in Knockout Maus Linien.**

Als Versuchsmodell wurden bei Knockout Mäusen (tPA Knockout Maus und BACE Knockout Maus) die Umwandlung von CALEB getestet. Lysate von akuten Kortex Schnitten (1 mm dick) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und WB (CALEB-Antikörper 3-2G10) untersucht. Die Inkubation erfolgte durch Begasung bei RT für 2 h. In beiden Knockout Mäusen findet die Umwandlung von CALEB in eine kurze membranständige Form statt. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der linken Seite des Blots angegeben.

Weiterhin wurde die Prozessierung von CALEB in verschiedenen Hirnregionen untersucht (Abb. 25). Die Umwandlung von CALEB in eine kurze, membranständige Form erfolgt in allen untersuchten Hirnregionen.



**Abb. 25: Untersuchung zur Prozessierung von CALEB in verschiedenen Hirnregionen.**

Lysate von akuten Kortex-Schnitten (1 mm dick) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und der Blot mit dem CALEB-Antikörper (3-2G10) und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper entwickelt. Die Inkubation wurde durch Begasung bei Raumtemperatur für 2 Stunden durchgeführt. Leupeptin wurde als Proteinase Inhibitor verwendet. Die Umwandlung von CALEB wurde in allen Hirnregionen festgestellt. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der linken Seite des Blots angegeben

Abschließend kann festgestellt werden, dass CALEB in allen untersuchten Hirnregionen durch eine Cystein/Serin-Protease prozessiert wird und diese Umwandlung durch neuronale Aktivität beeinflusst wird.

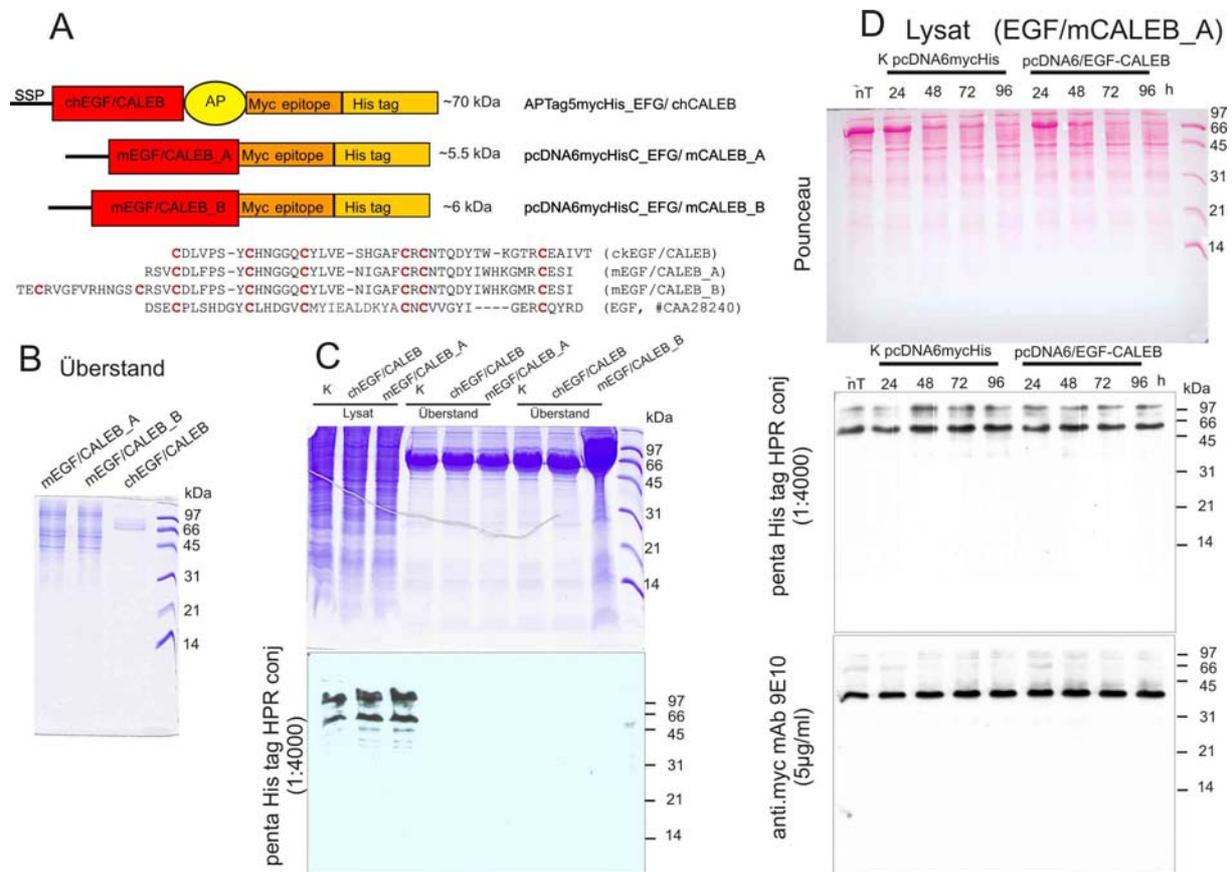
### 3.8. Untersuchung zur Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren durch die EGF-Domäne von CALEB

Die proteolytische Umwandlung von CALEB zu einer verkürzten Plasmamembran-assoziierten Form mit einer frei zugänglichen EGF Domäne lässt vermuten, dass CALEB als juxtacrines Signaltransduktionsystem zwischen benachbarten Neuronen wirken kann. Diese Interpretation setzt ein Rezeptorprotein voraus. Von anderen Mitgliedern der EGF Familie ist bekannt, dass diese ErbB-Rezeptoren phosphorylieren.

Um die Frage zu klären, ob auch die EGF Domäne von CALEB an ErbB-Rezeptoren bindet und eine Phosphorylierung induzieren kann, wurde die EGF-Domäne an verschiedenen Karzinomzelllinien (MDA-MD 231, MDA-MD 453, T47D), die Tyrosinkinaserezeptoren (ErbB1, 2, 3 oder 4) enthalten, getestet.

Zunächst wurden für diese Versuche unterschiedlich hergestellte EGF Domänen verwendet: (a) rekombinant hergestellte EGF-Domänen und (b) Aufreinigung von CALEB aus embryonalen Hühneraugen.

Die EGF-Domäne von CALEB wurde durch Expressionsklonierung (pcDNA6/myc-HisC und APTag5/myc-His) in COS7-Zellen versucht herzustellen (Abb. 26). Alle Konstrukte enthalten ein Signalpeptid, so dass die synthetisierten Proteine in den Kulturüberstand sezerniert werden.



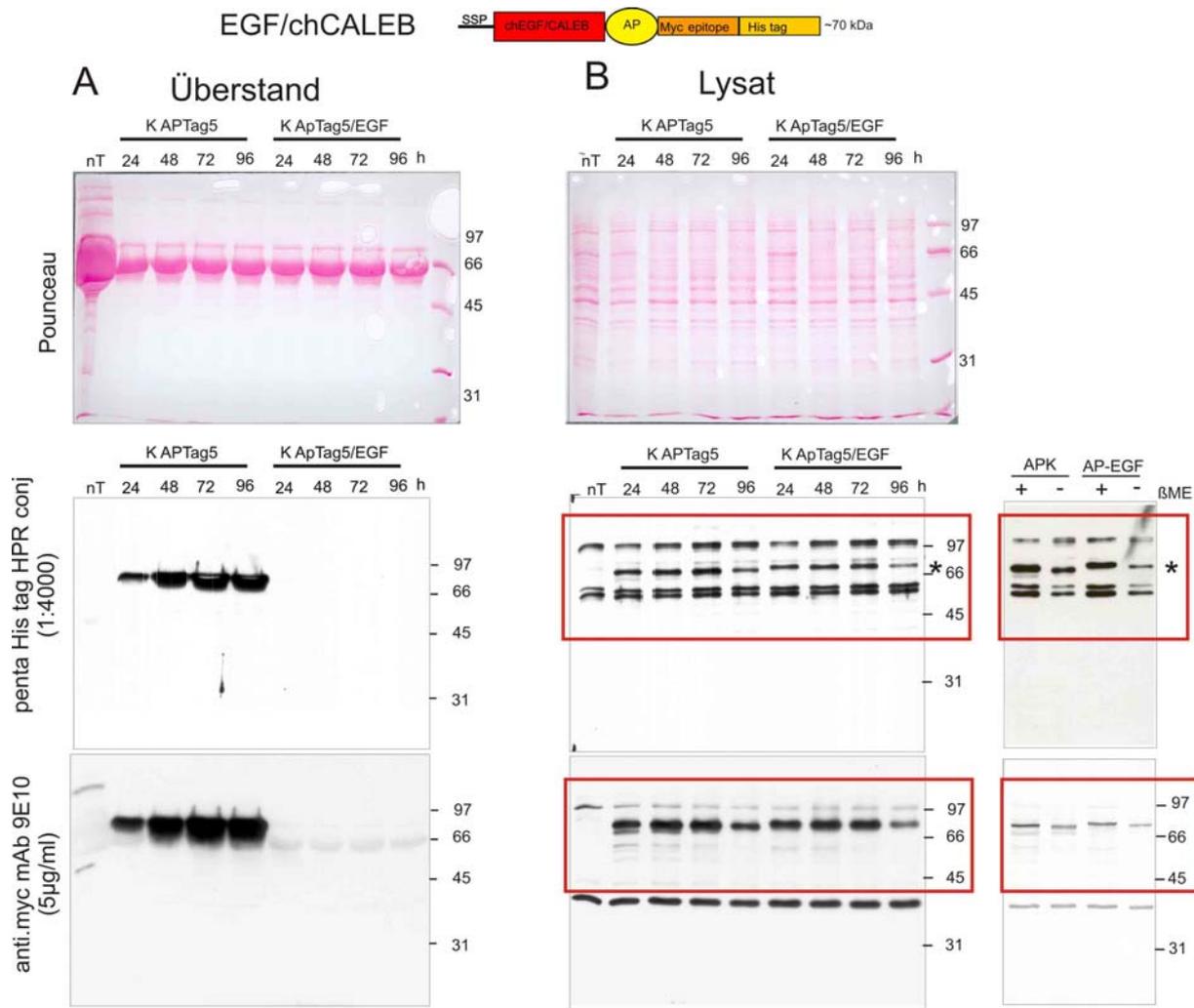
**Abb. 26: Unterschiedlich hergestellte EGF Domänen als rekombinantes Protein**

**A:** Schematische Darstellung von verschiedenen Konstrukten der CALEB EGF-Domäne und Vergleich der entsprechenden Proteinsequenzen von Maus, Hühn und huEGF-Domänen (GenBank #CAA28240, *Homo sapiens* – „epidermal growth factor“). **B-D:** Eukaryotische Herstellung und Reinigung von der CALEB EGF-Domäne; **B:** Überstände transfizierter COS-7 Zellen (mit der EGF-Domäne von mCALEB bzw. chCALEB). Das jeweilige Konstrukt konnte mittels Coomassie-blue-Färbung nicht nachgewiesen werden. **C:** Lysat und Überstand der verschiedenen COS-7 Zellen. 15 % SDS-PAGE mit anschließender WB-Analyse. Die jeweiligen CALEB EGF-Domänen konnten ausschließlich im Lysat detektiert werden. **D:** WB-Analyse nach 15 % SDS-PAGE des mCALEB EGF-Lysates neben Kontroll-Lysat (mit leerem Vektor transfizierte Zellen). Durch beide Antikörper (penta His tag-Antikörper sowie anti-myc mAb9E10) konnte kein Protein im Lysat mit der Größe der mEGF/CALEB Domäne detektiert werden. Das Konstrukt pcDNA6mycHisC enthält ein Signalpeptid, so dass hergestelltes Protein in den Überstand sezerniert werden sollte. Die Abwesenheit von CALEB im Überstand und Zelllysat könnte als Folge einer veränderten Proteinfaltung von CALEB im endoplasmatischen Reticulum erklärt werden. **SSP:** Signalpeptid, **AP:** alkalische Phosphatase, **nT:** nicht Transfiziert. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der rechten Seite des Blots angegeben.

Die Expressions der EGF-Domäne (EGF/mCALEB\_A) als auch der EGF-Domäne mit zusätzlich 14 Aminosäuren in Richtung des N-Terminus (EGF/mCALEB\_B) in COS-7 Zellen war jedoch nicht erfolgreich (Abb. 26 B-D). Die Abwesenheit der EGF Domäne von CALEB

im Überstand und in der Lysat-Fraktion der Zellen könnte als Folge einer inkorrekten Proteinfaltung von CALEB im endoplasmatischen Reticulum erklärt werden.

Hingegen wurde die Expression der Hühner CALEB EGF-Domäne (EGF/chCALEB) wenigstens in dem Zelllysate nachgewiesen (Abb. 27). Eine kleinere Bande als die entsprechende Größe der CALEB EGF-Domäne mit der alkalischen Phosphatase (AP) wurde in der Kontrolle (AP-Fusionsprotein allein transfiziert) detektiert. Aus diesem Grund lässt sich vermuten, dass eine Fehlfaltung von CALEB im endoplasmatischen Reticulum oder eine Störung des Transfers durch die Plasmamembran die Sekretion verhindert. Um dies zu untersuchen, wurde getestet, ob ein verändertes Wanderungsverhalten unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen vorliegt. Die Änderung der apparenten Masse mit der entsprechenden Größe wurde nur in der Probe der CALEB EGF-Domäne und nicht in dem AP Fusionsprotein allein (Kontrolle) nachgewiesen. Das Auffinden von CALEB in der Lysat-Fraktion könnte als Folge eines sofortigen Abbaus der CALEB EGF-Domäne erklärt werden, so dass die Sekretion möglicherweise verhindert wird.



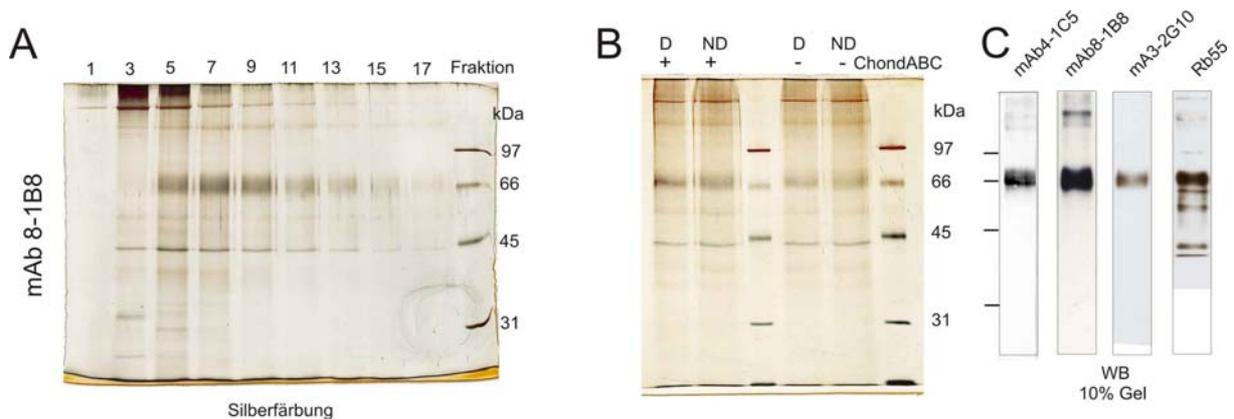
### Abb. 27: Eukaryotische Herstellung der EGF-Domäne von chCALEB

**A:** Überstand von mit EGF von chCALEB (chEGF/CALEB) transfizierten COS-7 Zellen. Die CALEB EGF Domäne wurde nicht im Überstand durch Coomassie-blue-Färbung nachgewiesen. Jedoch wurde mit dem penta His tag-Antikörper und anti-myc mAb9E10 Antikörper, die das AP-Fusionsprotein mit His und myc allein erkennen, in der Kontroll-Transfektion (Konstrukt APTag5mycHis) detektiert. **B:** Das Lysat der eukaryotischen Herstellung der CALEB EGF-Domäne wurde mittels 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und durch WB-Analyse untersucht. Eine Bande mit der entsprechenden Größe der CALEB EGF-Domäne konnte detektiert werden. In untransfizierten Zellen kommt diese nicht vor. Das aufgereinigte Lysat wurde unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen in einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und der Blot mit dem penta Histag-Antikörper bzw. anti-myc mAb9E10 Antikörper und mit einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper entwickelt. Eine entsprechende Veränderung der apparenten Masse konnte lediglich auf Höhe des CALEB EGF-Konstruktes nachgewiesen werden. Die Probe mit leerem Vektor zeigt kein verändertes Wanderungsverhalten. Das Auffinden von CALEB in der Lysat-Fraktion könnte als Folge eines sofortigen Abbaus der CALEB EGF-Domäne erklärt werden, so dass die Sekretion möglicherweise verhindert wird. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der rechten Seite des Blots angegeben

Natives CALEB wurde es aus einer Plasmamembranpräparation und anschließender Affinitätschromatographie mit einem monoklonalen Antikörper gegen das zytoplasmatische Segment von CALEB (mAb8-1B8) isoliert (Abb. 28).

Eine sehr deutlich erkennbare Bande mit der entsprechenden Größe des nativen CALEB (~ 80 kDa und 140 kDa) konnte (Abb 28 A-B) mit verschiedenen Antikörpern gegen CALEB

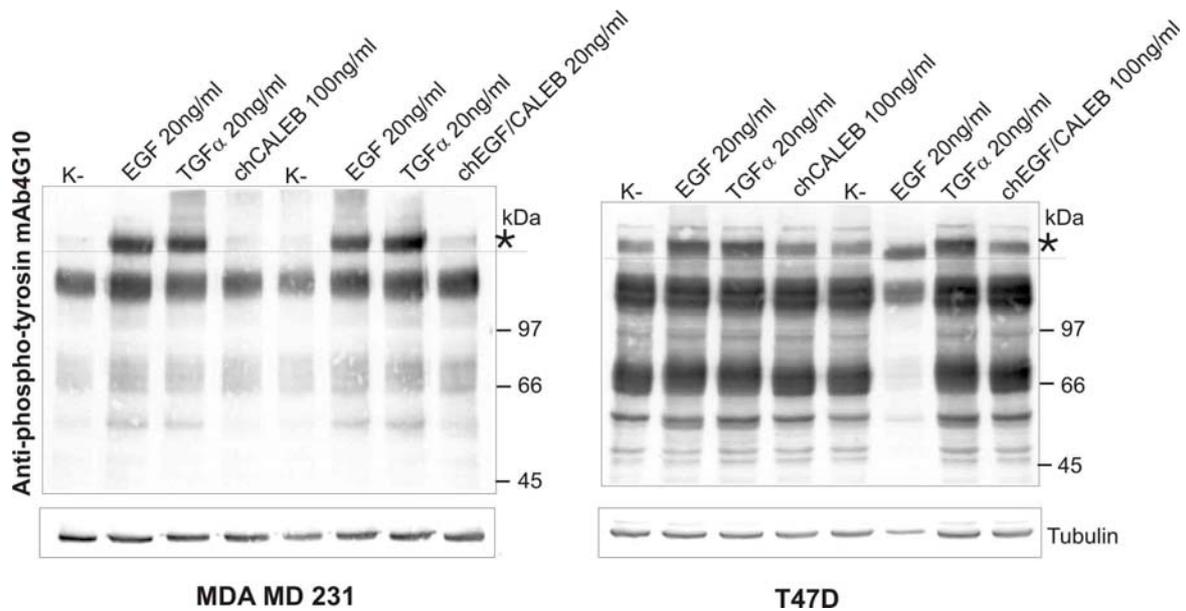
nachgewiesen werden (Abb. 28 C). Die am stärksten konzentrierte Fraktion wurde in Kooperation mit Dr. Otto (MDC) per ESI-MS als CALEB identifiziert (Abb 30; Tabelle I).



**Abb. 28: Aufreinigung von CALEB aus Hühneraugen**

CALEB lässt sich durch Affinitätschromatographie (mAb 81B8 und mAb 4-1C5) aus Plasmamembranen embryonaler Hühneraugen anreichern. **A:** Die Säulen wurden mit vier Säulenvolumina gewaschen und mit 0,1 M DEA pH 11,5/ 0,1 % CHAPS eluiert. Anschließend erfolgte eine Fraktionierung nach Volumen (zu je 1 mL). Einige Fraktionen (jede zweite) wurden mittels SDS-PAGE gefolgt von einer Silbernitratfärbung untersucht. **B:** Die jeweils am stärksten konzentrierte Fraktion wurde (mit (+) und ohne (-) Chondroitinase ABC Behandlung) durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Behandlung und nicht-Behandlung der Fraktionen führte zu keinem Unterschied im Laufverhalten. So konnte bestätigt werden, dass CALEB im embryonalen Stadium der Hühnchen Retina sehr wenig oder nicht glycosyliert ist. **C:** Die jeweils am stärksten konzentrierte Fraktion wurde nach Chondroitinase ABC Behandlung durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit verschiedenen Antikörpern gegen CALEB analysiert. Eine Bande von 80 kDa wurde durch alle Antikörper detektiert. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der rechten Seite der Gele angegeben. **D:** dialysiert, **ND:** nicht dialysiert.

Um zu testen, ob die EGF Domäne von CALEB Tyrosinkinaserzeptoren phosphorylieren kann, wurden die unterschiedlichen Karzinomzelllinien mit den verschiedenen EGF-Domänen behandelt. Anschließend wurde die Phosphorylierung der ErbB-Rezeptoren analysiert. Als Kontrolle wurde die Phosphorylierung der Tyrosinkinaserzeptoren durch EGF (Sigma) und TGF $\alpha$  (Sigma) durchgeführt (Abb. 29).



**Abb. 29: Keine Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren durch die EGF-Domäne von CALEB**  
 Karzinomzelllinien (MDA-MD 231 und T47D), welche Tyrosinkinaserzeptoren (ErbB1, 2, 3 oder 4) enthalten, wurden nach Zugabe der hergestellten EGF Domäne (EGF/chCALEB 20 ng/ml, als rekombinant-hergestellte EGF Domäne) und nativem CALEB (chCALEB 100 ng/ml, aus einer Aufreinigung von CALEB aus Hühneraugen) getestet. Als Kontrolle wurde die Phosphorylierung der Tyrosinkinaserzeptoren durch EGF (Sigma) und TGF $\alpha$  (Sigma) analysiert. Die EGF-Domäne von CALEB kann unter den getesteten Bedingungen keine Phosphorylierung von ErbB-Rezeptoren induzieren. Die Sternchen zeigen die phosphorylierten Tyrosinkinaserzeptoren durch EGF oder TGF $\alpha$ . Als Kontrolle für die Proteinmenge wurden die Blots parallel mit anti- $\gamma$ Tubulin gefärbt. Die molekularen Massen von Kontrollproteinen sind auf der rechten Seite des Blots angegeben.

Durch Zugabe der hergestellten EGF-Domäne von CALEB und dem isolierten nativen CALEB aus Hühneraugen zu allen getesteten Karzinomzelllinien konnte keine Phosphorylierung der ErbB-Rezeptoren beobachtet werden. Jedoch zeigten die Kontrollen eine positive Reaktion (Abb. 29). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die EGF-Domäne von CALEB unter den getesteten Bedingungen keine Phosphorylierung von ErbB-Rezeptoren induziert.

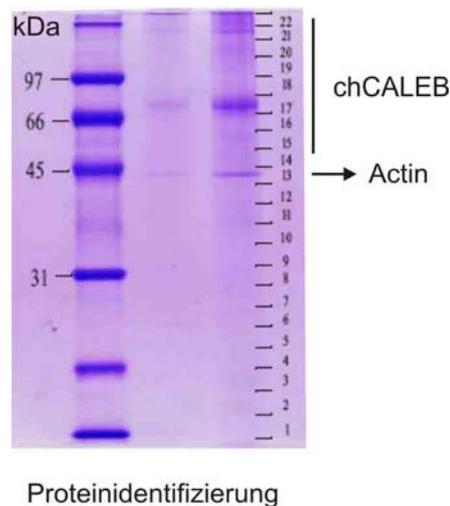
### 3.9. Mit CALEB ko-isolierende Komponenten

Das CALEB Affinitätsisolat wurde auch dahingehend untersucht, ob Komponenten aus dem embryonalen Nervensystem ko-isolieren. Ko-isolierende Moleküle könnten putative Interaktionspartner von CALEB darstellen.

Dazu wurde das CALEB-Affinitätsisolat in der SDS-PAGE aufgetrennt, gefärbt und anschließend das Gel in 22 gleiche Abschnitte (nach Größe zerlegt)geordnet (Abb. 30).

Proteine in den Gelschnitten wurden von Herr Dr. Otto tryptisch verdaut und die Sequenzen mittels Massenspektrometrie bestimmt. Einige der ko-isolierten Komponenten sind in

Tabelle I aufgeführt. Um zu testen, ob diese Moleküle mit CALEB interagieren, müssten diese in verschiedenen Bindungstests weiter untersucht werden.



**Abb. 30: Affinitätsisolat von CALEB.**

Das CALEB Isolat wurde in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt, mit kolloidalem Coomassie angefärbt und anschließend in 22 gleiche Abschnitte zerlegt. Nach tryptischen Verdau wurden per Massenspektrometrie die Sequenz der Peptide ermittelt (siehe Tabelle I).

**Tabelle I: Durch Affinitätschromatographie mit CALEB Antikörper (mAb 8-1B8) ko-isolierte Proteine. Die Proteinidentifizierung erfolgte durch Massenspektrometrie. (Abb. 30)**

Band	Bezeichnung	Database
3	Synaptobrevin	SWISS Prot
5	Peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	NCBI
6	Myosin light chain 1 (MLEK)	SWISS Prot
8	Ras-related protein Rab-1A (RAB1A)	SWISS Prot
10	Similar to Phosphoglycerate mutase family member 5	NCBI
	Similar to 2,4-dienoyl-CoA reductase	NCBI
	Guanine nucleotide-binding protein (GGB1)	SWISS Prot
	Guanine nucleotide-binding protein	NCBI
11	Alpha-tropomyosin	NCBI
	Tropomyosin beta chain (TPM2)	SWISS Prot
	Tropomyosin alpha chain (TPM1)	SWISS Prot
15	Calsequestrin-1 precursor (CASQ1)	SWISS Prot
	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex alpha subunit	NCBI
21	Myosin-3 (MYH3)	SWISS Prot
22	Myosin-3 (MYH3)	SWISS Prot

### 3.10. Analyse der Genexpression in CALEB-defizienten Mäusen

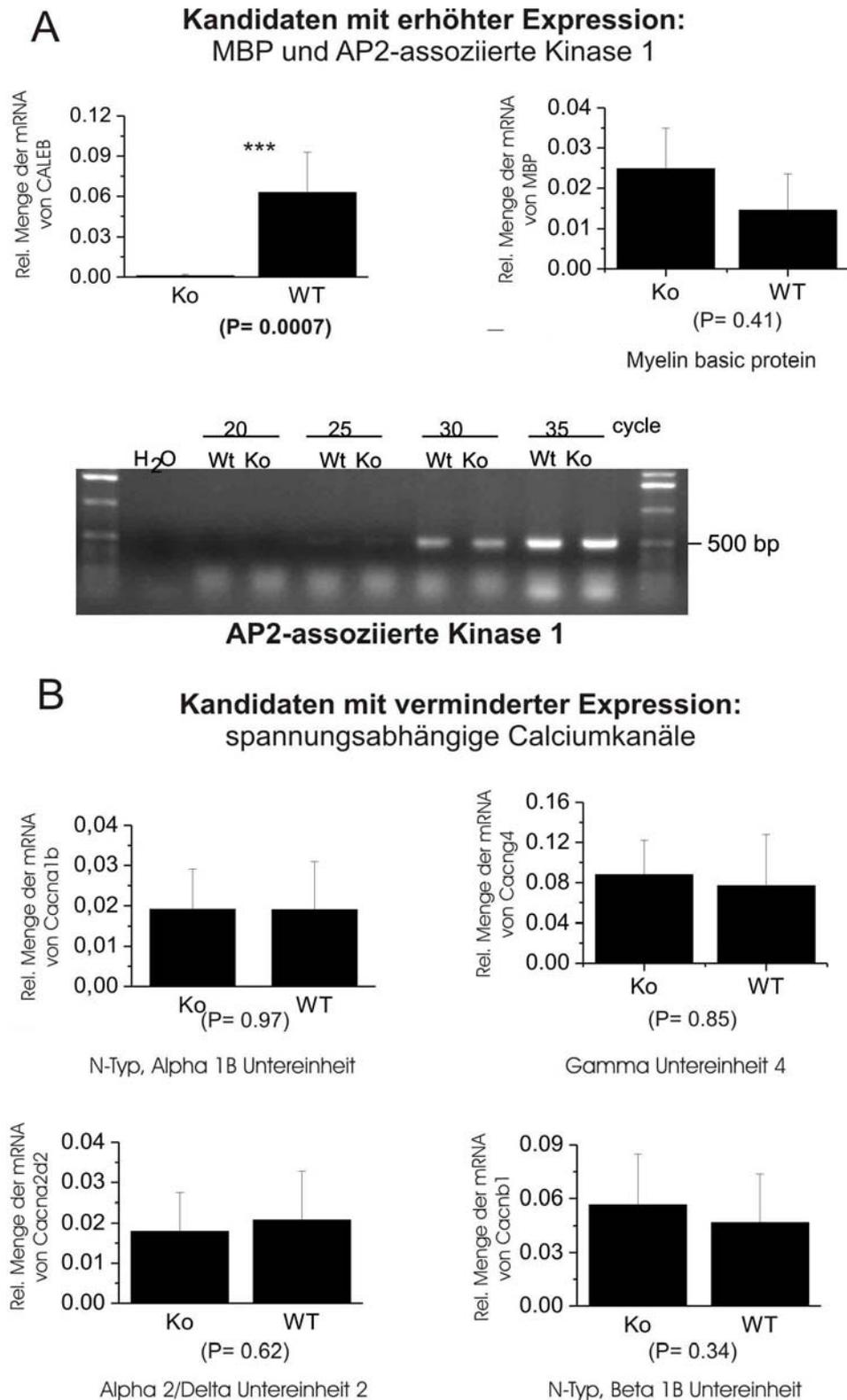
Die Abwesenheit von CALEB führt zu einer reduzierten Neurotransmitter-Freisetzungswahrscheinlichkeit in den frühen Phasen der Entwicklung (Jüttner et al., 2005), zu Veränderungen in der Synapseneliminierung an der Purkinje-Zelle im Kleinhirn (Jüttner und Rathjen, unveröffentlicht) und zu einem veränderten Lernverhalten im Laufrad Test (D. Montag, Leibnitz Institut, Magdeburg, unveröffentlicht). Um einen erklärenden molekularen Mechanismus zu finden, wurde in unserer Arbeitsgruppe die Genexpression mit

Hilfe einer Affymetrix-Gene-Chip-Analyse (GeneChipMouse Genome 430 2.0 Array) im Colliculus superior von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu CALEB Knockout-Mäusen durchgeführt. Ausgehend von dieser mRNA-Expressionsanalyse, führte ich eine „real-time-PCR“-Analyse von einer Reihe veränderter Kandidatengene durch. Unter ihnen sind insbesondere Myelin-basic Proteine (mbp), Untereinheiten spannungsabhängiger Calciumkanäle und die AP2-associated-kinase 1 (aak1) von Interesse, da sie in Ihrer Expression in der CALEB-Mutante vermindert erscheinen.

Es wurden verschiedene Primer erstellt, um die mRNA-Expressionsanalyse durch eine „real-time-PCR“-Analyse in Colliculus superior P3 von Wildtype Mäusen im Vergleich zu CALEB Knockout Mäusen zu untersuchen (Tabelle II).

**Tabelle II: Untersuchung von mRNA Expression von einer Affymetrix-Gene-Chip-Analyse (GeneChipMouse Genome 430 2.0 Array) im Colliculus superior von Wildtype Mäusen im Vergleich zu CALEB Knockout Mäusen.**

Affimatrix-Gene-Chip-Analyse					„real-time-PCR“-Analyse	
Bezeichnung	Symbol	Gen Name	P Wert	„Fold change“	Methode	Genbank
<b>Erhöht</b>						
AP2 associated kinase 1	Ap2a2	1432007_s_at	9.50E-05	1.76	RT-PCR	NM_177762
Myelin basic protein	Mbp	1419646_a_at	6,92E-06	2,249	Real time (P=0,41)	NM_010777
		1433532_a_at	3,77-06	2,180		AI323506
		1436201_x_at	1,28E-05	2.092		BB761376
		1456228_x_at	5,94E-06	2,027		AV328388
<b>Vermindert</b>						
Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4	Cacng4	1450975_at	0.0183	0.677	Real time (P=0,85)	NM_019431
Calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	Cacnb1	1451834_at	0.0654	0.270	Real time (P=0,34)	NM_007579
Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	Cacna2d2	1450754_at	0.00705 5.66E-6	0.526 0.3924	Real time (P=0,62)	NM_020263 AF 247139*
Calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	Cacna1b	1439612_x_at	0.00135	0.667	Real time (P=0.97)	NM_145121
		1447511_at	0.088	0.582		
		1425812_a_at	0.12	0.400		



**Abb. 31: mRNA-Expressionsanalyse der CALEB-defizienten Maus.**

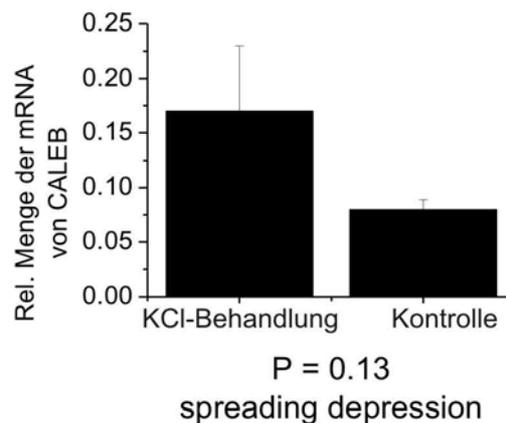
**A:** Kandidaten mit erhöhter Expression: MBP und AP2-assoziierte Kinase 1. **B:** Kandidaten mit verminderter Expression: spannungsabhängige Calciumkanäle. Die Gesamt-mRNA vom Colliculus superior P3 wurden durch „real-time-PCR“ und semi-quantitativer RT-PCR analysiert. Spezifische Primer wurden für die PCR Reaktion erstellt, um das Fragment zwischen zwei Exons zu amplifizieren.  $\beta$ -Aktin wurde für die endogene Kontrolle verwendet. Keiner der Kandidaten zeigte jedoch signifikante Unterschiede in der „real-time-PCR“ zwischen Wildtyp und CALEB  $-/-$ .

Mit der RT-PCR konnten jedoch bei keinem der genannten Kandidaten signifikante Unterschiede beobachtet werden (Abb. 31).

### 3.11. Expression von CALEB bei kortikaler „Spreading Depression“

Durch Gen-Expressionsanalysen wurde gezeigt, dass *CSPG5* (Gen für CALEB) bei „Spreading Depression“ kurzzeitig hochreguliert wird (Urbach et al., 2006). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen CALEB und einer mit KCl-ausgelösten „Spreading Depression“ nachzuweisen, wurden zunächst die von der AG Witte (Univ. Friedrich-Schiller) zur Verfügung gestellten Proben quantitativ mit der „real-time-PCR“ analysiert.

Die „real-time-PCR“ wurde mit spezifischen Primern für das CALEB Gen durchgeführt. So konnte die Expression der mRNA von CALEB in den zur Verfügung gestellten Proben ermittelt werden (Abb. 32). Es zeigte sich bei der CALEB mRNA-Expression eine geringe Erhöhung der Expression bei einer „Spreading depression“ Behandlung, jedoch ohne signifikanten Unterschied.



**Abb. 32: Expression von CALEB bei kortikaler „Spreading Depression“.**

Gesamt mRNA vom Kortex, mit KCl Behandlung und nicht Behandlung, wurden durch „real-time-PCR“ analysiert. Spezifische Primer wurden für die PCR Reaktion erstellt, um das Fragment zwischen den Exons zu amplifizieren.  $\beta$ -Aktin wurde als endogene Kontrolle verwendet (n= 3). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der CALEB mRNA-Expression.



## 4. Diskussion

Die strukturelle Charakterisierung von CALEB, sowie dessen Transkription und Genlokalisierung wurde für verschiedene Species detailliert beschrieben (Aono et al., 2000; Aono et al., 2006; Schumacher et al., 1997; Watanabe et al., 1995; Yasuda et al., 1998). Die genaue Verteilung im Nervensystem, die Expression in verschiedenen Hirngeweben, sowie die subzelluläre Lokalisation und vor allem die zellbiologische Funktion ist wenig bekannt und Gegenstand der Diskussion. Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass die Expression von CALEB auf das embryonale und adulte Nervensystem von Vertebraten, z.B. von Säugetieren und dem Huhn beschränkt ist. Die Expression ist besonders stark in den frühen Stadien der Entwicklung (Schumacher et al., 1997; Yasuda et al., 1998). Darüber hinaus enthält CALEB eine EGF-ähnliche Domäne, die eine vergleichbare Sequenz zu EGF-ähnlichen Domänen von Mitgliedern der EGF-Familie von transmembranalen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren aufweist (Schumacher et al., 1997).

Aus diesem Grund war das hauptsächliche Ziel der vorliegenden Arbeit die Expression, Lokalisation und Charakterisierung der Funktion von CALEB während früher Stadien der Entwicklung des Nervensystems der Maus, speziell während der Synaptogenese, zu analysieren.

Um die Funktion von CALEB *in vivo* bei der Bildung von Synapsen untersuchen zu können, wurde in der Arbeitsgruppe Rathjen eine CALEB-defiziente Maus erzeugt (Jüttner et al., 2005). Diese ist äußerlich normal und weist keine offensichtlichen anatomischen Veränderungen im Gehirn auf.

Um der Frage nach der Bedeutung von CALEB in Bezug auf die Synaptogenese nachzugehen, wurden unterschiedliche biochemische und molekulare Techniken angewendet. Zunächst wurde die genaue Lokalisation und Expression von CALEB während der Entwicklung untersucht. In einem weiteren Schritt wurde die Morphologie von Neuronen der Wildtyp Mäuse im Vergleich zu CALEB *-/-* Mäusen in der Zellkultur analysiert. Eine detaillierte Analyse des Phänotyps zeigt, dass die Abwesenheit von CALEB zu einer Abweichung in den Eigenschaften der Synapsen im Vergleich zum Wildtyp führt. Es ist wichtig zu betonen, dass die beobachteten Veränderungen in Abwesenheit von CALEB nur während eines bestimmten Entwicklungsabschnittes zu beobachten sind (Jüttner et al., 2005). Ausgehend von den analysierten morphologischen Unterschieden zwischen den Neuronen der Wildtyp Maus und CALEB *-/-* in der kortikalen Zellkultur wurden besonders Aspekte der synaptischen Organisation untersucht. Schließlich wurden einige der in der Literatur

beschriebenen Untersuchungen über die physiologische Funktion von CALEB detailliert überprüft.

#### **4.1. Expression und Lokalisation von CALEB im Nervensystem**

In der vorliegenden Arbeit konnte CALEB ausschließlich im Maus Hirngewebe nachgewiesen werden, jedoch nicht im Muskel, Leber, Herz, Niere und Milz. Dies bestätigte bisherige Untersuchungen an anderen Organismen, z.B. der Ratte (Watanabe et al., 1995), dem Menschen (Aono et al., 2006; Yasuda et al., 1998) und dem Huhn (Schumacher et al., 1997).

Um einen Überblick über die Expression von CALEB in den verschiedenen Hirnregionen zu erhalten, wurden in dieser Arbeit Sagittalschnitte vom Mäusegehirn (P10) mittels Immunfärbung untersucht, wobei erstmals CALEB -/- Mäuse als Negativkontrolle verwendet wurden (Jüttner et al., 2005).

Die Ergebnisse zeigten eine relativ uniforme Verteilung von CALEB, jedoch ist die Expression in einigen Gehirnregionen etwas stärker, z.B. im Kortex, Colliculus superior und im Cerebellum.

Im Kortex der Maus (P10) war CALEB besonders stark in der Molekularschicht und in der äußeren Körnerschicht exprimiert, was (Brandt et al., 2007) auch bei adulten Ratten festgestellt wurde. Im Hippocampus von Mäusen konnte CALEB in den faserreichen Arealen (*Striatum oriens*, *Radiatum* und *Lacunosum moleculare*) detektiert werden, nicht jedoch in Pyramidal- und Granularzellen. Dies stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen von (Aono et al., 2006; Brandt et al., 2007) bei adulten Ratten überein. Im Cerebellum P7 und P10 ist CALEB nur in der Granulärschicht und in der Purkinjezellschicht exprimiert, wie auch schon Jüttner und Kollegen (2005) beschrieben hat. In einer detaillierten Untersuchung der Entwicklungsstadien wurde CALEB in der frühen Phase (P3) in der Purkinjezellschicht detektiert (Jüttner, unpubliziert).

In der späteren Phase der Entwicklung (P22) konnte es in der Molekularschicht nachgewiesen werden. Von Aono und Kollegen (2000) wurde CALEB bei postnatalen und adulten Mäusen in den Zellkörpern und im ersten und zweiten Dendriten von Purkinjezellen nachgewiesen.

Im Colliculus superior der Maus weist CALEB eine uniforme Expression im Stadium P10 auf, was auch bei der Maus im Stadium P3 gezeigt werden konnte (Jüttner et al., 2005).

Um das Expressionsmuster von CALEB im postnatalen Alter genauer darzustellen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Profil von CALEB in unterschiedlichen Geweben und verschiedenen Entwicklungsstadien der Maus untersucht. Ähnliche Untersuchungen wurden

bereits publiziert, jedoch wurden andere Organismen und Hirnregionen analysiert (Huhn: Retina - Schumacher et al., 1997; Ratte: Kortex – Watanabe et al., 1995; Maus: Cerebellum – Aono et al, 2000; Maus: Colliculus superior – Jüttner et al., 2005).

Um die immunhistologischen Daten zu stützen, wurde die Expression ebenfalls durch Western Blotting untersucht.

Da stets gleiche Mengen von Protein-Lysat verwendet wurden, konnte nicht nur das Expressionsprofil von CALEB im Lauf der Entwicklung der Mäuse analysiert, sondern auch die Intensität der Expression von CALEB in verschiedenen Gehirngeweben quantitativ verglichen werden.

Im Western Blotting zeigte sich, dass CALEB im Kortex und Colliculus superior am stärksten exprimiert ist, während die Expression in anderen Hirnregionen wie im Hippocampus und der Retina, wesentlich schwächer ist. Die starke Expression im Kortex und Colliculus superior konnte auch durch Immunfärbung bestätigt werden.

In den Hirnregionen, in denen CALEB seine stärkste Expression zeigt, wurde eine maximale Expression zwischen dem 10. und 20. postnatalen Tag gefunden, die in weiteren Entwicklungsstadien wieder abnahm.

Weiterhin konnten einige Banden in der Größe von 30 bis 50 kDa und Banden zwischen 120-200 kDa mit dem Antikörper 3-2G10 gefunden werden. Diese niedrigeren Komponenten könnten ein Abbauprodukt von CALEB in der Probenvorbereitung oder ein Indiz für die Prozessierung von CALEB sein. Durch neuronale Aktivität kommt es zur Spaltung dieses Proteins in der extrazellulären Region, wobei die EGF-Domäne freiliegt und selbst als Ligand oder Rezeptor zur Verfügung steht (Jüttner et al., 2005). Dieser Punkt wird weiter unter später bei der Prozessierung von CALEB noch diskutiert (4.6). Die Banden der Größe 120-200 kDa entsprechen glykosylierter Formen von CALEB. Nach einer Chondroitinase-ABC-Behandlung, welche das Protein deglykosyliert, konnte eine Hauptbande bei etwa 120 kDa detektiert werden. Bemerkenswerterweise zeigte die Methode des Western Blotting sowohl mit, als auch ohne Chondroitinase-ABC-Behandlung in einigen Stadien der Entwicklung eine Bande in einer Größe von 120 kDa und einige verschmierte Banden zwischen 120 und 200 kDa. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es auch ohne Chondroitinase-ABC-Behandlung eine nicht-glykosylierte Form von CALEB gibt. Die Glykosylierung von CALEB wird weiter unten diskutiert (4.7).

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass CALEB nicht im PNS vorkommt, d.h. in den Spinalganglien. Dies wurde durch Western Blotting und Immunfärbung von Spinalganglien-Transversalschnitten im Entwicklungsstadium E15

nachgewiesen. CALEB wurde auch im Rückenmark (ZNS) detektiert, wie auch von (Aono et al., 2004), aber nicht in den Spinalganglien (PNS).

Es gibt Hinweise dafür, dass Gliazellen eine Rolle in der Synaptogenese spielen. Gemäß (Ullian et al., 2004) sind Astrozyten mit Synapsen im ZNS assoziiert und helfen bei der Regulation von Ionen und Neurotransmittern. Die Astrozyten sind beteiligt an der Kontrolle der Anzahl der gebildeten Synapsen im ZNS. Sie sind essentiell für die postsynaptische Funktion und werden für die synaptische Stabilität und Erhaltung benötigt. Astrozyten dienen nicht nur der Unterstützung, sondern sie tragen auch zur aktiven Kontrolle von struktureller und funktioneller Plastizität von Synapse in entwickelnden und adulten Organismen bei (Ullian et al., 2004). In dieser Arbeit wurde die mRNA von CALEB in allen Gliazelltypen gefunden. Ebenso konnte eine teilweise Kollokalisierung von CALEB auf retinalen Müller-Glia-Zellen (Schumacher et al., 1997) bestätigt werden. In der Retina von EGFP-GFAP-Mäusen sieht man für CALEB in der inneren Gliagrenzmembran eine Überlagerung mit Gliazellen.

#### **4.2. Untersuchung der subzellulären Verteilung von CALEB**

CALEB wurde ursprünglich durch immunologische Screens gegen Axon-assoziierte Glycoproteine über die Interaktion mit den extrazellulären Matrixglykoproteinen Tenascin-C und -R entdeckt (Schumacher et al., 1997). In der Überlagerung der Fluoreszenz von CALEB und Tenascin -C und -R in synapsenreichen Arealen der Retina und des Cerebellums von Huhn und Nagern, sowie aus früheren Antikörperstörexperimenten in Zellkulturen gegen CALEB, wurde eine Beteiligung von CALEB bei der Neuritenformation vermutet (Schumacher et al., 1997). Daraus lassen sich auch Hinweise auf die neuronale Funktion von CALEB in der Dendritogenese ableiten.

Die Anreicherung von strukturellen Proteinen in präsynaptischen Terminalien und in der PSD mittels biochemischer Methoden gibt Auskunft über die Struktur und Organisation von prä- und postsynaptischen Membranen (Dresbach et al., 2001; Fernandez-Chacon and Sudhof, 1999; Garner et al., 2000; Scannevin and Huganir, 2000).

Aus diesem Grund wurde die Lokalisation von CALEB mit unterschiedlichen biochemischen Methoden analysiert.

CALEB wurde in der PSD-Präparation in der Synaptosomen-Fraktion (SY), in der Fraktion für synaptosomale Membranen (SM) und in der Plasmamembran-Fraktion nachgewiesen, welche auch reich an Synaptophysin, einem präsynaptischen Marker, sind. In der Fraktion für synaptosomale Membranen, für synaptische Verbindungen (SJ - „synaptic junctions“) und der

PSD Fraktion wurde das Protein PSD95 gefunden. CALEB kommt in den beiden letzt genannten Fraktionen allerdings nicht vor.

Durch die PSD-Präparation ist es möglich Hinweise über die subzelluläre Lokalisation von Proteinen zu gewinnen. Problematisch bei dieser Methode ist jedoch der Nachweis der Proteine, die nur eine schwache Interaktion untereinander aufweisen. Diese Proteine werden durch die Triton X-100 Behandlungen freigesetzt werden und können dadurch nicht mehr in der PSD-Fraktion detektiert werden. Aus diesem Grund können Aussagen bezüglich der Lokalisation nur in Kombination mit anderen Methoden getroffen werden (Toomre et al., 2000).

Zur weiteren Charakterisierung der subzellulären Verteilung von CALEB im ZNS von postnatalen Mäusen wurden Synaptosomen- und synaptische Vesikel-Präparation verwendet. CALEB wurde in der Synaptosomen-Fraktion und in der Fraktion der Plasmamembranen und unlöslicher Anteile des Zytoskeletts besonders stark angereichert. Wie zu erwarten reicherte sich Synaptophysin sehr stark in den synaptischen Vesikeln an. Eine schwache Anreicherung von Synaptophysin konnte in der Fraktion detektiert werden, in welcher CALEB vorkommt.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass CALEB besonders stark in der Synaptosomen Fraktion und in der Fraktion der Zellmembranen angereichert ist, jedoch nicht in der Fraktion der synaptischen Vesikel.

Um die Lokalisation weiter zu analysieren, wurden immunzytologische Untersuchungen gegen dendritische und axonale Marker und CALEB durchgeführt. CALEB weist vorrangig eine punktförmige Verteilung auf dem Zellkörper und auf Dendritenbäumen auf. Jedoch wurde keine Kolo-kalisation von CALEB mit Neurofilament, einem vorwiegend axonalen Protein, nachgewiesen. Diese Lokalisation auf Dendriten und Zellkörpern wurde auch im Cerebellum (Purkinjezelle) von postnatalen (P10) und adulten Mäusen (Aono et al., 2000) gezeigt. Diese Beobachtung unterscheidet sich von Immunfärbungsexperimenten an hippocampalen Zellkulturen, bei denen extra- und intrazelluläre anti-CALEB Antikörper (anti-MBP-mCALextra und anti-GST-hCALb-cyt) und MAP2 Antikörper (Brandt et al., 2007) eine Lokalisation von CALEB auch auf Axonen zeigte. Jedoch wurden in diesem Experiment keine axonalen Marker verwendet.

Um die subzelluläre Verteilung von CALEB *in vivo* weiter zu analysieren, wurden Retina-Schnitte von früh postnatalen Mäusen (P15) immunhistochemisch untersucht. Die Retina stellt aufgrund ihrer charakteristischen Schichtung ein ideales Modell zur Analyse der Lokalisation von Proteinen dar.

CALEB wurde in der Photorezeptorschicht, der inneren Körnerzellschicht, der inneren plexiformen Schicht (IPS) und der inneren Gliagrenzmembran (IG) detektiert. CALEB kolokalisiert in der IPS und der IG mit MAP2. Neurofilament wurde dagegen nur in der äußeren plexiformen Schicht (APS) und der optischen Faserschicht (OFS) detektiert, eine Kolokalisation mit CALEB konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Auch am Austrittspunkt des Sehnervs (*Nervus opticus*) konnte keine überlagerte Fluoreszenz von CALEB und Neurofilament beobachtet werden.

Die Untersuchungen der Retinaschnitte zeigen deutlich, dass CALEB nicht axonal lokalisiert ist, was besonders deutlich durch Färbungen an der Austrittsöffnung des optischen Sehnervs gezeigt werden konnte.

In Phosphorylierungsstudien wurde festgestellt, dass CALEB in „Lipid Rafts“ lokalisiert ist (Yamauchi et al., 2002). „Lipid Rafts“ sind Mikrodomänen reich an Sphingolipiden und Cholesterin. Sie haben eine besondere Bedeutung für die neuronale Zelloberfläche, da sie eine Plattform für die Signaltransduktion, z.B. für Neurotransmitter und Rezeptoren, darstellen (Rajendran and Simons, 2005; Simons and Ikonen, 1997; Toomre et al., 2000; Tsui-Pierchala et al., 2002). Durch die Liganden-vermittelte Rezeptor Dimerisierung von Zelloberflächenproteinen werden diese innerhalb der Membran in „Lipid Rafts“ verschoben, wo deren Phosphorylierungsstatus, durch Kinasen oder Phosphatasen, reguliert werden kann. Diese Steuerung ist wichtig für die Auslösung der Signaltransduktion (Rajendran and Simons, 2005; Simons and Ikonen, 1997; Tsui-Pierchala et al., 2002).

Um diese subzelluläre Lokalisation von CALEB weiter zu analysieren, wurden zuerst „Lipid Rafts“ durch differentielle Zentrifugation in Saccharose-Gradienten angereichert. CALEB wurde zum Teil in denselben Fraktionen wie bekannte Marker der „Lipid Rafts“ gefunden. Anschließend wurde diese Beobachtung weiter durch immunzytochemische Methoden überprüft. In dieser Arbeit konnte für CALEB nur eine niedrige Kolokalisation mit „Lipid Rafts“ nachgewiesen werden. Trotzdem ist denkbar, dass „Lipid Rafts“ eine hypothetische Möglichkeit für den Wirkmechanismus, um CALEB in einen aktiven oder inaktiven Zustand zu überführen, darstellen.

### **4.3. Untersuchungen zur synaptischen Lokalisation von CALEB**

Um die Beteiligung von CALEB an der Etablierung und Regulation synaptischer Verbindungen zu untersuchen, wurden bereits von Jüttner und Kollegen (2005) die Eigenschaften der synaptischen Transmission in einem knock-out Mausmodell analysiert. Dieses Tier ist äußerlich normal und weist keine offensichtlichen anatomischen

Veränderungen im Gehirn auf. Eine detaillierte Analyse des Phänotyps zeigt jedoch, dass die Abwesenheit von CALEB eine Abweichung der Eigenschaften der Synapsen vom Wildtyp bedingt. Im Colliculus superior, einem Teil des visuellen Systems, sind bei elektrophysiologischen Untersuchungen im Wesentlichen vier Veränderungen zu beobachten: (1) eine Verminderung der spontanen Frequenz der IPSCs und EPSCs, (2) eine Zunahme der postsynaptischen Antwort nach Doppel-Puls-Stimulierung, (3) eine Verminderung der Depression nach wiederholter Stimulation und (4) eine Verminderung der Freisetzungswahrscheinlichkeit von Neurotransmitter. Die Amplitude und die Kinetiken der postsynaptischen Ströme sind hingegen unverändert. Diese Befunde deuten darauf hin, dass CALEB für die Entwicklung oder die Funktion der Präsynapse von Bedeutung ist. Es ist wichtig zu betonen, dass die beobachteten Veränderungen in Abwesenheit von CALEB nur im früh postnatalen Entwicklungsabschnitt zu beobachten sind.

Es war jedoch unklar, ob das CALEB Protein auf der prä- oder postsynaptischen Seite lokalisiert ist. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CALEB in kortikalen Zellkulturen und auch an Retinaschichten nur auf Dendriten und nicht auf Axonen lokalisiert ist.

Von Aono und Kollegen (2000) wurde CALEB in Purkinjezellen von postnatalen (P5) und adulten Mäusen mittels Elektronenmikroskopie in Zellmembranen, synaptischen Verbindungen („synaptic junctions“) und in Membranen des endoplasmatischen Reticulums beobachtet.

Um zu klären, ob CALEB in Synapsen lokalisiert ist, wurden in kortikalen Zellkulturen Doppel-Immunfärbungen gegen prä- und postsynaptische Proteine und CALEB durchgeführt. Die Immunfärbungen zeigten, dass CALEB zum Teil mit synaptischen Markern kolokalisiert, jedoch nicht spezifisch auf Synapsen beschränkt ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass CALEB nicht auf die Synapse beschränkt ist, jedoch eine somato-dendritische Lokalisierung aufweist.

#### **4.4. Analyse des Dendritenbaumes in CALEB -/- Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen**

Ausgehend von der Beobachtung, dass eine Überexpression von CALEB in Hippocampus-Zellkulturen zu einer erhöhten Komplexität des Dendritenbaumes und zur verstärkten Spinebildung führt (Brandt et al., 2007), sowie durch die Beobachtung, dass CALEB somato-dendritisch lokalisiert ist, wurde untersucht, ob auch in CALEB -/- Neuronen die Dendritenmorphologie verändert sind.

Die Überexpression von einem nicht endogenen Protein zusammen mit einem EGFP-Plasmid („Enhanced Green Fluorescent Protein“) in primären Zellkultursystemen stellt eine nicht natürliche Situation dar, die den Stoffwechsel und die Morphologie der Neuronen beeinflussen könnte. EGFP wird häufig verwendet, um lebendige Zellen zu studieren, obwohl auch zahlreiche Studien belegen, dass es physiologische Effekte beeinflussen kann. So kann die Expression von EGFP und die von EGFP-Fusionsproteinen Polyubiquitinylierung inhibieren, eine posttranslationale Modifikation, die u.a. zelluläre Prozesse wie Aktivierung von Kinasen oder Proteinabbau durch das Proteasom kontrolliert (Baens et al., 2006).

Um diese Effekte zu vermeiden, wurde hier zunächst die Dendritenbaummorphologie von CALEB <sup>-/-</sup> Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen mit Hilfe des dendritisch-lokalisierten Proteins MAP2 untersucht.

Um die Rolle von CALEB in den verschiedenen Phasen der Entwicklung besser zu verstehen, erfolgte die Analyse des Dendritenbaumes zu unterschiedlichen Zeitpunkten (DIV4, DIV8 und DIV 14). Zur Analyse des Dendritenbaumes wurde die Fast-Sholl-Analyse verwendet, sie ermöglicht die Analyse der Anzahl von primären Neuriten und die Dendritenbaumkomplexität in kürzerer Zeit als die herkömmliche Sholl-Analyse (Gutierrez and Davies, 2007; Sholl, 1953).

Da eine Analyse der Dendritenbäume in älteren Kulturen (DIV 14) mittels MAP2 Färbungen aufgrund starker Überlagerungen nicht möglich ist, wurden diese älteren Kulturen mit einem EGFP-Plasmid transfiziert. Durch Transfektion mit EGFP ist es möglich, Zellen auch in dichten Kulturen zu analysieren, da nur wenige Neurone EGFP-positiv sind. Weiterhin wurden bei Verwendung dieser Methode auch die kleinen, sekundären Verzweigungen besser sichtbar. Ein Nachteil besteht darin, dass nicht nur Dendriten, sondern auch Axone gefärbt sind. Diese Untersuchung unterscheidet sich von anderen Überexpressions-Studien, bei denen CALEB durch Kotransfektion mit einem EGFP-Plasmid von Wildtyp Zellen analysiert wurde (Brandt et al., 2007; Brandt et al., 2008), da der oben erwähnte negative Effekt der EGFP-Transfektion in beiden Zellkulturen (Wildtyp und CALEB <sup>-/-</sup> Neuronen) auftreten kann.

Mit der Fast-Sholl-Analyse sieht man keinen Unterschied in der Länge der Dendriten in allen Stadien der Entwicklung, sowohl in Hippocampus- als in Kortex-Zellkulturen. Dies unterstützt die äußerlich normale Anatomie der CALEB knock-out Maus, da sie keine offensichtlichen anatomischen Veränderungen im Gehirn aufweist.

In der frühen Phase der Dendritogenese bei DIV 4 (Stadium 4, Abb. 2), in der das dendritische Wachstum beginnt, wurde kein signifikanter Unterschied bei den apikalen-Dendriten festgestellt, sowohl in Hippocampus- als auch in der Kortex-Zellkultur.

In einer späteren Phase DIV 8 und DIV 14 (Stadium 5, Abb.2), in der die kontinuierliche Reifung sowohl der Dendriten als auch der Axone charakteristisch ist, wurde der Effekt bei primären Dendriten, als auch bei apikalen Dendriten nachgewiesen.

Im Gegensatz zur Überexpression von CALEB in Hippocampus-Zellkulturen (Brandt et al., 2007) wurde in dieser Arbeit ein Unterschied auch bei Primärdendriten gezeigt. Die genannten Autoren zeigen, dass der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg eine wichtige Rolle für die CALEB-vermittelte Dendritenverzweigung spielt. Der Einfluss dieser Signalkaskade auf die Dendritenbaumkomplexität kombiniert mit anderen Signalwegen, ist bereits in der Literatur beschrieben worden (Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005). Diese Studien zeigen, dass durch die Inhibition von mTOR basale Dendriten beeinflusst werden (Jaworski et al., 2005) und durch konstitutiv aktive PI3K oder aktives Akt die Anzahl von Primärdendriten auch erhöht wird (Kumar et al., 2005).

Studien mit Echtzeitaufnahmen von lebendigen tektalen Neuronen von *Xenopus* (Cline, 2001) zeigten, dass Dendriten durch eine Balance von Auswachsen und Zurückziehen entstehen. Eine geringere Dendritenbaumkomplexität in CALEB  $-/-$  Kulturen könnte darauf hindeuten, dass möglicherweise die veränderte Morphologie einen Einfluss auf die synaptische Konnektivität hat.

#### **4.5. Analyse der Anzahl von Synapsen in CALEB $-/-$ Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen**

Die Synaptotropische Hypothese von (Vaughn, 1989) postuliert, dass synaptische Inputs die Anordnung des Dendritenbaumes regulieren.

In den letzten Jahren wurden Evidenzen gegen die Synaptotropische Hypothese veröffentlicht, insbesondere Studien in „Munc 18 knock-out“ Mäusen (Verhage et al., 2000). Diese Tiere sind äußerlich normal und weisen keine strukturellen anatomischen Veränderungen im Gehirn auf, jedoch fehlt ihnen die Neurotransmitter-Sekretion bei synaptischen Vesikeln und sie sterben nach der Geburt. Andere Untersuchungen zeigen Moleküle, welche die Dendritenbaumstruktur beeinflussen, ohne eine Wirkung auf den synaptischen Input zu haben (Moore et al., 2002). Ebenso existieren Wachstumsfaktoren, z.B. BDNF welche die Synapsen-Dichte verändern ohne die Dendritenbaumstruktur zu beeinflussen (Sanchez et al., 2006), d.h. die Dendritenbaumkomplexität kann sich unabhängig von der Synapsen-Entwicklung entwickeln. Dies bestätigt die Beobachtung der letzten Jahre, dass Dendriten intrinsisch determiniert sind und als passive Elemente bei der Bildung der synaptischen Konnektivität im Nervensystem fungieren. Besonders durch neue

Aufnahme-Methoden konnte gezeigt werden, dass dendritisches Wachstum jedoch eher dynamisch als passiv ist (Scott and Luo, 2001).

Die Diskussionen über morphologische Veränderungen eines Neurons und des Synapsen-Inputs während der Entwicklung stellten in den letzten Jahren einen interessanten Ansatzpunkt für das Verständnis der synaptischen Aktivität dar. Aus diesem Grund wurde die Analyse der Anzahl der Synapsen in CALEB  $-/-$  Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen durchgeführt und parallel wurden in Kooperation mit Dr. Jüttner und Dr. Stoenica (AG Rathjen) einige physiologische Untersuchungen angeschlossen. Ebenso wurde untersucht, ob die Anzahl von GABAergen und glutamatergen Synapsen verändert ist.

Die Anzahl von GABAergen Synapsen in kortikalen Wildtyp und CALEB  $-/-$  Kulturen (DIV 14) zeigten keinen signifikanten Unterschied. Die Anzahl von inhibitorischen präsynaptischen Terminalien (VGAT) ist ebenso unverändert, jedoch konnte eine reduzierte Anzahl von Gephyrin Agregaten in CALEB  $-/-$  Kulturen festgestellt werden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der Anteil von Gesamt-Gephyrin in CALEB  $-/-$  geringer ist, aber nicht jedoch das in Synapsen lokalisierte Gephyrin. Eine etwas geringere Menge von Gesamt-Gephyrin in CALEB  $-/-$  konnte auch durch Western Blotting nachgewiesen werden, was sich aber bei Anwendung von statistischen Tests als nicht signifikant erwies.

Gephyrin ist ein multifunktionelles Protein. Es ist verantwortlich für die Molybdänium-Cofaktor-Synthese sowie für die Glycin- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren Aggregation in inhibitorischen Synapsen (Fritschy et al., 2008). Es ist denkbar, dass diese postsynaptische Aggregation nur in einer spezifischen Gephyrinkonformation, durch posttranslationale Proteinmodifikationen oder durch Anwesenheit von ergänzenden Molekülen möglich ist. Gephyrin bildet intrazelluläre Aggregate, aber keine postsynaptischen Aggregate in Abwesenheit von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren *in vivo* (Fritschy et al., 2008). Gephyrin bindet verschiedene Proteine, die wichtige Interaktionen mit dem Actin-Zytoskellel vermitteln, z.B. Dlc1/2, Mena-VASP und Profilin (Bausen et al., 2006; Gieseemann et al., 2003).

Auch bei der Anzahl der glutamatergen Synapsen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Jedoch ist die Anzahl von AMPA-R Agregaten in CALEB  $-/-$  Kulturen höher als in Wildtyp Kulturen. Da die Anzahl der Synapsen unverändert ist, die AMPA Rezeptoren aber erhöht sind, ist anzunehmen, dass mehr AMPA-Rezeptoren extra-synaptisch in CALEB  $-/-$  Kulturen vorhanden sind.

In zusätzlichen elektrophysiologischen Untersuchungen wurde die spontane synaptische Aktivität GABAergen und glutamaterger Synapsen mittels Whole-cell Patch-clamp Messungen in Wildtyp und CALEB <sup>-/-</sup> Kulturen analysiert.

Die spontane Aktivität von GABAergen Synapsen zeigt eine signifikante Senkung der Amplitude, aber keinen Unterschied in der Frequenz der CALEB <sup>-/-</sup> Kulturen im Vergleich zu Wildtyp Kulturen. Die mIPSCs zeigten jedoch keinen Unterschied, weder Amplitude noch Frequenz.

Die spontanen Aktivitäten von glutamatergen Synapsen zeigen eine signifikante Erhöhung in der Frequenz, aber keinen Unterschied in der Amplitude von sEPSC der CALEB <sup>-/-</sup> Kulturen im Vergleich zu Wildtyp Kulturen. Die mEPSC zeigten wiederum keinen Unterschied (Dr. Jüttner und Dr. Stoenica, unpubliziert). Interessanterweise wurde auch in CALEB <sup>-/-</sup> Kulturen mehr „Bursts“ im Vergleich mit Wildtyp Kulturen beobachtet.

Zusammenfassend kann man festgestellt werden, dass die Abwesenheit von CALEB in kortikalen Zellkulturen eine Wirkung auf den Dendritenbaum und extrasynaptische Strukturen hat. Es gibt keinen Unterschied in der Anzahl von GABA-ergen und glutamatergen Synapsen in kortikalen Wildtyp und CALEB <sup>-/-</sup> Kulturen, jedoch liegt eine Veränderung in der synaptischen Transmission vor.

Eine hypothetische Möglichkeit für den Wirkmechanismus von CALEB in Kulturen ist eine Beteiligung in der Balance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen, d.h. in Abwesenheit von CALEB sind die Amplituden von GABAergen Synapsen reduziert, da weniger extrasynaptisches Gephyrin, und mehr extrasynaptische AMPA-Rezeptoren vorliegen. Obwohl die Anzahl der Synapsen unverändert ist, gibt es weniger Hemmung und mehr „Burst“, was mit der niedrigeren Antwort der Amplitude GABAergen Synapsen korreliert.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Veränderung in der Morphologie von CALEB <sup>-/-</sup> Neuronen eine Wirkung auf die synaptische Transmission haben könnte. Da sich die Morphologie der Dendriten bereits zu einem frühen Zeitpunkt ändert (DIV4), wenn synaptische Aktivität erst unwesentlich vorhanden ist.

#### **4.6. Proteolytische Umwandlung von CALEB**

Proteolyse ist eine posttranslationale Regulation der Funktion von verschiedenen Gruppen von Proteinen, wie Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmolekülen und Proteoglykanen. Die Abspaltung einer Ektodomäne von einem Protein, eine proteolytische Spaltung oder das

Ektodomänen-, „Shedding“ an der Zelloberfläche ist ein regulierter Prozess (Blobel, 2000), der ein Protein in einen aktiven oder inaktiven Zustand überführen kann.

Die proteolytische Umwandlung von CALEB, von einer Vorläuferform in eine verkürzte Form, wurde sowohl beim Huhn als auch bei der Maus nachgewiesen (Jüttner et al., 2005). Diese Prozessierung von CALEB zu einer verkürzten Plasmamembran-assoziierten Form mit einer frei zugänglichen EGF-Domäne wird durch neuronale Aktivität gefördert.

(Shuo et al., 2007) zeigten, dass CALEB in einer löslichen Form existiert. Diese lösliche Form wurde bei Gehirnlysaten der Ratte (P10) und in neuronalen Zellkultur-Überständen durch Immunpräzipitation beobachtet. Die Autoren schlossen daraus, dass die Prozessierung von CALEB, durch Ektodomänen-, „Shedding“, zwischen der EGF-ähnlichen Domäne von CALEB und der Transmembrandomäne durch eine Metalloprotease (TIMP-2 oder 3) stattfindet. Gemäß Jüttner und Kollegen (2005) kann die Abspaltung der EGF-ähnlichen Domäne von CALEB in eine verkürzte Plasmamembran Form nicht ausgeschlossen werden, jedoch ist dies unwahrscheinlich, da: (1) kleine Komponenten, die nur das zytoplasmatische Segment von CALEB enthalten, nicht durch Antikörper gegen das zytoplasmatische Segment von CALEB gefunden werden konnten; (2) die Region zwischen der EGF-ähnlichen Domäne und der Transmembrandomäne von CALEB (4 – 6 Aminosäuren) relativ kurz für ein Ektodomänen-, „Shedding“ ist (Han und Fischbach, 1999). So benötigt man bei Neuregulin-1 für diesen proteolytischen Prozess mindesten eine Region mit elf Aminosäuren zwischen der EGF-ähnlichen-Domäne und der Transmembrandomäne (Han and Fischbach, 1999).

Weiterhin wurden im Expressionsprofil von verschiedenen Hirnregionen einige Banden in der Größe von 30 bis 50 kDa nachgewiesen, die der eventuell prozessierten Form von CALEB mit einer frei zugänglichen EGF Domäne entsprechen. In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen die zytoplasmatische Domäne von CALEB verwendet, um die Umwandlung zu untersuchen. Wenn es ein Gesamt-Ektodomänen-, „Shedding“ gäbe, wären noch kleinere Komponenten als 30 bis 50 kDa zu erwarten. Die zytoplasmatische Domäne von mCALEB enthält nur 121 (mCALEBb) oder 94 (mCALEBa) Aminosäuren. Dies war aber nicht der Fall, so dass daraus geschlossen werden kann, dass es keine Gesamt-Ektodomänen-, „Shedding“ gibt.

Ausgehend von dieser Beobachtung stellt sich eine Frage hinsichtlich des vorliegenden Mechanismus: welche Protease ist für die Prozessierung von CALEB verantwortlich? Um dies zu klären, wurde an akuten, kortikalen Hirnschnitten ein neues Versuchmodell etabliert (Jüttner et al., 2005).

Die Western Blotting Analyse von kortikalen Hirnschnitten zeigte, dass die Umwandlung von CALEB ab 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und ab einer Inkubationszeit von 15 min festgestellt werden kann.

Ausgehend von dieser Beobachtung wurde die proteolytische Umwandlung in Anwesenheit verschiedener Protease-Inhibitoren durchgeführt. Besonders effektiv konnte die Umwandlung von CALEB durch Leupeptin, ein Cystein/Serin Protease Inhibitor, und E64, eine Cystein Protease Inhibitor, verhindert werden. Daher kann auf eine Cystein/Serin-Protease als CALEB Konvertase geschlossen werden.

Um den Einfluss neuronaler Aktivität auf die Struktur von CALEB zu ergründen, wurden verschiedene Blocker gegen Glutamat-Rezeptoren getestet. Durch die Hemmung (APV, CPP und MK801) wurde die Umwandlung von CALEB in eine kurze membranständige Form vermindert.

Weiterhin wurde die CALEB Umwandlung auch in Hirnschnitten von verschiedenen „Knock-out-Mäusen“ analysiert, z.B. tPA-defiziente und BACE1-defiziente Mäuse. tPA ist eine Serin-Protease, welche Plasmin aus Plasminogen spaltet. BACE1 ist eine Aspartat-Peptidase (mit  $\beta$ -Secretase Aktivität), welche Neureguline prozessiert, zu deren Gruppe auch CALEB zählt (Willem et al., 2006). Jedoch konnte in beiden Versuchsmodellen keine Beteiligung an der Umwandlung von CALEB nachgewiesen werden.

Abschließend konnte mit diesem Versuchsmodell gezeigt werden, dass eine Cystein/Serin-Protease für die Umwandlung von CALEB in verschiedenen Hirnregionen verantwortlich ist, wobei die Hemmung von Glutamat-Rezeptoren die Prozessierung von CALEB in eine kurze membranständige Form vermindert.

Es deutet darauf hin, dass die proteolytische Umwandlung von CALEB durch neuronale Aktivität gefördert wird, allerdings ist der molekulare Mechanismus durch biochemische Methoden noch nicht aufgeklärt.

#### **4.7. Glykosylierung von CALEB**

CALEB liegt während der frühen Phase der postnatalen Entwicklung stark glykosyliert vor, in späteren Stadien nimmt die Glykosylierung von CALEB ab. Dieses Glykosylierungsmuster wurde im Cerebellum der Maus in verschiedenen Stadien der Entwicklung beschrieben (Watanabe et al., 1995). Im Stadium P7 und im adulten Tier wurde dies auch in anderen Hirnregionen der Maus nachgewiesen (Aono et al., 2004).

Interessanterweise konnten Hirnregionen gezeigt werden, in denen CALEB wesentlich schwächer exprimiert wird (Hippocampus, und Retina). Diese Regionen zeigen nicht das typische Glykosylierungsmuster der frühen Entwicklungsphase.

Die schwache Glykosylierung von CALEB in der Maus-Retina konnte in dieser Arbeit bei der Aufreinigung von nativem CALEB aus Hühneraugen bestätigt werden. Die Aufreinigung von nativem CALEB durch Affinitätschromatographie aus Hühneraugen ohne Chondroitinase-ABC-Behandlung war wahrscheinlich nur deshalb möglich, weil dort eine schwache Glykosylierung vorliegt. Eine Aufreinigung von CALEB aus dem gesamten Gehirn der Maus war jedoch unter verschiedenen Bedingungen nicht möglich, weil wahrscheinlich eine starke Glykosylierung vorliegt.

Dieses unterschiedliche Glykosylierungsmuster von CALEB, das typisch für „part-time“ Proteoglykane ist, wurde auch in anderen Studien festgestellt (Aono et al., 2004; Sugahara and Mikami, 2007). In CALEB findet man mehrere potenzielle Glycosylierungsstellen für Chondroitinsulfatketten und für eine N-Glykosylierung (Aono et al., 2004; Schumacher et al., 1997; Watanabe et al., 1995; Yasuda et al., 1998). Die Eigenschaft als „part-time“-Proteoglykan ist eine interessante Besonderheit von CALEB, weil die Glykosaminoglycan-Ketten (GAG) nur in früh postnatalen Entwicklungsstadien vorkommen. Die Glykosylierung spielt eine wichtige Rolle bei zellulären Geschehen wie z.B. der Mitogenese, der Zelldifferenzierung, dem axonalen Wachstum und der Synaptogenese. Die Glykosylierung dient sehr unterschiedlichen Funktionen, z.B. der Erhöhung der Stabilität der Struktur von Proteinen, dem Schutz vor proteolytischem Abbau sowie der Beteiligung an der Regulation von Molekülen durch die Matrix (Bülow and Hobert, 2006; Kleene and Schachner, 2004; Oohira et al., 2000b; Sugahara and Mikami, 2007).

#### **4.8. Untersuchungen zur Phosphorylierung von CALEB**

Auf eine potentielle Phosphorylierung von CALEB wurde in verschiedenen Arbeiten für verschiedene Organismen hingewiesen (Mensch, T459, S516 – Yasuda et al., 1998; Ratte, S255, S276 - Yamauchi et al., 2002; Ratte, T452 - Brandt et al., 2008).

Gemäß (Yamauchi et al., 2002) findet die Phosphorylierung von CALEB im intrazellulären und perizellulären Bereich statt. Diese Phosphorylierung konnte bisher nur *in vitro* und nicht in „Lipid Raft-Fraktionen“ nachgewiesen werden. CALEB soll von einer Kinase, ähnlich der Casein-Kinase II, in der Ectodomäne phosphoryliert werden (Yamauchi et al., 2002). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase A (B56 $\beta$ ) mit CALEB im intrazellulären Bereich (T452) interagiert und CALEB dephosphoryliert (Brandt et al., 2008). Diese Interaktion reguliert eine Dephosphorylierung von CALEB, die in Beziehung zur Dendritenbäumkomplexität gebracht werden kann. Jedoch ist in dieser Arbeit nicht klar, ob B56 $\beta$  als negativer Regulator der CALEB-vermittelten

Dendritenbaumkomplexität agiert. B56 $\beta$  könnte CALEB direkt am intrazellulären Segment dephosphorylieren oder mit PI3K-Akt-mTOR-Signalkaskaden interferieren, indem es beispielsweise Akt dephosphoryliert, was zu einer verminderten Dendritenbaumkomplexität führt.

Es konnte bereits eine zytoplasmatische Phosphorylierungsstelle von chCALEB durch Aufreinigung des Proteins und anschließende Proteinsequenzierung identifiziert werden (Prof. Rathjen, persönliche Kommunikation). Die zytoplasmatische Domäne von CALEB in der Maus enthält eine identische Phosphorylierungsstelle wie die von chCALEB.

Unter Verwendung spezifischer Phosphomotiv-Antikörper gegen die Phosphorylierungsmotive von PKC und Akt konnte jedoch kein phosphoryliertes CALEB weder in Lysaten von kortikalen Zellkulturen erkannt werden, noch bei Kulturen bei denen Aktivatoren oder Inhibitoren von Akt und PKC verwendet wurden. Schlußfolgernd lässt sich sagen, dass entweder die Phosphomotiv-Antikörper die Phosphorylierungsstelle von CALEB nicht erkennen (d.h. der Antikörper ist nicht genügend sensitiv) oder dass CALEB durch eine andere Kinase wie Akt oder PKC phosphoryliert wird.

Die Frage nach der Phosphorylierung von CALEB kann bis heute nicht geklärt werden. Jedoch kann angenommen werden, dass CALEB das Neuritenwachstum über die PI3K-Akt-mTOR und PKC Signalkaskade beeinflusst (Nakanishi et al., 2006) oder dass CALEB die Dendritenbaumkomplexität über die PI3K-Akt-mTOR und die Spine Morphologie zusätzlich über die PI3K-Akt-mTOR und PKC Signalkaskade beeinflusst (Brandt et al., 2007).

#### **4.9. Untersuchung zur Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren durch die EGF-Domäne von CALEB**

Die proteolytische Umwandlung von CALEB zu einer verkürzten Plasmamembran-assoziierten Form mit einer frei zugänglichen EGF Domäne lässt vermuten, dass CALEB als juxtacrines Signaltransduktionsystem zwischen benachbarten Neuronen wirken kann. Diese Interpretation setzt einen Interaktionspartner voraus. Von anderen Mitgliedern der EGF-Familie ist bekannt, dass diese ErbB-Rezeptoren binden und phosphorylieren.

Aus diesem Grund haben (Kinugasa et al., 2004) die Interaktion von CALEB und ErbB-Rezeptoren in Karzinomzelllinien, die Tyrosinkinaserzeptoren enthalten, untersucht. Sie beschrieben, dass die extrazelluläre Domäne von CALEB direkt mit dem ErbB3-Rezeptor interagiert und den ErbB2-Rezeptor transaktiviert. Weiterhin sind die Autoren der Ansicht, dass NGC/CALEB ein neues Mitglied der Neuregulin-Familie ist. In dieser Untersuchung

haben die Autoren die Induktion der Zellproliferation durch CALEB als eine neue zellbiologische Funktion der ErbB-Rezeptoren vorgeschlagen. Die Zellproliferation könnte eine wichtige Funktion für CALEB sein.

Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass CALEB in der frühen Phase der Entwicklung eine andere Funktion hat, z.B. das Auswachsen von Neuriten beeinflusst (Nakanishi et al., 2006) und die Dendritenbaumkomplexität reguliert (Brandt et al., 2007; Brandt et al., 2008). Die Zellproliferation findet in einer sehr frühen Phase der Entwicklung statt und bildet somit einen Widerspruch zum Expressionsprofil von CALEB, das vorwiegend in postnatalen Stadien des Nervensystem auftritt (Kinugasa et al., 2004).

Um die Interaktion von CALEB mit ErbB Rezeptoren zu prüfen, also ob die EGF-ähnliche Domäne von CALEB an ErbB-Rezeptoren bindet und eine Phosphorylierung induzieren kann, wurde hier die Interaktion der EGF-ähnlichen Domäne an verschiedenen Karzinomzelllinien, die Tyrosinkinaserzeptoren (ErbB1, 2, 3 und 4) enthalten, getestet. Hierfür wurde eine rekombinante EGF-ähnliche Domäne in COS-7 Zellen hergestellt und natives CALEB aus embryonalen Hühneraugen isoliert und mit Karzinomzelllinien inkubiert. Dieser Ansatz unterscheidet sich von den Experimenten von Kinugasa und Kollegen (2004) dahingehend, dass dort eine rekombinate extrazelluläre Domäne von CALEB/NGC in *E. coli* und CHO-Zellen hergestellt wurde. Es wurde eine Bindung an ErbB-Rezeptoren und eine Induktion der Zellproliferation von Karzinomzelllinien mittels einer bakteriell hergestellten extrazellulären Domäne von CALEB/NGC beobachtet. Allerdings bleibt zu fragen, ob die Disulfidbrücken der EGF-ähnlichen Domäne von CALEB in Bakterien korrekt geschlossen sind.

Durch Zugabe der rekombinant hergestellten EGF-Domänen von CALEB oder dem isolierten nativen CALEB aus Hühneraugen zu allen getesteten Karzinomzelllinien konnte in unserem Experiment keine Phosphorylierung der ErbB-Rezeptoren beobachtet werden. Jedoch zeigten die Kontrollen, EGF und TGF $\alpha$ , eine deutliche Tyrosinphosphorylierung. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die EGF-Domäne von CALEB unter den getesteten Bedingungen keine Phosphorylierung von ErbB-Rezeptoren induziert.

Bis jetzt konnte keine Interaktion von CALEB und ErbB-Rezeptoren durch uns nachgewiesen werden. Diese Interaktion wäre sehr interessant, da eine Publikation zeigt, dass EGF und Neuregulin-1 neurotrophische Faktoren für mesencephalische dopaminerge Neuronen darstellen und Mutationen von Nrg-1 mit Schizophrenie korrelieren. CALEB enthält eine EGF-Domäne, die strukturell denen von Neuregulin-1 ähnlich ist. Weiterhin ist die Expression von ErbB-Rezeptoren (ErbB3 und ErbB4) mit einer starken Expression am 18.

postnatalen Tag nachgewiesen worden (Abe et al., 2009). Dieses Expressionsprofil korreliert mit den Glykosylierungsprofil von CALEB in einigen Hirnregionen. Die Glykosylierung ist beteiligt an der Regulation von Wachstumsfaktoren in der extrazellulären Matrix (Bülow and Hobert, 2006; Kleene and Schachner, 2004; Oohira et al., 2000a; Sugahara and Mikami, 2007).

#### 4.10. Analyse der Genexpression in CALEB-defizienten Mäusen

Die Abwesenheit von CALEB führt zu einer reduzierten Neurotransmitter-Freisetzungswahrscheinlichkeit in den frühen Phasen der Entwicklung (Jüttner et al., 2005), zu Veränderungen in der Synapseneliminierung an der Purkinje-Zelle im Kleinhirn (Dr. Jüttner, unveröffentlicht) und zu einem veränderten Lernverhalten im Laufrad-Test (Dr. Montag, Leibnitz Institut, Magdeburg, unveröffentlicht). Um den molekularen Mechanismus zu verstehen, der für diese Phänomene verantwortlich ist, wurde in unserer Arbeitsgruppe das mRNA Expressionmuster im Colliculus superior von Wildtyp-Mäusen und CALEB Knockout-Mäusen unter Verwendung von Affymetrix-Genchips durchgeführt.

Ausgehend von dieser mRNA-Expressionsanalyse, wurde eine „real-time-PCR“-Analyse von einer Reihe veränderter Kandidatengene durchgeführt. Unter ihnen sind insbesondere Gene, welche die Exo- und Endozytose der präsynaptischen Vesikel beeinflussen, und deren Expression in der CALEB-Mutante vermindert ist, z.B. die AP2-associated-kinase 1 (aak1) und Untereinheiten spannungsabhängiger Calciumkanäle, die zu veränderter Neurotransmitter Freisetzung führen könnten. Ein anderes verändertes Kandidatengen aus der Affymetrix-Genchip-Analyse war das Myelin-basic Protein (mbp).

Mit der RT-PCR konnten jedoch bei keinem der genannten Kandidaten signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und CALEB  $-/-$  gezeigt werden.

Weiterhin wird die *CSPG5* mRNA Menge bei der „Spreading Depression“ in einer mRNA-Expressionsanalyse (Affymetrix-Genchips) als kurzzeitig erhöht beobachtet (Urbach et al., 2006). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen CALEB und einer KCl-ausgelösten „Spreading Depression“ zu analysieren, wurde hier die zu untersuchende Probe mit der „real-time-PCR“ analysiert. Diese Untersuchung zeigte bei der CALEB mRNA eine geringe Erhöhung der Expression, die jedoch in statistischen Test als nicht signifikant bewertet wurde. Die mRNA-Expressionsanalysen von Affymetrix-Genchips geben Hinweise für Kandidatengene, jedoch eine Aussage bezüglich einer veränderter Genexpression ist nur in Kombination mit der „real-time-PCR“ möglich. Die „real-time-PCR“ ist eine sehr sensitive Methode für mRNA-Expression.

#### 4.11. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Aspekte über die Expression und Lokalisation von CALEB geklärt, sowie der Einfluss auf die Dendritenbaumkomplexität in „Knock-out“ Neuronen untersucht.

CALEB ist in einigen Gehirnregionen besonders stark in frühen Stadien der Entwicklung exprimiert und weist eine starke Glykosylierung auf. Interessantweise weist CALEB eine somato-dendritische Lokalisation auf, ist dabei jedoch nicht spezifisch auf Synapsen beschränkt.

Die genauen Mechanismen der Funktion von CALEB, sowie seine Phosphorylierung sind Fragen, die noch in weiterführenden Studien geklärt werden müssen. Die signifikante Reduktion der Dendritenbaumkomplexität in CALEB  $-/-$  Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp Neuronen und der Einfluss auf die synaptische Transmission sollten Gegenstand künftiger Untersuchungen sein. Da neuronale Zellkulturen möglicherweise Veränderungen durch ihre Isolierung unterliegen, sollte in der Zukunft die Analyse des Dendritenbaumes in kortikalen Hirnschnitten in CALEB  $-/-$  Tieren und mit den Dendritenbäumen in Wildtyp Tieren verglichen werden (*in vivo*).

Ein Aspekt der vorliegenden Arbeit ist, die Schaffung eines Test-Systems für neue Interaktionspartner von CALEB, die nach Zugabe in der Neuronenkultur eine Veränderung der Dendritenbaummorphologie verursachen könnten.

Zusammenfassend weist die veränderte neuronale Morphologie darauf hin, dass CALEB Aspekte der Entwicklung von neuronalen Verschaltungen beeinflusst.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abe, Y., Namba, H., Zheng, Y., and Nawa, H. (2009). In Situ Hybridization Reveals Developmental Regulation of *ErbB1-4* Mrna Expression in Mouse Midbrain: Implication of ErbB Receptors for Dopaminergic Neurons. *Neuroscience* *161*, 95-110.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (New York: Garland Science).
- Ansorge, W. (1985). Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *J. Biochem. Biophys. Methods* *11*, 13-20.
- 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.
- Aono, S., Tokita, Y., Shuo, T., Yamauchi, S., Matsui, F., Nakanishi, K., Hirano, K., Sano, M., and Oohira, A. (2004). Glycosylation site for chondroitin sulfate on the neural part-time proteoglycan, neuroglycan C. *J. Biol. Chem.* *279*, 46536-46541.
- Aono, S., Tokita, Y., Yasuda, Y., Hirano, K., Yamauchi, S., Shuo, T., Matsui, F., Keino, H., Kashiwai, A., Kawamura, N., Shimada, A., Kishikawa, M., Asai, M., and Oohira, A. (2006). Expression and identification of a new splice variant of neuroglycan C, a transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, in the human brain. *J. Neurosci. Res.* *83*, 110-118.
- Baens, M., Noels, H., Broeckx, V., Hagens, S., Fevery, S., Billiau, A.D., Vankelecom, H., and Marynen, P. (2006). The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS. ONE.* *1*, e54.
- Bausen, M., Fuhrmann, J.C., Betz, H., and O'sullivan, G.A. (2006). The state of the actin cytoskeleton determines its association with gephyrin: role of ena/VASP family members. *Mol. Cell Neurosci.* *31*, 376-386.
- Bellone, C., and Nicoll, R.A. (2007). Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron* *55*, 779-785.
- Berardi, N., Pizzorusso, T., Ratto, G.M., and Maffei, L. (2003). Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci.* *26*, 369-378.
- Bjorkblom, B., Ostman, N., Hongisto, V., Komarovski, V., Filen, J.J., Nyman, T.A., Kallunki, T., Courtney, M.J., and Coffey, E.T. (2005). Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: Role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *Journal of Neuroscience* *25*, 6350-6361.
- Blobel, C.P. (2000). Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 606-612.
- Brandt, N., Franke, K., Johannes, S., Buck, F., Harder, N., Hassel, B., Nitsch, R., and Schumacher, S. (2008). B56 beta, a regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with CALEB/NGC-mediated dendritic branching. *Faseb Journal* *22*, 2521-2533.
- Brandt, N., Franke, K., Rasin, M.R., Baumgart, J., Vogt, J., Khrulev, S., Hassel, B., Pohl, E.E., Sestan, N., Nitsch, R., and Schumacher, S. (2007). The neural EGF family member CALEB/NGC mediates dendritic tree and spine complexity. *EMBO J.* *26*, 2371-2386.

- Brown,D.A., and Rose,J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.
- Bulow,H.E., and Hobert,O. (2006). The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22, 375-407.
- Burridge,K., and Wennerberg,K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179.
- Caceres,A., and Dotti,C. (1984). Immunoreactivity Changes in Map2 and Tubulin in Partially Denervated Purkinje-Cells. *Archivos de Biologia y Medicina Experimentales* 17, R122.
- 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. *Journal of Cell Biology* 86, 831-843.
- Carmignoto,G., and Vicini,S. (1992). Activity-Dependent Decrease in Nmda Receptor Responses During Development of the Visual-Cortex. *Science* 258, 1007-1011.
- Chamberlain,L.H., Burgoyne,R.D., and Gould,G.W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: Implications for the spatial control of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5619-5624.
- Chomczynski,P., and Sacchi,N. (1987). Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.
- Cline,H., and Haas,K. (2008). The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: a review of the synaptotrophic hypothesis. *Journal of Physiology-London* 586, 1509-1517.
- Cline,H.T. (2001). Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 118-126.
- Cohen,P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology* 4, E127-E130.
- Craig,A.M., and Banker,G. (1994). Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 267-310.
- da Silva,J.S., and Dotti,C.G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 694-704.
- Dalva,M.B., Takasu,M.A., Lin,M.Z., Shamah,S.M., Hu,L., Gale,N.W., and Greenberg,M.E. (2000). EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103, 945-956.
- Dijkhuizen,P.A., and Ghosh,A. (2005). BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways. *Journal of Neurobiology* 62, 278-288.
- Dotti,C.G., Sullivan,C.A., and Banker,G.A. (1988). The Establishment of Polarity by Hippocampal-Neurons in Culture. *Journal of Neuroscience* 8, 1454-1468.
- Dresbach,T., Qualmann,B., Kessels,M.M., Garner,C.C., and Gundelfinger,E.D. (2001). The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 94-116.
- Edelmann,L., Hanson,P.I., Chapman,E.R., and Jahn,R. (1995). Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* 14, 224-231.
- Feller,M.B. (1999). Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* 22, 653-656.

- Feng,G.P., Mellor,R.H., Bernstein,M., Keller-Peck,C., Nguyen,Q.T., Wallace,M., Nerbonne,J.M., Lichtman,J.W., and Sanes,J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41-51.
- Fernandez-Chacon,R., and Sudhof,T.C. (1999). Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle. *Annu. Rev. Physiol* 61, 753-776.
- Fink,C.C., Bayer,K.U., Myers,J.W., Ferrell,J.E., Jr., Schulman,H., and Meyer,T. (2003). Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron* 39, 283-297.
- Fritschy,J.M., Harvey,R.J., and Schwarz,G. (2008). Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends in Neurosciences* 31, 257-264.
- Garner,C.C., Nash,J., and Haganir,R.L. (2000). PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol.* 10, 274-280.
- Garner,C.C., Zhai,R.G., Gundelfinger,E.D., and Ziv,N.E. (2002). Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends in Neurosciences* 25, 243-250.
- Gascon,E., Dayer,A.G., Sauvain,M.O., Potter,G., Jenny,B., De Roo,M., Zraggen,E., Demareux,N., Muller,D., and Kiss,J.Z. (2006). GABA regulates dendritic growth by stabilizing lamellipodia in newly generated interneurons of the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 26, 12956-12966.
- Gaudilliere,B., Konishi,Y., de la Iglesia,N., Yao,G.I., and Bonni,A. (2004). A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron* 41, 229-241.
- Giesemann,T., Schwarz,G., Nawrotzki,R., Berhorster,K., Rothkegel,M., Schluter,K., Schrader,N., Schindelin,H., Mendel,R.R., Kirsch,J., and Jockusch,B.M. (2003). Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J. Neurosci.* 23, 8330-8339.
- Goda,Y., and Davis,G.W. (2003). Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 40, 243-264.
- Goodman,C.S., and Shatz,C.J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72 *Suppl.*, 77-98.
- Gutierrez,H., and Davies,A.M. (2007). A fast and accurate procedure for deriving the Sholl profile in quantitative studies of neuronal morphology. *J. Neurosci. Methods* 163, 24-30.
- Han,B., and Fischbach,G.D. (1999). The release of acetylcholine receptor inducing activity (ARIA) from its transmembrane precursor in transfected fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 274, 26407-26415.
- Hanahan,D. (1985). Techniques for transformation of E.coli. In *DNA cloning, a practical approach* (Volume I), D.M. Glover, ed. (Washington D.C.:IRL Press Oxford), pp. 109-135.
- Hassel,B., Schreff,M., Stube,E.M., Blaich,U., and Schumacher,S. (2003). CALEB/NGC interacts with the Golgi-associated protein PIST. *J. Biol. Chem.* 278, 40136-40143.
- Hestrin,S. (1992). Developmental Regulation of Nmda Receptor-Mediated Synaptic Currents at A Central Synapse. *Nature* 357, 686-689.
- Hoogenraad,C.C., Feliu-Mojer,M.I., Spangler,S.A., Milstein,A.D., Dunah,A.W., Hung,A.Y., and Sheng,M. (2007). Liprin alpha 1 degradation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates LAR receptor tyrosine phosphatase distribution and dendrite development. *Developmental Cell* 12, 587-602.

- Huttner, W.B., Schiebler, W., Greengard, P., and Decamilli, P. (1983). Synapsin-I (Protein-I), A Nerve Terminal-Specific Phosphoprotein .3. Its Association with Synaptic Vesicles Studied in A Highly Purified Synaptic Vesicle Preparation. *Journal of Cell Biology* 96, 1374-1388.
- Ichihara-Tanaka, K., Oohira, A., Rumsby, M., and Muramatsu, T. (2006). Neuroglycan C is a novel midkine receptor involved in process elongation of oligodendroglial precursor-like cells. *J. Biol. Chem.* 281, 30857-30864.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247-269.
- Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2003). The control of dendrite development. *Neuron* 40, 229-242.
- Jaworski, J., Spangler, S., Seeburg, D.P., Hoogenraad, C.C., and Sheng, M. (2005). Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J. Neurosci.* 25, 11300-11312.
- Jüttner, R., More, M.I., Das, D., Babich, A., Meier, J., Henning, M., Erdmann, B., Müller, 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.
- Jüttner, R., and Rathjen, F.G. (2005). Molecular analysis of axonal target specificity and synapse formation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 2811-2827.
- Katz, L.C., and Crowley, J.C. (2002). Development of cortical circuits: lessons from ocular dominance columns. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 34-42.
- Kennelly, P.J., and Krebs, E.G. (1991). Consensus Sequences As Substrate-Specificity Determinants for Protein-Kinases and Protein Phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* 266, 15555-15558.
- Kinugasa, Y., Ishiguro, H., Tokita, Y., Oohira, A., Ohmoto, H., and Higashiyama, S. (2004). Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 1045-1049.
- Kleene, R., and Schachner, M. (2004). Glycans and neural cell interactions. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 195-208.
- Konur, S., and Ghosh, A. (2005). Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron* 46, 401-405.
- Kumar, V., Zhang, M.X., Swank, M.W., Kunz, J., and Wu, G.Y. (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J. Neurosci.* 25, 11288-11299.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Massague, J., and Pandiella, A. (1993). Membrane-Anchored Growth-Factors. *Annual Review of Biochemistry* 62, 515-541.
- McAllister, A.K. (2000). Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cerebral Cortex* 10, 963-973.
- McCormick, D.A. (1999). Spontaneous activity: signal or noise? *Science* 285, 541-543.
- McMahon, H.T., Foran, P., Dolly, J.O., Verhage, M., Wiegant, V.M., and Nicholls, D.G. (1992). Tetanus toxin and botulinum toxins type A and B inhibit glutamate, gamma-aminobutyric acid, aspartate, and

- met-enkephalin release from synaptosomes. Clues to the locus of action. *J. Biol. Chem.* 267, 21338-21343.
- Moore,A.W., Jan,L.Y., and Jan,Y.N. (2002). hamlet, a binary genetic switch between single- and multiple- dendrite neuron morphology. *Science* 297, 1355-1358.
- Nakanishi,K., Aono,S., Hirano,K., Kuroda,Y., Ida,M., Tokita,Y., Matsui,F., and 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.
- Nestler,E.J., and Greengard,P. (1983). Protein-Phosphorylation in the Brain. *Nature* 305, 583-588.
- Neuhoff,V., Arold,N., Taube,D., and Ehrhardt,W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Oohira,A., Kushima,Y., Tokita,Y., Sugiura,N., Sakurai,K., Suzuki,S., and Kimata,K. (2000a). Effects of lipid-derivatized glycosaminoglycans (GAGs), a novel probe for functional analyses of GAGs, on cell-to-substratum adhesion and neurite elongation in primary cultures of fetal rat hippocampal neurons. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 378, 78-83.
- Oohira,A., Matsui,F., Tokita,Y., Yamauchi,S., and Aono,S. (2000b). Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374, 24-34.
- Parrish,J.Z., Emoto,K., Kim,M.D., and Jan,Y.N. (2007). Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. *Annual Review of Neuroscience* 30, 399-423.
- Parton,R.G., and Simons,K. (1995). Digging into caveolae. *Science* 269, 1398-1399.
- Perdew,G.H., Schaup,H.W., and Selivonchick,D.P. (1983). The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes. *Anal. Biochem.* 135, 453-455.
- Rajendran,L., and Simons,K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science* 118, 1099-1102.
- Redmond,L., and Ghosh,A. (2005). Regulation of dendritic development by calcium signaling. *Cell Calcium* 37, 411-416.
- Redmond,L., Kashani,A.H., and Ghosh,A. (2002). Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* 34, 999-1010.
- Roach,P.J. (1991). Multisite and Hierarchical Protein-Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 266, 14139-14142.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview).
- Sanchez,A.L., Matthews,B.J., Meynard,M.M., Hu,B., Javed,S., and Cohen,C.S. (2006). BDNF increases synapse density in dendrites of developing tectal neurons in vivo. *Development* 133, 2477-2486.
- Scannevin,R.H., and Huganir,R.L. (2000). Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 133-141.

- Schumacher,S., Jung,M., Norenberg,U., Dorner,A., Chiquet-Ehrismann,R., Stuermer,C.A., and Rathjen,F.G. (2001). CALEB 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.
- Schumacher,S., and Stube,E.M. (2003). 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.
- 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.
- Scott,E.K., and Luo,L. (2001). How do dendrites take their shape? *Nat. Neurosci.* 4, 359-365.
- Sheng,M. (2001). Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7058-7061.
- Sholl,D.A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J. Anat.* 87, 387-406.
- Shuo,T., Aono,S., Nakanishi,K., Tokita,Y., Kuroda,Y., Ida,M., Matsui,F., Maruyama,H., Kaji,T., and Oohira,A. (2007). Ectodomain shedding of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, by TIMP-2- and TIMP-3-sensitive proteolysis. *Journal of Neurochemistry* 102, 1561-1568.
- Simons,K., and Ikonen,E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Sin,W.C., Haas,K., Ruthazer,E.S., and Cline,H.T. (2002). Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature* 419, 475-480.
- Sugahara,K., and Mikami,T. (2007). Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 536-545.
- Thomas,C.G., Miller,A.J., and Westbrook,G.L. (2006). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* 95, 1727-1734.
- Toomre,D., Steyer,J.A., Keller,P., Almers,W., and Simons,K. (2000). Fusion of constitutive membrane traffic with the cell surface observed by evanescent wave microscopy. *J. Cell Biol.* 149, 33-40.
- Tsui-Pierchala,B.A., Encinas,M., Milbrandt,J., and Johnson,E.M. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends in Neurosciences* 25, 412-417.
- Ullian,E.M., Christopherson,K.S., and Barres,B.A. (2004). Role for glia in synaptogenesis. *Glia* 47, 209-216.
- Urbach,A., Bruehl,C., and Witte,O.W. (2006). Microarray-based long-term detection of genes differentially expressed after cortical spreading depression. *Eur. J. Neurosci.* 24, 841-856.
- Urbanska,M., Blazejczyk,M., and Jaworski,J. (2008). Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 68, 264-288.
- Vaughn,J.E. (1989). Fine-Structure of Synaptogenesis in the Vertebrate Central Nervous-System. *Synapse* 3, 255-285.

Verhage,M., Maia,A.S., Plomp,J.J., Brussaard,A.B., Heeroma,J.H., Vermeer,H., Toonen,R.F., Hammer,R.E., van den Berg,T.K., Missler,M., Geuze,H.J., and Sudhof,T.C. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-869.

Voet,D., and Voet,J. (1992). *Biochemie*.

Watanabe,E., Maeda,N., Matsui,F., Kushima,Y., Noda,M., and Oohira,A. (1995). Neuroglycan-C, A Novel Membrane-Spanning Chondroitin Sulfate Proteoglycan That Is Restricted to the Brain. *Journal of Biological Chemistry* 270, 26876-26882.

Whitford,K.L., Dijkhuizen,P., Polleux,F., and Ghosh,A. (2002). Molecular control of cortical dendrite development. *Annual Review of Neuroscience* 25, 127-149.

Willem,M., Garratt,A.N., Novak,B., Citron,M., Kaufmann,S., Rittger,A., DeStrooper,B., Saftig,P., Birchmeier,C., and Haass,C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-666.

Winder,D.G., and Sweatt,J.D. (2001). Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity (vol 2, pg 461, 2001). *Nature Reviews Neuroscience* 2, 670.

Wong,R.O., and Ghosh,A. (2002). Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 803-812.

Wu,G.Y., and Cline,H.T. (1998). Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII. *Science* 279, 222-226.

Wu,J.I., Lessard,J., Olave,I.A., Qiu,Z., Ghosh,A., Graef,I.A., and Crabtree,G.R. (2007). Regulation of dendritic development by neuron-specific chromatin remodeling complexes. *Neuron* 56, 94-108.

Yamauchi,S., Tokita,Y., Aono,S., Matsui,F., Shuo,T., Ito,H., Kato,K., Kasahara,K., and Oohira,A. (2002). Phosphorylation of neuroglycan C, a brain-specific transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, and its localization in the lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 277, 20583-20590.

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 proteoglycan with an EGF module. *Neurosci. Res.* 32, 313-322.

Zhang,J., Zhang,L., Jiao,H., Zhang,Q., Zhang,D., Lou,D., Katz,J.L., and Xu,M. (2006). c-Fos facilitates the acquisition and extinction of cocaine-induced persistent changes. *J. Neurosci.* 26, 13287-13296.



## **7. Lebenslauf**

### Veröffentlichungen

**Craveiro, R.B.** and Miyaki, C.Y. Analysis of the genetic variability of *Propyrrhura maracana* (Psittaciformes, Aves) using DNA fingerprinting. **Ararajuba** 8 (2): 79-84 Dez. 2000.

**Craveiro, R.B.**, Ramalho, J.D., Chagas, J.R., Wang, P.H.M., Casarini, D., Pasquero, J.L., Araujo, R.C., and Pesquero, J.B. (2006). High expression of human carboxypeptidase M in *Pichia pastoris*. Purification and partial characterization. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39, 211-217.

Paredes-Gamero, E.J., **Craveiro, R.B.**, Pesquero, J.B., Franca, J.P., Oshiro, M.E.M., and Ferreira, A.T. (2006). Activation of P2Y(1) receptor triggers two calcium signaling pathways in bone marrow erythroblasts. *European Journal of Pharmacology* 534, 30-38.

**Craveiro, R.B.**, Jüttner, R., Stoenica, L. and Rathjen, F.G (2009). The absence of CALEB impairs dendritic tree development and synapse maturation (In preparation).

### Posterbeiträge

**Craveiro, RB**, Jüttner, R, Babich, A and Rathjen, FG. Developmentally regulated expression pattern of CALEB, an EGF-like protein restricted to the central nervous system. **Berlin Neuroscience Forum 2006**, Liebenwalde, Juni 8-10.

Jüttner, R., Moré, MI, Babich, A, Meier, J., Erdmann, B., Grantyn, R., Montag, D., **Craveiro, RB**, and Rathjen, FG. CALEB, an activity-regulated protein involved in the establishment of synaptic connectivity. **Axon guidance, synaptogenesis & neural plasticity - Cold Spring Harbor 2006**, New York, Sep. 13-17.

**Craveiro, RB**, Jüttner, R and Rathjen, FG. Developmentally regulated expression, localization and functional regulation of CALEB, an EGF-like protein. **Berlin Neuroscience Forum 2008**, Liebenwalde, Juni 5 – 7.

**Craveiro, RB**, Jüttner, R and Rathjen, FG. Developmentally regulated expression, localization and functional regulation of CALEB, an EGF-like protein. **I NEUROLATAM, 2008**, Buzios, Brazil, Sep. 1 - 4.

## 8. Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Fritz G. Rathjen herzlich für die Möglichkeit, meine Dissertation in seinem Labor anzufertigen, danken. Seine ständige Bereitschaft Hilfestellungen zu geben sowie die vielfältigen Diskussionen, werden mir aus dieser intensiven Zeit positiv im Gedächtnis bleiben.

Prof. Dr. Carmen Birchmeier-Kohler danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. René Jüttner, der mir insbesondere in der ganzen Doktorarbeit mit zahlreichen Anregungen, methodischen Tipps und seinem Interesse am Fortgang der Arbeit hilfreich zur Seite stand.

Ebenfalls danken möchte ich Dr. Hannes Schmidt, Dr. Christopher Patzke, Dr. Sabrina Eichler und Dr. Luminita Stoenica für die bereitwillige Preisgabe ihres methodischen Wissens sowie für die interessanten fachlichen Diskussionen.

Weiterhin möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Rathjen am MDC danken, welche mir durch ihre freundliche und kollegiale Art mir immer zur Seite standen: Agné Stonkute, Birgit Cloos, Jadwiga Cholewa, Hannelore Drechsler, Madlen Driesner, Mechthild Henning, Mie Kristensen, Roberta Schmieder, und Vicent Ramillon.

Auch Dr. Dasa Berackova, Dr. Hans Jürgen Streicher, Dr. Wolfgang Hanuschik und Horst Hennert möchte ich für ihre freundliche Unterstützung bei kleinen Problemen mit der deutschen Sprache danken.

Außerdem möchte ich mich auch herzlich bedanken bei:

- Dr. Albrecht Otto (AG Wanker, MDC, Berlin) für die Massenspektrometrie-basierte Identifizierung verschiedener Proteinbanden.
- Dr. Anje Sporbert für die Konfokale Mikroskopie
- Frau Bach, die mir viele Arbeiten bei der Tierzucht abgenommen hat.
- dem DAAD für die finanzielle Unterstützung während meiner Doktorarbeit

Ganz besonderer Dank gebührt natürlich meiner lieben Familie, die auf ihre Art nie müde wurde, mich aufzumuntern und zu unterstützen.

## 9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Rogério Bastos Craveiro, geboren am 22.05.1976, in Sao Paulo, dass die von mir vorgelegte Dissertation „Lokalisation, proteolytische Umwandlung von CALEB und seine Funktion bei der Reifung neuronaler Verschaltungen“ selbstständig angefertigt wurde. Verwendete Hilfsmittel und Hilfen wurden vollständig angegeben.

Diese Dissertation wurde noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt. Die diesem Promotionsverfahren zugrunde liegende Promotionsordnung habe ich zur Kenntnis genommen.

Berlin, den 6 August 2009.

---

Rogério Bastos Craveiro