

Die Bedeutung von CALEB/NGC für die Ausdifferenzierung von Dendritenbäumen

D i s s e r t a t i o n

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

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

vorgelegt von

Nicola Brandt
aus Hannover

Berlin

November 2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2004 bis November 2008 im Institut für Zell- und Neurobiologie, Centrum für Anatomie, Charité – Universitätsmedizin Berlin und unter der Leitung von Prof. Dr. Robert Nitsch angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Robert Nitsch
2. Gutachter: Prof. Dr. Constance Scharff

Disputation am 05.03.2009

Darin besteht das Wesen der Wissenschaft. Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte. Dann sieht man nach, ob es der Fall ist, und im allgemeinen ist es nicht der Fall.

Bertrand Russell, brit. Philosoph und Mathematiker, 1950

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	VI
Zusammenfassung	IX
Summary	XI
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau des Nervensystems	1
1.2 Regulation des Dendritenwachstums	2
1.3 Extrazelluläre Faktoren, die an der Regulation der Dendritenkomplexität beteiligt sind	6
1.4 Intrazelluläre Faktoren, die an der Regulation der Dendritenbaumkomplexität beteiligt sind	8
1.4.1 Rho-GTPasen	8
1.4.2 Signalwege, die für die Dendritenentwicklung von Bedeutung sind	9
1.4.2.1 CaMKII β und Transkriptionsfaktor CREB	9
1.4.2.2 Der MEK-MAPK-Signalweg in der Dendritendifferenzierung	10
1.4.2.3 Die Bedeutung des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges für die Dendritenkomplexität	10
1.5 CALEB/NGC	12
1.5.1 Molekularstruktur von CALEB/NGC	12
1.5.2 CALEB/NGC Expression im Nervensystem	16
1.5.3 Bekannte Interaktionen von CALEB/NGC	17
1.5.3.1 Extrazelluläre Interaktionspartner von CALEB/NGC	17
1.5.3.4 Intrazellulärer Interaktionspartner von CALEB/NGC	18
1.5.4 Mögliche Funktionen von CALEB/NGC	19
1.6 Ziel der Arbeit	20

2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und Zellkulturmaterialien	22
2.1.2	Geräte	22
2.1.3	Antikörper	24
2.1.4	Konstrukte	25
2.1.5	Oligonukleotide	26
2.1.6	Organismen	27
2.1.6.1	Bakterien	27
2.1.6.2	Zelllinie	27
2.1.7	Vektoren	28
2.1.8	Versuchstiere	29
2.1.9	Standards	29
2.1.10	Reinigungs-und Isolierungskits	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	30
2.2.1.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	30
2.2.1.3	Minipräparation von Plasmid-DNA durch Alkalische Lyse (nach Macherey und Nagel)	31
2.2.1.4	Midipräparation von Plasmid-DNA	32
2.2.1.5	Anlegen von Glycerolkulturen	32
2.2.1.6	Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.2.1.7	DNA-Gelelektrophorese	33
2.2.1.8	DNA-Fragment-Isolierung	34
2.2.1.9	DNA-Ligation	34
2.2.1.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
2.2.1.11	Gerichtete Mutagenese	35
2.2.1.12	Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung	36

2.2.2	Biochemische Methoden	37
2.2.2.1	Expression und Reinigung	37
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	38
2.2.2.2.1	BCA-Methode	38
2.2.2.2.2	Bradford-Methode	39
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.2.2.3.1	Herstellung der Gele	40
2.2.2.4	Immunblot (Western Blot)	41
2.2.2.5	Blot-Overlay-Assay (Peptidkompetitionsassay)	42
2.2.2.6	Herstellung von Zelllysaten	43
2.2.2.7	Membranpräparation	43
2.2.2.8	Immunpräzipitation	44
2.2.2.9	Kopplung von Peptiden an NHS-aktivierte Sepharose	46
2.2.3	Zellbiologische Methoden	47
2.2.3.1	Medium, Kulturgefäße und Kulturbedingungen	47
2.2.3.2	Passagieren von Zellen	47
2.2.3.3	Primäre Zellkultur	48
2.2.3.4	Transiente Transfektion von Zellen	49
2.2.3.4.1	Transfektion mit FuGene TM Transfektionsreagenz	49
2.2.3.4.2	Transfektion mit Effectene Transfektionsreagenz	49
2.2.3.5	Inhibitoren	50
2.2.3.6	Verwendete shRNAs und siRNAs	51
2.2.3.7	Fixierung und Permeabilisierung der transfizierten Zellen	51
2.2.3.8	Indirekte Immunfluoreszenz (Epifluoreszenz und konfokale Aufnahme)	51
2.2.4	Statistische Verfahren	53

3 Ergebnisse	54
3.1 Zelluläre Analysen	54
3.1.1 CALEB/NGC und seine Funktion in der Entwicklung der Dendritenkomplexität von hippocampalen Neuronen	54
3.1.2 Die Expression von CALEB/NGC in Neuronen erhöht die Dendritenkomplexität	55
3.1.3 Herabregulierung („knockdown“) der endogenen Expression von CALEB/NGC mittels RNA-Interferenz	60
3.1.4 Der „knockdown“ von endogenem CALEB/NGC reduziert Dendritenkomplexität	65
3.1.5 Ein dominant-negatives CALEB/NGC-Konstrukt verringert die Dendritenkomplexität hippocampaler Neurone	67
3.1.6 Eingrenzung der intrazellulären Region von CALEB/NGC, die für die Erhöhung der Dendritenkomplexität notwendig ist	69
3.1.7 Einfluss des extrazellulären Bereichs von CALEB/NGC auf die Dendritenkomplexität: Analyse der EGF-ähnlichen Domäne	73
3.2 Untersuchungen zur Signaltransduktion des CALEB/NGC-vermittelten Effektes auf Dendritenkomplexität	78
3.2.1 Die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität ist nicht vom MEK-MAPK- Signalweg abhängig	78
3.2.2 Die Bedeutung des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges für CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität	80
3.2.3 CALEB/NGC stimuliert Dendritenkomplexität unabhängig von elektrischer Aktivität	85
3.2.4 CALEB/NGC stimuliert Dendritenkomplexität abhängig von PKC	87
3.3 Biochemische Charakterisierung der Interaktion von B56 β mit CALEB/NGC	89
3.3.1 Konstrukte und Proteinexpression	89
3.3.2 Proteinaufreinigung	90
3.3.3 Untersuchung der Interaktion von B56 β , einer regulatorischen Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, mit CALEB/NGC im Blot-Overlay-Assay	91
3.3.4 Analyse der Assoziation von B56 β mit CALEB/NGC in HEK293-Zellen	93

3.3.5	Charakterisierung der Interaktionsstelle von B56 β mit CALEB/NGC	95
3.3.6	B56 β interagiert mit CALEB/NGC <i>in vivo</i>	97
3.4	Funktionsanalyse der Interaktion von B56 β und CALEB/NGC in primären Neuronen	99
3.4.1	B56 β kolokalisiert mit CALEB/NGC in den Dendriten primärer Neurone	99
3.4.2	Die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität wird durch B56 β inhibiert	100
3.4.3	Die CALEB/NGC-induzierte Phosphorylierung von dendritischem Akt wird durch B56 β inhibiert	102
3.5	Das Punktmutationskonstrukt mCALEBb-T452A ist nicht in der Lage, Dendritenkomplexität zu stimulieren	105
4 Diskussion		109
4.1	Die Expression von CALEB/NGC in primären hippocampalen Neuronen erhöht die Dendritenkomplexität	110
4.2	Der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg ist notwendig für CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität	119
4.3	Biochemische Charakterisierung der Interaktion von B56 β und CALEB/NGC	124
4.4	Funktionsanalyse der Interaktion von B56 β und CALEB/NGC	126
4.5	Ausblick	131
5 Literatur		133
6 Anhang		144
6.1	Publikationsverzeichnis	144
6.2	Lebenslauf	145
Danksagung		146
Eidesstattliche Erklärung		148

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BIM	Bisindolylmaleimide
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	Cornu Ammonis
CALEB/NGC	Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein/ Neuroglycan C
cDNA	„copy“-Desoxyribonukleinsäure (komplementäre DNA)
Cdc42	Zellteilungszyklus-(„cell division cycle“) Protein 42
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
CSPG5	Chondroitinsulfat-Proteoglykan 5
CS	Chondroitinsulfat
Cy3	Cyanin3
D-APV	D(-)-2-Amino-5-phosphopentanoic acid
DIV	days <i>in vitro</i>
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DNAse	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonalstadium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und Andere (et altera)
EtOH	Ethanol
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EPSCs	excitatory postsynaptic currents
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	„fetal calf serum“ (fötales Kälberserum)
x g	Erdbeschleunigung
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5’-triphosphat
GTPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
h	Stunden
HA	Hämagglutinin
HBSS	„Hank’s Balanced Salt Solution“ (gepufferte Salzlösung)
HEK293-Zellen	Humane embryonale Nierenzelllinie
HRP	„horseraddish peroxidase“ (Meerrettich-Peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin

IP	Immunpräzipitation
IPSCs	inhibitory postsynaptic currents
IPTG	Isopropyl- β -D-1-Thiogalactopyranosid
IRES	internal ribosomal entry site
kDa	Kilo Dalton
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria-Bertani Medium
LP-Motiv	Leucin- und Prolin-reiches Motiv
mA	Milliamper
Mab	monoklonaler Antikörper
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“ (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MBP	Maltose-Binding-Protein
MCS	„multiple cloning site“
MEK	MAPK/ERK („mitogen-activated protein kinase“/extracellular-regulated protein kinase“) (Mitogen-aktivierte Proteinkinase/Extrazellulär regulierte Proteinkinase)
MEM	„Minimal Essential Medium“ (Zellkulturmedium)
μ m	Micrometer
μ M	Micromolar
MK	Midkine
Min	Minuten
Mol, mmol, μ mol, pmol	Mol, Millimol, Mikromol, Pikomol
mRNA	„messenger-RNA“ (Boten-Ribonukleinsäure)
n	Anzahl
NBA	Neurobasal A (Zellkulturmedium)
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF	Nifedipine
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD	optische Dichte
p	p-Wert
P	Postnatal
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P-Akt	Phospho-Akt
PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PI3K-Akt-mTOR	Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt- mammalian Target Of Rapamycin
PIST	„Golgi-associated PDZ domain containing protein
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rac	Protein mit GTPase-Aktivität („ras-related C3 botulinum toxin substrat 1)
Rb	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen
Rho	Ras-homology

RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
sec	Sekunden
SDS	„Sodium dodecyl sulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
sh	short hairpin
si	short interference
Tab.	Tabelle
TBS	„Tris buffered saline“ (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembran
TNET	total number of dendritic end tips
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
Tween20	Polyoxyethylensorbitan-Monomylaurat
U	„Units“ (Enzymeinheiten)
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	„volume per volume“ (Volumen pro Volumen)
w/v	„weight per volume“ (Gewicht pro Volumen)
well	Vertiefung
ZNS	zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Die Dendritenbaumentwicklung von Nervenzellen ist ein komplexer Prozess, der eine entscheidende Rolle beim Aufbau des neuronalen Netzwerkes spielt. An den Dendriten ausgebildete Synapsen übertragen Informationen und regeln damit die Signalweiterleitung in der Zelle (Jan und Jan, 2003; Scott und Luo, 2001; Whitford et al., 2002). In dieser Arbeit wurde erstmals eine Funktion für das neurale EGF-Familienmitglied CALEB/NGC in der Dendritogenese gezeigt. Dieses Protein wird gehirnspezifisch exprimiert und ist vor allem in dendriten- und synapsenreichen Regionen lokalisiert. Während der Dendritendifferenzierung ist die CALEB/NGC-Expression erhöht. Als Grundlage für die hier dargestellten Untersuchungen diente das Modellsystem der primären hippocampalen Neuronenkultur. So konnte gezeigt werden, dass CALEB/NGC von hippocampalen Neuronen exprimiert wird. Die Überexpression von CALEB/NGC erhöht die Dendritenbaumkomplexität von Neuronen und nimmt dadurch direkten Einfluss auf die Morphologie von Zellen, wohingegen der „knockdown“ von endogenem CALEB/NGC mittels RNAi-Technik zu einer reduzierten Dendritenverzweigung führt. Dieses belegt die Bedeutung von endogenem CALEB/NGC für die Verzweigung von Dendriten. Ebenso führt die Überexpression eines funktionell dominant-negativ wirkenden, von CALEB/NGC-abgeleiteten Konstrukts, dessen intrazellulärer Teil vollständig fehlt, zu einer Reduktion der Komplexität von Dendritenbäumen. Mittels zweier von CALEB/NGC-abgeleiteter intrazellulärer Deletionskonstrukte konnten die intrazellulären Peptidsegmente A und B als notwendig und hinreichend für die Vermittlung der Dendritenkomplexität durch CALEB/NGC identifiziert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die EGF-ähnliche Domäne, eine der prominentesten Regionen im extrazellulären Bereich von CALEB/NGC, nicht nur ausreichend, sondern essentiell ist, um die Dendritenkomplexität zu stimulieren. Untersuchungen zur Signaltransduktion des CALEB/NGC-vermittelten Effekts auf Dendritenkomplexität mittels pharmakologischer Inhibitoren zeigten, dass dieser nicht vom MEK-MAPK-Signalweg abhängig ist, da die CALEB/NGC-vermittelte Stimulation der Dendritenkomplexität auch unter Inhibitoreinfluss bestehen blieb. Allerdings konnte die Bedeutung eines aktiven PI3K-Akt-mTOR-Signalweges für die durch CALEB/NGC-induzierte Dendritenverzweigung gezeigt werden. Pharmakologische Inhibitoren der einzelnen Komponenten dieses Signalwegs, PI3K, Akt sowie mTOR, bewirkten die völlige bzw. partielle Inhibition der CALEB/NGC-vermittelten Dendritenkomplexität. Darüber hinaus konnte eine Abhängigkeit von PKC festgestellt werden. Außerdem konnte ich zeigen, dass CALEB/NGC die Dendritenkomplexität

unabhängig von neuronaler Aktivität stimuliert. Auch unter Einfluss von Aktivitätsblockern blieb die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität signifikant erhöht gegenüber Kontrollzellen.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals B56 β , eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase A als neuer intrazellulärer Interaktionspartner für CALEB/NGC beschrieben und mittels verschiedener biochemischer Analysen wie Blot-Overlay-Assays und Immunpräzipitationen bestätigt. Die Bindung von B56 β an CALEB/NGC erfolgt über das juxtamembranäre zytoplasmatische Peptidsegment A, wie Koimmunpräzipitationen mit den von CALEB/NGC-abgeleiteten intrazellulären Deletionskonstrukten sowie Affinitätspräzipitationen und Kompetitionsstudien mit entsprechend geeigneten Peptiden zeigten. Die Interaktion beider Proteine konnte nicht nur *in vitro*, sondern ebenfalls *in vivo* in neuronalem Gewebe anhand von Immunpräzipitationen aus solubilisierten Membranfraktionen von Rattenhirn nachgewiesen werden.

Um die funktionelle Auswirkung der Interaktion von B56 β und CALEB/NGC zu untersuchen, wurde zunächst das endogene Expressionsmuster von CALEB/NGC und B56 β in Dendriten verglichen. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergab, dass B56 β , ein zytosolisches Protein, und CALEB/NGC, ein Transmembranprotein, in einzelnen diskreten Anreicherungen („Spots“) auf den Dendriten, oftmals an dendritischen Verzweigungspunkten kolokalisieren. Die Koexpression von CALEB/NGC und B56 β bewirkte eine signifikante Reduktion der Anzahl dendritischer Endverzweigungen hippocampaler Neurone.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Bedeutung von CALEB/NGC für die Entwicklung von Dendritenbäumen gezeigt. Darüber hinaus wurde B56 β als neuer Interaktionspartner von CALEB/NGC identifiziert, welcher an der negativen Regulation der CALEB/NGC-vermittelten Dendritenkomplexität beteiligt ist.

Summary

The development of dendritic arbors is critical to neuronal circuit formation as dendrites are the primary sites of synaptic input (Scott and Luo, 2001; Whitford et al., 2002; Jan and Jan, 2003). In this work, the neural EGF family member CALEB/NGC was identified as a critical mediator of dendritic tree complexity. CALEB/NGC is highly expressed in brain, in particular in dendrite- and synapse-rich areas, and the expression of this protein is upregulated during times of dendrite differentiation. By means of primary hippocampal neurons in culture, a well-established model system for studying dendrite development, CALEB/NGC was shown to be expressed in hippocampal neurons and to localize to dendrites early in development. Overexpression of CALEB/NGC enhanced dendritic tree complexity, whereas reducing the endogenous expression level via RNAi-technology impaired dendritic branching. In addition, the CALEB/NGC-derived construct, which lacks the whole intracellular part, interferes in a dominant-negative manner with endogenous CALEB/NGC function. Using two different CALEB/NGC-derived intracellular deletion constructs, the intracellular peptide segments A and B were shown to be necessary and sufficient for CALEB/NGC to induce dendritic arbor complexity. Furthermore mapping experiments demonstrated that the extracellular EGF-like domain of CALEB/NGC is necessary and sufficient for increasing dendritic branching. Investigations concerning signal transduction of the CALEB/NGC-induced effect on dendritic complexity showed that the PI3K-Akt-mTOR pathway plays an important role in CALEB/NGC-mediated dendritic branching as pharmacological intervention at different steps of this pathway partially or fully inhibited the effects on dendritic tree complexity evoked by CALEB/NGC. It was also shown that a specific MEK-inhibitor did not block the CALEB/NGC-mediated dendritic branching which implies that the MEK-MAPK pathway is not involved in CALEB/NGC-induced dendritic tree complexity. PKC also participates in this process. Further studies demonstrated that CALEB/NGC is able to induce dendritic arbor complexity independently of electrical activity. CALEB/NGC could stimulate the complexity of the dendritic tree even in the presence of activity inhibitors.

Blot-overlay-assays identified B56 β , a regulatory B-subunit of the protein phosphatase 2A (PP2A), as a novel intracellular interaction partner of CALEB/NGC. Interaction of B56 β and CALEB/NGC in cell culture systems and neural tissue *in vivo* was shown by immunoprecipitations. B56 β bound to the intracellular juxtamembrane peptide segment A of CALEB/NGC as was shown *in vitro* by coimmunoprecipitations with two different CALEB/NGC-derived intracellular deletion constructs and affinity precipitation as well as

competitor studies with the respective peptides. The interaction between CALEB/NGC and B56 β *in vivo* was confirmed by performing immunoprecipiations from solubilized membrane fractions of rat brain.

Comparing the endogenous expression pattern of B56 β and CALEB/NGC in primary hippocampal neurons, I found that in addition to the cell body, B56 β and CALEB/NGC colocalize in discrete spots on main dendrites. Although B56 β is a cytosolic protein, it is membrane-associated on dendrites, which could be due to an interaction with the transmembrane protein CALEB/NGC. Furthermore, B56 β interferes with the CALEB/NGC-induced dendritic branching as was shown by functional analysis in hippocampal neurons. This work shows that dendritic branching stimulated by CALEB/NGC is dependent on active Akt. Enhanced expression of CALEB/NGC in hippocampal neurons leads to an increased phosphorylation of dendritic Akt, while coexpression of B56 β completely inhibits the phosphorylation of Akt induced by CALEB/NGC.

This work provides evidence that CALEB/NGC is critical for the regulation of key steps involved in generating dendritic tree complexity. In addition it was shown that B56 β is a novel interaction partner of CALEB/NGC, which is involved in negative regulating CALEB/NGC-induced dendritic branching.

1 Einleitung

1.1 Aufbau des Nervensystems

Das Nervensystem höherer Organismen, wie z.B. der Säugetiere, besteht hauptsächlich aus mehreren Milliarden Nervenzellen sowie Gliazellen, welche die Nervenzellen zahlenmäßig etwa um das Zehnfache übertreffen. Gliazellen werden unterteilt in Makro- und Mikroglia. Die grundlegenden Einheiten des Nervensystems bilden die Neurone. Neurone sind hoch polarisierte Zellen mit zwei Arten von strukturell und funktionell unterschiedlichen Fortsätzen, Axonen und Dendriten. Um ihrer grundsätzlichen Funktion der Weiterleitung, Speicherung und Verarbeitung von Informationen nachzukommen, sind Neurone anatomisch hochspezialisiert. Der Zellkörper, oder Perikaryon, enthält den Zellkern und die zytoplasmatischen Organellen. Eine variable Anzahl von Dendriten, die sich in Größe und Gestalt in Abhängigkeit ihres neuronalen Zelltyps unterscheiden, geht vom Perikaryon aus. Axone sind lange dünne Fortsätze, ihre Spezialisierung liegt in der schnellen Weiterleitung elektrischer Impulse. Dendriten sind stark verzweigte, zytoplasmatische Zellausläufer, die auf Empfang und Verarbeitung synaptischer Eingänge spezialisiert sind. Sie können eine enorme Vielfalt an Formen aufweisen und spielen eine bedeutende Rolle in der neuronalen Informationsverarbeitung (Cline, 2001; Wong und Ghosh, 2002). Die Dendriten mancher Neurone sind dicht mit Dornen, den sogenannten dendritischen „spines“ besetzt. Einfache „spines“ sind Ausstülpungen vom Dendriten von gewöhnlich nicht mehr als 2 μm , die oftmals in einem Köpfchen enden und eine unterschiedliche Morphologie aufweisen, die z.B. filopodienartig, pilzförmig, dünn, stummelförmig oder kelchförmig sein kann (zur Übersicht siehe Hering und Sheng, 2001).

Ihre hochkomplexen Aufgaben bewältigen die Neurone nur in organisierter Zusammenarbeit. Sie entwickeln sich durch konstante Interaktion mit anderen Neuronen und Gliazellen. Die dazu notwendige Kontrolle des Wachstums, der Differenzierung, der Verschaltung und des Überlebens wird durch vielfältige Regulationsmechanismen gesichert. Die Differenzierung des Nervensystems ist somit das Ergebnis komplexer Abläufe von Zellkommunikationen, die durch Moleküle, welche an verschiedenen Aspekten der Entwicklung beteiligt sind, vermittelt werden. Ein wichtiges Stadium beim Aufbau des neuronalen Netzwerkes ist die Entwicklung der Dendritenbäume, weil an den Dendriten Synapsen ausgebildet werden, welche Informationen übertragen und damit die Signalweiterleitung regeln (Jan und Jan, 2003; Scott und Luo, 2001; Whitford et al., 2002). Da den Dendriten eine fundamentale Rolle im

neuronalen Netzwerk zugeschrieben wird, ist es nicht überraschend, dass Abnormalitäten der Dendritenbaumstruktur und Plastizität mit einer Vielzahl bekannter humaner Krankheiten wie dem Down-Syndrom, Rett-Syndrom und dem Fragilen-X-Syndrom assoziiert sind (Kaufmann und Moser, 2000). Reduktionen in der Dendritenverzweigung können in vielen pathologischen Bedingungen beobachtet werden, wie z.B. in mentaler Retardierung (Kaufmann und Moser, 2000) und Alzheimerscher Erkrankung (Scheibel, 1983). Untersuchungen zur Entwicklung der Dendritenbäume können daher wichtige Einsichten in die zelluläre Basis der normalen Gehirnentwicklung sowie auch in neurologische, degenerative und verletzungsbedingte Erkrankungen bieten.

1.2 Regulation des Dendritenwachstums

Während der Entwicklung des Nervensystems wandern neuronale Vorläuferzellen in zukünftiges Nervengewebe ein und differenzieren sich, indem sie Neuriten und Dendriten ausbilden und synaptische Verbindungen mit entsprechenden Zielzellen bilden (zur Übersicht siehe Jessel und Sanes, 2000). Die Ausbildung der polarisierten Morphologie von Dendriten und Axonen ist ein essentieller Schritt bei der Differenzierung der Neurone und resultiert unter anderem aus Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts. Nach einer kurzen Beschreibung des Vorgangs der Dendritenbaumentwicklung wird im Folgenden ein Überblick über bereits bekannte Mechanismen, die an der Regulation der Dendritenbaumarchitektur beteiligt sind, gegeben.

Hippocampale Neurone in Kultur haben sich als gutes Modellsystem zur Beobachtung der neuronalen Differenzierung erwiesen (Bray et al., 1973; Bray und Chapman, 1985). Dotti et al. beschrieben die stereotype Abfolge der Ereignisse, die zur Verzweigung des Dendritenbaumes von primären hippocampalen Neuronen in Kultur führt, in fünf Entwicklungsstadien (Dotti et al., 1988):

Kurz nach der Anheftung auf einem geeigneten Substrat bilden dissoziierte embryonale Hippocampus-Neurone in Kultur flache, motile Lamellipodien, F-Aktin-reiche Strukturen, rund um den Zellkörper aus (Stadium 1), die nach 12-24 h zu vier bis fünf kurzen Fortsätzen kondensieren (Stadium 2). Zu diesem Zeitpunkt ist die Zelle noch unpolarisiert, die kleinen hochbeweglichen Fortsätze unterliegen einer permanenten Verlängerung und Retraktion. Aus diesen morphologisch nicht zu unterscheidenden Fortsätzen wächst ein Fortsatz kontinuierlich aus und differenziert sich zum Axon (Stadium 3). Die Dendriten entwickeln

sich aus den verbleibenden Fortsätzen wenige Tage später (Stadium 4). Nach Kultivierung von sieben Tagen haben hippocampale Neurone *in vitro* eine polarisierte Gestalt mit einem einzelnen Axon und mehreren Dendriten etabliert (Dotti et al., 1988; Banker und Cowan; 1977). Das fünfte von Dotti et al. beschriebene Stadium bezeichnet die kontinuierliche Reifung des Axons als auch der Dendriten, welche Dendritogenese, die Bildung von dendritischen Dornen und die Synaptogenese umfasst (zur Übersicht siehe Craig und Banker, 1994).

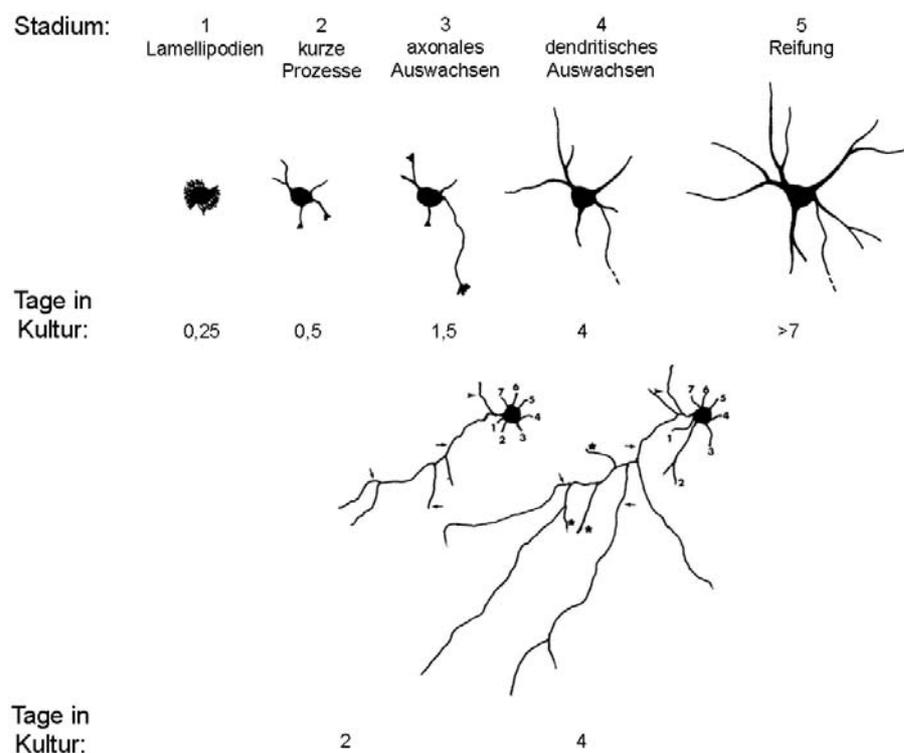


Abbildung 1: Stadien der Entwicklung hippocampaler Neurone in Kultur. Modifiziert nach Dotti et al., 1988. Erläuterungen siehe Text. Nach zwei (2d) Tagen in Kultur kann eine Verzweigung des Axons beobachtet werden (Pfeile), vom Zellkörper beginnen kurze Fortsätze auszuwachsen (1-7). Nach vier Tagen in Kultur (4d) können mehrere kollaterale Zweige des Axons (Sternchen) sowie dendritisches Auswachsen beobachtet werden (1-7).

Zur Zeit werden zwei Modelle für den Mechanismus der Dendritenverzweigung diskutiert:

Das eine Modell besagt, dass zwei neue Dendritenzweige durch Spaltung des Wachstumskegels generiert werden (Bray et al., 1973). Beim zweiten Modell des „interstitial branching“ wird davon ausgegangen, dass ein neuer Dendritenzweig aus einem bereits etablierten Dendritenschaft seitlich hervorgeht (Dailey und Smith, 1996; Scott und Luo, 2001). Jeder Dendritenzweig erscheint zunächst in Form eines einzelnen Filopodiums, dessen

Struktur auf F-Aktin-Bündeln beruht. Während die meisten dieser Filopodien retrahieren, bilden einige Wachstumskegel-ähnliche Strukturen und entwickeln sich zu stabilen Strukturen (Dailey und Smith, 1996). Auf diese Weise führt eine Kombination aus Wachstum und Retraktion zu einer Verzweigung der einzelnen Dendriten. Zeitraffer („Time-lapse“)-Studien sich entwickelnder pyramidalen Neurone in hippocampalen Schnitt („slice“)-Kulturen unterstützen die Annahme des zweiten Modells, dass sich neue Dendriten aus bereits existierenden formen.

Bei voranschreitender Entwicklung beginnt die Verzweigung der Dendriten, dies führt zur Ausbildung des Dendritenbaumes (Cline, 2001; Wong und Ghosh, 2002). Die Dendritenstruktur bestimmt nicht nur das räumliche Ausmaß und die Art der Signaleingänge, sondern auch die biophysikalischen Eigenschaften des Dendriten. Die Kommunikation der Zellen wird schließlich durch Synapsenausbildungen erreicht.

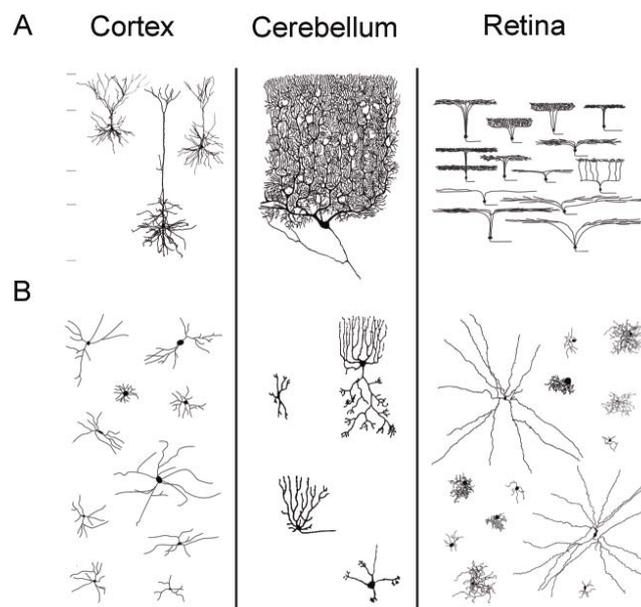


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Neuronen in drei verschiedenen Strukturen des ZNS. (A) Projektionsneurone und (B) intrinsische Neurone. Pyramidenzellen sind die Projektionsneurone des Cortex, intrinsische Zellen werden als Interneurone bezeichnet. Projektionsneurone des Cerebellums stellen die Purkinjezellen dar, intrinsische Zellen sind Körner-, Korb-, Stern- und Golgi-Zellen. Projektionsneurone der Retina sind die retinalen Ganglionenzellen, die intrinsischen Zellen werden von Bipolaren und Amakrinzellen gebildet. Modifiziert nach Masland et al., 2004.

In der neuronalen Reifung und der Etablierung des neuronalen Netzwerkes ist die Entwicklung von Dendriten folglich ein entscheidendes Ereignis.

Von welchen Faktoren ist die Dendritenmorphogenese jedoch abhängig? In welchem Ausmaß sind intrinsische neuronale Differenzierungsprogramme, aber auch extrinsische Faktoren aus der Umgebung notwendig für die Verzweigung von Dendriten? Zell-intrinsische Programme wie auch externe molekulare Signale, die verschiedene Aspekte der Dendritenentwicklung beeinflussen, sind an der Regulation der frühen Dendritenentwicklung beteiligt (zur Übersicht siehe McAllister, 2000; Scott und Luo, 2001; Cline, 2001; Whitford et al., 2002; Miller und Kaplan, 2003; Jan und Jan, 2003). Die Entwicklung des Dendritenbaumes ist ein hochdynamischer Prozess, der sowohl durch aktivitätsunabhängige als auch durch aktivitätsabhängige Signale reguliert wird (Kossel et al., 1997). Ein kurzer Überblick soll im Folgenden diesen Aspekt näher beleuchten, da eine Vielzahl molekularer Signalstoffe, die an der Dendritenverzweigung beteiligt sind, selbst durch neuronale Aktivität reguliert wird. Neuronale Aktivität kann die Verzweigung von Dendriten positiv beeinflussen (McAllister et al., 1996; Jin et al., 2003; Yu und Malenka, 2003). Die Deprivation neuronaler Aktivität mittels pharmakologischer Inhibition *in vitro* und *in vivo* führt zu einem Defizit des Dendritenwachstums (McAllister et al., 1996; Rajan und Cline, 1998; Redmond et al., 2002). Diese Effekte von neuronaler Aktivität auf das Dendritenmuster werden durch Calcium-abhängige Signalwege vermittelt. In Neuronen wird der Calcium-Spiegel sowohl durch den Einstrom von Calcium durch Calciumkanäle in der Zellmembran als auch durch die Freisetzung desselben aus intrazellulären Speichern reguliert. Die Freisetzung aus intrazellulären Speichern involviert entweder die Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung oder die Aktivierung von Liganden, welche zur Produktion von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) führen, das wiederum die Freisetzung aus den Speichern bewirkt. Der Calcium-Einstrom in Neuronen wird hauptsächlich durch spannungssensitive Calciumkanäle („voltage-sensitive calcium channels“; VSCC) und NMDA (N-methyl-D-Aspartat) -Rezeptoren vermittelt (Ghosh und Greenberg, 1995). Durch den Calcium-Einstrom werden intrazelluläre Proteinkinasen und damit Signalkaskaden aktiviert, beispielsweise zum einen die Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaMKs), zum anderen die Mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK) (zur Übersicht siehe Ghosh und Greenberg, 1995). Die Wichtigkeit der im Folgenden beschriebenen Faktoren für die Dendritenentwicklung wurde bereits in verschiedenen Studien dargelegt (McAllister et al., 1995, 1996; Yacoubian und Lo, 2000; Yu und Malenka, 2003; Polleux et al., 2000; Whitford et al., 2002; Sestan et al., 1999; Redmond et al., 2000).

1.3 Extrazelluläre Faktoren, die an der Regulation der Dendritenkomplexität beteiligt sind

Eine wichtige Rolle für die Entwicklung dendritischer Bäume kortikaler Neurone in Vertebraten spielt die Familie der Neurotrophine. Sie besteht unter anderem aus dem „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF), dem „nerve growth factor“ (NGF) und den Neurotrophinen NT-3 und NT-4. Neurotrophine sind die Liganden der hoch-affinen Trk-Familie von Rezeptortyrosinkinasen (McAllister et al., 1997; 1999). Experimente, in denen der Einfluss der Neurotrophine auf die Kontrolle des Dendritenwachstums in „slice“-Kulturen untersucht wurde, zeigten eine höhere Dendritenkomplexität pyramidalen Neurone, die auf der Erhöhung der Gesamtdendritenlänge, der Anzahl der Dendritenverzweigungspunkte und/oder der Anzahl primärer Dendriten beruhte (Baker et al., 1998; McAllister et al., 1996). BDNF ist ein sehr bekanntes Beispiel dafür, dass Expression und Freisetzung dieses Moleküls durch neuronale Aktivität moduliert werden. BDNF ist bedeutend für die Regulation des Wachstums sowie der Dendritenverzweigung kortikaler Neurone (McAllister et al., 1996) in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität, da durch Calcium-abhängige Signalwege die Expression von BDNF reguliert wird (Gorski et al., 2003). Die Überexpression von BDNF (Horch et al., 1999) oder seinem TrkB-Rezeptor (Yacoubian und Lo, 2000) begünstigt die Addition von vor allem basalen Primärdendriten in kortikalen bzw. pyramidalen Neuronen. Ein ebenfalls bedeutsamer Vermittler der Dendritenmorphogenese ist β -Catenin, einer der Hauptregulatoren des aktivitätsabhängigen Wnt-Signalweges. Yu und Malenka (2003) zeigten, dass die Induktion des Dendritenwachstums durch aktivitätsabhängigen Ca^{2+} -Einstrom Cadherin/ β -Catenin-Interaktion benötigt. Die Erhöhung zellulärer Spiegel von β -Catenin und anderer Mitglieder des Cadherin/Catenin-Komplexes, N-Cadherin und α N-Catenin, durch Überexpression führt zu einer erhöhten Dendritenverzweigung in hippocampalen Neuronen der Ratte (Yu und Malenka, 2003). Umgekehrt wird die Anzahl der dendritischen Endverzweigungen durch Überexpression der intrazellulären Domäne von N-Cadherin, welche funktionell dominant-negativ wirkt, erniedrigt, indem sie endogenes β -Catenin bindet und dadurch dessen Bindung an andere funktionelle Partner kompetitiv inhibiert.

In den letzten Jahren wurde die Auswirkung mehrerer Rezeptor-Liganden-Systeme, die für die Axon-Wegfindung Bedeutung haben, auf das Dendritenwachstum beschrieben. Polleux et al. (2000) demonstrierten, dass sekretiertes Semaphorin3A (Sema3A) zur gleichen Zeit chemoattraktiv für Dendriten kortikaler Neurone wie chemorepulsiv für Axone wirkt.

Postmitotische Neurone, die während der Migration die kortikale Platte erreichen, treffen auf einen Gradienten von Sema3A, der für die Ausrichtung neu geformter Axone in Richtung der weißen Substanz sorgt. Gleichzeitig wirkt Sema3A chemoattraktiv auf apikale Dendriten in Richtung der pialen Oberfläche. Dies verdeutlicht, dass chemotrophe Reize das axonale und dendritische Muster unterschiedlich beeinflussen können (Polleux et al., 2000). Der chemoattraktive Effekt auf die Dendritenentwicklung wird durch den Sema3A-Rezeptor Neuropilin-1, sowie durch eine selektive Verteilung von löslicher Guanylat-Zyklase im apikalen Dendriten vermittelt (Polleux et al., 2000).

Ein weiteres Liganden-Rezeptor-Paar mit Bedeutung für Axon-Wegfindung, Slit1 mit seinem Rezeptor Roundabout/Robo (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1998, 1999), beeinflusst ebenfalls die Dendritenkomplexität kortikaler Neurone (Whitford et al., 2002). Slit1, das in der späten embryonalen und frühen postnatalen Phase sehr stark in der kortikalen Platte exprimiert wird, führte in verschiedenen Slice-Overlay-Assays sowie in primären kultivierten Neuronen zu einer Erhöhung der Dendritenbaumkomplexität. Experimente mit den extrazellulären Domänen der Robo-Rezeptoren, die mit einer Fc-Domäne fusioniert waren oder dominant negativ wirkenden Robo-Konstrukten, die inhibitorisch auf die Slit1-Robo Signaltransduktion wirkten oder Aktivierungsassays des Rezeptors zeigten, dass diese Interaktion wichtig für die Kontrolle der dendritischen Entwicklung ist.

Für Notch1, ein Typ-I Zelloberflächenprotein, wurde eine kontaktabhängige Inhibition des Auswachsens von Neuriten in Kokulturen kortikaler Neurone mit Zelllinien, die entsprechend die Notch-Liganden Delta- oder Jagged exprimierten, sowie in hippocampalen Neuronen beschrieben (Sestan et al., 1999; Berezovska et al., 1999). Weitere Experimente belegten jedoch auch, dass Notch1 zusätzlich einen positiven Effekt auf die Verzweigung der Dendriten ausübt (Redmond et al., 2000). Die Inhibition von Notch1 durch Überexpression eines dominant-negativen Notch1-Konstruktes oder die Behandlung mit antisense-Oligonukleotiden führte zu einer Abnahme der Dendritenkomplexität in Neuronen, wohingegen die Überexpression eines konstitutiv aktiven Notch1-Konstruktes die durchschnittliche Dendritenlänge verringerte, die Verzweigung aber erhöhte, was zu einer erhöhten Dendritenkomplexität führte. Insgesamt wurde in diesen Experimenten eine positive Rolle von Notch1 für die Verzweigung von Dendritenbäumen und eine negative Rolle für Dendriten- und Neuritenlänge belegt.

1.4 Intrazelluläre Faktoren, die an der Regulation der Dendritenbaumkomplexität beteiligt sind

Verschiedene intrinsische Faktoren und genetische Programme sind ebenfalls an der Regulation der Dendritenmorphologie beteiligt (Jan und Jan, 2001). Beispielsweise beeinflussen Zytoskelett-assoziierte Proteine, die Rho-Familie kleiner GTPasen, Transmembranproteine und Transkriptionsfaktoren die Verzweigung von Dendriten (Threadgill et al., 1997; Luo 2002; Whitford et al., 2002; Gao und Bogert, 2003). Diese Faktoren umfassen Regulatoren zytoskelettaler Elemente und Komponenten von Signaltransduktionswegen wie auch transkriptionelle Regulatoren (Gao und Bogert, 2003; Scott und Luo, 2001).

1.4.1 Rho-GTPasen

Rho-GTPasen („Ras homology“) gehören zur Ras-Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine (McCormick, 1995), wobei die Familienmitglieder RhoA (Ras homologous member A), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) und Cdc42 (cell division cycle 42) am besten charakterisiert sind. Funktionell kommt diesen GTPasen eine große Bedeutung bei der Organisation und dem Umbau des Aktin-Zytoskeletts in eukaryotischen Zellen zu (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997). GTPasen sind kleine molekulare Schalter in der Zelle, sie kommen in einem aktiven, GTP-gebundenen, und inaktiven, GDP-gebundenen Zustand vor. Ihre Aktivität ist durch das Verhältnis von GTP zu GDP in der Zelle bestimmt und wird durch eine Anzahl verschiedener regulatorischer Moleküle beeinflusst. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) beschleunigen den Austausch von GDP nach GTP und vermitteln somit die Aktivierung der GTPasen, während GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die GTP-Hydrolyse stimulieren und die GTPasen auf diese Weise in einen inaktiven Zustand überführen. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Rho-GTPasen, insbesondere RhoA, Rac1 und Cdc42 aufgrund der Regulationen des Aktin-Zytoskeletts auch für die Funktionsfähigkeit des Nervensystems von entscheidender Bedeutung sind. Während RhoA hemmend wirkt, stimulieren Cdc42 und Rac1 die Dendritenbildung (Ahnert-Hilger et al., 2004; Hayashi et al., 2002). Es wird angenommen, dass die komplexe Wirkungsweise dieser GTPasen für eine präzise Regulierung des Aktin-Zytoskeletts, beispielsweise während der Bildung und Stabilität neuronaler Fortsätze und dendritischer Dornen notwendig ist (Govek et al., 2005).

1.4.2 Signalwege, die für die Dendritenentwicklung von Bedeutung sind

Um extrazelluläre Ereignisse (z.B. Ligandenbindung) in Änderungen der zytoskelettalen Struktur eines Neurons zu übersetzen, bedarf es einer regulierten intrazellulären Signaltransduktion hin zum Zytoskelett. Im Folgenden werden daher Signaltransduktionswege vorgestellt, die für Dendritendifferenzierung relevant sind.

1.4.2.1 CaMKII β und Transkriptionsfaktor CREB

Von den Ca²⁺/calmodulin-abhängigen (CaM)-Proteinkinasen sind die „Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II“ (CaMKII) die am meisten untersuchten in Bezug auf eine Funktion in Dendriten. Deshalb werden sie im Folgenden kurz vorgestellt. Der „Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II β “ (CaMKII β) wurde eine wichtige Funktion für die Verzweigung von Dendritenbäumen zugeschrieben (Fink et al., 2003). Die Aktivierung der CaMKII β ist von Ca²⁺/CaM abhängig. CaM-Kinasen sind ein bekanntes Beispiel dafür, wie die Effekte neuronaler Aktivität auf Dendritenentwicklung durch Calcium-abhängige Signalwege vermittelt werden (Wu und Cline, 1998; Redmond et al., 2002). Geringe Ca²⁺/CaM Konzentrationen, die durch die basale neuronale Aktivität dargeboten werden, reichen bereits für eine Aktivierung aus. Überexpression der CaMKII α kann zu einer dendritischen Stabilisierung führen (Wu und Cline, 1998). Mäuse, denen das Gen für die CaMKIV fehlt, weisen Defekte in der Dendritenentwicklung auf (Ribar et al., 2000), die Expression der aktivierten Form von CaMKIV initiiert hingegen den durch Ca²⁺-Einstrom induzierten Effekt des Dendritenwachstums (Redmond et al., 2002). Aufgrund der nuklearen Lokalisation wird davon ausgegangen, dass die CaMKIV ihren Effekt auf das Dendritenwachstum über transkriptionelle Aktivitäten vermittelt. Das am besten charakterisierte Ziel der CaMKIV ist der Transkriptionsfaktor CREB, der durch die CaMKIV phosphoryliert wird. Da die Effekte des Ca²⁺-Einstroms und konstitutiv aktiver CaMKIV auf kortikale Dendriten mit einer dominant-negativen Mutante von CREB supprimiert werden können, ist davon auszugehen, dass eine CREB-abhängige Transkription für aktivitätsabhängiges Dendritenwachstum notwendig ist (Redmond et al., 2002). Die Aktivierung von CREB alleine ist für die Induktion des Dendritenwachstums jedoch nicht ausreichend, so dass postuliert wird, dass auch andere Transkriptionsfaktoren in

aktivitätsabhängiges Dendritenwachstum involviert sind, wie z.B. CREST (Aizawa et al., 2004).

1.4.2.2 Der MEK-MAPK-Signalweg in der Dendritendifferenzierung

Die Untersuchung des MEK-MAPK (MAPK: mitogen-activated protein kinase; MEK: MAPK/ERK (extracellular-regulated kinase)) -Signalweges zeigte, dass dieser in die aktivitätsabhängige Dendritendifferenzierung involviert ist (Wu et al., 2001; Vaillant et al., 2002). Die selektive Aktivierung des MEK-MAPK-Signalwegs führt zu einer Erhöhung der Dendritenkomplexität, die primär durch die Erhöhung der distalen Dendritendynamik zustande kommt, ohne die Primärdendriten zu beeinflussen. Wie die CaMKs wird auch die MAPK durch NMDA-Rezeptor- oder VSCC-vermittelten Calcium-Einstrom und somit aktivitätsabhängig aktiviert. Wiederholte Depolarisierung kann zu einer permanenten MAPK-Aktivierung führen und so die Bildung und Stabilität dendritischer Filopodien beeinflussen (Wu et al., 2001).

1.4.2.3 Die Bedeutung des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges für die Dendritenkomplexität

Die Wichtigkeit der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) in der Dendritenentwicklung wurde von Dijkhuizen und Ghosh beschrieben (2005). Zu den „downstream“-Effektoren der PI3K gehört unter anderem die Akt/Proteinkinase B (zur Übersicht siehe Rodgers und Theibert, 2002). Der PI3K-Akt-Signalweg wurde als bedeutend für neuronales Wachstum, Überleben, Neuritenauswachsen und synaptische Plastizität beschrieben (Atwal et al., 2000; Kuruvilla et al., 2000; Markus et al., 2002; Sanna et al., 2002).

Die Bedeutung von einem der Akt-regulierten Proteine, der hochkonservierten Serin/Threonin-Proteinkinase „mammalian Target Of Rapamycin“ (mTOR), für die Differenzierung von Dendriten wurde erst kürzlich gezeigt. Bislang wurde davon ausgegangen, dass mTOR die neuronale Zellgröße (Kwon et al., 2003), lokale Proteinsynthese in Dendriten (Takei et al., 2004) und synaptische Plastizität (Tang et al., 2002; Cammalleri et al., 2003; Hou und Klann, 2004) kontrolliert, primär durch die Regulation der Proteintranslation durch Phosphorylierung von „eIF-4E binding protein“ (4E-BP1) und p70S6K (ribosomale Protein S6 Kinase).

Die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen durch Mitogene oder trophische Faktoren führt zur Aktivierung der Phosphoinositol-3 Kinase (PI3K) durch Rekrutierung von SH-Domänen („src-homology“) enthaltenden Adapterproteinen und Ras. Dies führt zu einer erhöhten Produktion an Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃). Als Konsequenz dieses erhöhten PIP₃-Spiegels werden die „3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1“ (PDK1) und Akt an die Zellmembran rekrutiert und Akt durch die PDK1 phosphoryliert.

In neueren Arbeiten wurde der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg als wichtig für die Kontrolle der Dendritenkomplexität beschrieben. So zeigten verschiedene Autoren, dass die Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges in Abhängigkeit von mTOR zu einer erhöhten Dendritenverzweigung in kultivierten hippocampalen Neuronen im Alter von DIV7-14 führte (Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005). Im Gegensatz dazu war die Inhibition von mTOR durch Rapamycin, einem Immunsuppressant, das im Komplex mit FK506-binding protein (FKBP12) die N-terminale Domäne von mTOR bindet und somit die enzymatische Aktivität inhibiert, ausreichend, um die Anzahl und Komplexität der Dendritenverzweigung zu erniedrigen. Ebenso wurde die Dendritenkomplexität durch Herabregulation der Expression von mTOR mittels RNA-Interferenz reduziert. Auch die Blockierung der PI3K und Akt reduzierten die Dendritenkomplexität. Die Überexpression von PI3K und Akt hingegen führte zu einer Erhöhung der Dendritenkomplexität. Der „knockdown“ von PTEN, einer PIP₃-Phosphatase, die der PI3K entgegenwirkt, durch RNAi führte zu einem ähnlichen Phänotyp der Dendritenmorphologie, wie durch die Überexpression der PI3K erreicht wurde. mTOR reguliert somit nicht nur die Somagröße der Zelle sowie synaptische Plastizität, sondern auch die Entwicklung und Verzweigung des Dendritenbaumes von Neuronen. mTOR stimuliert Translation durch die Aktivierung der p70S6K, einer Kinase, die die Synthese mehrerer Komponenten der Translationsmaschinerie erhöht (Jefferies et al., 1997). Außerdem phosphoryliert mTOR 4E-BP1 und inhibiert somit die Bindung von 4E-BP1 an den Initiationsfaktor eIF4E („eukaryotic initiation factor (eIF) 4E“). Dies führt zur verstärkten Bildung des Initiationskomplexes für die Translation von „5' guanin-cap-containing“ mRNAs (Beretta et al., 1996). Suppression von p70S6K oder Überexpression von 4E-BP1 beeinträchtigt die Dendritenverzweigung in gleicher Weise wie die Inhibition von mTOR. Somit wurde postuliert, dass die mTOR-abhängige Proteinsynthese in die Regulation der Dendritenverzweigung involviert ist.

In der vorliegenden Arbeit wird das transmembranale Chondroitinsulfat-Proteoglykan CALEB/NGC im Prozess der Dendritogenese analysiert.

1.5 CALEB/NGC

CALEB/NGC (Chicken acidic Leucine-rich EGF-like Domain Containing Brain Protein/Neuroglycan C) wurde erstmalig im Nervensystem des Huhns und der Ratte beschrieben (Schumacher et al., 1997; Watanabe et al., 1995; Yasuda et al., 1998). Das Vorkommen wurde nur in Vertebraten, im Huhn sowie in Mammalia (Schumacher et al., 1997; Yasuda et al., 1998) gezeigt. In der Literatur ist das humane CALEB/NGC-Gen ebenfalls unter dem Namen CSPG5 (Chondroitinsulfat-Proteoglykan 5), das Rattenhomolog unter dem Namen Neuroglycan C bekannt (Yasuda et al., 1998; Watanabe et al., 1995). Im Folgenden wird die Bezeichnung CALEB/NGC verwendet.

CALEB/NGC wurde ursprünglich im Nervensystem des Huhns auf der Suche nach neuen Bindungspartnern bekannter axon-assoziiertes Glykoproteine über die Interaktion mit den extrazellulären Matrixglykoproteinen Tenascin-C und -R identifiziert. Es handelt sich um ein hochkonserviertes neurales Transmembranprotein mit EGF-ähnlicher Domäne, die eine hohe Sequenzhomologie zu EGF-ähnlichen Domänen von Mitgliedern der EGF-Familie von transmembranalen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren aufweist. Aufgrund dessen wird CALEB/NGC nach strukturellen Gesichtspunkten ebenfalls dieser Proteinfamilie zugeordnet (Schumacher et al., 1997). Die Mitglieder der EGF-Familie transmembranaler Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sind wichtige Regulatoren für verschiedene Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Erhaltung verschiedener Gewebe sowie Reparaturmechanismen, unter anderem im Nervensystem (zur Übersicht siehe Massague und Pandiella, 1993). Die Mitglieder dieser EGF-Proteinfamilie können als Liganden an Rezeptortyrosinkinasen (ErbB1-4) binden.

1.5.1 Molekularstruktur von CALEB/NGC

CALEB/NGC ist ein transmembranales Multidomänenprotein, welches aus einer N-terminalen extrazellulären und einer C-terminalen zytoplasmatischen Region, die durch die Transmembrandomäne voneinander getrennt sind, besteht. Das Kernprotein von CALEB/NGC wird in mehrere strukturell unterschiedliche Bereiche unterteilt. So enthält die N-terminale Region mehrere potentielle Glykosylierungsstellen für die Anheftung von Chondroitinsulfatketten und weiter in C-terminaler Richtung ein Peptidsegment mit starker Anhäufung saurer Aminosäuren. C-terminal vom sauren Peptidsegment enthält CALEB/NGC

eine EGF-ähnliche Domäne, die möglicherweise charakteristisch für das Protein ist. Diese EGF-ähnliche Domäne ist ein mehrere Cysteine enthaltendes Peptidsegment, welches im extrazellulären Bereich kurz vor der Transmembrandomäne lokalisiert ist. Die Anzahl und Anordnung der Cysteine sowie weiterer konservierter Aminosäuren weisen es nach strukturellen Gesichtspunkten als EGF-ähnliche Domäne aus (Campbell und Bork, 1993). Nach der Transmembranregion folgt ein relativ kurzer zytoplasmatischer Bereich, der verschiedene putative Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen enthält. Dieser Bereich weist keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen auf. Er wird in vier Abschnitte unterteilt: A, B, C, und D. Das juxtamembranäre Peptidsegment A bindet an das „Golgi-associated PDZ domain containing protein“ PIST (Hassel et al., 2003), die Region C wird alternativ gespleißt. Für die Peptidsegmente B und D sind weder Interaktionspartner noch jegliche Funktionen bekannt. Das Huhn-Homolog CALEB weist im Vergleich eine größere extrazelluläre Region und eine kürzere zytoplasmatische Region als CALEB/NGC aus Maus, Ratte und Mensch auf. Dieser Unterschied ist bedingt durch ein Leucin- und Prolin-reiches Segment im N-terminalen Bereich der extrazellulären Region, welches durch eine achtfache Wiederholung von sieben Aminosäuren mit einem Leucin an jeder ersten, und Prolin an jeder vierten Position mit einer Ausnahme gekennzeichnet ist. Dieser als LP-Motiv bezeichnete Bereich ist bei CALEB/NGC in den Spezies Maus, Ratte und Mensch nicht vorhanden. Die Säugerhomologe von CALEB/NGC können jedoch einen Einschub von 27 Aminosäureresten (Abschnitt C) im zytoplasmatischen Bereich enthalten, welcher im Huhn nicht detektiert wurde.

Es gibt verschiedene Komponenten von CALEB/NGC mit unterschiedlicher molarer Masse. Die Doppelbande mit einem Molekulargewicht von ca. 120 kDa in der SDS-PAGE entspricht dem Kernprotein von CALEB/NGC aus Säugern, die glykosylierte Form besitzt ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa. Aufgrund seines vom Entwicklungsstand abhängigen Glykosylierungsstatus durch Anheftung von Chondroitinsulfatseitenketten (CS) wird CALEB/NGC als sogenanntes „Part-time“-Proteoglykan bezeichnet (Schumacher et al., 1997; Inatani et al., 2000; Aono et al., 2000). Im Huhn existiert CALEB/NGC in einer 200 kDa- (CALEB/NGC₂₀₀) sowie in einer 140 kDa- (CALEB/NGC₁₄₀) bzw. 80 kDa-Form (CALEB/NGC₈₀), wobei CALEB/NGC₂₀₀ die posttranslational modifizierte, CS-glykosylierte Form von CALEB/NGC₁₄₀ ist. CALEB/NGC₈₀ unterscheidet sich strukturell von CALEB/NGC_{200/140} durch das Fehlen des N-terminalen Proteinteils einschließlich des LP-Motivs.

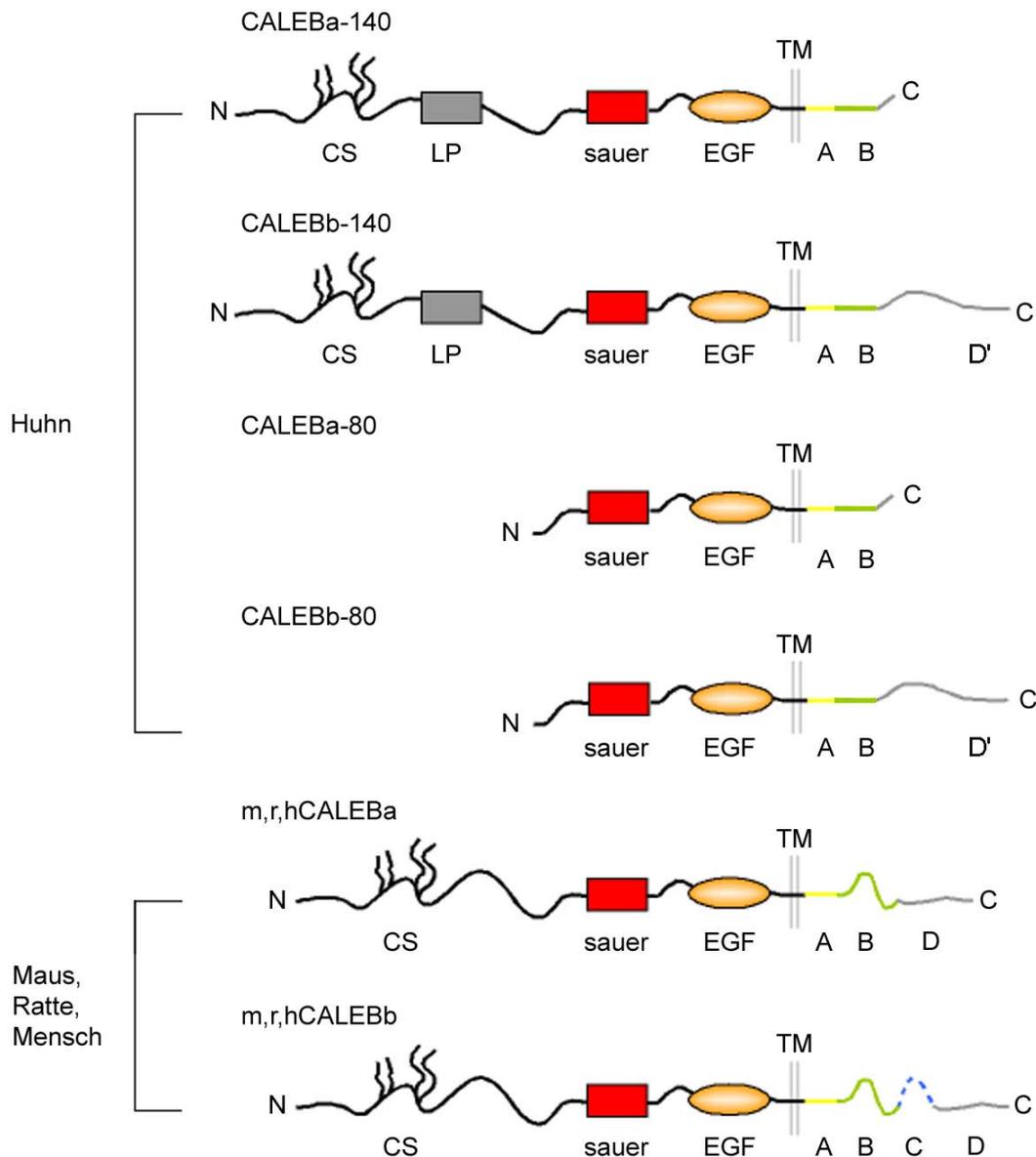


Abbildung 3: Schematische Darstellung von CALEB/NGC. Dargestellt sind die verschiedenen Isoformen, a und b, von CALEB/NGC aus Huhn, Maus, Ratte und Mensch. Die wichtigsten Bereiche von CALEB/NGC sind in bunt dargestellt. CS, Chondroitinsulfatketten; LP, Leucin- und Prolin-reiches Segment; sauer, saures Peptidsegment; EGF, EGF-ähnliche Domäne; TM, Transmembrandomäne; A-D intrazelluläre Peptidsegmente; D, Maus, Ratte, Mensch; D', Huhn.

In allen Spezies wurden bislang zwei Isoformen von CALEB/NGC gefunden, die durch alternatives prä-mRNA Spleißen generiert und als Protein exprimiert werden.

Im Huhn wurden mittels cDNA Studien zwei Isoformen von CALEB identifiziert, die als „a“ und „b“ Form bezeichnet werden (CALEBa und CALEBb) und sich in ihren zytoplasmatischen Teilen unterscheiden (Schumacher et al., 2001). Während die „a“-Form identisch mit der früher publizierte CALEB-Sequenz ist (Schumacher et al., 1997), fehlen

der „b“-Form acht C-terminale Aminosäurereste (REAQHRAL) (D-Segment). Sie enthält stattdessen einen zusätzlichen Einschub von 50 Aminosäureresten. Auch bei Maus und Ratte wurde mit Klonierungsstudien die Expression zweier Isoformen belegt, wobei die „b“-Form von Maus- und Ratten-CALEB/NGC (mCALEBb bzw. rCALEBb) gegenüber der „a“-Form (mCALEBa bzw. rCALEBa) einen zusätzlichen Peptideinschub von 27 Aminosäureresten enthält (Schumacher et al., 2001).

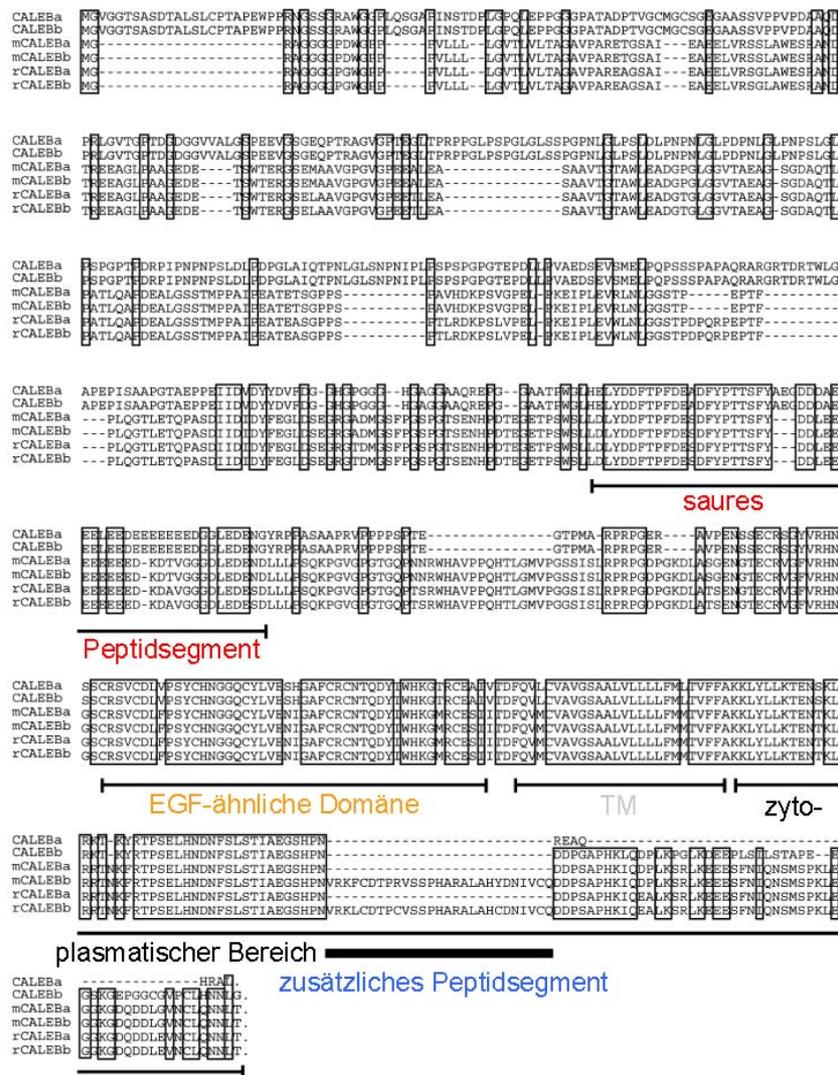


Abbildung 4: Darstellung der Primärstrukturen beider Isoformen von CALEB/NGC aus den Spezies Huhn, Maus und Ratte. Die wichtigsten Domänen sind farblich unterlegt. Der CALEB/NGCb-Isoform aus Huhn fehlen gegenüber der CALEB/NGCa-Isoform acht C-terminale Aminosäurereste (REAQHRAL) im zytoplasmatischen Bereich, sie enthält stattdessen einen zusätzlichen Einschub von 50 Aminosäureresten. Die CALEB/NGCb-Isoform aus den Spezies Maus und Ratte hat gegenüber der CALEB/NGCa-Isoform ein zusätzliches Peptidsegment von 27 Aminosäuren in der zytoplasmatischen Domäne. Modifiziert nach Schumacher et al., 2001.

Angeblich soll es noch zwei weitere Isoformen von CALEB/NGC geben. Diese wurden vom Labor um Aono beschrieben (Aono et al., 2000; Aono et al., 2006). Jedoch gibt es bislang keinen Nachweis eines translatierten Proteins und weder einen Datenbank-Eintrag der Nukleotid- noch der Proteinsequenz.

Die proteolytische Spaltung und Freisetzung von Transmembranproteinen, als Ektodomänen-„Shedding“ bezeichnet, hat in den letzten Jahren als posttranslationale Modifikation für die Regulation der Funktion diverser Gruppen von Zell-Oberflächen-Proteinen einschließlich Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Zelladhäsionsmolekülen sowie Proteoglykanen an Bedeutung gewonnen (Hooper et al., 1997; Blobel, 2000). Für CALEB/NGC wurde ebenfalls die proteolytische Spaltung des extrazellulären Bereichs sowohl im Huhn als auch in den Spezies Maus und Ratte beschrieben (Jüttner et al., 2005; Shuo et al., 2007). Die aktivitätsabhängige proteolytische Spaltung extrazellulärer Segmente von CALEB/NGC resultiert nach den Daten aus dem Labor von Rathjen in einer Membran-assoziierten Form von CALEB/NGC mit einer exponierten EGF-ähnlichen Domäne (Jüttner et al., 2005).

1.5.2 CALEB/NGC Expression im Nervensystem

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Expression der CALEB/NGC-mRNA auf das zentrale Nervensystem (ZNS) beschränkt ist und offenbar in enger Beziehung zur Differenzierung des Nervensystems steht. Der Expressionsspiegel von CALEB/NGC unterliegt einer entwicklungsspezifischen räumlichen und zeitlichen Regulation. Insbesondere in axon- und synapsenreichen Regionen während der Phasen der Entwicklung des Nervensystems, in denen sich die neuronalen Verschaltungen aktiv formen, ist die Expression von CALEB/NGC besonders stark (Schumacher et al., 1997). So wurde eine Expression von CALEB/NGC in verschiedensten Strukturen des Gehirns wie z.B. der Retina, dem Colliculus superior sowie dem Cerebellum von Vertebraten nachgewiesen.

Immunohistochemische Studien zeigten eine Assoziation von CALEB/NGC mit neuronalen Strukturen des Neuropils, Dendriten und Axonen (Schumacher et al., 1997; Aono et al., 2000; Inatani et al., 2000). Dieser Aspekt soll im Folgenden an einzelnen Beispielen näher beleuchtet werden.

In der Retina des Huhns wird CALEB/NGC in faserreichen Arealen, in der optischen Faserschicht sowie in der inneren und äußeren plexiformen Schicht, exprimiert (Schumacher et al., 1997; Jüttner et al., 2005). Diese Schichten sind reich an Axonen und ein großer Teil

der Dendriten und Synapsen ist dort lokalisiert. Die starke Expression von CALEB/NGC in diesen Nervenschichten deutet auf eine Beteiligung des Proteins an der Entwicklung von Dendriten und Synapsen der Retina hin (Schumacher et al., 1997; Inatani et al., 2000).

Im Colliculus, der funktionell zum retino-tektalen System gehört, wurde eine uniforme Verteilung von CALEB/NGC in allen Schichten beschrieben (Jüttner et al., 2005). Im Cerebellum wurde eine deutliche Assoziation von CALEB/NGC mit Purkinje-Zellfortsätzen in den Spezies Huhn und Maus belegt (Schumacher et al., 1997; Aono et al., 2000). Diese werden von Kletterfasern innerviert. Die entwicklungsabhängige unterschiedliche Lokalisation von CALEB/NGC, die sich vom Soma in der frühen Entwicklung bis hin zu den Dendriten im adulten Cerebellum bemerkbar macht, korreliert mit der Entwicklung der Synapsenverschaltungen des Kletterfasersystems mit den Purkinjezellen. Auch hier deutet sich eine mögliche Funktion von CALEB während der Dendritogenese und Synaptogenese an.

Auch in einem Modellsystem zur Untersuchung von Läsionen im ZNS wurde die Expression von CALEB/NGC untersucht. Es zeigte sich, dass die CALEB/NGC-Expression auch nach Läsion des optischen Nerven dynamisch reguliert wird (Schumacher et al., 2001).

1.5.3 Bekannte Interaktionen von CALEB/NGC

Erste Hinweise auf eine mögliche zelluläre Funktion eines noch wenig erforschten Proteins geben unter anderem die Interaktionspartner dieses Proteins. Für CALEB/NGC wurden bislang fünf Interaktionspartner, vier extrazellulär und einer intrazellulär, beschrieben (Schumacher et al., 1997; Hassel et al., 2003; Kinugasa et al., 2004).

1.5.3.1 Extrazelluläre Interaktionspartner von CALEB/NGC

Zu den bekannten Liganden von CALEB/NGC zählen die extrazellulären Matrix- und Glykoproteine Tenascin-C und -R. Deletionsanalysen und biochemische Experimente führten zu der Erkenntnis, dass sowohl Tenascin-C als auch Tenascin-R über das Fibrinogen-ähnliche Modul am C-Terminus beider Moleküle mit dem sauren Peptidsegment von CALEB/NGC interagieren (Schumacher et al., 1997; Schumacher et al., 2001). Im sauren Peptidsegment ist das C-terminal gelegene Sequenzelement „GGLEDE“, das zwischen den einzelnen Spezies

Huhn, Maus, Ratte und Mensch konserviert ist, von entscheidender Bedeutung für diese Interaktion (Schumacher und Stübe, 2003). Interessanterweise zeigte sich, dass die Bindung von Tenascin-C und -R an CALEB/NGC im Huhn Isoform-abhängig reguliert wird. Im zellulären Milieu (Expression auf COS-Zellen) kann nur CALEB₈₀, nicht aber CALEB₁₄₀ an diese Tenascin-C binden. Wurde CALEB/NGC jedoch aus der Zellmembran herausgelöst, dann konnten sowohl CALEB/NGC₈₀ als auch CALEB/NGC₁₄₀ an Tenascin-C und -R binden (Schumacher und Stübe, 2003). Da eine CALEB₈₀-entsprechende Proteinvariante in den Spezies Maus, Ratte und Mensch bisher nicht beschrieben wurde, ist die Bedeutung der Interaktion zwischen Tenascin-C und -R und CALEB/NGC in diesen Spezies noch unklar. Eine extrazelluläre Bindung der EGF-ähnlichen Domäne von CALEB/NGC an die Rezeptortyrosinkinase ErbB3 wurde von Kinugasa vorgeschlagen (Kinugasa et al., 2004). Ein weiterer extrazellulärer Interaktionspartner von CALEB/NGC wurde mit Midkine (MK), einem HB-EGF-Wachstumsfaktor, beschrieben (Ichihara-Tanaka et al., 2006). In CG-4-Zellen, einer Oligodendrozyten-Vorläuferzelllinie, wurde gezeigt, dass diese Bindung von Midkine an CALEB/NGC durch zwei verschiedene Domänen im extrazellulären Bereich von CALEB/NGC, zum einen durch die Chondroitinsulfat-Region und zum anderen durch das saure Peptidelement, vermittelt wird. Es wurde postuliert, dass CALEB/NGC in einem Rezeptorkomplex als MK-Rezeptor fungiert, um die Verlängerung von Zellfortsätzen zu fördern.

1.5.3.4 Intrazellulärer Interaktionspartner von CALEB/NGC

Mit PIST (PDZ domain protein interacting specifically with TC10), das ursprünglich als Interaktionspartner der kleinen GTPase TC10 beschrieben wurde und das als Golgi-assoziiert, involviert in Autophagie- sowie Neurodegenerationsprozesse gilt, ist im zytoplasmatischen Bereich ein weiterer Interaktionspartner von CALEB/NGC bekannt (Hassel et al., 2003). PIST reguliert den Transport mehrerer Transmembranproteine an die Plasmamembran. Deletionsanalysen und biochemische Experimente führten zu der Erkenntnis, dass das juxtamembranäre intrazelluläre Peptidsegment von CALEB/NGC, welches zwischen allen bisher untersuchten Spezies hochkonserviert ist, für die Interaktion mit PIST notwendig und ausreichend ist. In COS7-Zellen kolokalisierten nach Kotransfektion CALEB/NGC und PIST in den intrazellulären Strukturen des Golgi-Apparates sowie in Golgi-abhängigen Vesikeln. Der Golgi-Apparat ist für die Reifung und den Transport von Proteinen zur Plasmamembran

von großer Bedeutung. Darüber hinaus konnte eine starke Kollokalisierung von CALEB/NGC und PIST in Vesikel-ähnlichen Strukturen in den Hauptprozessen von primären hippocampalen Neuronen in frühen Phasen der Entwicklung festgestellt werden. In einem *in vivo* Modellsystem zu Mikrotubuli-abhängigen Transportprozessen in Neuronen wurden Daten ermittelt, die eine Beteiligung von PIST am Transport von CALEB/NGC in die neuronalen Fortsätze vorschlagen (Hassel et al., 2003). Mit Ausnahme von PIST ist über intrazelluläre Interaktionspartner von CALEB/NGC bislang nichts bekannt.

1.5.4 Mögliche Funktionen von CALEB/NGC

Den ersten Hinweis auf eine mögliche Funktion von CALEB/NGC erbrachten Experimente mit Fab-Fragmenten von gegen CALEB/NGC gerichteten Antikörpern. In Zellkultur inhibierten diese das Neuritenwachstum tektaler Neurone auf unterschiedlichen Wachstumssubstraten (Schumacher et al., 1997).

Untersuchungen in neuronalen Primärzellen aus embryonalen Ratten lieferten Hinweise darauf, dass der extrazelluläre CALEB/NGC-Bereich an der Stimulation des Auswachsens von Neuriten beteiligt ist. Die rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteine wurden *in vitro* in Bezug auf ihre Domänen-spezifischen Funktionen charakterisiert. Es zeigte sich hierbei, dass die Zugabe des rekombinanten gesamten extrazellulären Bereichs von CALEB/NGC das Auswachsen von Neuriten in kultivierten Neuronen stimulierte, die einzelnen Regionen jedoch eine unterschiedliche Wirkung hatten. Es wurde postuliert, dass sowohl die EGF-ähnliche Domäne als auch das saure Peptidsegment des extrazellulären Bereichs in den Prozess des Neuritenwachstums involviert sind. Während durch die Anwesenheit der rekombinanten EGF-Domäne präferentiell die Verlängerung eines Neuriten gefördert wurde, führte die Kultivierung der Neurone mit dem rekombinanten sauren Peptidsegment zur Ausbildung mehrerer Neuriten (Nakanishi et al., 2006). Darüber hinaus wurde eine positive Beeinflussung des Neuritenwachstums über die Phosphoinositol-3-Kinase sowie die Proteinkinase C postuliert. Der Einsatz bekannter Inhibitoren der PI3-Kinase sowie der PKC führten zu einer Dosis-abhängigen Blockierung des Neuritenauswachsens.

Mittlerweile ist bekannt, dass die Abwesenheit von CALEB/NGC zu einer beeinträchtigten Synapsenfunktion während der postnatalen Entwicklung führt. Das Ausschalten des CALEB/NGC-Gens mittels der „knockout“-Technik in Mäusen hatte nach elektrophysiologischen Untersuchungen der synaptischen Konnektivität in den visuellen

Schichten des Colliculus superior eine Änderung der synaptischen Transmission zur Folge (Jüttner et al., 2005). So wurde im frühen postnatalen Stadium zwischen P1 und P3 eine geringere Frequenz von spontanen EPSCs („excitatory postsynaptic currents“) und IPSCs („inhibitory postsynaptic currents“) in „slice“-Kulturen festgestellt. Im späten postnatalen Stadium P20 – P22 konnte jedoch kein Unterschied zu Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Die Anzahl der Synapsen bei der „knockout“-Maus ändert sich im Vergleich zum Wildtyp jedoch nicht. „Paired-pulse“-Experimente zeigten eine signifikant höhere „paired-pulse“-Ratio in CALEB/NGC-defizienten Mäusen. Die höhere „paired-pulse“-Ratio wird als veränderte Freisetzungswahrscheinlichkeit von Neurotransmittern in der CALEB/NGC „knockout“-Maus in einem frühen postnatalen Stadium interpretiert. Es wurde daher angenommen, dass CALEB/NGC *in vivo* in einem limitierten Zeitfenster für die Funktion von Synapsen nötig oder aber für eine Feinregulation während früher Phasen der Gehirnentwicklung wichtig ist (Jüttner et al., 2005).

Zusammengefasst deuten die bisherigen Erkenntnisse über CALEB/NGC auf eine Beteiligung des Proteins an verschiedenen Aspekten der Entwicklung des Nervensystems an. Neben einer Rolle im Neuritenwachstum (Schumacher et al., 1997) wird für CALEB/NGC eine Rolle in der Synaptogenese vorgeschlagen (Schumacher et al., 1997; Aono et al., 2001; Jüttner et al., 2005). Da CALEB/NGC im sich entwickelnden Nervensystem stark in Arealen exprimiert wird, in denen Dendritenbäume lokalisiert sind, liegt die Vermutung nahe, dass CALEB/NGC an deren Differenzierung beteiligt sein könnte. Thematischer Schwerpunkt dieser Arbeit ist daher die Frage nach der Bedeutung von CALEB/NGC für Dendritogenese.

1.6 Ziel der Arbeit

In der Einleitung ist dargelegt worden, dass die Differenzierung des Nervensystems das Ergebnis komplexer Abläufe von Zellkommunikationen ist, die durch Moleküle, welche an verschiedenen Aspekten der Entwicklung beteiligt sind, vermittelt werden. Ein wichtiges Stadium beim Aufbau des neuronalen Netzwerkes ist die Entwicklung der Dendritenbäume, da an den Dendriten die Informationsverarbeitung und Signalweiterleitung geregelt wird. Um den funktionellen Ablauf der Entwicklung des Nervensystems besser verstehen zu können, ist es notwendig, möglichst viele der daran beteiligten Moleküle zu identifizieren und in ihrer Funktion zu charakterisieren. CALEB/NGC ist ein transmembranales Mitglied der EGF-

Familie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, über dessen zelluläre Funktion in der Entwicklung des Nervensystems nur wenig bekannt ist. Bisherige Publikationen konnten herausstellen, dass eine prominente Expression von CALEB/NGC insbesondere in synapsen- und faserreichen Regionen des ZNS zu erkennen ist und darüber hinaus einer entwicklungsabhängigen Regulation unterliegt. Vor allem in dem Zeitfenster, in dem sich die neuronalen Verschaltungen ausbilden, wurde eine hochregulierte CALEB/NGC-Expression beobachtet. Die offenbar hirnspezifische Expression und die Lokalisation in dendriten- und synapsenreichen Arealen deuten auf eine Funktion von CALEB/NGC bei der Differenzierung von Dendriten hin. Somit lag es nahe zu untersuchen, ob CALEB/NGC für die Entwicklung von Dendriten von Bedeutung ist.

Vor diesem Hintergrund war es ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit, CALEB/NGC bezüglich seiner Funktion in der Dendritogenese zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde das Modellsystem der primären hippocampalen Neuronenkultur verwendet, um zielgerichtete funktionelle Untersuchungen durchzuführen. Die Relevanz von CALEB/NGC für die Entwicklung dendritischer Bäume sollte durch Überexpression des CALEB/NGC-Proteins sowie eines abgeleiteten funktionell dominant-negativen Konstrukts analysiert werden. Als weiterer experimenteller Ansatz sollte der Einfluss von endogenem CALEB/NGC auf zellulärer Ebene mit Hilfe der RNA-Interferenz-Technik untersucht und Aufschluss über eine Funktion von CALEB/NGC während der Dendritogenese gewonnen werden.

Da nur sehr wenig über die intrazellulären Signalwege, welche die Prozesse der Dendritenverzweigung kontrollieren, verstanden ist, bestand ein großes Interesse darin, die Beteiligung von CALEB/NGC an möglichen Signalwegen, deren Effekt auf die Dendritogenese bekannt ist, aufzuklären. Für diese Experimente sollten verschiedene pharmakologische Inhibitoren alleine oder in Kombination eingesetzt und deren Wirkung auf CALEB/NGC-vermittelte Dendritendifferenzierung im zellulären System analysiert werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, in molekular-proteinbiochemisch orientierten experimentellen Ansätzen nach zytoplasmatischen Interaktionspartnern für CALEB/NGC zu suchen. Diese neuen Bindungspartner sollten helfen, mögliche Einbindungen von CALEB/NGC in intrazelluläre Signalkaskaden zu untersuchen. Ferner war es ein Ziel, die Interaktion von CALEB/NGC mit putativen Interaktionspartnern auf Proteinebene zu verifizieren. Die Ergebnisse sollten dazu beitragen, die Funktion von CALEB/NGC bei der Differenzierung der Dendritenbäume präziser definieren zu können und das Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Ausdifferenzierung von Dendriten zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Zellkulturmaterialien

Die eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Difco (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm) Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Invitrogen (Karlsruhe), Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden), Pierce (Rockford, USA), Roth (Karlsruhe) und BioRad (München) in analytischer Qualität bezogen.

Bezugsquelle für Enzyme waren, sofern nicht anders vermerkt, die Firmen Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Bad Schwalbach), Stratagene (Heidelberg) und Applied Biosystems (Foster City, USA).

Zellkultur-Materialien wurden von den Firmen BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA), Biochrom KG (Berlin) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Glasdeckplättchen für die Zellkultur wurden von den Firmen Marienfeld und Assistent benutzt.

Plastikwaren, die nicht für die Zellkultur benutzt wurden, wurden zusätzlich zu den bereits genannten Firmen von Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen) und Sarstedt (Nürnbrecht) bezogen.

2.1.2 Geräte

Binokkular GZ 6:	Leica, Bensheim
Digitale Kamera Photometric Cool Snap ES:	Visitron Systems, Puchheim
Digitale Kamera Intas:	Intas, Göttingen
Elektrophorese-System Mini-Protean II:	BioRad, München
Geldokumentationsanlage:	Intas UV-Systeme, Göttingen
Heizblock:	SK1101D, Duxford Cambridge, UK
Heizrührer:	RCTbasic, IKA Labortechnik, Staufen
Inkubatoren:	Hera Cell 240, Heraeus, Hanau Nuair US Auto Flow, Plymouth, USA
Mikroskope:	Konfokales Laser Scanning Mikroskop, Leica TCS SL, Bensheim

	Fluoreszenzmikroskop BX50, Olympus, Hamburg
	Fluoreszenzmikroskop Ck2, Olympus, Hamburg
Photometer:	Pharmacia Biotech Ultrospec 1000, UV/VIS Spectrophotometer, Cambridge, England
	Pharmacia Biotech Ultrospec 2000, UV/VIS Spectrophotometer, Cambridge, England
Power Pac 200:	BioRad, München
Software:	Metamorph Systems, Adobe Photoshop 7.0, Microsoft OfficeXP, Leica confocal software (LCS)
Schüttelinkubator:	Gerhardt, Königswinter
Sonifier:	SH70G, Bandelin Elektronik, Berlin
Trans-Blot SD:	Semi-Dry Transfer Cell 240, BioRad, München
Thermocycler:	Thermocycler MJ Research, MWG, Ebersberg
Thermomixer:	Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg
Rundschüttel-Inkubatoren:	Roto-Shake Genie, Scientific-Industries, Inc., Bohemia, N.Y., USA
	Heidolph Instruments, Polymax 1040 Stuart rotator SB3
Vortex Genie™2:	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen:	Beckmann CoulterOptima L-90K Ultracentrifuge, Krefeld
	Eppendorf Zentrifuge 5471R, Hamburg
	Eppendorf Zentrifuge 5804R, Hamburg
	Hettich Zentrifugen Rotina 35R, Tuttlingen
	Biofuge pico, Heraeus, Hanau

2.1.3 Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Zusammenfassung aller verwendeten Primärantikörper

EH: eigene Herstellung (Dr. Stefan Schumacher); IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot; IP: Immunpräzipitation

Bezeichnung	Antigen	Quelle	Organismus	Art	Verdünnung/ Konzentration
anti-MBP-mCALextra	mCALEBb	EH	Kaninchen	polyklonal	3-8 µg/ml (IF); 5 µg/ml (IP)
anti-GST-hCALb-cyt	hCALEBb-cyt	EH	Kaninchen	polyklonal	5 µg/ml (IF)
anti-NGC	Neuroglycan C	BD Biosciences (#610986)	Maus	monoklonal	1,5 µg/ml (WB)
anti-CSPG5 (M01) 5C11	Neuroglycan C	Abnova	Maus	monoklonal	3 µg/ml (WB); 5 µg/ml (IF)
anti-FLAG (M2)	FLAG-Epitop-„tag“	Sigma	Maus	monoklonal	2 µg/ml (IF); 1 µg/ml (WB)
anti-FLAG	FLAG-Epitop-„tag“	Sigma	Kaninchen	polyklonal	5 µg/ml (IP)
anti-GFP (LGB-1)	GFP	Biozol	Maus	monoklonal	0,5 µg/ml (IF)
anti-GFP	GFP	abcam	Kaninchen	polyklonal	0,2 µg/ml (IF)
anti-MAP2 (HM-2)	MAP2	Sigma	Maus	monoklonal	1:1000 (IF)
anti-MAP2	MAP2	Chemicon	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (IF)
anti-HA (HA-7)	HA-Epitop-„tag“	Sigma	Maus	monoklonal	1:1000 – 1:2000 (IF); 1:1000 (WB)
anti-myc (9E10)	myc-Epitop-„tag“	Roche	Maus	monoklonal	2 µg/ml (IF); 2 µg/ml (WB)
anti-c-myc	myc-Epitop-„tag“	Sigma	Kaninchen	polyklonal	4 µg/ml (IF)
anti-Tubulin	Tubulin	Santa Cruz (H-235)	Kaninchen	polyklonal	2 µg/ml (WB)
anti-B56β	B56β	EH	Kaninchen	polyklonal	3 µg/ml (IF); 2 µg/ml (WB)
anti-PP2A-B56β (C-19)	B56β	Santa Cruz	Ziege	polyklonal	4 µg/ml (IF); 3 µg/ml (WB)
anti-Akt	Akt	Cell Signaling Technology	Kaninchen	polyklonal	1:200 (WB)
anti-Phospho Akt (587F11)	PhosphoAkt (Ser 473)	Cell Signaling Technology	Maus	monoklonal	(IF); 1:200 (WB)
anti-p44/42 MAPK	p44/42 MAPK	Cell Signaling Technology	Kaninchen	polyklonal	1:250 (WB)
anti-p44/42 Phospho MAPK (E10)	Phospho p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology	Maus	monoklonal	1:500 (WB)

Tabelle 2: Zusammenfassung aller eingesetzten Sekundärantikörper

IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot

Bezeichnung	Antigen	Quelle	Organismus	Verdünnung
anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488	Maus IgG	Molecular Probes	Ziege	1:1000 (IF)
anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG	Molecular Probes	Ziege	1:1000 (IF)
Cy TM 3-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG	Maus IgG	Jackson Immuno Research	Ziege	1:1000 (IF)
Cy TM 3-conjugated AffiniPure Goat anti- Rabbit IgG	Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research	Ziege	1:1000 (IF)
anti-mouse-IgG-horseraddish peroxidase linked whole antibody	Maus IgG	Amersham Biosciences	Schaf	1:5000 (WB)
anti-rabbit-IgG- horseraddish peroxidase linked whole antibody	Kaninchen IgG	Amersham Biosciences	Esel	1:5000 (WB)
anti-goat-IgG-HRP	Ziege IgG	Santa Cruz	Esel	1:5000 (WB)
anti-mouse-IgG-AP	Maus IgG	Dianova	Ziege	1:4000 (WB)
anti-rabbit-IgG-AP	Kaninchen IgG	Dianova	Ziege	1:4000 (WB)

2.1.4 Konstrukte

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Konstrukte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammenfassung aller eingesetzten Konstrukte

HA: Hämagglutinin

Konstrukt	Bezeichnung	Vektor	Epitop-“tag”
EGFP	EGFP	pEGFP-N1	
409	mCALEBb	p3xFLAG-Myc-CMV-25 (Sigma)	3xFLAG (N-term.), myc (C-term.)
479	mCALEBb	p3xFLAG-CMV-13	3xFLAG (C-term.)
396	Deletionskonstrukt von mCALEB ohne C-terminalen Teil einschließlich „KKLYLL“ nach der TM	p3xFLAG-Myc-CMV-25 (Sigma)	3xFLAG (N-term.), myc (C-term.)
388	Deletionskonstrukt von mCALEB ohne den C-terminalen Teil der Sequenz ab „NKFRTPE“	p3xFLAG-Myc-CMV-25 (Sigma)	3xFLAG (N-term.), myc (C-term.)
400	Deletionskonstrukt von mCALEB ohne den C-terminalen Teil der Sequenz ab „VRKFCDTP“	p3xFLAG-Myc-CMV-25 (Sigma)	3xFLAG (N-term.), myc (C-term.)
EGFshedding1	Deletionskonstrukt von mCALEBb, N-terminal ab „VPPQHTL“ bis C-Terminus	p3xFLAG-Myc-CMV-25 (Sigma)	3xFLAG (N-term.), myc (C-term.)
EGFmut1	mCALEBb mit einer Vier-Punkt Mutation in der EGF-ähnlichen Domäne (G385D, G409E, R411G, C412G)	p3xFLAG-Myc-CMV-25 (Sigma)	3xFLAG (N-term.), myc (C-term.)
T452A	mCALEBb Phosphomutante, Austausch von Threonin 452 zu Alanin	p3xFLAG-CMV-13	3xFLAG (C-term.)
T452E	mCALEBb Phosphomutante,	p3xFLAG-CMV-13	3xFLAG (C-term.)

	Austausch von Threonin zu Glutaminsäure		
405	B56β	pHA-CMV	HA
244	B56β	pCMV-myc	myc
PR55γ	PR55γ	pCMV-HA	HA
PR55γ	PR55γ	pCMV-myc	myc
pCGLH (Chen et al., 2005)	exprimiert EGFP zusätzlich zu Insert, IRES-getrieben	pCGLH	
shRNA CAL1	Kontrollsequenz für mCALEBb shRNA	pCGLH	
shRNA CAL3	mCALEBb shRNA	pCGLH	

2.1.5 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammenfassung aller eingesetzten Oligonukleotide

Nr	Konstrukt	Bezeichnung	Sequenz
1	mCALEBb-T452A	CALEB479-T452A-fw	GCTCTATCTGCTCAAGGCTGAGAATACCAAGCTGCG
2	mCALEBb-T452A	CALEB479-T452A-re	CGCAGCTTGGTATTCTCAGCCTTGAGCAGATAGAGC
3	mCALEBb-T452E	CALEB479-T452E-fw	GCTCTATCTGCTCAAGGAGGAGAATACCAAGCTGCGG
4	mCALEBb-T452E	CALEB479-T452E-re	CCGCAGCTTGGTATTCTCCTCCTTGAGCAGATAGAGC
5	EGFshed1	mFLAG12a-fw	CACGAATTCTGTTCCCCCACAGCATACTCTGGGGATGGT
6	EGFshed1	mFLAG12c-fw	CACGAATTCCTGCCCTCTCAAAGCCTGGTGTGGGGCCT
7	EGFshed1	mFLAG12b-re	CACTCTAGAGGTTAGGTTATTCTGCAGACAGTTACCCCCAA
8	EGFmut1	EGFmut1	CTACATCTGGCACAAGGAGATGGGCGGTGAGTCCATCATCAC G
9	EGFmut2	EGFmut2	TCCGAGTTACTGTCAACGGCGACCAGTGCTACCTGGTGG
10	PR55γ	PP2APR55Bgam ma-fw	CACGAATTCAAATGGGCGAGGACACGGACACGCGGAAA
11	PR55γ	PP2APR55Bgam ma-re	CACAGATCTCTAGTGCATGTCAGAGTTTACCTTGTCTGGAAG

2.1.6 Organismen

2.1.6.1 Bakterien

Zur Klonierung und Expression rekombinanter Proteine wurden die *Escherichia coli*-Stämme One Shot TOP10F', One Shot TOP10, XL1 Gold eingesetzt. Die Stämme weisen folgende relevante genotypische Merkmale auf:

BL21 (DE3): F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3)

Bl21-AI: F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm araB::T7RNAP-tetA*.

TOP10F': F' {*lacI^qTn10 (Tet^R)*} *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG*

XL10-GOLD : Tet^RΔ(*mcrA*) 183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 end A1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' *proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R*]^a

Zur Anzucht von *E. coli* wurde folgendes Medium verwendet:

LB (Luria Bertani)-Medium: 10 g/l NaCl

10 g/l Trypton/Pepton

5 g/l Hefeextrakt

Für die Selektion rekombinanter Klone wurde das Medium in Abhängigkeit des Vektors mit 50 µg/ml Kanamycin oder 150 µg/ml Ampicillin versetzt.

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden dem LB-Medium 15–20g/l Agar-Agar zugegeben.

2.1.6.2 Zelllinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die folgende Zelllinie verwendet:

HEK293: humane embryonale Nierenzelllinie (Graham et al., 1977)

2.1.7 Vektoren

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgte mit dem Vektor pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences). Dieser Vektor beinhaltet einen durch IPTG induzierbaren Promotor, der die Expression des inserierten DNA-Fragmentes als Fusionsprotein mit GST bewirkt. Über diesen GST-„tag“ können die Fusionsproteine affinitätschromatographisch mittels GST-Sepharose-Matrix aufgereinigt werden.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Proteinen in kultivierten eukaryotischen Zellen kamen verschiedene Vektoren zum Einsatz.

Der Vektor pEGFP-N1 (Clontech), welcher die Sequenz für eine Variante des Grünfluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequorea victoria*, das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) beinhaltet, wurde für die Transfektion von primären Neuronen verwendet.

Des Weiteren wurden die eukaryotischen Expressionsvektoren p3xFLAG-Myc-CMV-25 (Sigma), p3xFLAG-CMV-13 (Sigma), pCMV-myc (Clontech) und pCMV-HA (Clontech) verwendet. Durch Klonierung der DNA-Fragmente in diese Vektoren „erhielten“ die zu untersuchenden Proteine durch Expression in den transfizierten Zellen einen oder zwei „tags“. Dabei handelt es sich um kurze Nukleotidsequenzen, welche für Aminosäuresequenzen kodieren, die als C- oder N-terminaler Fusionsanteil des Proteins vorliegen und über die die betreffenden Proteine mit vorhandenen, spezifischen Antikörpern detektiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die sogenannten FLAG-Epitop-, myc-Epitop-, und HA-Epitop-„tags“ verwendet, gegen die sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper käuflich zu erwerben sind. Für shRNA-Klonierungen wurde der pCGLH-Vektor verwendet, der auch die für EGFP kodierende Sequenz hinter einer IRES („internal ribosomal entry site“)-Stelle enthält (Chen et al., 2005).

Tabelle 5: Aminosäuresequenzen der verwendeten „tags“

„tag“	Aminosäure-Sequenz
c-Myc	EQKLISEEDL
HA	YPYDVPDYA
FLAG	DYKDDDDK

2.1.8 Versuchstiere

Zur Präparation der hippocampalen Neurone wurden terminiert verpaarte Wistar-Ratten aus der Zucht der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM, Berlin) bezogen.

2.1.9 Standards

DNA-Standard: PeqGOLD Leiter-Mix
10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500,
2.000, 1.500, 1.200, 1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400,
300, 200, 100 bp

Protein Standard: Precision Plus Protein™ Standards All Blue
250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa

2.1.10 Reinigungs-und Isolierungskits

DNA-Aufreinigung: QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)

Plasmid-Reinigung: Plasmid Mini/Midi Kit (Qiagen)
EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
Nucleo Bond® PC100 (Macherey - Nagel)

Gerichtete Mutagenese: QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Vor der Transformation müssen die Bakterienzellen für die Aufnahme von Fremd-DNA vorbereitet, d.h. kompetent gemacht werden. Die Kompetenz wird bei *E. coli* durch die Inkubation der Bakterien aus der frühen log-Phase in CaCl_2 bzw. RbCl erreicht.

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes (TOP10F') angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0,6\text{--}0,8$) bei 37°C und 140 rpm kultiviert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die Kultur wurde 10 min bei $5000 \times g$ abzentrifugiert, das Bakterienpellet wurde in 30 ml TFB I resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation. Das Pellet wurde danach in 5 ml eiskaltem TFB II Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden die kompetenten Bakterien aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

TFB I Puffer: 30 mM Kac
50 mM MnCl_2
100 mM RbCl
10 mM CaCl
15% Glycerin
pH 5,8 (mit 0,2 N Hac eingestellt)

TFB II Puffer: 10 mM Na-MOPS
75 mM CaCl_2
10 mM RbCl
15% Glycerin
pH 7,0

Alle Puffer wurden sterilfiltriert.

2.2.1.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

50 μl chemisch kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 2-4 μl Ligationsansatz oder 1 ng zirkulärem Plasmid gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis

erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min. Nach Abkühlen des Transformationsansatzes auf Eis für 5 min wurden 400 µl LB-Medium ohne Antibiotika dazugegeben und 30–60 min bei 37°C inkubiert, um die Expression der Resistenzgene zu ermöglichen. Die Bakteriensuspension wurde für 30 sec bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand bis auf 100 µl abgenommen, die sedimentierten Bakterien im verbleibenden Überstand resuspendiert, auf den entsprechenden Antibiotika-haltigen Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.3 Minipräparation von Plasmid-DNA durch Alkalische Lyse (nach Macherey und Nagel)

Plasmid-DNA wurde im analytischen Maßstab aus transformierten *E. coli*-Zellen mittels alkalischer Lyse aufgereinigt (Birnboim und Doly, 1979). Die Bakterien werden zunächst mit EDTA und SDS unter Zugabe von NaOH aufgeschlossen. Im stark basischen pH-Bereich werden Proteine und hochmolekulare genomische DNA denaturiert, während Plasmide im ringförmigen oder „supercoiled“ Zustand verbleiben. Durch schnelle Zugabe von Kaliumacetat entsteht ein schwer löslicher Komplex aus genomischer DNA, der zusammen mit den denaturierten Proteinen und Zelltrümmern bei der Zentrifugation sedimentiert. Aus dem plasmidhaltigen Überstand wurde die gelöste Plasmid-DNA mit 2-Propanol ausgefällt und durch Zentrifugation abgetrennt, verbleibende Salze wurden durch Waschen mit 70% Ethanol entfernt.

1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden 10 min bei 6000 x g zentrifugiert und das Bakteriensediment in 0,4 ml S1-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 0,4 ml S2-Puffer (SDS und NaOH lösen die Zellmembran auf und setzen den Zellinhalt frei) und mehrmaligem Invertieren sowie 5 min Inkubation bei RT, die Neutralisation durch Zugabe von 0,4 ml S3-Puffer, mehrmaligem Invertieren und 5 min Inkubation auf Eis. Um die ausgefällten Proteine und Zelltrümmer abzutrennen, wurde 15 min bei 4°C und 130000 x g zentrifugiert. Die in der wässrigen Phase enthaltene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 600 µl 2-Propanol ausgefällt und für 25 min bei 13000 x g präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 20 µl TE pH 8,0 aufgenommen.

<i>Resuspensionspuffer S1:</i>	<i>50 mM Tris-HCl</i> <i>10 mM EDTA</i> <i>100 µg/ml RNase A, pH 8,0</i>
<i>Lysispuffer S2:</i>	<i>200 mM NaOH</i> <i>1% SDS</i>
<i>Neutralisationspuffer S3:</i>	<i>2,8 M KAc, pH 5,1</i>
<i>TE (Tris-EDTA-Puffer):</i>	<i>10 mM Tris, pH 8,0</i> <i>1 mM, pH 8,0</i>

2.2.1.4 Midipräparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA mit einem hohen Reinheitsgrad zu erhalten, welche für die Transfektionen in eukaryotische Zellen erforderlich ist, empfiehlt sich die Plasmidpräparation mit dem Kit von Macherey und Nagel, die nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Anionenaustausch-Chromatographie funktioniert. Die Anzucht und Lyse der Bakterien sowie die Präparation der DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers („Nucleo Bond[®]PC100“, Macherey-Nagel).

Ist endotoxinfreie DNA notwendig (z.B. für transiente Transfektionen von Säugerzellen, im besonderen primäre hippocampale Neurone), wurde Plasmid-DNA mit Hilfe des „EndoFree[®]Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) aufgereinigt.

2.2.1.5 Anlegen von Glycerolkulturen

Um Dauerkulturen anzulegen wurden 100 µl aus einer Bakterienübernachtskultur bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,5–1,0 angezogen. 600 µl dieser Bakteriensuspension wurden dann mit 600 µl 100%igem Glycerol im 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis versetzt. Diese Kulturen konnten bei –80°C über längere Zeit gelagert werden.

2.2.1.8 DNA-Fragment-Isolierung

Für die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde der „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen) benutzt. Die negativ geladene DNA bindet an Glaspulver und kann anschließend eluiert werden. Entsprechende Banden wurden aus dem quantitativen Gel auf dem UV-Tisch herausgeschnitten und entsprechend des Herstellerprotokolls aufgereinigt.

2.2.1.9 DNA-Ligation

Mit Hilfe von Ligasen können DNA-Fragmente neu kombiniert werden, da sie die Bildung von kovalenten Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Fragmenten katalysieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (Fermentas) eingesetzt. Die T4-Ligase benutzt als Cofaktor ATP, das bereits im Reaktionspuffer enthalten ist.

Die Ligationen wurden in einem Volumen von 20 µl angesetzt, Vektor und Insert lagen dabei im molaren Verhältnis von 1:3 vor. Es wurden 1/10 des Ligationspuffers (10x Stock) und 0,2 µl T4-Ligase eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C oder für ca. 4 h bei RT. Für eine Transformation in Bakterien wurde dieser Ansatz ohne weitere Behandlung eingesetzt.

2.2.1.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels PCR können definierte DNA-Sequenzen mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase amplifiziert werden. Die Amplifikation verläuft in drei Schritten: DNA-Hitze-Denaturierung, Primer-Anlagerung (annealing) und DNA-Synthese (Extension). Als Primer werden chemisch synthetisierte Oligonukleotide eingesetzt, die den zu amplifizierenden Strang flankieren und zu jeweils einem der Stränge komplementär sind (sense- und reverse Primer). Die Verwendung von Primern, die am 5'-Ende zusätzlich zur Zielsequenz die Erkennungssequenz von verschiedenen Restriktionsenzymen tragen, ermöglicht eine gerichtete Klonierung der PCR-Produkte. Durch das exponentielle Ansteigen der DNA-Menge während der Reaktion erhält man nach 20-30 Zyklen aus einer geringen Menge Ausgangsmaterial eine sehr große Menge der gewünschten DNA-Sequenzen (Mullis & Faloona, 1987).

Für analytische Zwecke wurde die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt. Ihr fehlt die 3'→5'-Exonukleasefunktion („proof-reading“), so dass die amplifizierte Fragmente Mutationen in Form von Nukleotidaustauschen aufweisen können. Aus diesem Grund wurden PCR-Fragmente, die kloniert werden sollten, ausschließlich mit einer „proof-reading“ DNA-Polymerase, wie der *Thermus thermophilus* rTth DNA Polymerase, amplifiziert. Über PCR generierte Konstrukte wurden nach der Klonierung sequenziert, um Nukleotidaustausche auszuschließen.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (für Klonierungen):

3,3 x XL-Puffer:	6 µl
Mg(OAc) ₂ :	2,2 µl
dNTPs (je 10 mM):	1 µl
Oligonukleotid 1 (100 µM Stocklösung; 1 µM f.c.):	0,5 µl
Oligonukleotid 2 (100 µM Stocklösung; 1 µM f.c.):	0,5 µl
H ₂ O	ad 20 µl
Hotstart: 5 min 85°C dann 30 sec 20°C	
3,3 x XL Puffer:	9 µl
rTth-Polymerase:	2,5 µl
Plasmid-DNA (ca. 400 ng):	0,5 µl
H ₂ O:	ad 50 µl

2.2.1.11 Gerichtete Mutagenese

Der QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene macht es möglich, Nukleotide innerhalb einer Sequenz gezielt auszutauschen. Zur Durchführung wird ein Vektor mit der zu mutierenden Zielsequenz benötigt, sowie zwei Oligonukleotid-Primer, welche die einzubringende Mutation tragen. Die Primer binden an die komplementären Seiten des Vektors und werden von der *PfuTurbo* DNA Polymerase während einer PCR verlängert. Ist diese abgeschlossen, folgt ein *DpnI*-Verdau. Die *DpnI*-Endonuklease spaltet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA und kann so zwischen methylierter Ausgangs-DNA und neu synthetisiertem PCR-Produkt unterscheiden. An den Verdau schloss sich eine Transformation in XL10- Gold ultrakompetente Zellen an, aus denen der mutierte Vektor im Anschluss aufgereinigt werden konnte.

Mutagenese-Ansatz:

10x Puffer:	2,5 µl
Plasmid-DNA (0,2 µg/µl; ca. 100 ng f.c.):	0,5 µl
QuikSolution:	0,5 µl
Oligonukleotid 1(0,1 µg/µl; 100 ng f.c.):	1 µl
Oligonukleotid 2 (0,1 µg/µl; 100 ng f.c.):	1 µl
dNTPs (je 10 mM):	1 µl
EnzymeBlend:	1 µl
H ₂ O:	ad 25 µl

Nach Abschluß der Zyklen und Zugabe von 1 µl *DpnI* folgte eine 1-stündige Inkubationszeit bei 37°C, um die parentale ds-DNA zu verdauen. Dann konnten die Ansätze direkt in kompetente Zellen transformiert werden.

2.2.1.12 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung

Die von Sanger entwickelte Methode zur enzymatischen Sequenzierung doppelsträngiger DNA läuft ähnlich einer PCR ab (Sanger et al., 1977). Es wird dabei jedoch nur ein Primer verwendet. Zusätzlich zu den in einem gewöhnlichen PCR-Ansatz vorhandenen Desoxynukleotiden (dNTPs) werden bei der Sequenzierung in geringer Menge Didesoxynukleotide eingesetzt, welchen die 3'-OH-Gruppe fehlt. Durch den zufälligen Einbau der Didesoxynukleotide über die PCR kommt es zum Kettenabbruch der DNA-Synthese.

Die vier verwendeten Didesoxynukleotide sind mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert, so dass alle Fragmente, deren Synthese durch den Kettenabbruch gestoppt wird, an ihrem Ende in Abhängigkeit des jeweiligen Nukleotids einen dieser Farbstoffe tragen. Bei Anregung mit einem Laserstrahl weisen sie entsprechend unterschiedliche Emissionspektren auf und können detektiert werden. Die Auswertung der Sequenzreaktion erfolgt automatisch über die dazugehörige Software.

Die Durchführung aller Sequenzierungen von Plasmid-DNA erfolgte durch den Sequenzierservice SMB Services in Molecular Biology (Berlin).

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Expression und Reinigung

Der für die Expression rekombinanter Proteine verantwortliche *tac*-Promotor des Vektors pGEX-6P-1 ist durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,3 mM) induzierbar. Nach Induktion der Transkription wurde eine Expressionskinetik erstellt. Die dafür entnommenen Proben wurden entsprechend ihrer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) nach Zentrifugation mit SDS-Probenpuffer versetzt und mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt.

GST-hCALEBb-cyt ist ein Fusionsprotein, bestehend aus GST und dem zytoplasmatischen Teil der längeren Isoform von humanem CALEB (hCALEBb). GST-hCALEBb-cyt sowie GST wurden mittels des prokaryotischen Expressionsvektors pGEX-6P-1 im *E. coli*-Stamm BL21 AI (Invitrogen) exprimiert. 1,2 l *E. coli*-Kulturen wurden in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz (Ampicillin, 150 µg/ml) bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37°C inkubiert. Nach Induktion der Expression mit 0,3 mM IPTG wurden die Bakterien nach zwei- bis dreistündiger Inkubation sedimentiert (3500 x g, 10 min), das Pellet in eiskaltem STE-Puffer pH 8,0 gewaschen und anschließend in eiskaltem STE-Puffer mit 1mg/ml Lysozym, Pepstatin, Aprotinin, Leupeptin und PMSF resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis und Zugabe von DTT zu einer finalen Konzentration von 5 mM erfolgte das Einfrieren bei -80°C. Nach Auftauen der Zellsuspension und Zugabe von N-Lauroylsarcosin (10% in STE-Puffer) zu einer finalen Konzentration von 1,5%, fünfzehnminütiger Inkubation auf Eis, Zugabe von Triton X-100 (10% in STE-Puffer) zu einer finalen Konzentration von 4% und erneuter zwanzigminütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension mit einem Volumen STE-Puffer pH 6,8, welcher mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail versetzt war, verdünnt. Die Bakterien wurden nach Mischen und wiederholter zwanzigminütiger Inkubation durch Ultraschall (3 x 30 s mit 30 s Pause) aufgeschlossen. Zellfragmente wurden bei 4°C für 20 min bei 15000 x g abzentrifugiert.

Der Überstand wurde mit in PBS äquilibrierter Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow (Glutathion-S-Transferase) bei 4°C für 2 h mit end-over-end Rotation inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden im „Batch“-Verfahren nach dem Herstellerprotokoll (Amersham Biosciences) durchgeführt. Mit eiskaltem Elutionspuffer eluiertes Protein wurde auf seine Reinheit durch SDS-PAGE überprüft.

Elutionspuffer: 50 mM Tris/Cl pH 8,0
10 mM GSH
5 mM DTT

STE-Puffer: 10 mM Tris/Cl pH 8,0
150 mM NaCl
1 mM EDTA

Proteaseinhibitoren: Aprotinin = 100 mg in 60 ml H₂O
Pepstatin = 100 mg in 30 ml MeOH
Leupeptin = 100 mg in 40 ml H₂O
PMSF = 870 mg in 25 MeOH

PBS: 1,37 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,4 mM N₂HPO₄
4,3 mM KH₂PO₄
pH 7,4

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.2.2.2.1 BCA-Methode

Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des „Micro BCA™ Protein Assay Kits“ der Firma Pierce bestimmt. Im Kit enthalten sind folgende Lösungen: Lösung MA (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat und Natriumtartrate), Lösung MB (4% BCA) sowie MC (4% CuSO₄·5H₂O). Als Detektionsreagenz für Cu⁺ wird Bichinon-4-Carbonsäure verwendet, welche entsteht, wenn Proteine im alkalischen Milieu Cu²⁺ zu Cu⁺ reduzieren. Die BCA reagiert mit Cu⁺, indem zwei BCA-Moleküle einen purpur-gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu⁺-Ion eingehen. Die Proben werden in 2 ml Reaktionsgefäßen mit je 1 ml der Reaktionslösung versetzt, die sich aus 25:24:1 Teilen der Lösungen MA:MB:MC zusammensetzt. Alternativ wurden die Proben mit je 200 µl der Reaktionslösung in einer 96-well-Mikrotiterplatte versetzt. Nach 60 min Inkubation bei 60°C bzw. 30 min bei 37°C (Mikrotiterplatte) wird die Extinktion bei 562 nm im Spektralphotometer oder am ELISA-Reader vermessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichgeraden mit 0,5–200 µg/ml BSA bestimmt.

2.2.2.2 Bradford-Methode

Die Methode nach Bradford (1976) basiert auf der Reaktion der Proteine mit Coomassie-Blau, die über einen großen Konzentrationsbereich linear zur eingesetzten Proteinmenge ist. Dabei entstehende Farbstoffkomplexe weisen ein Absorptionsmaximum bei 595 nm auf, da sich das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brilliant-Blue G250 von 465 nm nach 595 nm verschiebt, wenn es in saurer Lösung an Proteine, hauptsächlich über Arginin-Reste, bindet. 20 µl Proteinlösung wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte mit 100 µl Bradford-Reagenz (Sigma) versetzt und nach 15 min Inkubation bei 595 nm photometrisch mittels eines „ELISA-Readers“ vermessen. Die Proteinkonzentration wurde in Abhängigkeit einer Eichgeraden im Bereich von 0,5–10 µg/10 µl bestimmt.

BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad): 1:5

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese können Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen proportional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und analysiert werden. Eingesetzt wurde hier das Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelsystem nach Laemmli (1970). Die Proben wurden mit 2,5x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C, GST-hCALb-cyt aber nur bei 50°C denaturiert. Das im Probenpuffer enthaltene anionische Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) denaturiert die Proteine. Die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich damit nur noch in ihrer Größe, so dass diese proportional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Entsprechend der Molekulargewichte der zu analysierenden Proteine wurden Gele unterschiedlicher Polyacrylamid-Konzentration (8–12%) verwendet. Die Auftrennung erfolgte im Trenngel bei konstanten 120 V. Im Anschluss hieran wurden die Gele entweder mit Coomassie gefärbt und zur Verdeutlichung der Proteinbanden mit Wasser wieder entfärbt oder für einen Immunblot weiterverwendet. Als Größenstandard diente der All Blue Precision Plus ProteinTM Standard von BioRad.

<i>5x SDS-Probenpuffer (Laemmli-Probenpuffer)</i>	<i>0,5 M DTT 10% SDS 0,4 M Tris/Cl pH 6,8 50% Glycerol Spatelspitze Bromphenolblau</i>
<i>Trenngelpuffer:</i>	<i>1,5 M Tris, pH 8,8</i>
<i>Sammelgelpuffer:</i>	<i>0,5 M Tris, pH 6,8</i>
<i>Elektrophoresepuffer:</i>	<i>25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS</i>
<i>Coomassie-Färbung:</i>	<i>Bio-Safe™ Coomassie, Coomassie G250 Stain (BioRad)</i>

2.2.2.3.1 Herstellung der Gele

Die mit Ethanol gesäuberten Glasplatten wurden zusammgebaut, das Trenngel wurde in den durch „spacer“ geschaffenen Spalt gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Acrylamids wurde das 2-Propanol dekantiert, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt. Die Prozentigkeit der Trenngele richtete sich nach dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine und lag im Bereich von 8 –12%. Verwendet wurde das System von BioRad. Die Menge war für vier 0,75 cm bzw. zwei 1,5 cm dicke Spacerplatten berechnet.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Trenngels

Substanz	8%	10%	12%
H ₂ O	9,38 ml	8 ml	6,7 ml
Trenngelpuffer	5 ml	5 ml	5 ml
Acrylamid (30%)	5,32 ml	6,66 ml	8 ml
SDS (10%)	200 µl	200 µl	200 µl
APS (10%)	100 µl	100 µl	100 µl
Temed	14 µl	14 µl	14 µl

Tabelle 7: Zusammensetzung des Sammelgels

Substanz	
H ₂ O	6,1 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Acrylamid (30%)	1,3 ml
SDS (10%)	100 µl
APS (10%)	100 µl
Temed	10 µl

2.2.2.4 Immunblot (Western Blot)

Im Immunblot werden die SDS-denaturierten Proteine nach der Auftrennung in Gel spezifisch nachgewiesen. Die aufgetrennten Proteine werden durch Anlegen einer Spannung elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell) transferiert und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Freie Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran wurden für 1 h bei RT oder üN bei 4°C mit 2% (w/v) BSA (bovine serume albumine) + 0,02 (0,05) % Thimerosal in TBST abgesättigt. Nach Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem ersten Antikörper in 2% (w/v) + 0,02 % Thimerosal in TBST für 2 h bei RT inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit TBST entfernt, bevor der gegen den ersten Antikörper gerichtete Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-gekoppelt (HRP) bzw. alkalische Phosphatase-konjugiert (AP)) in Blocklösung für 1 h 30 min zugegeben wurde. Nach anschließendem Waschen erfolgte die Blotentwicklung. Der Nachweis von HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (horse raddish peroxidase) erfolgte nach dem „enhanced chemoluminescence“ (ECL) -System der Firma Cell Signaling Technology. Dieses System beruht auf einer Chemilumineszenzreaktion, bei der mit Hilfe der Peroxidase unter Lichtemission Luminol oxidiert wird. Das Licht wurde mittels Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Der Nachweis von AP-konjugierten Sekundärantikörpern erfolgte durch Inkubation der Membranen mit einer BCIP/NBT Entwicklungslösung. Die sich hierbei entwickelnde Farbreaktion wurde durch Aqua dest. gestoppt. Für die Quantifizierung des RNAi-„knockdowns“ wurden die Proteinbanden auf dem Röntgenfilm gescannt und mit der Alpha Ease FC Software (Alpha Imager; Alpha Innotech Corporation; Version 1.0; San Leandro, CA 94577, USA) ausgewertet.

<i>TBS:</i>	<i>50 mM Tris/Cl pH 7,4 150 mM NaCl</i>
<i>TBST:</i>	<i>TBS 0,05% Tween 20</i>
<i>TBST/BSA:</i>	<i>TBST 2% BSA 0,02 % Thimerosal</i>
<i>BCIP/NBT Entwicklungslösung:</i>	<i>20 µl BCIP (Stock) 40 µl NBT (Stock) 10 ml AP-Puffer</i>
<i>BCIP Lösung (Stock):</i>	<i>(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl.phosphate) 50 mg/ml in 100% DMF</i>
<i>NBT Lösung (Stock):</i>	<i>(Nitroblue Tetrazoliumchloride) 50 mg/ml in 70% DMF</i>
<i>AP-Puffer:</i>	<i>100 mM TrisCl pH 9,5 100 mM NaCl 5mM MgCl₂</i>

2.2.2.5 Blot-Overlay-Assay (Peptidkompetitionsassay)

Über Glutathion-Sepharose-Affinitäts-Matrix gereinigtes rekombinantes GST-hCALEBb-cyt sowie GST-Protein als Kontrolle wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulosemembran transferiert. Parallel dazu wurde ein Proteingel mit kolloidalem Coomassie-Blau gefärbt. HEK293-Zellen wurden in drei 6-well Platten ausgesät und das entsprechende c-myc Epitop-markierte Plasmid (B56β) mit FuGENE-Transfektionsreagenz in die Zellen eingebracht. Nach zweitägiger Inkubation im Brutschrank wurde das Zelllysate hergestellt. Dafür wurden die Zellen mit 4 ml 1x PBS pro well gewaschen und anschließend mit 333 µl Aufschlusspuffer pro well mit Hilfe eines Zellschabers gelöst. Die Zellen wurden mit Hilfe einer 23 G-Kanüle aufgeschlossen und Zelltrümmer bei 14000 rpm für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend für den Blot-Overlay Peptidkompetitionsassay benutzt, indem die Nitrocellulose mit 2 µM rCAL1 Peptid bzw. rMas1 Peptid üN bei 4°C drehend inkubiert wurde. An GST-hCALEBb-cyt gebundenes myc-

B56 β wurde mit einem Antikörper, der gegen das myc-Epitop gerichtet ist (Mab 9E10 anti myc, Roche, München), und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen.

Aufschlusspuffer: siehe Herstellung von Zelllysaten

2.2.2.6 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden mit 4 ml 1x PBS pro well gewaschen und anschließend in 200 μ l Aufschlusspuffer pro well aufgenommen. Die Zellsuspensionen eines Doppelsatzes wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe einer 23 G-Kanüle (Syringe 5 ml; Braun) durch siebenmaliges Auf- und Abziehen auf Eis und unter Vermeidung von Schaumbildung. Die Zelltrümmer wurden bei 14000 rpm für 30 min bei 4°C abzentrifugiert, das Zelllysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Aufschlusspuffer (20 ml): 1x TBS (2 ml einer 10x-Lösung)
1,2% Triton X-100 (2,4 ml einer 10%igen Lösung)
Proteaseinhibitoren (PMSF, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin)
1:500 (40 μ l)
ad 20 ml H₂O

2.2.2.7 Membranpräparation

Für die Membranpräparation wurde die Methode nach Hoffman et al., 1982 verwendet, bei der die Membranen über eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation angereichert werden. Dazu wurden die Gehirne von fünf P16 Ratten in 50 ml Aufschlusspuffer II suspendiert, mittels eines Potterhomogenisators homogenisiert und anschließend bei 4°C für 15 min bei 17000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand in ca. 45 ml Endvolumen 2,25 M Saccharoselösung resuspendiert. Im Zentrifugenröhrchen wurden insgesamt 45 ml Homogenisat mit ca. 22,5 ml 0,8 M Saccharoselösung vorsichtig überschichtet und im Anschluss 1,5 h bei 100000 x g (28141 rpm; SW 40 Ti; Beckmann Coulter Optima L-90K Ultracentrifuge) abzentrifugiert. Da sich die Membranen in der Interphase befanden, wurden die untere sowie die obere Phase verworfen und die Membranfraktionen zweimal mit der vierfachen Menge 1x PBS homogenisiert bzw. gewaschen und bei 17000 rpm für 15 min bei 4°C sedimentiert. Anschließend wurde die

Membranfraktion in insgesamt 15 ml Aufschlusspuffer aufgenommen, erneut im Potterhomogenisator homogenisiert und 1 h bei 14000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die nachfolgende Immunpräzipitation verwendet.

Aufschlusspuffer II: *1 mM NaHCO₃*
 0,2 mM CaCl₂
 0,2 mM MgCl₂
 1 mM Spermidin (Putrescin; 1,4-Diaminobutane;
 Tetramethyldiamine Dihydrochloride)
 Proteaseinhibitoren

Aufschlusspuffer (50 ml): *1x TBS (5 ml einer 10x Lösung)*
 1,2 % TX100 (6 ml einer 10%igen Lösung)
 Proteaseschutz (Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin A, PMSF; je
 100 µl auf 50 ml Puffer)
 10 mM NaF
 10 mM Na-pyrophosphat
 1 mM Na-orthovanadat
 5 mM EDTA (500 µl einer 0,5 M Lösung)
 ad. 50 ml H₂O

PBS: *140 mM NaCl*
 2,6 mM KCl
 1,4 mM KH₂PO₄
 8,1 mM Na₂HPO₄

Proteaseinhibitoren: *Aprotinin 40 U/ml*
 Leupeptin 10 µM
 Pepstatin A 10 µM
 PMSF 100 mM

Geräte und Pufferlösungen alle auf 0-4 °C vorkühlen und sämtliche Operationen bei 4°C oder auf Eis durchführen.

2.2.2.8 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) können Antigene, für die spezifische Antikörper vorliegen, aus einem komplexen Proteingemisch präzipitiert werden. Das präzipitierte Zielprotein und seine etwaigen Interaktionspartner werden dann im Western-Blot

nachgewiesen. Für die IP wurde entweder Homogenat aus Rattenhirn oder Zelllysate von kotransfizierten HEK293-Zellen, welche die Interaktionspartner überexprimierten, verwendet. Für die Präzipitation der entsprechenden Proteine aus Gehirn wurde der Antikörper an Protein A-Kügelchen gekoppelt. Protein A stammt aus der bakteriellen Zellwand des *Staphylococcus aureus* und bindet mit hoher Affinität an die Fc-Region vieler Immunglobuline von Säugern. Bindet der Fc-Teil des Antikörpers an Protein A, so bleibt der Fab-Teil des Antikörpers für die Bindung des Antigens zugänglich.

Für die Koimmunpräzipitation wurden 1,5 ml Gehirnlisat von P16 Ratten nach erfolgter Membranpräparation zur Präadsorption, um unspezifische Bindungen des Lysats an Protein zu vermeiden, mit 40 µl EZview Red Protein A Affinity Gel (Sigma) im Eppendorf Gefäß (Eppendorf, AG) für 45 min drehend bei 4°C inkubiert und anschließend für 30 s bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt, mit 5 µg entsprechendem Antikörper oder Ig-Kontrolle versetzt und 1h bei 4°C drehend inkubiert. Die 1h-Ansätze wurden nach Zugabe von 40 µl EZview Red Protein A Affinity Gel für weitere 2 h end-over-end bei 4°C inkubiert und für 30 s bei 4000 rpm abzentrifugiert. Nach fünfmaligem Waschen mit jeweils 1 ml Aufschlusspuffer und einmaligen Waschen mit 1x PBS wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 25 µl 2,5x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot.

Um die Interaktion von Epitop-markierten überexprimierten Proteinen in Zellen nachzuweisen, wurden HEK293-Zellen in einer 6-well Platte ausgesät und die entsprechenden Plasmide mit FuGENE-Transfektionsreagenz in die Zellen eingebracht. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurden Zelllysate für die IP hergestellt. Dafür wurden die Zellen mit 4ml PBS pro well gewaschen und anschließend mit 200 µl Aufschlusspuffer pro well mittels eines Zellschabers gelöst. Die Zellsuspensionen von jeweils zwei wells pro verwendetem Konstrukt wurden dann in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe einer 23 G-Kanüle (Syringe 5 ml; Braun) durch siebenmaliges Auf- und Abziehen auf Eis und unter Vermeidung von Schaumbildung. Die Zelltrümmer wurden bei 14000 rpm für 30 min bei 4°C abzentrifugiert, das Zelllysate in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Präzipitation der Proteinkomplexe erfolgte mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das spezifische Epitop, in diesem Fall HA-Epitop bzw. FLAG-Epitop gerichtet sind und in diesem Falle bereits mit Agarose konjugiert waren. Von dieser Agarose wurden pro IP 25 µl „slurry“ eingesetzt, die vorher viermalig mit jeweils 1 ml Aufschlusspuffer gewaschen wurde (2000 x g, 2 min). Die Kopplung des Proteins mit dem Agarose-konjugierten Antikörper erfolgte für

4 h bei 4°C drehend. Nach der Inkubation des Lysats mit der Antikörper-gekoppelten Agarose wurde diese bei 2000 x g für 3 min bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet nach sechsmaligem Waschen im Aufschlusspuffer in 70 µl 2,5x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot.

Aufschlusspuffer für Homogenat aus Rattenhirn (50 ml): 1x TBS (5 ml einer 10x Lösung)
1,2 % TX100 (6 ml einer 10%igen Lösung)
Proteaseschutz (Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin A, PMSF; je 100 µl auf 50 ml Puffer)
10 mM NaF
10 mM Na-pyrophosphat
1 mM Na-orthovanadat
5 mM EDTA (500 µl einer 0,5 M Lösung)

Aufschlusspuffer für Zellyse (50 ml): 1x TBS 5 ml (10x)
1,2% TX-100 6 ml (10% Stock)
PMSF 100 µl
Aprotinin 100 µl
Leupeptin 100 µl
Pepstatin A 100 µl
2 mM EDTA 200 µl (0,5 M Stock)

2.2.2.9 Kopplung von Peptiden an NHS-aktivierte Sepharose

Um die Peptide rCAL1 und rMas1 für die Immunpräzipitationen einsetzen zu können, müssen sie vorher gelöst und an (NHS)-aktivierte Sepharose gekoppelt werden. Pro mg zu koppelndem Peptid werden 2 ml NHS-aktivierte Sepharose einmal mit 1 mM HCl eingewaschen. 1 mg der zu koppelnden Peptide, in diesem Fall rCAL1 sowie rMas1 als Kontrolle, werden in Aq. dest bzw. in Kopplungspuffer (rMas1 löst sich nur im basischen Bereich) gelöst, die Peptide für die Kopplung jeweils zu der eingewaschenen Sepharoselösung gegeben, mit Kopplungspuffer zu einem Gesamtvolumen von 12 ml in einem 15 ml Falcon Röhrchen aufgefüllt und bei 4°C üN drehend inkubiert. Die Kopplungsreaktion wurde durch Zugabe von 5 ml 0,2 M Glycinlösung abgestoppt. Die Peptid-gekoppelte Sepharose wurde jeweils zweimalig mit TBS, TBS + 2 M NaCl und wieder TBS eingewaschen und anschließend für die Präzipitation eingesetzt.

<i>HCl:</i>	<i>1 mM</i>
<i>Kopplungspuffer:</i>	<i>0,2 M NaHCO₃ pH 8,3</i> <i>0,5 M NaCl</i>
<i>Glycin:</i>	<i>0,2 M, pH 8,0</i>

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Medium, Kulturgefäße und Kulturbedingungen

Für die Kultivierung tierischer Säugerzellen wurde als Kulturmedium „Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) von Cambrex (Belgien) verwendet, welches mit 5–10% FCS (Fötale Kälberserum) sowie Penicillin und Streptomycin in einer Endkonzentration von 1% versetzt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in Kulturgefäßen der Firma Falcon BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA) und Nunc (Wiesbaden) kultiviert. Primärzellen wurden in Hanks Balanced Salts (HBSS) präpariert, in Minimal Essential Medium (MEM) supplementiert, mit 10% Pferdeserum und 0,6% Glucose sowie 1% Penicillin/Streptomycin ausplattiert und in Neurobasal A Medium kultiviert, welches mit 1x B27 Supplement, 0,5 mM Glutamin sowie 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Alle Medien, Lösungen und Zusätze wurden von Gibco bezogen und waren steril.

Für Immunfluoreszenzstudien wurden die Zellen auf mit 0,1 mg/ml poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich) beschichteten Deckgläschen ausgesät.

2.2.3.2 Passagieren von Zellen

Je nach Zelldichte mussten die Zellen nach ca. 2–3 Tagen passagiert bzw. für Transfektionen in einer definierten Zellzahl neu ausgesät werden. Nach Waschen der Zellen mit 1x PBS wurden diese mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen gelöst hatten. Anschließend wurde das Enzym durch Zugabe des doppelten Volumens von FCS-haltigem DMEM inhibiert. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen in der entsprechenden Zellkonzentration neu ausgesät.

2.2.3.3 Primäre Zellkultur

Für die Präparation primärer hippocampaler Neurone wurden Rattenembryonen im Embryonalstadium 18–20 (E18–E20) benutzt. Dazu wurde beim Muttertier der Bauchraum eröffnet und die Uteri entnommen. Die Köpfe der Embryonen wurden dekapitiert und die Gehirne vorsichtig isoliert. Anschließend wurden die Meningen sorgfältig abpräpariert, die Hippocampi herausgeschnitten, präpariert und in HBSS gesammelt. Nach zweimaligem Waschen des Gewebepellets mit HBSS wurden zum im Gesamtvolumen von 5 ml HBSS resuspendierten Gewebe 100–500 µl einer Trypsinstammlösung (2,5%; Gibco) hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 15–20 min Inkubation bei 37°C wurde die Verdauung abgenommen und der Verdau durch die Zugabe von ca. 3 ml Plating-Medium abgestoppt. Für die hiernach erfolgende Trituration wurden ca. 2 µl DNaseI einer 5-10 mg/ml Stammlösung in 1x PBS hinzugegeben, die Zellen wurden dann mittels einer feuerpolierten Pasteurpipette vorsichtig vereinzelt. Nach dem Absetzen nicht verdauter Gewebeteile wurde der Zellüberstand in ein neues Falcon überführt, resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte zwischen 70.000–150.000 Zellen pro well einer 12 well-Platte auf mit poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät. Nach ca. 3 h Inkubation im Brutschrank werden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und dann in 1 ml Wachstumsmedium pro well überführt.

HBSS

Plating Medium: (90 ml MEM (mit Earle's Salzen) + 0,6% Glucose + 10 % Pferdeserum)
3 ml einer 20%igen Glucoselösung
10 ml Pferdeserum (Gibco)
1 ml Penicillin/Streptomycin (100x Stock; Gibco)
ad 100 ml MEM (Gibco)
sterilfiltrieren

Wachstumsmedium: (Neurobasal A +B27 + 0,5 mM Glutamin)
1 ml B27 (50x Stock) (Gibco)
125 µl Glutamin (200 mM Stock; Gibco)
0,5 ml Penicillin/Streptomycin (100x Stock)
ad 50 ml Neurobasal A (Gibco)

Trypsin: 2,5% (Gibco)

Poly-L-Lysin: *100 µg/ml pLL in 100 mM Boratpuffer pH 8,5*

PBS: *1,37 mM NaCl*
 2,7 mM KCl
 1,4 mM N₂HPO₄
 4,3 mM KH₂PO₄
 pH 7,4

2.2.3.4 Transiente Transfektion von Zellen

2.2.3.4.1 Transfektion mit FuGENE[®] Transfektionsreagenz

FuGENE6 ist ein auf Lipiden basierendes nicht-liposomales Transfektionsreagenz, welches mit der DNA komplexiert und diese in die Zellen einschleust. Vorteile dieser Transfektionsmethode sind hohe Transfektionseffizienzen und nahezu keine Zytotoxizität.

Transiente Transfektionen für Koimmunpräzipitationen, bei denen eine gleichmäßige und hohe Transfektionseffizienz erforderlich war, wurden mit diesem Agens durchgeführt. Das vom Hersteller (Roche) vorgeschlagene Verhältnis FuGENE6-Reagenz zu µg DNA von 3:1 wurde eingehalten. HEK293-Zellen wurden in einer 6-well Platte ausgesät und nach eintägiger Inkubation im Brutschrank transfiziert. Dazu wurden jeweils 200 µl OptiMEM (Gibco) pro 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 6 µl FuGENE6 dazugegeben. Anschließend wurden 2 µg Plasmid-DNA hinzugegeben, sorgfältig gemischt und 20 bis 30 min bei RT inkubiert. Der FuGENE-DNA-Komplex wurde tropfenweise auf den Zellen verteilt, die sich in 2 ml Medium (DMEM + 5% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) befanden. Die Zellen wurden dann bis zum weiteren Experiment bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.2.3.4.2 Transfektion mit Effectene Transfektionsreagenz

Effectene ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, dessen Vorteile in der hohen Transfektionseffizienz für Zelllinien und Primärzellen sowie in der geringen Zytotoxizität liegen. Die DNA wird zunächst mit Hilfe eines Enhancers kondensiert, nach Zugabe von Effectene formt sich ein kationischer Effectene-DNA-Komplex, der von den Zellen aufgenommen wird. Die hippocampalen Primärzellen wurden nach der Präparation mit 150.000 Zellen pro well einer 12-well Platte ausgesät und entsprechend der Experimente nach

8, 10 bzw. 12 Tagen *in vitro* (DIV8 bzw. 10, 12) transfiziert. Für einen Doppelansatz wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß je 150 µl EC-Puffer vorgelegt, 1 µg pro Plasmid-DNA hinzugegeben sowie 10 µl Enhancer. Nach sorgfältigem Mischen erfolgte eine Inkubation für 5 min bei RT. Anschließend wurden 8 bis 16 µl Effectene dazugegeben und nach erneutem Mischen für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Wachstumsmedium wurde der Reaktionsansatz gleichmäßig auf den Zellen verteilt, die sich in 1 ml frischem Wachstumsmedium befanden. Nach 1–2 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend bis zum Experiment in Wachstumsmedium inkubiert. Für die Transfektion von siRNA in primäre Neurone auf 6-well Platten wurden 40 µl Enhancer und 35 µl Effectene eingesetzt und für 1 h 50 min mit dem Transfektionsansatz inkubiert.

2.2.3.5 Inhibitoren

Die für die Experimente notwendigen Inhibitoren wurden 3 h nach Transfektion zu den primären Neuronen ins Wachstumsmedium gegeben. In Kontrollkulturen wurde das äquivalente Volumen an Lösungsmittel für die Inhibitoren hinzugefügt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Zusammenfassung aller verwendeten Inhibitoren

Substanz	Inhibition	Finale Konzentration	Lösungsmittel	Hersteller
Tetrodotoxin (TTX)	Na ⁺ -Kanäle	1 µM	0,1 M Acetatpuffer, pH 7,4	Sigma
D(-)-2-Amino-5-phosphopentanoic acid (D-APV)	NMDA Rezeptor	50 µM	DMSO	Sigma
Nifedipin	Ca ²⁺ -Kanäle	10 µM	DMSO	Sigma
U0126	MEK 1 and 2	10 µM	DMSO	Sigma/Calbiochem
LY294002	PI3 Kinase	20 µM	DMSO	Sigma
Akt-Inhibitor I	Akt/PKB	10 µM	DMSO	Calbiochem
Akt-Inhibitor III	Akt/PKB	25 µM	DMSO	Calbiochem
Rapamycin	mTOR	10 nM; 100 nM	DMSO	Calbiochem
Hypericin	PKC	10 µM	0,1 M NaOH	Sigma
Bisindolylmaleimide	PKC	1 µM; 10 µM	DMSO	Calbiochem

2.2.3.6 Verwendete shRNAs und siRNAs

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten shRNAs und siRNAs sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Verwendete shRNAs und siRNAs

	Spezifität	Sequenz Oligonukleotide (nach Brummelkamp et al, 2002)	Vektor
shRNA			
CAL3sh	Ratte und Maus CALEB/NGC	5'-AAGCUGAGGAGGACCAACAA-A-3' (für Ratte) 5'-AAGCUGCGGAGGACCAATAA-A-3' (für Maus)	pCGLH (Chen et al., 2005)
CAL1sh	CALEB/NGC Sequenz aus Huhn, nicht konserviert zwischen Huhn und Ratte bzw. Maus (Schumacher et al., 2001); Kontrolle	5'-AACCCCAACCCAGCCUUGAU-3' (für Huhn)	pCGLH
Die Sequenz für die hairpin ist 5'-GATCTCGXTTCAAGAGAYTTTTTGG AAC-3' und 5'-TCGAGTTCCAAAAAXTCTCTTGAAYCGA-3'. X, RNAi oligos; Y complement sequence of RNAi oligos.			
siRNA			
rCAL3	Ratte und Maus CALEB/NGC	5'-AAGCUGAGGAGGACCAACAA-A-3' (für Ratte) 5'-AAGCUGCGGAGGACCAATAA-A-3' (für Maus)	-
CAL1	CALEB/NGC Sequenz aus Huhn, nicht konserviert zwischen Huhn und Ratte bzw. Maus (Schumacher et al., 2001); Kontrolle	5'-AACCCCAACCCAGCCUUGAU-3' (für Huhn)	-

2.2.3.7 Fixierung und Permeabilisierung der transfizierten Zellen

Nach Transfektion und Kultivierung entsprechend der Fragestellung, wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und bei RT durch 10–30 min Inkubation mit 4°C kaltem 4% (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS fixiert und anschließend mit 1x PBS/ 5% FCS/ 0,02% Thimerosal für 10–30 min bei RT geblockt. Nach 2–10 min Permeabilisierung der Zellen mit 0,2 % TX-100 in Blocklösung bei RT konnte mit der Inkubation der Antikörper begonnen werden.

2.2.3.8 Indirekte Immunfluoreszenz (Epifluoreszenz und konfokale Aufnahme)

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie kann die Lokalisation von zellulären Bestandteilen untersucht werden. Das nachzuweisende Protein, das durch die Verwendung eines

spezifischen Primärantikörpers und eines fluorochrom-markierten Spezies-spezifischen Sekundärantikörpers mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird, wird mit kurzwelligem Licht angeregt und emittiert längerwelliges Fluoreszenzlicht (Immunfluoreszenz). Dieses Licht kann beobachtet und aufgezeichnet werden. Die Benutzung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Alexa Fluor 488 (grüne Emission) und Cy3 (rote Emission) erlaubt eine Mehrfachfärbung. Damit können in konfokalen Aufnahmen mit dem LSM (Laser Scanning Microscope) auch Kolokalisationen von Proteinen beobachtet werden. Für diese Kolokalisationsstudien wurden Doppelfärbungen durchgeführt, indem Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet wurden.

Die Zellen wurden für mindestens 30 min bei RT mit PBS/ 5% FCS blockiert, mit PBS/ 5% FCS + 0,2% TX-100 für 10 min permeabilisiert und mit den entsprechenden 1. und 2. Primärantikörpern für 2 h bei RT oder üN bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS + 0,1% TX-100 erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Alexa Fluor 488- oder Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (beide 1:1000; Molecular Probes und Dianova) für 1 h. Die Zellen wurden erneut mehrmals gewaschen und in Glycerolgelatine (Sigma-Aldrich) eingebettet. Alle Antikörper wurden in PBS/ 5% FCS gelöst.

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus, BX 50), welches mit einer Cool SNAP ES Digitalkamera (Roper Scientific) ausgestattet war, untersucht. Es wurden die Filter U-MWIG, U-MNIBA und U-MWU2 (Olympus) benutzt. Für Vergrößerungsaufnahmen wurde das Öl-Immersionsobjektiv (PLAN APO 60X, 1,4 NA) benutzt. Alle Bilder wurden mit einem Leica TCS SL laser scanning confocal Mikroskop mit 40X HCX PL APO, 1,25 NA; 63X HCX PL APO, 1,4 NA oder 100X PLAN APO, 1,4 NA Öl-Immersionsobjektiven aufgenommen. Für die Analyse dendritischer Bäume wurden „z-stacks“ mit einer „step-size“ von 0,5 µm, 1024x1024 Auflösung und „line average“ 4 benutzt. Alle Messungen zur Analyse der Zellmorphologie wurden mit der Metamorph Image Analysis Software (Universal Imaging Corporation, Ypsilanti, MI, USA) durchgeführt.

Die quantitative Auswertung der Intensität von Immunfluoreszenzsignalen in Zellkörpern EGFP-exprimierender Neurone in „knockdown“-Experimenten mit siRNA sowie von Phospho-Akt-Färbungen in Dendriten hippocampaler Neurone erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 50), an das eine digitale Kamera (Photometric Cool Snap ES) angeschlossen war. Alle Aufnahmen für Kontrollen und Experimentalansätze innerhalb eines Experimentes wurden mit den gleichen Aufnahmeparametern (z.B. Kontrast, Helligkeit, Belichtung, Vergrößerung) und in einer Session gemacht. Diese Parameter wurden so gewählt, dass schwache Fluoreszenzen noch sichtbar waren, starke Fluoreszenzen

jedoch nicht überstrahlten. Die Analyse erfolgte nun über einen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten. Diese Intensitäten wurden mit dem Bildverarbeitungsprogramm Metamorph ermittelt. Dazu wird die zu messende Fläche eingegrenzt (= Region Of Interest (ROI)), die Gesamtfluoreszenz gemessen und die Fluoreszenz pro Flächeneinheit bestimmt. Die Daten wurden normalisiert. Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte unter Anwendung des Student's t-Test. Alle Experimente wurden verblindet ausgewertet.

2.2.4 Statistische Verfahren

Für die statistische Auswertung aller in dieser Arbeit vorliegenden Experimente wurden zunächst die Mittelwerte aus den jeweiligen Daten gebildet und anschließend der Standardfehler der Mittelwerte berechnet. Der Standardfehler errechnet sich aus der Standardabweichung geteilt durch die Quadratwurzel der Fallzahl (n) der Stichprobe.

Mit Hilfe des Student's t-Test für unverbundene Stichproben sollte herausgefunden werden, ob sich die durchschnittlichen Werte eines Versuches signifikant unterscheiden. Die Signifikanz eines Ergebnisses wird als p-Wert bezeichnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt, was einer 5%-igen Irrtumswahrscheinlichkeit entspricht. Der berechnete p-Wert wird mit dem festgelegten Signifikanzniveau verglichen. Die Prüfung dieser Signifikanz erfolgte unter Verwendung der Software Excel. War der errechnete Signifikanzwert kleiner als 0,05, so bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben. Ergab sich ein größerer Wert als 0,05, so bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stichproben.

3 Ergebnisse

3.1 Zelluläre Analysen

3.1.1 CALEB/NGC und seine Funktion in der Entwicklung der Dendritenkomplexität von hippocampalen Neuronen

Bisher konnte gezeigt werden, dass sich das Vorkommen von CALEB/NGC auf das sich entwickelnde und adulte Nervensystem beschränkt und das Protein insbesondere in axon- und synapsenreichen Regionen im sich entwickelnden Nervensystem exprimiert wird. Darüber hinaus wird die Expression während der Dendritogenese hochreguliert (Schumacher et al., 1997; Inatani et al., 2000; Aono et al., 2000). Dies legt eine Beteiligung von CALEB/NGC an der Dendritogenese und/oder Synaptogenese nahe. In Zellkulturstudien wurde bereits gezeigt, dass CALEB/NGC, ein Typ I Transmembranprotein, am Neuritenwachstum beteiligt ist (Schumacher et al., 1997; Watanabe et al., 1995; Yasuda et al., 1998). Daten aus unserer Arbeitsgruppe zufolge wird CALEB/NGC in hippocampalem Gewebe exprimiert. Es wurde eine starke Expression des Proteins in faserreichen Arealen des adulten sowie postnatalen (P10) Gyrus dentatus sowie der CA1 und CA3 (Cornu Ammonis) Regionen beobachtet (Brandt et al., 2007). So ist CALEB/NGC in Regionen lokalisiert, wo basale oder apikale Dendriten entstehen. Die der Dendritenentwicklung zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind sehr komplex und bis jetzt ist die Frage, wie Größe und Komplexität der neuronalen Dendritenbäume bestimmt werden, unklar. Die Identifikation von Molekülen, welche in die Dendritenmorphogenese involviert sind, ist ein wichtiger Schritt, um das Verständnis der Dendritenentwicklung zu verbessern. CALEB/NGC wird sehr stark im sich entwickelnden Nervensystem zu der Zeit exprimiert, in der Dendritenbäume und neuronale Verschaltungen aktiv ausgebildet werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass CALEB/NGC eine Rolle in diesen Prozessen spielen könnte. Als zelluläres Modellsystem für zielgerichtete funktionelle Untersuchungen wurden primäre hippocampale Neurone aus der Ratte verwendet (Brewer et al., 1993; Banker und Goslin, 1988; Dotti et al., 1988).

Um zu untersuchen, ob CALEB/NGC von primären hippocampalen Neuronen exprimiert wird, wurden Neurone nach neun Tagen *in vitro* (DIV9) indirekt mit zwei verschiedenen anti-CALEB/NGC-Antikörpern gefärbt. Zum einen wurde hier der polyklonale anti-MBP-mCALextra Antikörper eingesetzt, der gegen die extrazelluläre Region von CALEB/NGC-Fusionsprotein (Spezies Maus) gerichtet war, zum anderen der gegen den intrazellulären Teil

von CALEB/NGC-Fusionsprotein (Spezies Mensch) gerichtete polyklonale anti-GST-hCALb-cyt Antikörper. Zudem wurde als Markerprotein das Dendriten-spezifische Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) mit einem monoklonalen anti-MAP2 Antikörper nachgewiesen.

Die Ergebnisse zeigen, dass CALEB/NGC von primären hippocampalen Neuronen exprimiert wird. Sowohl mit dem anti-MBP-mCALextra (Abbildung 5A) als auch mit dem anti-GST-hCALb-cyt Antikörper (Abbildung 5D) konnte nachgewiesen werden, dass CALEB/NGC nicht nur auf Axonen und Zellkörpern vorhanden ist, sondern insbesondere stark auf Dendriten exprimiert wird, wie die Überlagerung der MAP2 Färbung mit der CALEB/NGC Färbung deutlich macht (Abbildung 5C). Diese Befunde deuten darauf hin, dass CALEB/NGC im Zeitfenster der Dendritogenese auf hippocampalen Neuronen exprimiert wird, und legen daher eine Beteiligung dieses Proteins an der Dendritendifferenzierung nahe.

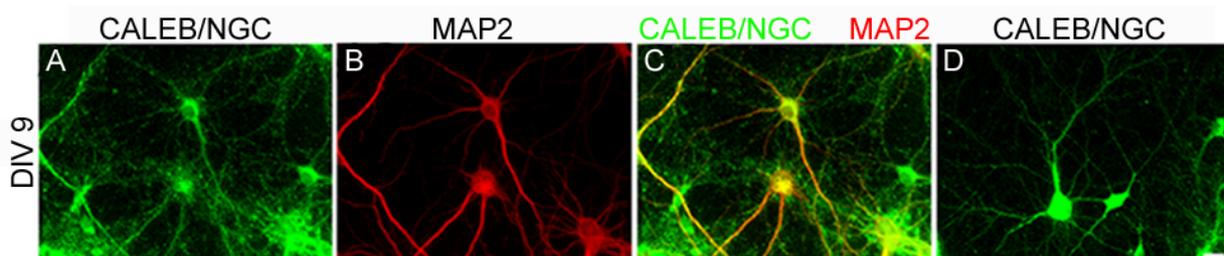


Abbildung 5: CALEB/NGC wird von hippocampalen Neuronen exprimiert.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Hippocampale Neurone (DIV9) in Kultur wurden mit dem anti-MBP-mCALextra Antikörper sowie dem anti-hCALb-cyt Antikörper gefärbt. Sowohl der anti-MBP-mCALextra Antikörper (A) als auch der anti-hCALb-cyt Antikörper (D) erkennen CALEB/NGC an DIV9. (A) Anti-MBP-mCALextra-Färbung (B) MAP2-Färbung (C) Übereinanderlagerung anti-MBP-mCALextra- und MAP2-Färbungen (D) Anti-GST-hCALb-cyt-Färbung. In Neuronen ist CALEB/NGC auf Zellkörpern, Axonen und stark auf Dendriten lokalisiert; Balken: 15 µm.

3.1.2 Die Expression von CALEB/NGC in Neuronen erhöht die Dendritenkomplexität

Hippocampale Neurone in Kultur haben sich als gutes Modellsystem für die Untersuchung neuronaler Differenzierung erwiesen (Dotti et al., 1988). Dissoziierte embryonale Neurone in Kultur bilden bereits kurz nach der Anheftung auf einem geeigneten Substrat Lamellipodien rund um den Zellkörper aus (Stadium 1), die nach 12-24 h zu vier bis fünf kurzen Fortsätzen kondensieren (Stadium 2). Aus diesem Pool von morphologisch nicht zu unterscheidenden Fortsätzen wächst einer rapide aus und entwickelt sich zum Axon (Stadium 3). Die Dendriten

bilden sich aus den verbleibenden Fortsätzen wenige Tage später (Stadium 4). Nach Kultivierung von sieben Tagen (DIV7) haben hippocampale Neurone *in vitro* somit eine polarisierte charakteristische Gestalt mit einem einzelnen Axon sowie mehreren Dendriten etabliert (Dotti et al., 1988; Banker und Cowan; 1977). Signifikantes Dendritenwachstum kann ab dem vierten Tag in Kultur, 2-3 Tage nach dem axonalen Auswachsen, beobachtet werden. Das fünfte von Dotti et al., beschriebene Stadium bezeichnet die kontinuierliche Reifung vom Axon als auch von den Dendriten ab dem siebten Tag *in vitro* (DIV7), es schließt sowohl Dendritogenese, Synaptogenese und die Bildung von dendritischen Dornen („Spines“) ein (zur Übersicht siehe Craig und Banker, 1994). Für die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen waren daher kultivierte hippocampale Neurone ab DIV7, dem Zeitfenster der Dendritogenese, von Interesse.

Da CALEB/NGC sehr stark auf Dendriten lokalisiert ist, wurden folgende Experimentalansätze verfolgt, um herauszufinden, welche Funktion CALEB/NGC in der Dendritogenese ausübt:

1. „gain of function“-Analysen: Überexpression von CALEB/NGC in hippocampalen Neuronen.
2. „loss of function“-Analysen: „knockdown“ von endogen exprimiertem CALEB/NGC in hippocampalen Neuronen.
3. Überexpression eines mutmaßlich dominant-negativ wirkenden, von CALEB/NGC abgeleiteten Konstrukts in hippocampalen Neuronen

Die statistische Auswertung aller in dieser Arbeit vorliegenden Experimente erfolgte mit dem Student's t-Test.

Es gibt zwei verschiedene Isoformen von murinem CALEB/NGC, die sich in ihrem zytoplasmatischen Bereich durch einen Einschub von 27 Aminosäuren bei der längeren Isoform mCALEBb gegenüber der kürzeren Isoform mCALEBa unterscheiden. Nach Transfektion von Plasmiden, die entweder für mCALEBb oder für EGFP kodieren (im Folgenden wird der Einfachheit halber der Ausdruck mCALEBb bzw. EGFP benutzt) in DIV7 Neurone wurden die Zellen nach weiterer zweitägiger Kultivierung an DIV7+2 mit Paraformaldehyd fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden dann mit Antikörpern gegen das FLAG-„tag“ oder das myc-„tag“ von CALEB/NGC bzw. gegen EGFP gefärbt.

Pro Bedingung wurden bei der fluoreszenzmikroskopischen Durchmusterung der Deckplättchen alle vitalen Zellen analysiert, deren Dendritenbäume mehr als acht dendritische Verzweigungen aufwiesen. Als weiteres Parameter wurde nur die Anzahl der dendritischen

Endverzweigungen mit einer Länge von über 8 μm pro Neuron bestimmt, die in der Literatur als „total number of dendritic end tips“ (TNET; Yu und Malenka, 2003) beschrieben wird.

Die TNET Messung wurde für alle morphologischen Auswertungen zur Dendritenkomplexität in der vorliegenden Arbeit angewendet und die Zellen wurden blind gemessen.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab, dass die dendritischen Bäume mCALEBb-exprimierender Neurone komplexer waren, als die der EGFP-exprimierenden Zellen (Abbildung 6).

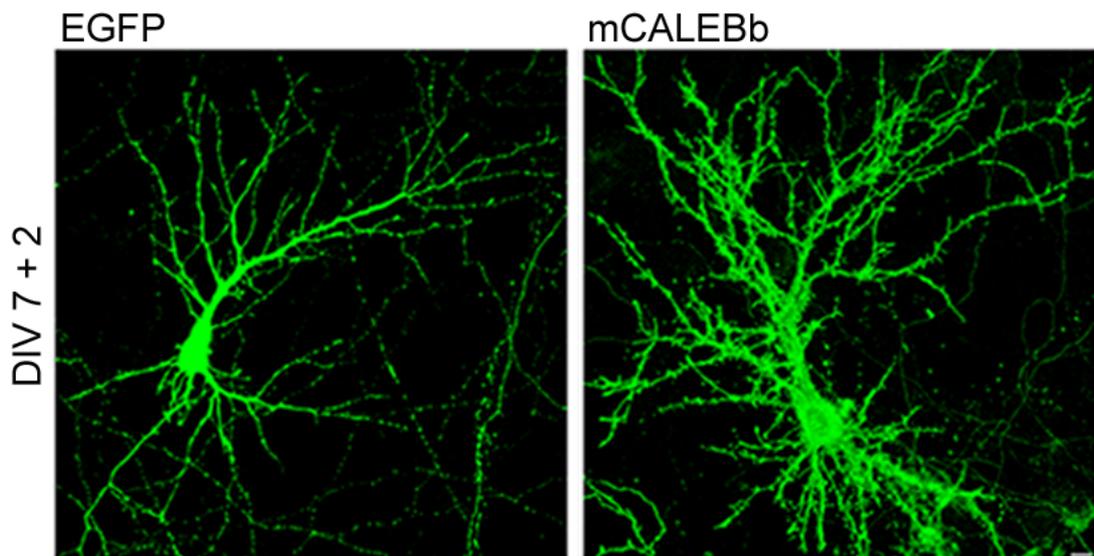


Abbildung 6: Die Überexpression von CALEB/NGC erhöht Dendritenkomplexität.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung. Hippocampale Neurone in Kultur, transfiziert an DIV7 mit EGFP- oder mCALEBb-Expressionsplasmiden, gefärbt an DIV7+2 mit polyklonalen anti-GFP (EGFP) bzw. monoklonalen anti-FLAG Antikörpern (mCALEBb). Balken = 15 μm .

Im Vergleich zeigten die mCALEBb-exprimierenden Neurone komplexere Dendritenbäume, was durch die Anzahl dendritischer Endverzweigungen von mehr als 8 μm Länge gemessen wurde (TNET: $52,7 \pm 1,5$ für mCALEBb und $40,1 \pm 1,2$ für EGFP) (Abbildung 7). In Klammern angegeben sind die Durchschnittswerte pro Bedingung \pm Standardfehler.

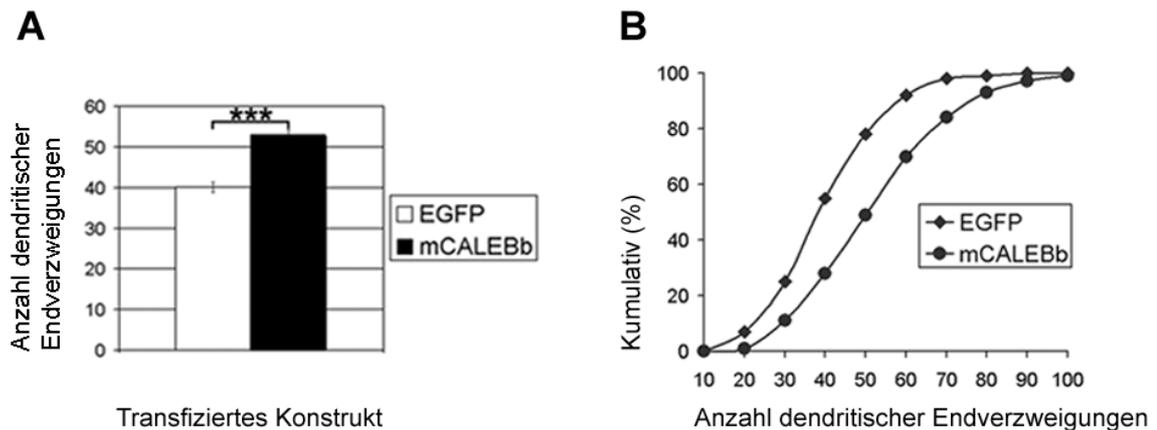


Abbildung 7: Untersuchung der CALEB/NGC-vermittelten Dendritenkomplexität.

(A) Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen von Neuronen, die mit EGFP- oder mCALEBb-Expressionsplasmiden transfiziert und an DIV7+2 mit polyklonalen anti-GFP bzw. monoklonalen anti-FLAG Antikörpern gefärbt wurden; $n = 150$, $***p < 0,0001$. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

(B) Summenhäufigkeit von Neuronen, die wie oben beschrieben transfiziert wurden.

Es ist grundsätzlich nicht selbstverständlich, dass verschiedene Proteine (z.B. EGFP und mCALEBb) in gleicher Weise und Effizienz in alle Zellausläufer (z.B. Dendritenendverzweigungen) transportiert werden. Wird die quantitative Auswertung der Anzahl der Dendritenverzweigungen nach Färbung dieser verschiedenen Proteine durchgeführt, könnte ein systematischer Messfehler erzeugt werden. Um diesen Fehler auszuschließen, wurde mCALEBb im p3xFLAG-myc-CMVTM-25 Expressionsvektor mit EGFP koexprimiert. Die Anzahl dendritischer Endverzweigungen von mCALEBb- und EGFP- koexprimierenden Zellen wurde dann mit Neuronen verglichen, die nur EGFP alleine exprimieren, nachdem alle Neurone mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper visualisiert worden waren. Hier zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung in der Anzahl der dendritischen Endverzweigungen bei den mCALEBb- und EGFP-koexprimierenden Zellen verglichen mit den EGFP-exprimierenden Zellen (TNDET: $52,4 \pm 2,2$ für mCALEBb und $44,0 \pm 2,1$ für EGFP). Dies ist in Abbildung 19 bzw. 20B dargestellt.

Eine häufig gebräuchliche Methode, um das dendritische Verzweigungsmuster von Neuronen zu analysieren, ist die Sholl-Analyse (Sholl, 1953). Bei dieser Methode werden zuerst konzentrische Kreise mit zunehmend größer werdendem Radius um die Somata der Neurone gezogen. Dann wird die Anzahl der Schnittpunkte der Dendritenbäume mit diesen Kreisen in Abhängigkeit vom Radius der konzentrischen Kreise bestimmt.

Diese detaillierte Sholl-Analyse bestätigte, dass sich das Dendritenmuster durch die Expression von mCALEBb im Vergleich zu EGFP-transfizierten Kontrollzellen verändert hat. Auch hier ist ein signifikanter Anstieg der dendritischen Endverzweigungen pro Neuron bei den mCALEBb-Zellen anhand der höheren Anzahl an Schnittpunkten zu erkennen (Abbildung 8). Im Unterschied zum Auszählen der Endverzweigungen belegt die Sholl-Analyse eindeutig, dass die durch CALEB/NGC hervorgerufene Komplexität der Dendritenbäume durch eine größere Zahl an Dendritenverzweigungen und nicht durch eine erhöhte Anzahl vom Soma aussprossender Primärdendriten verursacht wird.

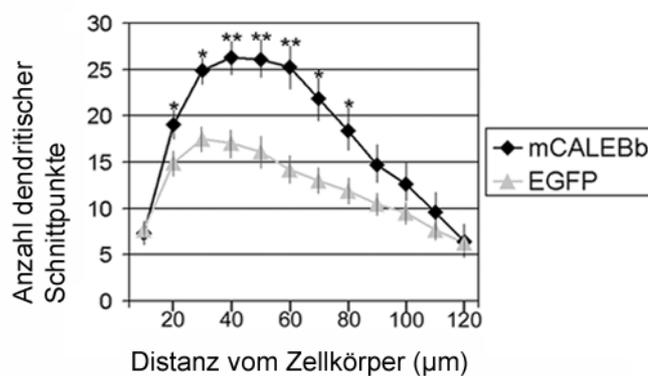


Abbildung 8: Die Sholl-Analyse bestätigt, dass CALEB/NGC die Dendritenbaumkomplexität von Neuronen stimuliert. Primäre Neurone wurden an DIV7 mit EGFP- oder mCALEBb-Expressionsplasmiden transfiziert und an DIV7+2 mit polyklonalen anti-GFP bzw. monoklonalen anti-FLAG Antikörpern gefärbt. Statistische Auswertung am Fluoreszenzbild, n = 15, **p < 0,001, *p < 0,01

Eine detailliertere Beschreibung dieses dendritischen Phänotyps erforderte die Untersuchung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen apikaler und basaler Dendriten sowie der Anzahl von Dendriten höherer Ordnung im selben experimentellen Ansatz wie oben beschrieben. Diese Analyse wurde auf solche Neurone mit eindeutig unterscheidbaren basalen und apikalen Dendriten begrenzt. Die Expression von mCALEBb führt zu einer Erhöhung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen basaler Dendriten. Dieser Anstieg war allerdings statistisch nicht signifikant. Es wurde jedoch im Falle der mCALEBb-Expression ein signifikanter Anstieg in der Anzahl dendritischer Endverzweigungen apikaler Dendriten im Vergleich zu EGFP-Kontrollzellen ermittelt. Darüber hinaus erhöhte die mCALEBb-Expression signifikant die Anzahl von Dendriten höherer Ordnung (Abbildung 9).

Diese Ergebnisse weisen eindeutig auf eine Beteiligung von CALEB/NGC an der Dendritenverzweigung hin. Die Erhöhung des CALEB/NGC-Spiegels in hippocampalen Neuronen ist ausreichend, um Dendritenbaumkomplexität in diesen Zellen zu steigern.

CALEB/NGC führt zu komplexeren Dendritenbäumen durch Erhöhung der Dendritenverzweigungen.

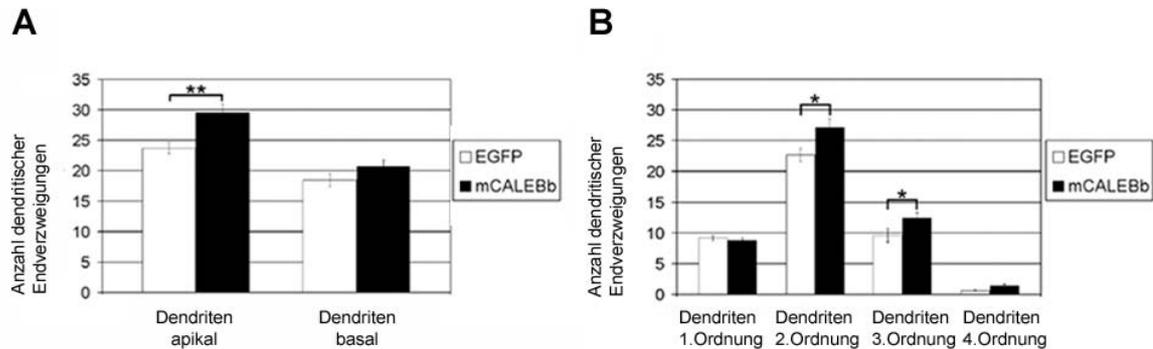


Abbildung 9: CALEB/NGC erhöht signifikant die Anzahl apikaler Dendriten, nicht jedoch basaler Dendriten, sowie die Anzahl von Dendriten höherer Ordnung. Primäre Neurone wurden an DIV7 mit EGFP- oder mCALEBb-Expressionsplasmiden transfiziert und an DIV7+2 mit polyklonalen anti-GFP bzw. monoklonalen anti-FLAG Antikörpern gefärbt. Statistische Auswertung am Fluoreszenzbild. (A) mCALEBb Expression erhöht die Anzahl apikaler Dendriten sowie (B) die Verzweigungen von Dendriten höherer Ordnung. $n = 32$, $**p < 0,005$, $* p < 0,05$. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler.

3.1.3 Herabregulierung („knockdown“) der endogenen Expression von CALEB/NGC mittels RNA-Interferenz

Nachdem gezeigt wurde, dass die Überexpression von CALEB/NGC die Anzahl dendritischer Endverzweigungen in DIV7+2 hippocampalen Neuronen erhöht, stellte sich die Frage, ob endogenes CALEB/NGC für die Entwicklung von Dendritenbäumen erforderlich ist.

Mittels der RNA-Interferenz (RNAi)-Technologie (Elbashir et al., 2001; Caplen et al., 2001) wurde die Auswirkung eines „knockdowns“ von endogen exprimiertem CALEB/NGC auf die Dendritenmorphogenese in hippocampalen Neuronen untersucht. Diese RNAi-Methode bietet die Möglichkeit, in kurzer Zeit die Expression eines Proteins zu unterdrücken und so die Funktion einzelner Gene zu untersuchen.

Von außen der Zelle zugeführte, synthetisch hergestellte künstliche Moleküle, die Sequenz-spezifischen „small interfering“ RNAs (siRNAs), führen zu einer gezielten Degradation der korrespondierenden Ziel-mRNA und damit zum Fehlen des entsprechenden Proteins. Vermittler dieser Sequenz-spezifischen mRNA Degradierung sind kurze Doppelstrang-RNA Moleküle (≈ 20 -25 Nukleotide lang), die die Translation einer bestimmten mRNA inhibieren.

Ein Nachteil der Methode der RNA-Interferenz mit siRNA-Molekülen kann jedoch sein, dass die durch Transfektion von siRNAs provozierten „knockdown“-Effekte transient sind aufgrund des Abbaus der siRNA-Moleküle in den Zellen. Durch die Verwendung von „short hairpin“-RNAs (shRNAs) kann eine stabile Suppression der Genexpression in kultivierten Säugerzellen durch eine kontinuierliche Expression erzielt werden, da hierbei die siRNAs durch die Zellen selber aus der vom geeigneten Expressionsvektor kodierten shRNA hergestellt werden (z.B. pCGLH Vektor, Chen et al., 2005; Paddison et al., 2002).

Es wurde sowohl mit siRNAs als auch mit shRNA-Konstrukten gearbeitet. Für die Transfektion der Experimente wurde das Effectene-Transfektionsreagenz ausgewählt, da es eine sehr niedrige Toxizität für die primären Neurone zeigte, bei vergleichsweise guter Transfektionseffizienz. Die verwendeten shRNAs und siRNAs sind im Folgenden dargestellt (siehe Tabelle 10). Als Kontrolle wurden Ansätze mit siRNA bzw. shRNA gewählt, deren Nukleotidabfolge einer Teilsequenz von CALEB/NGC aus Huhn abgeleitet war, die zwischen Huhn und Ratte bzw. Maus nicht konserviert ist. Zusätzlich wurde bei den Experimenten mit shRNA auch der Vektor pCGLH (Leervektor für die shRNA-Klonierungen) verwendet.

Tabelle 10: Zusammenfassung der verwendeten shRNAs bzw. siRNAs. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Material und Methoden unter Kapitel 2.1.5 aufgeführt.

	Spezifität
shRNA	
CAL3sh	CALEB/NGC aus Ratte bzw. Maus
CAL1sh	Huhn; Kontrolle
pCGLH	Leervektor für shRNA-Klonierungen
siRNA	
rCAL3	CALEB/NGC aus Ratte bzw. Maus
CAL1	Huhn; Kontrolle

Zunächst wurde überprüft, ob die Expression von endogenem CALEB/NGC durch die ausgewählten siRNAs/shRNAs herunterreguliert wird. Dazu wurden die im Folgenden aufgeführten Experimentalansätze verfolgt:

1. „knockdown“ von CALEB/NGC in heterologen Zellen; Western-Blot-Analyse.
2. „knockdown“ von CALEB/NGC in hippocampalen Neuronen; Western-Blot-Analyse.
3. „knockdown“ von CALEB/NGC in hippocampalen Neuronen; Analyse mit quantitativer Immunfluoreszenz.

Um zu kontrollieren, ob ein CALEB/NGC-„knockdown“ in einer heterologen humanen Zelllinie induziert werden kann, wurden HEK293-Zellen verwendet. Die HEK293-Zellen wurden zunächst mit mCALEBb und CAL3sh bzw. mCALEBb und CAL1sh als Kontrolle kotransfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden Zellextrakte hergestellt und die Gesamtproteinkonzentration mit Hilfe des Micro BCA Protein Assay Kits (Pierce) bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Nachweis des CALEB/NGC Proteins erfolgte mit dem monoklonalen anti-FLAG Antikörper gegen das am N-Terminus 3xFLAG-markierte mCALEBb. Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmengen des Western-Blots wurde β -Tubulin verwendet und mit einem polyklonalen anti- β -Tubulin Antikörper gefärbt. Der Vergleich des Tubulingehaltes in den Zellextrakten dokumentiert, dass gleiche Mengen Gesamtprotein aufgetragen wurden. Die Kotransfektion von mCALEBb und CAL3sh führte zu einer deutlichen Reduktion des Proteingehaltes von CALEB/NGC, verglichen mit dem Proteingehalt der Kontrollzellen, welche mit mCALEBb und CAL1sh transfiziert wurden (siehe Abbildung 10A). Somit konnte gezeigt werden, dass ein „knockdown“ des exprimierten mCALEBb Proteins in heterologen Zellen mittels shRNAs induziert werden kann.

Im Anschluss hieran wurde überprüft, ob die Expression von endogenem CALEB/NGC auch in Neuronen durch die Verwendung der RNAi-Technik herunterreguliert werden kann. Dazu wurden primäre hippocampale Neurone zunächst an DIV10 mit dem siRNA Oligonukleotid rCAL3 transfiziert. Dieses Stadium DIV10 für die Transfektion wurde so gewählt, da hier im Vergleich die beste Transfektionseffizienz bei gleichzeitig niedrigster Toxizität für die Neurone erreicht werden konnte. Wie eigene Untersuchungen gezeigt haben, ist der morphologische Effekt auf Dendritenkomplexität unabhängig von Alter zwischen DIV7 und DIV14 gleich. Dieses erlaubte es mir, den Transfektionszeitpunkt von einigen Konstrukten zu Gunsten einer besseren Verträglichkeit in einem späteren Stadium (z.B. DIV10 oder DIV12) zu wählen, was allerdings zu Lasten der Transfektionseffizienz ging.

Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden Zellextrakte hergestellt und die Gesamtproteinkonzentration mit Hilfe des Micro BCA Protein Assay Kits (Pierce) bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Nachweis des CALEB/NGC Proteins erfolgte mit einem spezifischen monoklonalen anti-CALEB/NGC Antikörper (Mab anti NGC; siehe Material und Methoden, Kapitel 2.1.3, Tabelle 1). Zur Standardisierung der

aufgetragenen Proteinmengen des Immunblots wurde ebenfalls β -Tubulin verwendet und mit einem polyklonalen anti- β -Tubulin Antikörper gefärbt.

Als Kontrolle wurden die Zellen mit der siRNA CAL1 transfiziert. Entsprechend der Erwartungen war der endogene CALEB/NGC-Spiegel durch die Transfektion mit der spezifischen siRNA rCAL3 im Vergleich zur Kontrolle mit CAL1 reduziert.

Wie auf dem Immunblot in Abbildung 10B zu erkennen ist, wurde die CALEB/NGC-Doppelbande in Höhe von ca. 120 kDa herunterreguliert. Zusätzlich kann eine Herunterregulation der Expression der Proteoglykan-Variante von CALEB/NGC in Höhe von ca. 150 kDa beobachtet werden.

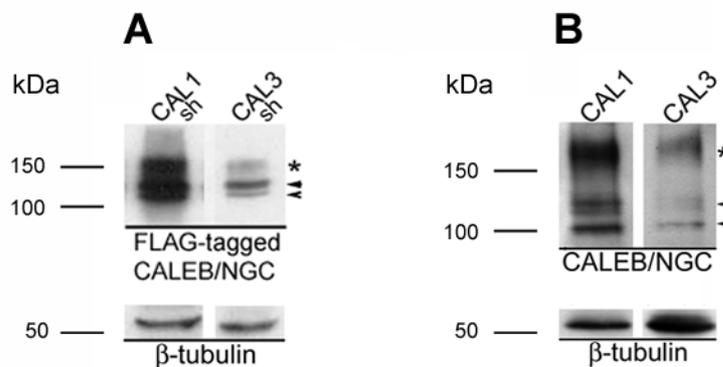


Abbildung 10: Darstellung der Herunterregulation von CALEB/NGC in HEK293-Zellen als auch in hippocampalen Neuronen. (A) HEK293-Zellen wurden mit der spezifischen shRNA CAL3 oder der Kontrolle CAL1 und mCALEBb kotransfiziert. Nach Herstellung von Zellextrakten wurden diese in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Nachweis des exprimierten CALEB/NGCs erfolgte mit einem monoklonalen anti-FLAG Antikörper. (B) Neurone wurden mit der spezifischen siRNA rCAL3 oder der Kontrolle CAL1 transfiziert, und analog wie oben beschrieben behandelt. Der Nachweis des endogenen CALEB/NGC erfolgte mit einem monoklonalen anti-CALEB/NGC Antikörper (Mab anti NGC). Mit CALEB/NGC-spezifischer siRNA wurde die endogene Proteinexpression von CALEB/NGC supprimiert.

Die Quantifizierung des CALEB/NGC-Gehaltes erfolgte durch die Auswertung von drei unabhängigen Immunblots. Die Röntgenfilme bzw. Membranen wurden eingescannt und die Intensität der Banden mit dem Computerprogramm Alpha Ease FC Software (Alpha Imager; Alpha Innotech Corporation; Version 4 1.0; San Leandro, CA 94577, USA) analysiert (Relativer Proteingehalt in willkürlichen Einheiten (AU = arbitrary units): $40 \pm 3,4$ für rCAL3, und $61 \pm 3,4$ für CAL1).

Die quantitative Analyse des CALEB/NGC Proteingehaltes belegt eindeutig den „knockdown“ von CALEB/NGC durch die verwendete CALEB/NGC-spezifische siRNA rCAL3. Neurone, die mit dem siRNA Oligonukleotid rCAL3 transfiziert wurden, weisen im Vergleich zu Neuronen, die mit dem Kontrolloligonukleotid CAL1 und EGFP kotransfiziert wurden, eine reduzierte Expression des CALEB/NGC Proteins auf (Abbildung 11).

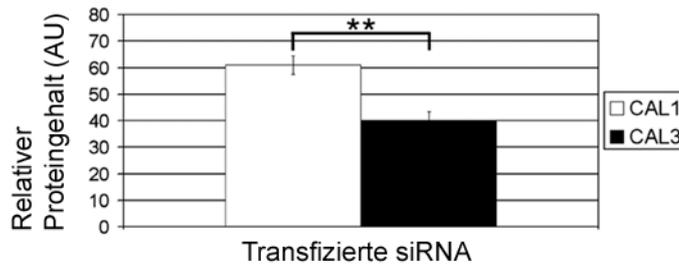


Abbildung 11: Die densitometrische Auswertung von Immunblots bestätigt den „knockdown“ des endogenen CALEB/NGC in hippocampalen Neuronen. Quantifizierung des CALEB/NGC-Gehaltes nach RNAi-Behandlung. Im Diagramm ist der relative Proteingehalt an CALEB/NGC nach RNAi-Behandlung dargestellt. Die Immunblots aus drei unabhängigen Versuchen wurden eingescannt und die Intensität der Banden mit dem Programm Alpha Ease FC vermessen. In der Grafik sind die Mittelwerte dreier Versuche gezeigt, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar, $n = 3$, $**p < 0,01$.

Als weiterer experimenteller Ansatz zur Bestätigung des „knockdowns“ von endogen exprimiertem CALEB/NGC wurde die Methode der quantitativen Fluoreszenzmessung gewählt. Hierbei wurden Neurone an DIV10 mit rCAL3 bzw. CAL1 siRNA und EGFP kotransfiziert. Zwei Tage später erfolgte nach Färbung der Neurone mit affinitätsgereinigten polyklonalen anti-CALEB/NGC (anti-MBP-mCALextra) Antikörpern sowie polyklonalen anti-GFP Antikörpern die quantitative Analyse des CALEB/NGC-spezifischen Immunfluoreszenzsignals von Zellkörpern mit Hilfe des Computerprogramms Metamorph (Metamorph Image Analysis Software). Die quantitative Analyse der Fluoreszenzintensitäten bestätigt den „knockdown“ der CALEB/NGC-Expression durch rCAL3 aber nicht CAL1 ($100 \pm 4,4$ für EGFP; $86 \pm 4,3$ für EGFP und rCAL3 sowie $105 \pm 4,6$ für EGFP und CAL1) (Abbildung 12). Die Intensität der Fluoreszenz ist geringer, was mit der reduzierten Expression von CALEB/NGC in diesen Zellen zu erklären ist.

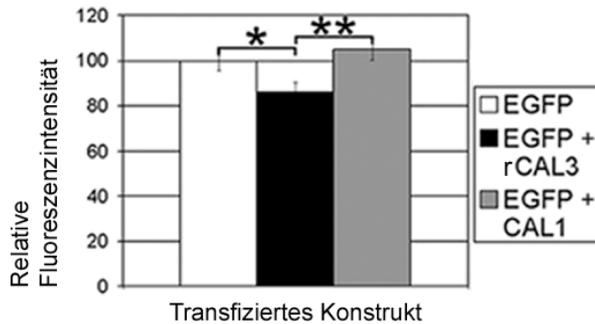


Abbildung 12: Die Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensitäten hippocampaler Neurone nach CALEB/NGC-Färbung belegt den „knockdown“ von CALEB/NGC. Die Zellen wurden an DIV10 mit den oben beschriebenen siRNAs transfiziert und zwei Tage später nach Färbung von CALEB/NGC mit einem affinitätsgereinigten polyklonalen anti-CALEB/NGC Antikörper, der seine Epitope im extrazellulären Bereich von CALEB/NGC erkennt, analysiert. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit dem Programm Metamorph analysiert, $n = 30$, $*p < 0,05$ und $**p < 0,01$. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

3.1.4 Der „knockdown“ von endogenem CALEB/NGC reduziert Dendritenkomplexität

Nachdem die Effizienz der „knockdown“ Methode überprüft worden war, wurde nun die Auswirkung des „knockdowns“ von endogenem CALEB/NGC auf die Differenzierung von Dendritenbäumen untersucht.

Hierzu wurden primäre hippocampale Neurone an DIV9 transfiziert, nach drei Tagen fixiert, permeabilisiert und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt.

Wenn die siRNAs rCAL3 und CAL1 transfiziert wurden, erfolgte eine Kotransfektion mit EGFP, um die transfizierten Neurone zu erkennen und deren Morphologie auswerten zu können. Im Gegensatz dazu war dieses bei den shRNAs CAL3sh und CAL1sh nicht erforderlich, da sie in den pCGLH Vektor kloniert worden waren und dieser auch die für EGFP kodierende Sequenz hinter einer IRES („internal ribosomal entry site“)-Stelle enthält.

Um die Morphologie der Neurone sichtbar zu machen und auswerten zu können, wurde ein polyklonaler anti-GFP Antikörper eingesetzt. Mit Hilfe des monoklonalen anti-CALEB/NGC (anti-CSPG5 5C11) Antikörpers, welcher sein Epitop im dem zytoplasmatischen Bereich von CALEB/NGC erkennt, wurde die Expression des endogenen CALEB/NGC gezeigt. Die Analyse erfolgte über das Zählen der Anzahl dendritischer Endverzweigungen.

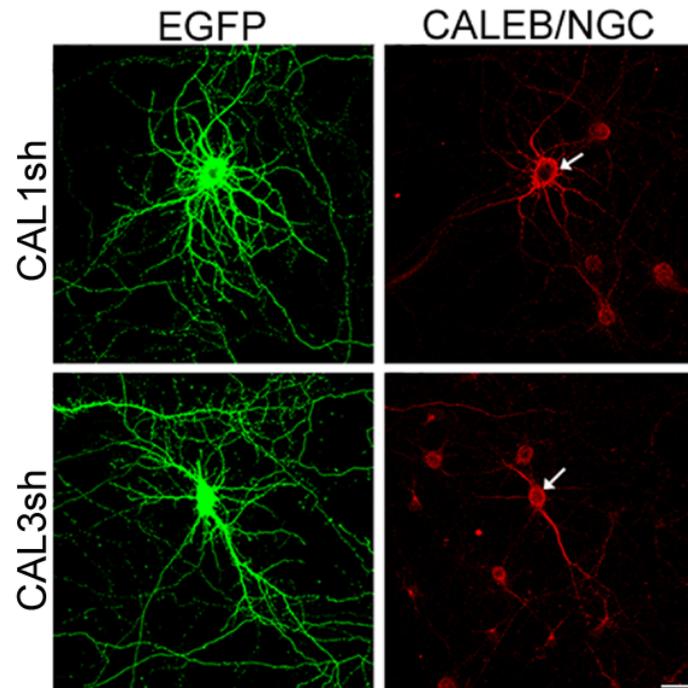


Abbildung 13: „Knockdown“ von endogenem CALEB/NGC reduziert die Dendritenkomplexität. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung. Hippocampale Neurone in Kultur wurden mit den shRNA Konstrukten CAL3sh und CAL1sh transfiziert und drei Tage später nach Färbung mit einem polyklonalen anti-GFP gefärbt. Die endogene CALEB/NGC Expression wurde mit einem monoklonalen anti-CALEB/NGC (anti-CSPG5 5C11) Antikörper nachgewiesen. Die Pfeile markieren die transfizierten Neurone, (grün) GFP-Färbung, (rot) CALEB/NGC-Färbung. Balken = 20 µm.

Es war eine deutliche Korrelation zwischen dem CALEB/NGC-Gehalt in den Neuronen und der Dendritenkomplexität in CAL3sh „knockdown“ Neuronen zu erkennen. Neurone mit verminderter Menge an endogen exprimiertem CALEB/NGC wiesen eine signifikant reduzierte Anzahl an dendritischen Endverzweigungen über 8 µm auf, wenn sie mit Kontrollzellen verglichen wurden, die entweder mit dem Leervektor pCGLH oder mit der Kontroll-shRNA CAL1sh transfiziert wurden (TNET: $29,7 \pm 1,4$ für pCGLH; $19,4 \pm 0,9$ für CAL3sh und $28,7 \pm 1,5$ für CAL1sh) (Abbildung 13, 14).

Die Reduzierung des CALEB/NGC Gehaltes mit Hilfe der siRNA Oligonukleotide führte zum gleichen Ergebnis. Bei Neuronen, die mit EGFP und der spezifischen siRNA rCAL3 transfiziert wurden, konnte nicht nur eine verminderte CALEB/NGC Expression gegenüber den Kontrollzellen, welche mit EGFP und dem Kontroll-siRNA Oligonukleotid CAL1 transfiziert wurden, sondern auch eine verringerte Komplexität der Dendritenbäume festgestellt werden (TNET: $29,8 \pm 1,4$ für EGFP; $26,3 \pm 1,1$ für EGFP + rCAL3 sowie $29,8 \pm 1,2$ für EGFP + CAL1).

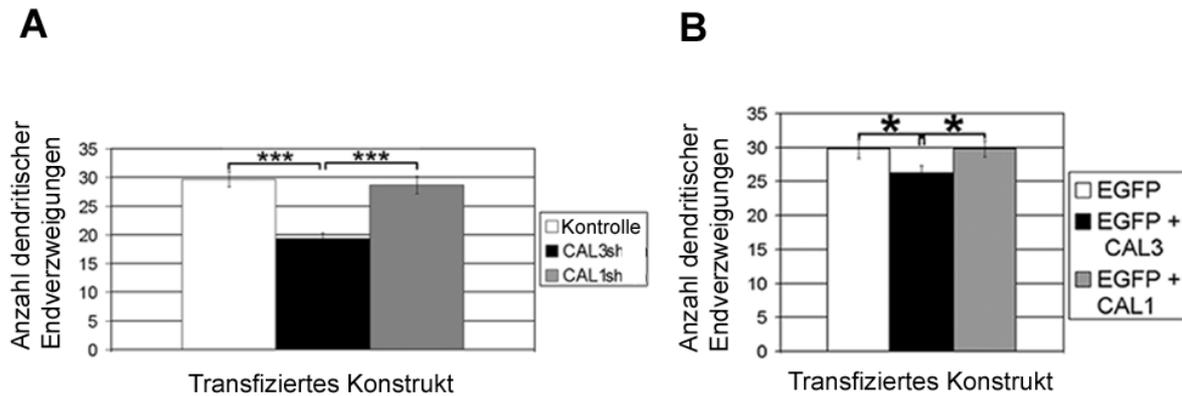


Abbildung 14: „Knockdown“ von endogenem CALEB/NGC reduziert die Anzahl der TNDET in hippocampalen Neuronen. (A) und (B) Die Diagramme zeigen die Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen nach Transfektion der Neurone mit den shRNA Konstrukten CAL1sh und CAL3sh. Außerdem wurden Neurone mit den siRNAs CAL1 bzw. rCAL3 und EGFP kotransfiziert. Die Analyse erfolgte nach Färbung mit einem polyklonalen anti-GFP bzw. einem monoklonalen anti-CALEB/NGC (anti-CSPG5 5C11) Antikörper. (A) $n = 40$, $*** p < 0,0001$, (B) $n = 150$, $*p < 0,05$. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Diese Ergebnisse belegen die Bedeutung von endogen exprimiertem CALEB/NGC für die Regulation der Dendritenkomplexität. Die Reduktion des endogenen CALEB/NGC-Spiegels in hippocampalen Neuronen mittels RNAi-Technik resultiert in einer verringerten Komplexität der Dendritenbäume.

3.1.5 Ein dominant-negatives CALEB/NGC-Konstrukt verringert die Dendritenkomplexität hippocampaler Neurone

Ein dominant-negativ wirkendes Protein interferiert mit der Funktion von endogenem Wildtyp Protein. Um den Effekt von CALEB/NGC auf die Dendritenkomplexität zu überprüfen, wurde das Deletionskonstrukt „396“ eingesetzt, dessen Sequenz der von mCALEBb abgeleitet ist. Es fehlt jedoch der gesamte zytoplasmatische Teil ab dem Sequenzmotiv „KKLYLL“, welches unmittelbar der Transmembranregion folgt (Abbildung 15). Ausgehend von der Hypothese, dass dieses Konstrukt durch den fehlenden intrazellulären Teil extrazelluläre Ereignisse, wie z.B. die Bindung eines putativen Liganden von der intrazellulären Signaltransduktion entkoppeln könnte, wurde vermutet, dass dieses Konstrukt „396“ dominant-negativ auf die endogene Funktion von CALEB/NGC bezüglich Dendritenkomplexität wirken könnte.

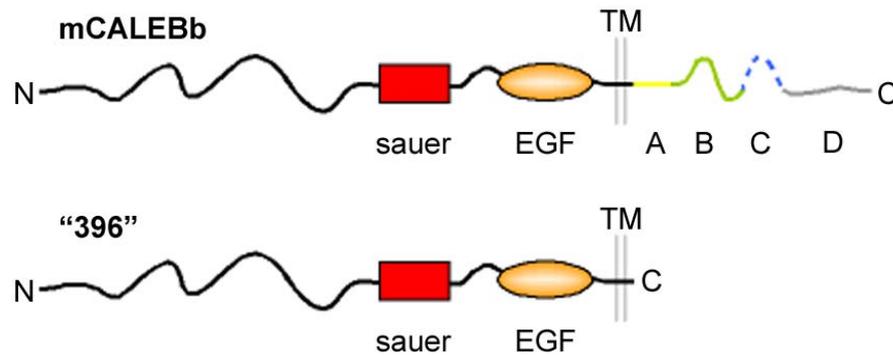


Abbildung 15: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskonstrukte. Abgebildet sind die Schemabilder mCALEBb und das Deletionskonstrukt „396“. Dem Konstrukt „396“ fehlt nahezu der gesamte intrazelluläre Bereich von CALEB/NGC.

Es wurde Konstrukt „396“ mit EGFP in DIV12 hippocampale Neurone kotransfiziert. An DIV12+2 wurden die Zellen dann fixiert, permeabilisiert und mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper gefärbt.

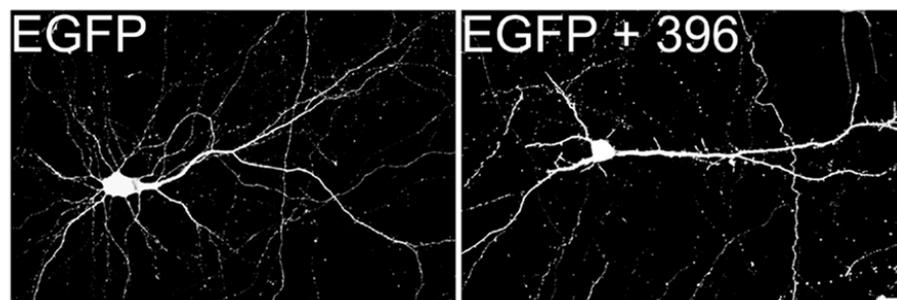


Abbildung 16: Die Dendritenkomplexität von CALEB/NGC wird durch das mutmaßlich dominant-negativ wirkende Konstrukt „396“ reduziert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit EGFP- oder EGFP und „396“-transfizierten hippocampalen Neuronen. Die Zellen wurden mit einem polyklonalen anti-GFP-Antikörper gefärbt. Das Konstrukt „396“ reduziert die Dendritenkomplexität hippocampaler Neurone. Balken = 25 µm

Die Analyse erfolgte über das Auszählen der dendritischen Endverzweigungen. „396“-exprimierende Zellen zeigen eine deutliche Reduktion in der Anzahl der dendritischen Endverzweigungen und folglich eine geringere Dendritenkomplexität (TNDET: $36,8 \pm 1,5$ für EGFP und $29,8 \pm 1,2$ für EGFP + „396“) (Abbildung 16, 17). Somit könnte dieses Konstrukt funktionell dominant-negativ wirken, um endogene CALEB/NGC-Aktivität zu inhibieren.

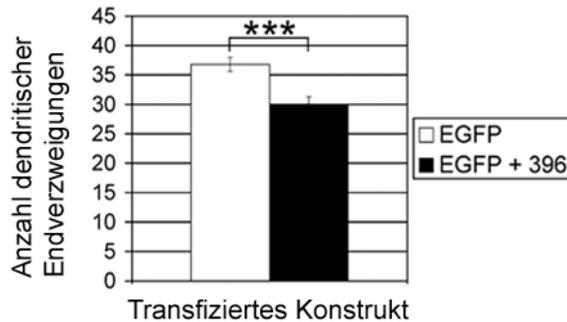


Abbildung 17: Bei Überexpression des Deletionskonstruktes „396“ in hippocampalen Neuronen wird die Anzahl dendritischer Endverzweigungen reduziert. Das Diagramm zeigt die Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen nach Kotransfektion von „396“ mit EGFP-Plasmid oder Transfektion von EGFP als Kontrolle. Die Analyse erfolgte zwei Tage nach Transfektion, nachdem die Neurone mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper gefärbt wurden. $n = 90$, $***p < 0,001$. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

3.1.6 Eingrenzung der intrazellulären Region von CALEB/NGC, die für die Erhöhung der Dendritenkomplexität notwendig ist

Um einen besseren Einblick in die intrazellulären Regionen von CALEB/NGC zu bekommen, die für die Weiterleitung der Signaltransduktion von der Plasmamembran zum Zytoskelett notwendig sind, und um die Spezifität des CALEB/NGC-induzierten Effektes auf die Dendritenkomplexität zu überprüfen, wurden verschiedene CALEB/NGC-Deletionskonstrukte in hippocampale Neurone in Kultur transfiziert und die Morphologie analysiert. Der zytoplasmatische Teil des Transmembranproteins CALEB/NGC wird in vier Abschnitte unterteilt: Das juxtamembranäre Peptidsegment A bindet an das „Golgi-associated PDZ domain containing protein“ PIST (Hassel et al., 2003) und Peptidsegment C wird durch alternatives Spleißen generiert. Für die Peptidsegmente B und D waren weder Interaktionspartner noch irgendeine Funktion bekannt. Daher wurden verschiedene Deletionskonstrukte für die Untersuchungen zur Dendritenmorphologie gewählt. Das Konstrukt „388“ enthält den gesamten extrazellulären Bereich sowie das Peptidsegment A im zytoplasmatischen Teil der mCALEBb Sequenz. Das Konstrukt „400“ enthält darüber hinaus das Peptidsegment B (Abbildung 18). Beide Konstrukte wurden im p3xFLAG-myc-CMVTM-25 Expressionsvektor exprimiert und trugen somit am N-terminalen Ende ein 3xFLAG-„tag“, über das sie nachgewiesen werden konnten.

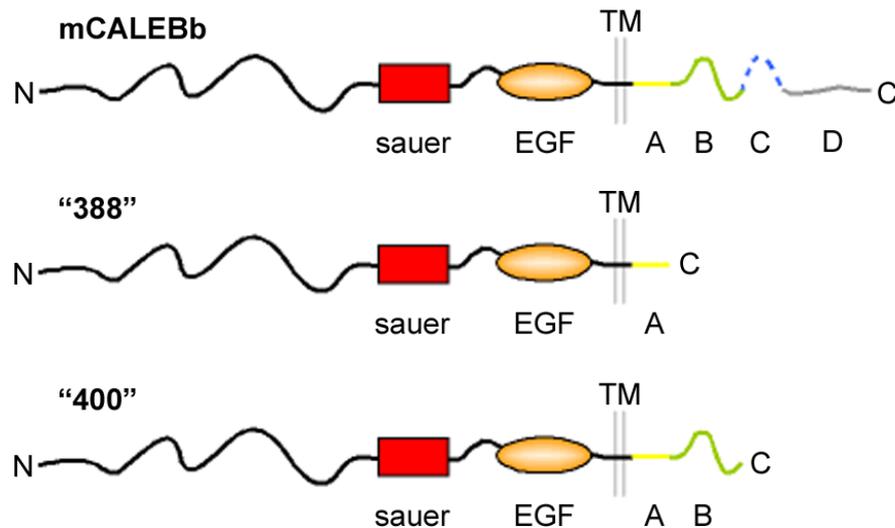


Abbildung 18: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskonstrukte „388“ und „400“. Abgebildet sind die Schemabilder mCALEBb und die Deletionskonstrukte „388“ sowie „400“. Die Konstrukte sind extrazellulär gleich, sie unterscheiden sich im intrazellulären Bereich. Während das Konstrukt „388“ mit dem Peptidsegment A endet und der restliche zytoplasmatische Bereich ab den Aminosäuren „NKFRTPE“ fehlt, enthält das Konstrukt „400“ die Peptidsegmente A und B, der zytoplasmatische Bereich fehlt hier ab den Aminosäuren „VRKFCDTP“.

Nach sieben Tagen *in vitro* (DIV7) wurden die Neurone mit den Konstrukten „388“ und „400“ transfiziert und zwei Tage später (DIV7+2) fixiert, permeabilisiert und mit einem polyklonalen anti-GFP bzw. einem monoklonalen anti-FLAG Antikörper gefärbt. Verglichen wurden diese Neurone dann mit Kontrollzellen, welche mit mCALEBb bzw. EGFP transfiziert worden waren.

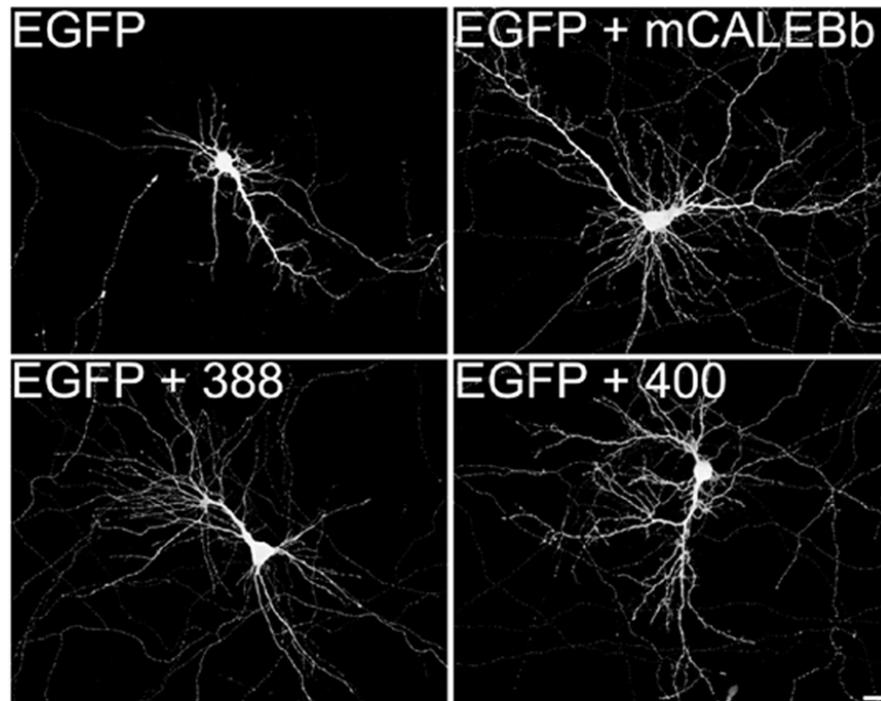


Abbildung 19: Das intrazelluläre Peptidsegment B ist wichtig für die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von hippocampalen Neuronen, die an DIV7 mit EGFP transfiziert bzw. mit EGFP und mCALEBb sowie EGFP und mCALEBb-Deletionskonstrukten (Konstrukte „388“ und „400“) kotransfiziert wurden. Die Zellen wurden an DIV7+2 mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper gefärbt. Die Überexpression des mCALEBb-Deletionskonstruktes „400“, welches die Peptidsegmente A und B enthält, führt zu einer Erhöhung der Dendritenbaumkomplexität im ähnlichen Ausmaß wie die Überexpression von mCALEBb. Konstrukt „388“-exprimierende Neurone weisen eine von EGFP nicht signifikant unterschiedliche Dendritenbaumkomplexität auf. Balken = 25 µm.

Die morphologische Untersuchung der Anzahl der dendritischen Endverzweigungen pro Neuron ergab, dass allein das Konstrukt „400“ in der Lage ist, eine Erhöhung der Dendritenkomplexität ähnlich der von mCALEBb zu bewirken (TNDET: $56,8 \pm 2,4$ für Konstrukt „400“ und $60,8 \pm 2,6$ für mCALEBb) (Abbildung 19). Die Expression von Konstrukt „388“ war jedoch nicht ausreichend, um die Komplexität dendritischer Bäume wie mCALEBb zu stimulieren. Die Anzahl der Endverzweigungen bei Neuronen, die Konstrukt „388“ exprimierten, war nicht signifikant verschieden zu denjenigen Neuronen, die EGFP exprimierten (TNDET: $48,0 \pm 2,2$ für Konstrukt „388“ und $45,9 \pm 2,1$ für EGFP) (Abbildung 20).

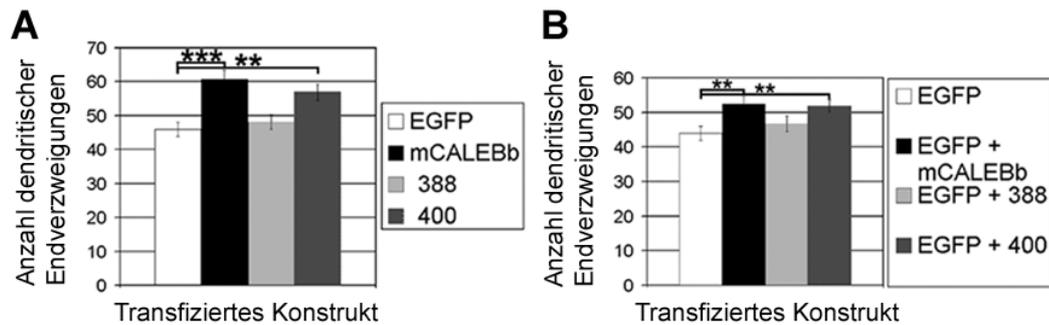


Abbildung 20: Charakterisierung des Einflusses verschiedener intrazellulärer mCALEBb-Deletionskonstrukte auf die Dendritenkomplexität. (A) Hippocampale Neurone wurden an DIV7 mit EGFP-Plasmid, mCALEBb oder den mCALEBb-Deletionskonstrukten „388“ oder „400“ transfiziert. Dargestellt ist die Quantifizierung der Anzahl der dendritischen Endverzweigungen nach Transfektion wie oben beschrieben, $n = 42$, $***p < 0,0001$ und $**p < 0,005$. (B) Hippocampale Neurone wurden an DIV7 mit EGFP-Plasmid und mCALEBb bzw. den mCALEBb-Deletionskonstrukten „388“ oder „400“ kotransfiziert. In beiden Fällen (A und B) wurden die Neurone zwei Tage später nach Färbung mit polyklonalen anti-GFP Antikörpern bzw. monoklonalen anti-FLAG Antikörpern analysiert (DIV7+2). Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen nach Kotransfektion wie oben beschrieben, $n = 45$, $**p < 0,01$. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass eines der Deletionskonstrukte nicht in alle Dendriten transportiert wurde, wurden zusätzlich alle verwendeten Konstrukte mit EGFP in die Neurone kotransfiziert und nach gleichem Verfahren wie oben analysiert. Es zeigte sich, dass der oben beobachtete Effekt bestehen blieb.

Während die Expression von EGFP + „400“ einen ähnlichen Einfluß auf die Anzahl der Dendritenverzweigungen hat, wie die Expression von EGFP + mCALEBb (TNDET: $51,9 \pm 1,9$ für EGFP + „400“ und $52,4 \pm 2,2$ für EGFP + mCALEBb), so reicht die Expression von EGFP + „388“ alleine nicht aus, um die Dendritenkomplexität zu stimulieren (TNDET: $46,7 \pm 2,3$ für EGFP + „388“ und $44,0 \pm 2,1$ für EGFP).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die zytoplasmatischen Peptidsegmente A und B von CALEB/NGC notwendig und hinreichend sind, um Dendritenkomplexität zu induzieren.

3.1.7 Einfluss des extrazellulären Bereichs von CALEB/NGC auf die Dendritenkomplexität: Analyse der EGF-ähnlichen Domäne

CALEB/NGC gehört strukturell zur EGF-Familie transmembranaler Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Schumacher et al., 1997; Massague und Pandiella, 1993), deren charakteristisches Strukturelement die konservierte EGF-Domäne ist. Von den anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie sind bisher fast ausschließlich Funktionen als Liganden für bestimmte Rezeptortyrosinkinasen beschrieben worden (Burden und Yarden, 1997). Der EGF (epidermal growth factor)-Rezeptor und seine Liganden, die EGF-Familie transmembranaler Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sind wichtige Regulatoren für verschiedene Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Erhaltung verschiedener Gewebe sowie Reparaturmechanismen unter anderem im Nervensystem (zur Übersicht siehe Massague und Pandiella, 1993). Der Effekt von CALEB/NGC auf die Dendritenkomplexität hippocampaler Neurone wurde auf CALEB/NGC-exprimierenden Zellen gemessen, die somit selbst CALEB/NGC haben. Daher stellte sich die Frage, ob CALEB/NGC eine Rezeptorfunktion hat und nicht wie die anderen Familienmitglieder dieser Proteinfamilie eine Ligandenfunktion. Nach meiner Arbeitshypothese wirkt CALEB/NGC als Rezeptor für einen noch nicht identifizierten Liganden. Um den Anteil des extrazellulären Bereichs von CALEB/NGC näher einzugrenzen, der für eine Ligandenbindung in Frage kommt, wurden verschiedene Deletionskonstrukte hergestellt, die sich in der Länge des extrazellulären Bereichs unterscheiden. Die EGF-ähnliche Domäne stellt eine der prominentesten Regionen in der extrazellulären Domäne von CALEB/NGC dar. Es ist daher theoretisch denkbar, dass ein putativer Ligand an die EGF-ähnliche Domäne von CALEB/NGC bindet.

Daher wurde zunächst ein Konstrukt, „EGFshedding1“, konzipiert, das von der mCALEBb-Sequenz abgeleitet ist und extrazellulär aus der EGF-ähnlichen Domäne ausgehend von den Aminosäuren VPPQHTL, der Transmembranregion sowie dem gesamten intrazellulären Teil bis zum C-Terminus besteht. Der N-terminale Bereich einschließlich des sauren Peptidsegmentes fehlt (Abbildung 21). Es wurde im p3xFLAG-myc-CMVTM-25 Expressionsvektor exprimiert und war somit über den 3xFLAG-„tag“ am N-Terminus nachweisbar.

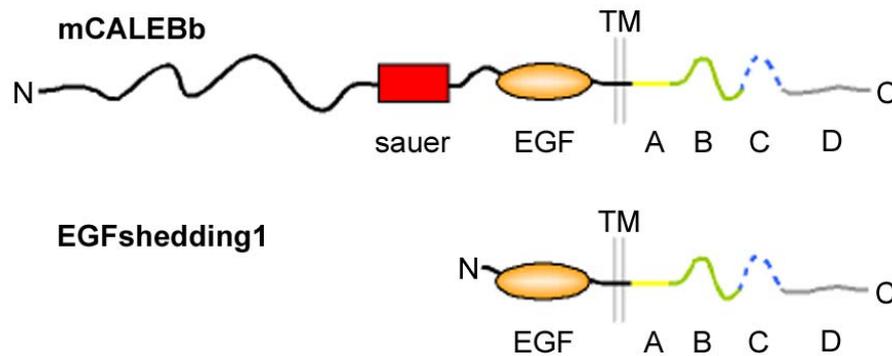


Abbildung 21: Schematische Darstellung des verwendeten „EGFshedding1“ Expressionskonstrukts. Abgebildet sind die Schemabilder mCALEBb und Konstrukt „EGFshedding1“. Dem Konstrukt „EGFshedding1“ fehlt im Vergleich zu mCALEBb außer der EGF-ähnlichen Domäne der gesamte übrige extrazelluläre Bereich. Die Transmembranregion und der intrazelluläre Teil sind identisch.

Nach Kotransfektion der Konstrukte „EGFshedding1“ bzw. mCALEBb mit EGFP in DIV7 hippocampale Neurone wurden die Zellen an DIV7+2 fixiert, permeabilisiert und die exprimierten Proteine mit polyklonalen anti-GFP und monoklonalen anti-FLAG Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 22). Quantifiziert wurde die Anzahl dendritischer Endverzweigungen von „EGFshedding1“- und EGFP- sowie mCALEBb- und EGFP-koexprimierenden Neuronen im Vergleich zu Zellen, die nur EGFP exprimierten. Bei den „EGFshedding1“- und EGFP-koexprimierenden Neuronen konnte die Fähigkeit, die Dendritenkomplexität analog mCALEBb zu stimulieren, nachgewiesen werden.

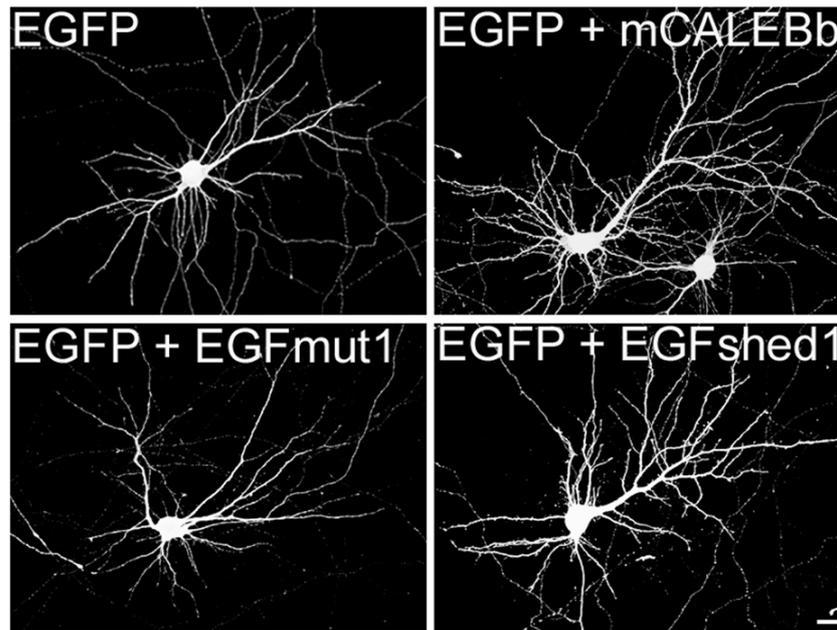


Abbildung 22: Die EGF-ähnliche Domäne von CALEB/NGC ist ausreichend und essentiell, um Dendritenkomplexität so wie CALEB/NGC selbst zu stimulieren. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von hippocampalen Neuronen, die an DIV7 mit EGFP transfiziert und mit EGFP und mCALEBb bzw. EGFP und „EGFshedding1“ oder „EGFmut1“ kotransfiziert wurden. Die Analyse erfolgte an DIV7+2 nach Färbung der Zellen mit polyklonalen anti-GFP sowie monoklonalen anti-FLAG Antikörpern. Neurone sind in der GFP-Färbung dargestellt. Neurone, die mit EGFP und „EGFshedding1“ kotransfiziert wurden (unten rechts), wiesen keine Unterschiede in der Dendritenmorphologie im Vergleich zu Zellen auf, die EGFP und mCALEBb koexprimieren (oben rechts). Neurone, die mit EGFP und „EGFmut1“ kotransfiziert wurden (unten links), wiesen eine signifikante Abnahme der Dendritenkomplexität im Vergleich zu Zellen auf, die EGFP und mCALEBb exprimieren. Die EGF-ähnliche Domäne ist extrazellulär notwendig und ausreichend für die CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität. Balken = 25 μ m.

Diese Neurone wiesen, verglichen mit EGFP-exprimierenden Zellen, eine signifikant höhere Anzahl dendritischer Verzweigungen auf (TNDET: $42,8 \pm 2,1$ für „EGFshedding1“ + EGFP und $33,7 \pm 1,9$ für EGFP). Darüber hinaus entsprach die Anzahl der Verzweigungen derjenigen, welche durch die Koexpression von EGFP und mCALEBb erzielt wurde (TNDET: $41,1 \pm 1,6$ für EGFP + mCALEBb) (Abbildung 23). Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass die EGF-ähnliche Domäne von CALEB/NGC ausreichend ist, um Dendritenkomplexität in gleicher Weise wie CALEB/NGC selbst zu induzieren.

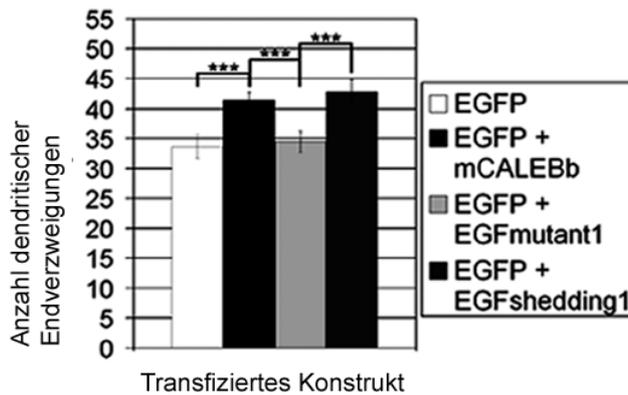


Abbildung 23: Auswertung der Auswirkung von der EGF-ähnlichen Domäne auf die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität. Das Diagramm zeigt die Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen nach Kotransfektion von EGFP und mCALEBb bzw. Konstrukt „EGFshedding1“ („EGFshed1“) und EGFP und mCALEBb bzw. „EGFmutant1“ („EGFmut1“), $n = 40$, $***p < 0,0001$. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Um nachzuprüfen, ob die EGF-ähnliche Domäne nicht nur ausreichend sondern auch notwendig für den Effekt von CALEB/NGC auf die Dendritenmorphogenese ist, wurde ein Mutationskonstrukt analysiert. Das Konstrukt „EGFmutant1“ ist identisch zu der mCALEBb Sequenz mit der Ausnahme einer Vierpunkt-Mutation in der EGF-ähnlichen Domäne (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.1.4) (Abbildung 24).

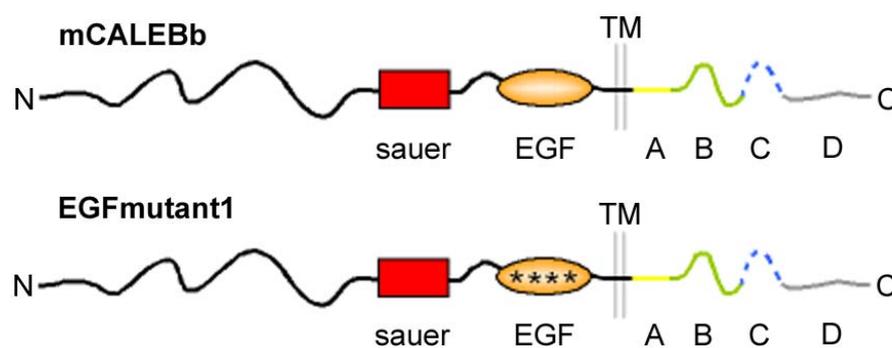


Abbildung 24: Schematische Darstellung des verwendeten Expressionskonstruktes nach Mutation der EGF-ähnlichen Domäne. Die mCALEBb- bzw. „EGFmutant1“-Konstrukte unterscheiden sich nur durch den Austausch von vier Aminosäuren in der EGF-ähnlichen Domäne (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.1.4, Tabelle 3).

Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie bei der Analyse des „EGFshedding1“-Konstruktes. Das „EGFshedding1“-Konstrukt vermittelt eine Dendritenkomplexität, die im ähnlichen Maß signifikant unterschiedlich zu EGFP-exprimierenden Kontrollzellen wie CALEB/NGC ist. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei dem „EGFmutant1“-Konstrukt, dass es Dendritenkomplexität unterschiedlich zu CALEB/NGC stimuliert und nicht signifikant unterschiedlich zu den EGFP-exprimierenden Kontrollzellen ist (TNDET: $34,5 \pm 1,2$ für EGFP + „EGFmutant1“ und $33,7 \pm 1,9$ für EGFP; $41,1 \pm 1,6$ für EGFP + mCALEBb) (Abbildung 23). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die EGF-ähnliche Domäne im extrazellulären Bereich von CALEB/NGC nicht nur ausreichend, sondern auch essentiell ist, um Dendritenkomplexität zu induzieren.

Zusammenfassend ergibt sich nach der morphologischen Analyse des Effektes von CALEB/NGC auf die Dendritenkomplexität folgendes Gesamtbild:

1. Die Überexpression von CALEB/NGC in hippocampalen Neuronen erhöht die Komplexität der Dendritenbäume.
2. Der „knockdown“ von endogenem CALEB/NGC mittels RNA-Interferenz führt zu einer reduzierten Dendritenkomplexität. Dieses belegt die Bedeutung von endogenem CALEB/NGC für die Verzweigung von Dendriten.
3. Zusätzlich wird die CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität durch die Verwendung eines funktionell mutmaßlich dominant-negativ wirkenden, von mCALEBb abgeleiteten Konstrukts inhibiert.
4. Die intrazellulären Peptidsegmente A und B sind für die Vermittlung der Dendritenkomplexität durch CALEB/NGC notwendig und ausreichend.
5. Darüber hinaus ist die EGF-ähnliche Domäne im extrazellulären Bereich von CALEB/NGC notwendig und essentiell für die CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität.

Aufgrund der Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen stellte sich nun die Frage, welche molekularen Mechanismen dem stimulierenden Effekt von CALEB/NGC auf Dendritenkomplexität zugrunde liegen. Welche Faktoren sind intrazellulär für die Signalweiterleitung verantwortlich, die zur zytoskelettalen Reorganisation und damit zu einer Veränderung der Morphologie führen? Es wurden zwei verschiedene Strategien gewählt, um die Signaltransduktion von CALEB/NGC intrazellulär zu untersuchen:

1. Die Untersuchung bekannter Signalwege, die bereits im Zusammenhang mit der Verzweigung von Dendritenbäumen beschrieben wurden (MEK-MAPK- und PI3K-Akt-mTOR-Signalwege).
2. Die Suche nach putativen Kandidaten, die CALEB/NGC intrazellulär an Signaltransduktionswege anbinden könnten.

3.2 Untersuchungen zur Signaltransduktion des CALEB/NGC-vermittelten Effektes auf Dendritenkomplexität

3.2.1 Die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität ist nicht vom MEK-MAPK-Signalweg abhängig

Kürzlich wurde von anderen Autoren die Wichtigkeit des MEK-MAPK- sowie des „phosphoinositide-3' kinase (PI3K) -Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR)“-Signalweges für die Kontrolle der Dendritenkomplexität beschrieben (Wu et al., 2001; Vaillant et al., 2002; Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob diese Signalwege für den CALEB/NGC-vermittelten Effekt auf Dendritenverzweigung von Bedeutung sind. Das Ziel war, Einsicht in die molekularen Wirkmechanismen von CALEB/NGC zu gewinnen.

Für diese Experimente wurden verschiedene bekannte Inhibitoren benutzt, die spezifisch die Wirkung verschiedener Kinasen innerhalb des MEK-MAPK- und des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges inhibieren. Damit konnte eine mögliche Relevanz dieser Kinasen für die CALEB/NGC-induzierte Dendritenkomplexität untersucht werden. 3 h nach Transfektion von EGFP oder mCALEBb in hippocampale Neurone an DIV7 wurde NBA Medium, supplementiert mit dem jeweiligen Inhibitor, zu den Zellen gegeben. In Kontrollkulturen wurde das äquivalente Volumen des Lösungsmittelagens der Inhibitoren hinzugegeben. Nach 48-stündiger Inkubation mit den Substanzen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Die Analyse erfolgte über das Auszählen der dendritischen Endverzweigungen.

Die spezifische Wirkung des MEK-Inhibitors U0126 zeigte keinen Effekt auf die Zellmorphologie der Zellkulturen an DIV9. Verglichen mit der Anzahl der dendritischen Endverzweigungen von EGFP- oder mCALEBb-exprimierenden Neuronen aus Kontrollkulturen konnte bei den mit 10 μ M U0126 behandelten Neuronen keine Reduktion in der Anzahl der TNET und somit keine Inhibition der CALEB/NGC-stimulierten

Dendritenkomplexität festgestellt werden (TNDET: $38,4 \pm 0,8$ für EGFP; $45,4 \pm 1,1$ für mCALEBb; $39,4 \pm 0,8$ für EGFP + U0126 sowie $44,4 \pm 1,1$ für mCALEBb + U0126) (Abbildung 25). Insbesondere blieb die CALEB/NGC-vermittelte Stimulation der Dendritenkomplexität auch mit Inhibitoreinfluss bestehen. Die gewählte Konzentration des Inhibitors entsprach der gängigen Literatur (Kumar et al., 2005; Nakanishi et al., 2006). Um auszuschließen, dass U0126 inaktiv war und somit keinen Effekt ausüben konnte, wurden hippocampale Neurone an DIV7 mit diesem Inhibitor behandelt und die Zellextrakte dann nach 48-stündiger Inkubation in der SDS-PAGE aufgetrennt. Ein Ansatz mit Zellen ohne Inhibitor diente als Kontrolle. Der nachfolgende Immunblot wurde mit anti-Phospho-p44/42 MAPK und anti-p44/42 MAPK Antikörpern gefärbt. Es war deutlich erkennbar, dass der Inhibitor die Phosphorylierung von MAPK blockiert und somit aktiv war. Während der Spiegel von MAPK in der Kontrollkultur gleich dem der in den U0126-behandelten Neuronen war, nachgewiesen durch anti-p44/42 Antikörper, war eine deutliche Reduktion der Menge an phosphorylierter p44/42 MAPK bei den behandelten Zellen im Vergleich mit der Kontrolle festzustellen. Darüber hinaus wurden in den zellulären Assays U0126-Chargen von zwei verschiedenen Herstellern (Calbiochem, Sigma) eingesetzt. Unabhängig von den Herstellerchargen war das Ergebnis gleich.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss von CALEB/NGC auf Dendritendifferenzierung nicht abhängig ist von aktiver MEK.

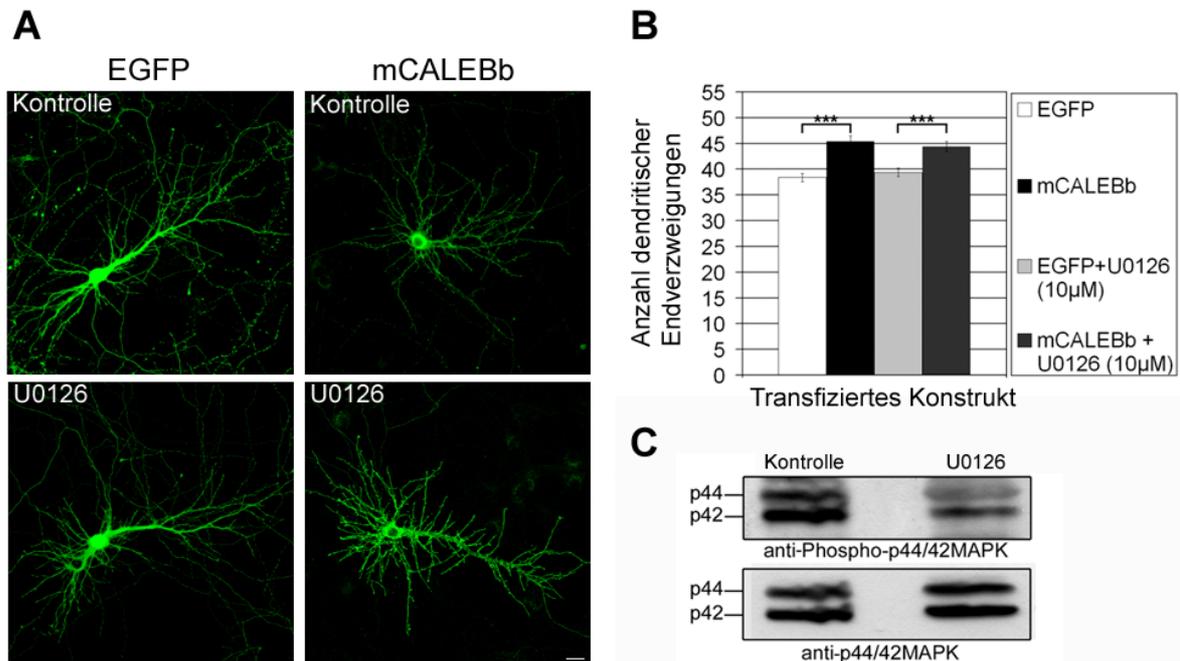


Abbildung 25: Der Einsatz des MEK-Inhibitors U0126 hat keine Auswirkung auf die von CALEB/NGC-induzierte Dendritenkomplexität. Hippocampale Neurone wurden an DIV7 mit EGFP- oder mCALEBb-Plasmid transfiziert und in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 10 µM U0126 für zwei Tage inkubiert. Nach Färbung der Neurone mit polyklonalen anti-GFP Antikörpern und monoklonalen anti-FLAG Antikörpern erfolgte die Analyse. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Neuronen, die mit oder ohne U0126-Inhibitor behandelt wurden, nach GFP- bzw. mCALEBb-Färbung. (B) Dargestellt ist die Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen nach Transfektion wie oben beschrieben, $n = 124$, $***p < 0,005$. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Balken = 25 µm. (C) Western Blot-Analyse von Zellextrakten hippocampaler Neurone nach Detergensaufschluß, die von DIV7 an zwei Tage mit oder ohne U0126 inhibiert wurden. Nachweis von phosphorylierter p44/42 MAPK durch anti-Phospho-p44/42 MAPK Antikörper und von gesamter p44/42 MAPK durch anti-p44/42 MAPK Antikörper.

3.2.2 Die Bedeutung des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges für CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität

Im Allgemeinen hat der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg eine zentrale Bedeutung für die Kontrolle des Wachstums von Zellen durch die Kontrolle der ribosomalen Biogenese und Aktivität der Translationsmaschinerie. In den letzten Jahren wurde eine breite Beteiligung der von Akt regulierten Serin/Threonin-Kinase mTOR an verschiedenen Prozessen der neuronalen Entwicklung beschrieben. (Kwon et al., 2003; Takei et al., 2004; Tang et al., 2002; Cammalleri et al., 2003; Hou und Klann, 2004). Interessanterweise zeigen neuere Arbeiten, dass der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg wichtig für die Dendritenkomplexität von Neuronen ist (Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005). Die Aktivierung des PI3K-Akt-

Signalweges in Abhängigkeit von mTOR führt im Alter von DIV7-14 zu einer erhöhten Dendritenverzweigung in kultivierten hippocampalen Neuronen (Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005).

Um die Bedeutung des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges für CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität zu untersuchen, wurden die verschiedenen Komponenten des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges inhibiert. Folgende Komponenten wurden durch Inkubation mit pharmakologischen Inhibitoren ausgeschaltet:

1. PI3-Kinase durch Inhibitor LY294002
2. Akt durch Akt-Inhibitor I und III
3. mTOR durch Inhibitor Rapamycin

Zur Untersuchung einer möglichen Relevanz der PI3-Kinase-Aktivität für die Signaltransduktion von CALEB/NGC wurden Versuche mit dem spezifischen PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 durchgeführt, welcher die Aktivierung der PI3-Kinase verhindert. Die Neurone wurden analog zu dem vorangegangenen Experiment behandelt und in An- bzw. Abwesenheit von 20 μ M LY294002 inkubiert. EGFP- bzw. mCALEBb-exprimierende Neurone ohne LY294002 dienten als Kontrolle. Es zeigte sich, dass EGFP-exprimierende Neurone mit Inhibitor im Vergleich zu unbehandelten Neuronen eine reduzierte Anzahl dendritischer Endverzweigungen hatten (Abbildung 26, 27). Diese Beobachtung entsprach kürzlich publizierten Ergebnissen (Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005). Insbesondere zeigte sich aber auch, dass nach Zugabe des Inhibitors LY294002 die von CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität vollständig inhibiert wurde (TNDET: $39,2 \pm 0,8$ für EGFP; $45,4 \pm 0,9$ für mCALEBb; $30,6 \pm 0,7$ für EGFP + LY294002 und $31,5 \pm 1,0$ für mCALEBb + LY294002).

Die Ergebnisse dieser Versuche belegen, dass die Aktivität der PI3-Kinase für die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenverzweigung relevant ist.

Nun wurde das nächste Glied in der PI3K-Akt-mTOR Signalkette, nämlich Akt/Proteinkinase B (PKB) inhibiert und sein Einfluss auf CALEB/NGC-induzierte Dendritenverzweigung untersucht.

Zunächst wurden hippocampale Neurone an DIV7 mit EGFP- und mCALEBb-kodierenden Plasmiden transfiziert und bis DIV9 mit 10 μ M Akt-Inhibitor I behandelt. In Kontrollkulturen wurde das äquivalente Volumen des Lösungsmittelagens der Inhibitoren hinzugegeben. Auch

in diesem Fall wurde die Anzahl der dendritischen Endverzweigungen bei den EGFP-exprimierenden Zellen durch den Akt-Inhibitor I reduziert (TNDET: $35,3 \pm 0,8$ für EGFP; $43,5 \pm 1,0$ für mCALEBb; $31,5 \pm 0,7$ für EGFP + Akt-Inhibitor I und $34,2 \pm 1,0$ für mCALEBb + Akt-Inhibitor I) (Abbildung 26, 27). Zusätzlich zeigten diese Versuche, dass der Effekt auf Dendritenkomplexität bei mCALEBb-exprimierenden Zellen gegenüber Kontrollzellen vollständig inhibiert wurde, wie bereits bei der Blockierung der Signalkaskade durch LY294002 beobachtet. Zur weiteren Unterstützung der Ergebnisse dieser Experimente wurden die wie üblich transfizierten Kulturen in An- bzw. Abwesenheit eines weiteren spezifischen Akt-Inhibitors, Akt-Inhibitor III, mit einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ inkubiert. Die Inkubation mit diesem Inhibitor hatte wiederum einen Rückgang der Anzahl dendritischer Endverzweigungen bei mCALEBb-exprimierenden Neuronen auf das Niveau der EGFP-exprimierenden Zellen zur Folge (TNDET: $27,9 \pm 1,1$ für EGFP + Akt-Inhibitor III und $29,9 \pm 1,1$ für mCALEBb + Akt-Inhibitor III) (Abbildung 26, 27).

Zusammengefasst führte die Inhibition der Proteinkinase Akt in allen Versuchen und unter Verwendung verschiedener Akt-Inhibitoren zu einer Reduktion der CALEB/NGC-vermittelten Dendritenverzweigung auf das Niveau der Kontrollzellen. Diese Studien verdeutlichen, dass für den CALEB/NGC-vermittelten Effekt auf die Dendritenmorphologie eine Aktivierung sowohl von der PI3-Kinase als auch von Akt notwendig ist.

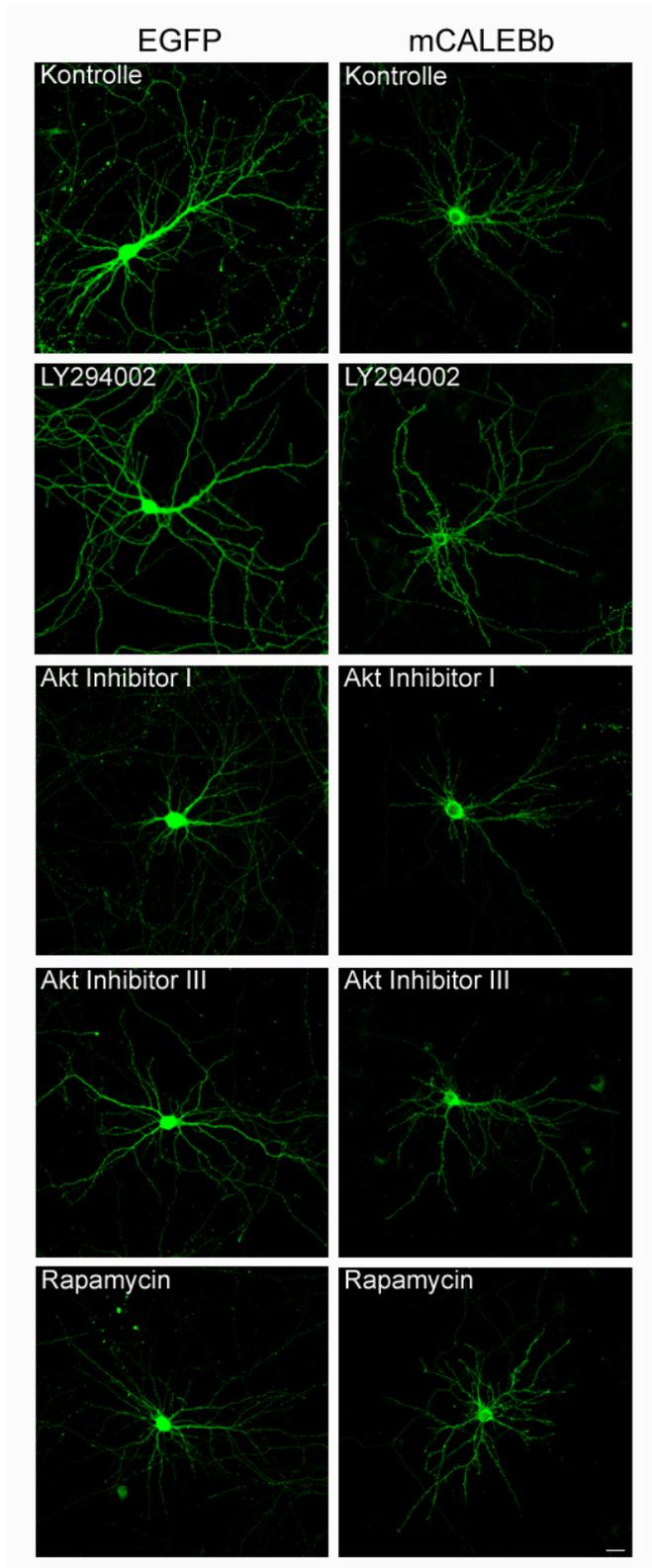


Abbildung 26: CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität ist abhängig von einem aktiven PI3K-Akt-mTOR-Signalweg. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen hippocampaler Neurone, die an DIV7 mit EGFP- oder mCALEBb-Plasmid transfiziert und mit den angegebenen Inhibitoren LY294002, Akt-Inhibitor I und III sowie Rapamycin für zwei Tage behandelt wurden. Die Konzentrationen der Inhibitoren sind in Abbildung 27 angegeben. Die morphologische Auswertung der Zellen erfolgte nach GFP- (EGFP) und FLAG-Färbung (mCALEBb). Balken = 25 μm .

Durch die Verwendung von Rapamycin, einem Inhibitor des Akt-Effektors mTOR, sollte geklärt werden, ob auch durch die Blockierung von mTOR eine Reduktion der Dendritenkomplexität auftritt. EGFP- oder mCALEBb-exprimierende Kulturen wurden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 10 nM und 100 nM Rapamycin für 48 h inkubiert, fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Es wurde kein Einfluss von Rapamycin auf die Anzahl dendritischer Endverzweigungen EGFP-exprimierender Zellen beobachtet. Die morphologische Auswertung ergab jedoch, dass bei einer Inhibierung des Akt-Effektors mTOR die CALEB/NGC-induzierte Dendritenverzweigung signifikant reduziert war. Neurone, die mCALEBb exprimierten, wiesen bei der Applikation von beiden Rapamycin-Konzentrationen eine signifikant geringere Anzahl dendritischer Endverzweigungen auf als mCALEBb-exprimierende Zellen, die nur mit DMSO, dem Lösungsmittel von Rapamycin, behandelt worden waren (Abbildung 26, 27). Interessanterweise war die Anzahl bei mCALEBb-exprimierenden Zellen, unabhängig von der eingesetzten Rapamycin-Konzentration, immer noch signifikant erhöht im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Neuronen (TNDET: $34,9 \pm 0,7$ für EGFP; $43,0 \pm 0,9$ für mCALEBb; $33,5 \pm 0,6$ für EGFP + Rapamycin (10 nM); $36,2 \pm 0,7$ für mCALEBb + Rapamycin (10 nM); $32,8 \pm 1,0$ für EGFP + Rapamycin (100 nM) und $36,4 \pm 1,1$ für mCALEBb und Rapamycin (100 nM)).

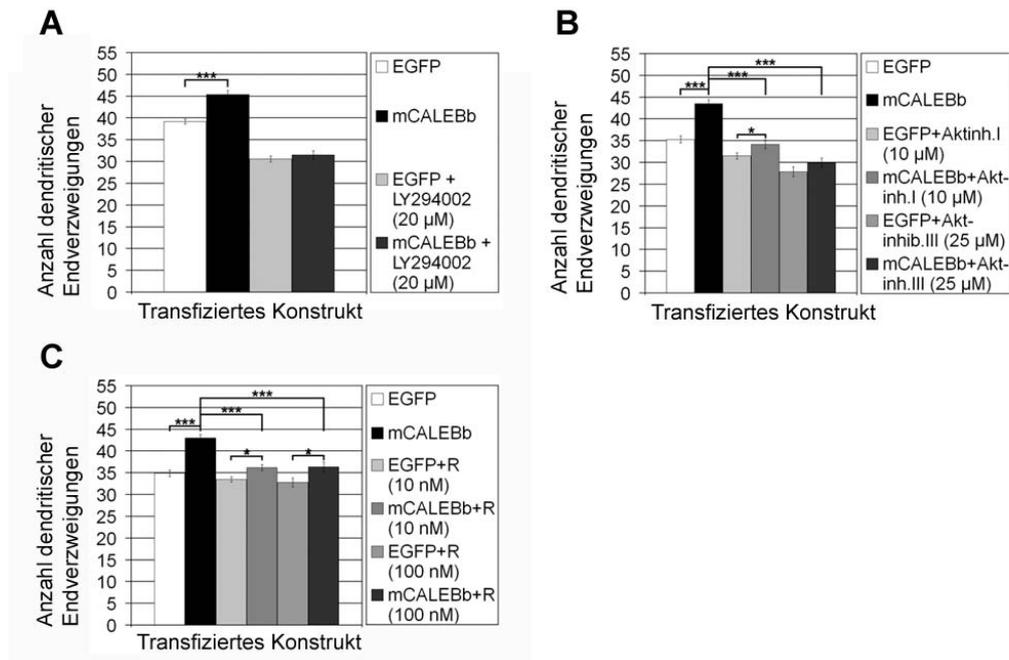


Abbildung 27: Auswertung des Einflusses verschiedener Inhibitoren des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges auf die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität. (A) Dargestellt ist die Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen von Neuronen, die mit EGFP-Plasmid oder mCALEBb-Plasmid transfiziert und mit oder ohne 20 μ M LY294002 behandelt wurden, $n = 81$, $***p < 0,0001$. (B) Darstellung der Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen von Neuronen, transfiziert wie oben beschrieben und behandelt mit oder ohne 10 μ M Akt-Inhibitor I bzw. 25 μ M Akt-Inhibitor III, $n = 87$ für Akt-Inhibitor I, $n = 49$ für Akt-Inhibitor III, $***p < 0,0001$, $*p < 0,005$. (C) Darstellung der Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen von Neuronen, transfiziert wie oben beschrieben und behandelt mit oder ohne 10 nM bzw. 100 nM Rapamycin, $n = 53$, $***p < 0,0001$, $*p < 0,05$. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Aufgrund der Resultate der durchgeführten Experimente wird deutlich, dass der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg, nicht jedoch der MEK-MAPK-Signalweg für die Effekte von CALEB/NGC auf die Dendritenkomplexität hippocampaler Neurone wichtig ist.

3.2.3 CALEB/NGC stimuliert Dendritenkomplexität unabhängig von elektrischer Aktivität

Der Einfluss neuronaler Aktivität auf die Dendritenentwicklung wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben (McAllister et al., 1996; Maletic-Savatic et al., 1999; Portera-Cailliau et al., 2003; Tolias et al., 2005). Um zu untersuchen, ob neuronale Aktivität für CALEB/NGC-induzierte Dendritenverzweigung notwendig ist, wurde im bekannten Zellkultursystem der

Einfluss verschiedener Inhibitoren von Ionenkanälen, die neuronale Aktivität vermitteln, getestet. Unter den Ionenkanälen, von denen bekannt ist, dass sie Bedeutung haben für aktivitätsabhängige Effekte auf die Dendritenmorphologie, sind NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptor sowie L-Typ spannungsabhängige Calciumkanäle. 3 h nach Transfektion der hippocampalen Neurone an DIV7 mit mCALEBb- oder EGFP-Expressionsplasmiden wurde eine Mischung verschiedener Antagonisten von Ionenkanälen zu den Kulturen gegeben. Die gewählte Inhibitor-Mischung wurde in Anlehnung an eine Arbeit aus dem Labor von Robert Malenka verwendet (Yu und Malenka, 2003). Diese bestand aus 1 μM Tetrodotoxin (TTX), 50 μM D-3-amino-phosphonovaleric acid (D-APV) und 10 μM Nifedipine (NF). Während TTX spannungsabhängige Natriumkanäle blockierte, die für die Entstehung von Aktionspotentialen notwendig sind, inhibierte D-APV den NMDA-Rezeptor und Nifedipine spannungsabhängige Calciumkanäle.

Die Zugabe von TTX/D-APV/NF führte zu einer Abnahme der Dendritenkomplexität von EGFP-exprimierenden Neuronen gegenüber unbehandelten EGFP-Kontrollzellen. Dieser Effekt wurde bereits von Malenka beschrieben (Yu und Malenka, 2003). Sie führte auch zu einer Abnahme der Dendritenkomplexität mCALEBb-exprimierender Neurone gegenüber unbehandelten mCALEBb-Kontrollzellen. Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass die Überexpression von mCALEBb auch in Gegenwart dieser Inhibitoren im direkten Vergleich zu EGFP-exprimierenden Zellen zu einer signifikant höheren Anzahl dendritischer Endverzweigungen führte (Abbildung 28).

CALEB/NGC erhöht signifikant die Komplexität von Dendriten. Auch unter Einfluss der Aktivitätsblocker bleibt die Dendritenkomplexität signifikant erhöht. Das Verhältnis der Anzahl dendritischer Endverzweigungen von mCALEBb- zu EGFP-transfizierten Neuronen bleibt jedoch gleich, unabhängig davon, ob die Neurone dem Aktivitätsinhibitor ausgesetzt wurden oder nicht (TNDET: $38,1 \pm 1,9$ für mCALEBb + TTX/D-APV/NF; $29,8 \pm 1,0$ für EGFP + TTX/D-APV/NF; $49,1 \pm 0,9$ für mCALEBb und $36,4 \pm 0,9$ für EGFP).

Diese Resultate belegen, dass der Effekt von CALEB/NGC auf die Dendritenmorphologie unabhängig von elektrischer Aktivität ist.

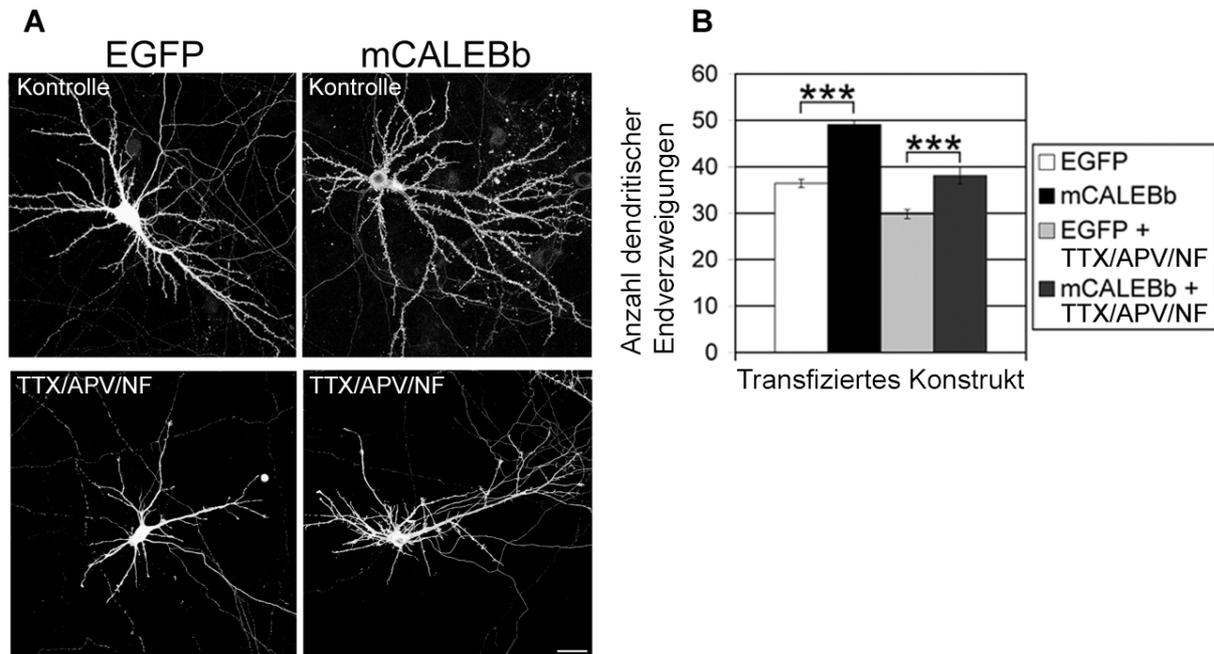


Abbildung 28: Die Blockade elektrischer Aktivität hat keinen Einfluss auf CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen hippocampaler Neurone, die an DIV7 mit EGFP- oder mCALEBb-Plasmid transfiziert und mit den angegebenen Konzentrationen einer Inhibitor-Mischung (1 μ M TTX, 50 μ M D-APV und 10 μ M NF) für zwei Tage behandelt wurden. Die morphologische Analyse der Neurone erfolgte nach GFP-Färbung (EGFP) und FLAG-Färbung (mCALEBb). (B) Darstellung der Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen von Neuronen, transfiziert und behandelt wie oben beschrieben, $n = 31$ (mCALEBb + Inhibitoren), $n = 75$ (alle anderen), $***p < 0,0005$. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Balken = 25 μ m.

3.2.4 CALEB/NGC stimuliert Dendritenkomplexität abhängig von PKC

Eine mögliche Beteiligung von CALEB/NGC am Neuritenwachstum wurde bereits publiziert (Schumacher et al., 1997; Nakanishi et al., 2006). Daten von Nakanishi et al. zufolge ist der extrazelluläre Bereich von CALEB/NGC in der Lage, über PI3K- und PKC-abhängige Signalwege das Auswachsen von Neuriten zu fördern. Um zu untersuchen, ob die PKC ebenfalls für die CALEB/NGC-induzierte Komplexität dendritischer Bäume relevant ist, wurden hippocampale Neurone an DIV7 mit EGFP- oder mCALEBb-kodierenden Plasmiden transfiziert. 3 h nach Transfektion wurden verschiedene Inhibitoren der PKC, 10 μ M Hypericin und 1 μ M bzw. 10 μ M Bisindolylmaleimide, zu den Kulturen gegeben und ihr Einfluss auf die Dendritenverzweigung getestet. Es wurde kein Einfluss der Inhibitoren auf die Anzahl dendritischer Endverzweigungen EGFP-exprimierender Zellen beobachtet. Die morphologische Auswertung der Neurone, die mCALEBb exprimierten, ergab jedoch, dass

die Anzahl dendritischer Endverzweigungen nach Blockierung mit Hypericin im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Kontrollzellen gering reduziert war (TNDET: $39,5 \pm 0,8$ für EGFP; $44,7 \pm 1,1$ für mCALEBb; $39,1 \pm 0,8$ für EGFP + Hypericin; $42,4 \pm 1,2$ für mCALEBb + Hypericin). Bei einer Inhibierung der PKC mit Bisindolylmaleimide hingegen, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, war die Anzahl der dendritischen Endverzweigungen bei mCALEBb-exprimierenden Zellen im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Neuronen signifikant reduziert (TNDET: $38,3 \pm 0,9$ für EGFP; $45,5 \pm 1,2$ für mCALEBb; $37,0 \pm 1,4$ für EGFP + BIM (1 μM); $40,5 \pm 1,4$ für mCALEBb + BIM (1 μM); $38,2 \pm 1,5$ für EGFP + BIM (10 μM) und $39,9 \pm 1,7$ für mCALEBb + BIM (10 μM) (Abbildung 28). Diese Daten deuten auf eine Beteiligung der PKC an CALEB/NGC-vermittelter Dendritenverzweigung hin.

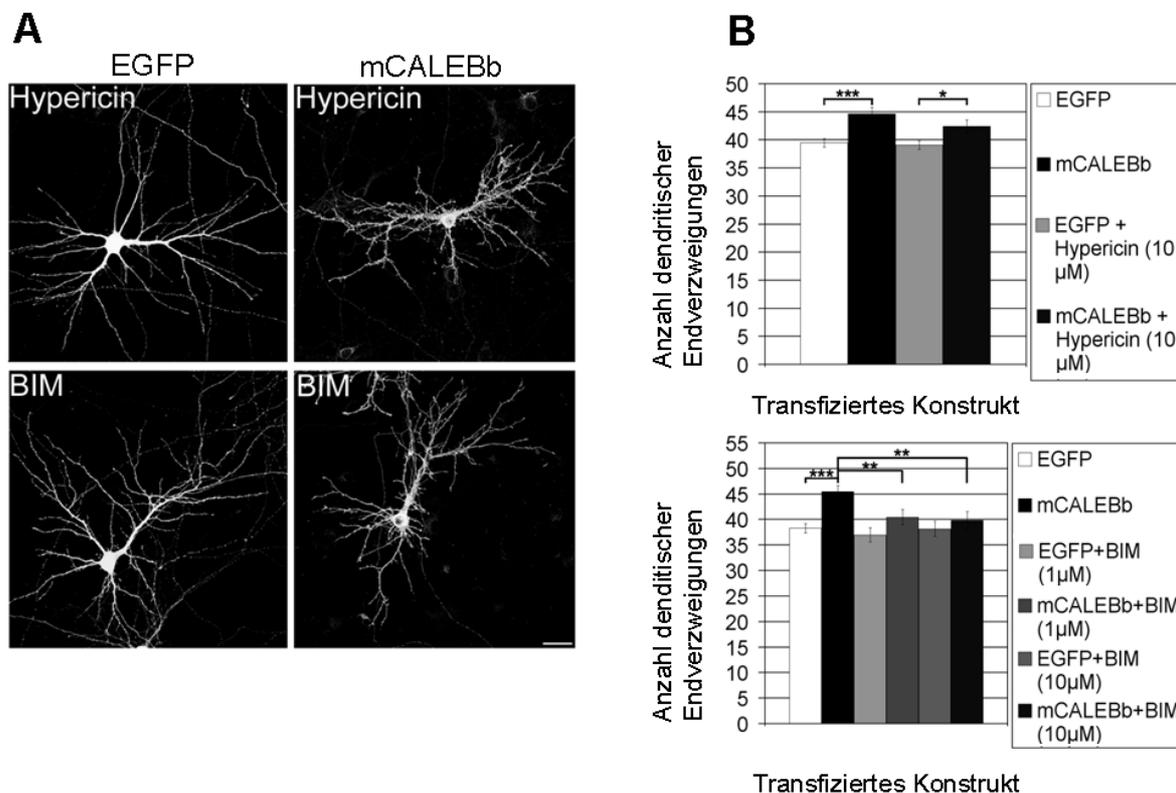


Abbildung 29: CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität ist abhängig von PKC.

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen hippocampaler Neurone, die an DIV7 mit EGFP- oder mCALEBb-Plasmid transfiziert und mit den angegebenen Konzentrationen der PKC-Inhibitoren Hypericin und Bisindolylmaleimide (BIM) (Hypericin 10 μM , BIM 1 μM und 10 μM) behandelt wurden. Die morphologische Analyse erfolgte nach GFP-Färbung (EGFP) und FLAG-Färbung (mCALEBb). (B) Darstellung der Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen von Neuronen, transfiziert und behandelt wie oben beschrieben, $n = 91$ (Hypericin), $***p < 0,0005$, $*p < 0,05$; $n = 66$ (1 μM BIM), $n = 31$ (10 μM BIM), $***p < 0,001$, $**p < 0,01$. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Balken = 25 μm .

3.3 Biochemische Charakterisierung der Interaktion von B56 β mit CALEB/NGC

Wie bereits beschrieben wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Experimentalansätze verfolgt, um Signaltransduktionskaskaden von CALEB/NGC aufzuklären. Die Untersuchung bekannter Signalkaskaden zeigte, dass CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität von einem aktiven PI3K-Akt-mTOR-Signalweg intrazellulär abhängig ist. Zudem wurde die Abhängigkeit von einer intakten EGF-ähnlichen Domäne extrazellulär belegt.

Es ist jedoch bisher kein Protein bekannt, welches das Transmembranprotein CALEB/NGC an den PI3K-Akt-mTOR-Signalweg molekular ankoppelt. Deshalb wurde ein unbekannter Interaktionspartner für CALEB/NGC gesucht. Der einzige bekannte intrazelluläre Interaktionspartner von CALEB/NGC ist das „Golgi-associated PDZ domain protein“ PIST, welches an das juxtamembranäre Peptidsegment von CALEB/NGC bindet (Hassel et al., 2003). Vorläufige Daten aus unserem Labor (nicht gezeigt) weisen jedoch nicht auf eine Rolle von PIST in der Regulation der CALEB/NGC-induzierten Dendritenkomplexität hin.

Um herauszufinden, welcher molekulare Mechanismus für die Regulation der Dendritenkomplexität erforderlich ist, wurde nach intrazellulären Interaktionspartnern für CALEB/NGC gesucht. In von der vorliegenden Arbeit unabhängigen Hefe-2-Hybrid-Screens („Yeast Two-Hybrid“) zur Identifizierung noch unbekannter intrazellulärer Proteine, die an CALEB/NGC binden, wurde B56 β , eine regulatorische Untereinheit der Protein Phosphatase 2A, als Interaktionspartner von CALEB/NGC gefunden. Um hier weitere Erkenntnisse über die Validität dieser Bindung zu gewinnen, wurden verschiedene biochemische und immunozytochemische Assays eingesetzt.

3.3.1 Konstrukte und Proteinexpression

Die biochemische Charakterisierung von der Interaktion zwischen CALEB/NGC und B56 β erfordert die Herstellung rekombinanter Proteine. Die eingesetzten Expressionskonstrukte sollen daher im Folgenden kurz vorgestellt werden. Für die Expression rekombinanter Proteine wurde in dieser Arbeit der Vektor pGEX-6P-1 benutzt. Bei Verwendung dieses Vektors entsteht in prokaryotischen Zellen (*E. coli*, BL21 AI, siehe Material und Methoden, Kapitel 2.1.6.1) ein Fusionsprotein, das N-terminal einen GST-„tag“ trägt, über den sich das Fusionsprotein aufreinigen lässt. Das Konstrukt enthielt, neben der für GST kodierenden, die

für den zytoplasmatischen Teil der humanen längeren Isoform hCALEBb kodierende Sequenz. Es wird im Folgenden als GST-hCALEBb-cyt bezeichnet.

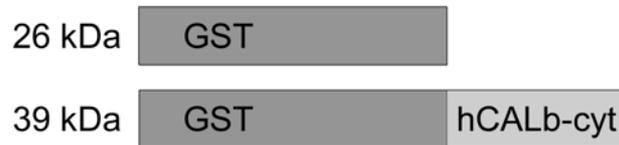


Abbildung 30: Schematische Darstellung der verwendeten rekombinanten Fusionsproteine. „GST-hCALb-cyt“ (ca.39 kDa) und „GST“ (ca. 26 kDa).

3.3.2 Proteinaufreinigung

Das rekombinante Protein wurde bakteriell exprimiert und über den GST-Fusionsanteil aufgereinigt. Es hat eine molare Masse von ca. 39 kDa. Abbildung 31 zeigt das Ergebnis einer SDS-PAGE des aufgereinigten Proteins. GST, im folgenden Experiment als Kontrolle benötigt, wurde mir freundlicherweise von Sascha Johannes zur Verfügung gestellt.

Neben der erwarteten Bande in Höhe von ca. 39 kDa zeigte das Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gel einige weitere Banden, deren Großteil als proteolytische Abbaubanden des Fusionsproteins identifiziert werden konnten. Die erfolgreiche Aufreinigung des rekombinanten GST-hCALb-cyt Fusionsproteins ermöglichte es, die Interaktion mit dem im „Yeast Two-Hybrid“-System gefundenen Interaktionspartner B56 β zu überprüfen und die Wechselwirkung zu charakterisieren.

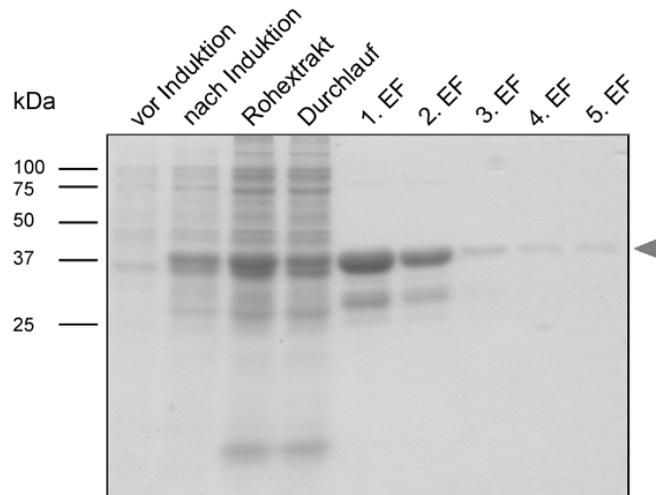


Abbildung 31: Aufreinigung von rekombinalem GST-hCALb-cyt Protein aus *E. coli* Bakterienzellen mittels Glutathion-Sephrose. Gelelektrophoretische Auftrennung des GST-Fusionsproteins und Färbung des SDS-PAA-Gels mit Coomassie Brilliant Blue. Die Elution erfolgte mit L-Glutathion enthaltendem Puffer. Die Pfeilspitze in Höhe von ca. 39 kDa markiert das GST-hCALb-cyt Fusionsprotein. EF = Elutionsfraktion.

3.3.3 Untersuchung der Interaktion von B56 β , einer regulatorischen Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, mit CALEB/NGC im Blot-Overlay-Assay

Zur detaillierteren Analyse der Interaktion von CALEB/NGC und B56 β , die im „Yeast Two-Hybrid“-System gezeigt werden konnte, wurde ein Blot-Overlay-Assay durchgeführt. Dazu wurden gleiche Mengen rekombinanten, gereinigten GST-hCALEBb-cyt Fusionsproteins sowie gereinigten GSTs als Kontrolle in der SDS-PAGE aufgetrennt. Ein SDS-PAA-Gel wurde zu Kontrollzwecken mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, das andere auf Nitrocellulose transferiert. Der Immunblot wurde dann mit der löslichen Fraktion eines detergens-haltigen Extrakts aus HEK293-Zellen inkubiert, die zuvor mit myc-B56 β transfiziert worden waren und dementsprechend rekombinantes B56 β exprimierten. Gebundenes myc-B56 β wurde mit einem primären monoklonalen anti-myc Antikörper, einem sekundären Alkalische-Phosphatase (AP) -gekoppelten Antikörper und einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Die Analyse des SDS-PAA-Gels nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue zeigte eine deutliche Bande von GST-hCALEBb-cyt in Höhe von ca. 39 kDa und eine weitere im Bereich von 26 kDa, bei der es sich um GST handelte. Ein Aliquot des HEK293-Zellextraktes wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und der Immunblot mit einem monoklonalen anti-myc Antikörper als Expressionskontrolle gefärbt.

Die Bande in Höhe von ca. 56 kDa konnte eindeutig der B56 β Untereinheit zugeordnet werden (Abbildung 32A).

Im Blot-Overlay konnte das GST-hCALEBb-cyt Fusionsprotein mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen das myc-Epitop von B56 β indirekt detektiert werden. Erwartungsgemäß konnte keine Bindung von myc-B56 β an GST festgestellt werden. Das Ergebnis dieses Experimentes erbrachte eine Bestätigung der Bindung von B56 β an den intrazellulären Teil von CALEB/NGC.

Aus den „Yeast Two-Hybrid“-Experimenten ging hervor, dass die Bindung von B56 β an CALEB/NGC über die intrazellulären Peptidsegmente A und/oder B erfolgt. Eigene weiterführende Experimente zur Charakterisierung der Bindungsstelle, die in der vorliegenden Arbeit später im Kapitel behandelt werden, bestätigten, dass B56 β an das intrazelluläre Peptidsegment A von CALEB/NGC bindet.

Durch die Verwendung von einem Peptid (rCAL1), das mit CALEB/NGC um die Bindung an B56 β konkurriert, sollte die Spezifität der Bindung von B56 β an das zytoplasmatische Peptidsegment A von CALEB/NGC im Blot-Overlay bestätigt werden. Die Aminosäuresequenz dieses Peptids war abgeleitet worden von der Sequenz des intrazellulären Peptidsegments A von CALEB/NGC (FFAKKLYLLKTENTKLRKT). GST-hCALEBb-cyt sowie GST wurden wiederholt in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine zum einen mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt, zum anderen auf Nitrocellulose transferiert. Das SDS-PAA-Gel nach Anfärbung der Proteine dokumentierte, dass gleiche Proteinmengen analysiert wurden. Der Immunblot wurde mit myc-B56 β -enthaltendem HEK293-Zelllysate inkubiert, dem entweder das Peptid rCAL1 oder aber das Peptid rMas1 zu Kontrollzwecken zugesetzt wurde (Abbildung 32B). Die Sequenz des rMas1-Kontrollpeptids war abgeleitet worden vom COOH-Terminus des Mas1 Protoonkogens der Ratte (NTVSIETVV). Beide Peptide wurden dem Zelllysate in einer Endkonzentration von 2 μ M zugesetzt.

Wie anhand der Abbildung 32B deutlich wird, wurde die Bindung von B56 β an GST-hCALEBb-cyt in der Anwesenheit von rCAL1 inhibiert, nicht jedoch in der Anwesenheit des Kontrollpeptids rMas1. Dieses Ergebnis bestätigte die Arbeitshypothese, dass die Bindung von B56 β an CALEB/NGC im zytoplasmatischen Peptidsegment A stattfindet.

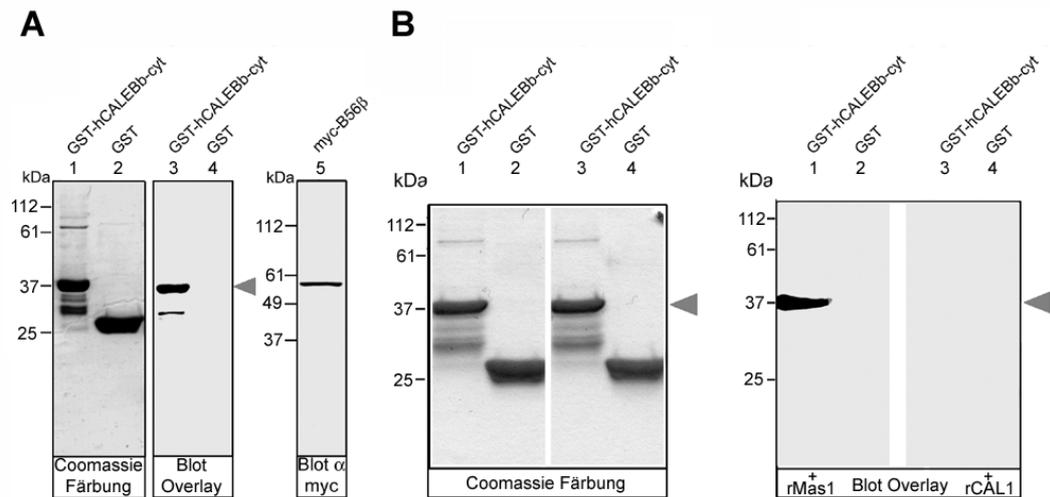


Abbildung 32: Rekombinantes GST-hCALb-cyt bindet im Blot-Overlay-Assay an B56β, eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A. (A) Coomassie Brilliant Blue-gefärbtes SDS-PAA-Gel von bakteriell exprimiertem und gereinigtem GST-hCALb-cyt Fusionsprotein und GST (Spuren 1 und 2). Beide aufgetrennten Proteine wurden dann im Immunblot mit HEK293-Zelllysate überschichtet, der myc-markiertes B56β enthielt. Die Bindung von myc-B56β an GST-hCALb-cyt wurde mit primären monoklonalen anti-myc Antikörpern sowie sekundären AP-gekoppelten Antikörpern sichtbar gemacht. Die Bindung von myc-B56β an GST-hCALb-cyt konnte nachgewiesen werden (Spur 3, Pfeilspitze), nicht jedoch die an GST (Spur 4). Als Expressionskontrolle wurde ein Aliquot des HEK293-Zellextraktes im Immunblot mit primären monoklonalen anti-myc Antikörpern sowie sekundären AP-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen (Spur 5). (B) Coomassie Brilliant Blue-gefärbtes SDS-PAA-Gel von gereinigtem GST (Spuren 2 und 4) und GST-hCALb-cyt Fusionsprotein (Spuren 1 und 3). Diese Proteine wurden wie oben beschrieben mit myc-B56β-enthaltendem HEK293-Zellextrakt in Anwesenheit des Kontrollpeptids rMas1 (Spuren 1 und 2) oder in Anwesenheit des Kompetitorpeptids rCAL1 (Spuren 3 und 4) inkubiert. Beide Peptide wurden dem Zellextrakt in einer Endkonzentration von 2 μ M zugesetzt. Die Bindung von myc-B56β wurde wie oben beschrieben visualisiert. In Anwesenheit des Kompetitorpeptids konnte keine Bindung von myc-B56β an GST-hCALb-cyt detektiert werden (rechts, Pfeilspitze).

3.3.4 Analyse der Assoziation von B56β mit CALEB/NGC in HEK293-Zellen

Um die Interaktion von B56β und CALEB/NGC in Zellen gezielter zu untersuchen, wurden Koimmunpräzipitationen aus transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Mit dieser Technik können Protein-Protein-Wechselwirkungen, die in Zellen stattfinden, untersucht werden. Zur Untersuchung der B56β-CALEB/NGC- Interaktion wurden B56β und PR55 γ im pHA-CMV Expressionsvektor sowie mCALEBb im p3xFLAG-myc-CMVTM-25 Expressionsvektor in HEK293-Zellen transfiziert, die Zellen nach 24-36 h Expressionszeit aufgeschlossen und die Koimmunpräzipitation wie in Material und Methoden, Kapitel 2.2.2.8 beschrieben

durchgeführt. Während B56 β zur B'-Familie gehört, ist PR55 γ ein Mitglied aus der B-Familie regulatorischer Untereinheiten der PP2A. PR55 γ diente in diesem Experiment als Negativkontrolle für die Spezifität der Bindung von B56 β und CALEB/NGC.

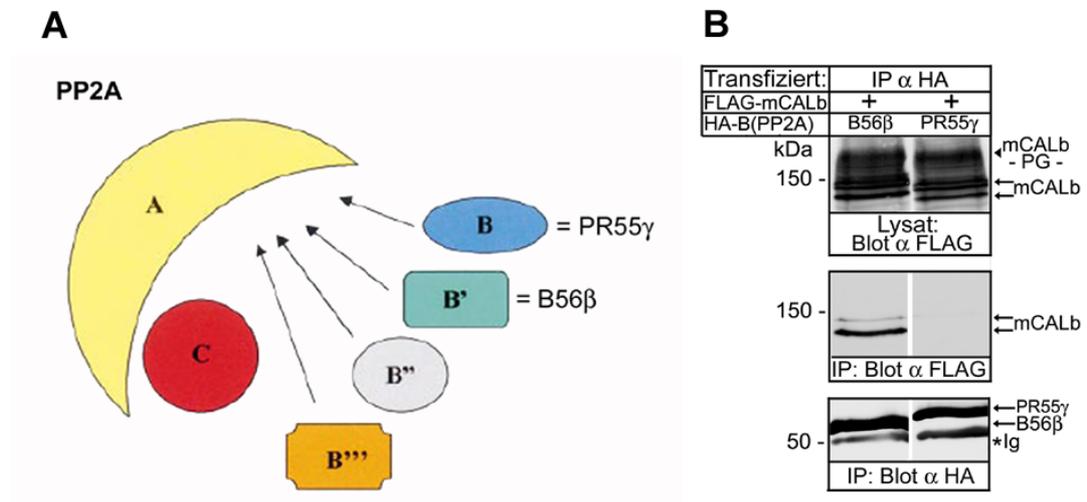


Abbildung 33: B56 β bindet an CALEB/NGC in HEK293-Zellen. (A) Schematische Darstellung der PP2A mit Hervorhebung der regulatorischen Untereinheiten B56 β und PR55 γ (modifiziert nach Janssens und Goris, 2001). (B) B56 β und PR55 γ , versehen mit einem HA-„tag“ (HA-B (PP2A) B56 β oder PR55 γ), wurden zusammen mit mCALEBb, das mit einem FLAG-„tag“ versehen war (FLAG-mCALb), transient in HEK293-Zellen transfiziert. Von den Zellen exprimiertes B56 β und PR55 γ wurde dann mit einem monoklonalen anti-HA Antikörper immunpräzipitiert (IP α HA). Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Präzipitierte und koimmunpräzipitierte Proteine wurden dann im Immunblot mit primären monoklonalen anti-HA (Blot α HA) und monoklonalen anti-FLAG Antikörpern (Blot α FLAG) sowie sekundären AP-gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Als Expressionskontrolle für FLAG-markiertes mCALEBb wurde ein Aliquot des Lysates im Immunblot mit einem anti-FLAG Antikörper nachgewiesen (Lysat: Blot α FLAG). mCALEBb konnte mit B56 β koimmunpräzipitiert werden, nicht jedoch mit PR55 γ . mCALb, mCALEBb; mCALb-PG, Proteoglykan-Variante von mCALEBb; *Ig, Schwere Kette des für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers.

Es war möglich, nach Präzipitation von HA-B56 β mit einem monoklonalen Antikörper gegen den HA-„tag“ FLAG-markiertes mCALEBb als Kopräzipitat mit einem monoklonalen anti-FLAG Antikörper nachzuweisen. FLAG-mCALEBb konnte jedoch nicht mit HA-PR55 γ kopräzipitiert werden, obwohl HA-PR55 γ mit dem anti-HA Antikörper präzipitiert werden konnte (wie Abbildung 33 deutlich zeigt) und mCALEBb im Lysat nachgewiesen wurde. Die verwendeten Antikörper zeigten in keinem Fall eine Kreuzreaktion mit dem jeweils anderen Affinitäts-„tag“ und keines der exprimierten Proteine wurde unspezifisch präzipitiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in transfizierten HEK293-Zellen B56 β , eine regulatorische Untereinheit der PP2A, im Komplex mit CALEB/NGC nachgewiesen werden konnte.

3.3.5 Charakterisierung der Interaktionsstelle von B56 β mit CALEB/NGC

Um die Interaktion zwischen B56 β und CALEB/NGC genauer zu untersuchen, war es wichtig, die Bindungsregion weiter zu charakterisieren. Die Ergebnisse aus den „Yeast Two-Hybrid“-Experimenten und den Blot-Overlay-Experimenten haben gezeigt, dass die intrazellulären Peptidsegmente A und/oder B von CALEB/NGC die Bindung an die B56 β vermitteln, und das Peptidsegment A notwendig ist. Ausgehend von dieser Situation wurden Koimmunpräzipitationen aus transfizierten HEK293-Zellen mit den vorher bereits in Kapitel 3.1.6 beschriebenen mCALEBb-Deletionskonstrukten „400“ und „388“ durchgeführt, um die Interaktionsstelle in einem zellulären System präzise zu kartieren. Während das Konstrukt „388“ den vollen extrazellulären Teil von mCALEBb sowie das Peptidsegment A intrazellulär enthält, umfaßt das Konstrukt „400“ zusätzlich das Peptidsegment B, wie bereits beschrieben wurde (Kapitel 3.1.6). Die beiden Konstrukte wurden ebenfalls im p3xFLAG-myc-CMVTM-25 Expressionsvektor zusammen mit B56 β im pHA-CMV Expressionsvektor in HEK293-Zellen transfiziert, die Zellen nach 24–36 h aufgeschlossen und die Koimmunpräzipitation, wie in Kapitel 2.2.2.8 beschrieben, durchgeführt. Nach Präzipitation von HA-markiertem B56 β mit dem anti-HA Antikörper konnten sowohl FLAG-markiertes Konstrukt „400“ als auch FLAG-markiertes Konstrukt „388“ im Präzipitat nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindungsstelle für B56 β in dem juxtamembranären Peptidsegment A von CALEB/NGC lokalisiert ist.

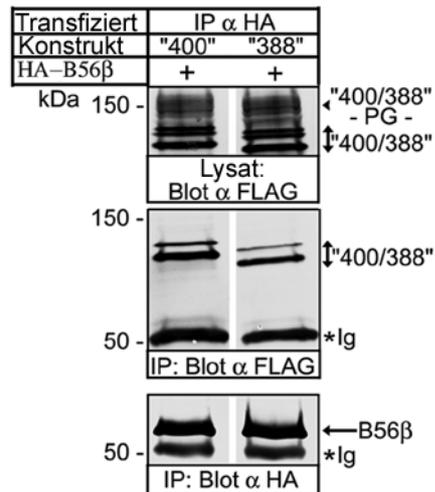


Abbildung 34: B56 β bindet an mCALEBb-Deletionskonstrukte in HEK293-Zellen.

HA-markiertes B56 β wurde zusammen mit den mCALEBb-Deletionskonstrukten „388“ oder „400“, die mit einem FLAG-„tag“ versehen waren, transient in HEK293-Zellen transfiziert. Exprimiertes B56 β Protein wurde dann mit einem monoklonalen anti-HA Antikörper immunpräzipitiert (IP α HA). Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Präzipitierte und koimmunpräzipitierte Proteine wurden dann im Immunblot mit primären monoklonalen anti-HA (Blot α HA) und monoklonalen anti-FLAG Antikörpern (Blot α FLAG) sowie sekundären AP-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen. Als Expressionskontrolle für die Konstrukte „388“ und „400“ wurde ein Aliquot der Lysate im Immunblot mit einem anti-FLAG Antikörper nachgewiesen (Lysat: Blot α FLAG). Beide mCALEBb-Deletionskonstrukte, „388“ und „400“, konnten mit B56 β koimmunpräzipitiert werden. „400/388“-PG, Proteoglykan Variante von mCALEBb-Deletionskonstrukten; *Ig, Schwere Kette des für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers.

Um weiter abzusichern, dass die B56 β -Bindungsstelle im Peptidsegment A von CALEB/NGC lokalisiert ist, wurde das rCAL1-Peptid, das im Kapitel vorher bereits beschrieben worden ist, eingesetzt (Abbildung 35A). rCAL1 wurde an NHS-aktivierte Sepharose immobilisiert, um mit dem immobilisierten Peptid dann Präzipitationen aus Zellextrakten durchführen zu können. Als Kontrolle diente hierbei das ebenfalls bereits beschriebene rMas1-Peptid (Abbildung 35B). Mit Hilfe des rCAL1-Peptids (P-rCAL1) konnte B56 β aus dem Zelllysate HA-B56 β exprimierender HEK293-Zellen präzipitiert werden. Bei der Präzipitation mit rMas1(P-rMas1) konnte hingegen B56 β nicht im Präzipitat nachgewiesen werden. Ein Aliquot des Lysates wurde als Expressionskontrolle von HA-B56 β mit anti-HA Antikörper verwendet (Abbildung 35C).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass B56 β an das juxtamembranäre Peptidsegment A von CALEB/NGC bindet.

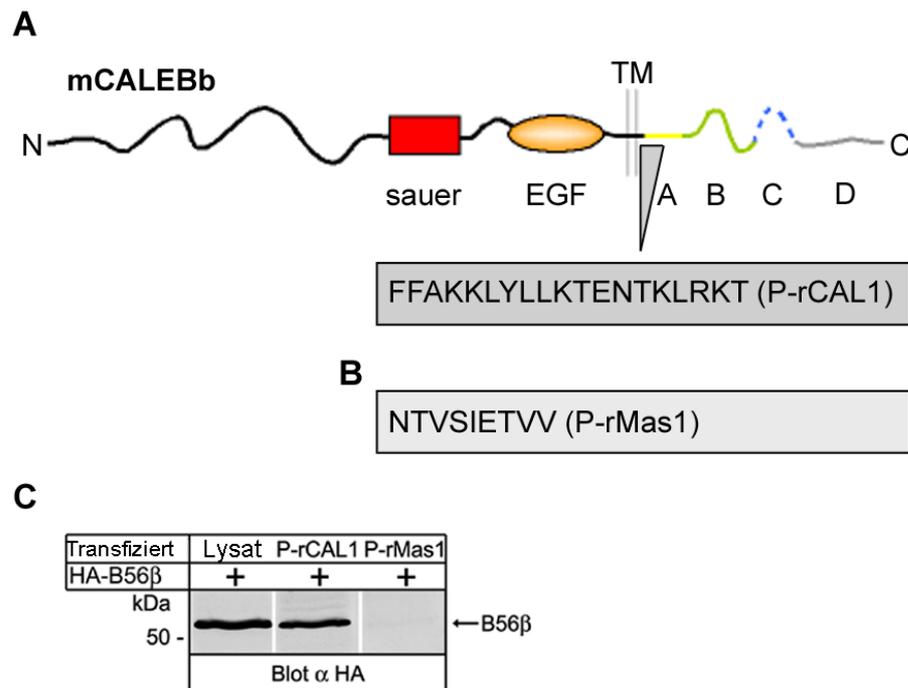


Abbildung 35: Untersuchung der Interaktion von B56β mit CALEB/NGC mit rCAL1-Peptid. (A) Schematische Darstellung des verwendeten rCAL1-Peptids (P-rCAL1). Die Sequenz stammt aus der Aminosäuresequenz des zytoplasmatischen Peptidsegments A von mCALEBb, die Kontrollsequenz (B) des rMas1-Peptids (P-rMas1) stammt vom COOH-Terminus des Mas1 Protoonkogens der Ratte. (C) B56β, mit einem HA-„tag“ versehen, wurde transient in HEK293-Zellen transfiziert. Zellextrakt mit exprimiertem HA-B56β wurde dann mit an NHS-aktivierter Sepharose immobilisiertem rCAL1 (P-rCAL1) - bzw. rMas1 (P-rMas1) -Peptid zusammengegeben. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Präzipitierte Proteine wurden dann im Immunblot mit einem monoklonalen anti-HA Antikörper nachgewiesen. Ein Aliquot des Lysates wurde als Expressionskontrolle für HA-B56β benutzt. Das immobilisierte Peptid rCAL1 konnte B56β aus transfizierten Zellen präzipitieren, nicht jedoch das Kontrollpeptid rMas1 (Blot α HA).

3.3.6 B56β interagiert mit CALEB/NGC *in vivo*

Eine wichtige Frage war, ob sich die in überexprimierenden Zellen gezeigte Interaktion von B56β und CALEB/NGC auch *in vivo* in neuronalem Gewebe bestätigen lassen würde. Daher wurden auch hier Immunpräzipitationen durchgeführt, um den B56β-CALEB/NGC-Komplex im Rattenhirn nachzuweisen. Als Ausgangsmaterial diente eine Membranpräparation aus Gehirn von P16 Ratten, die in Kapitel 2.2.2.7 ausführlich beschrieben worden ist. Hintergrund für die Wahl des Ausgangsmaterials war die Überlegung, dass CALEB/NGC, nicht aber B56β ein Transmembranprotein ist. Sollte B56β *in vivo* mit CALEB/NGC interagieren, so ist davon auszugehen, dass es möglich ist, beide Proteine aus einer solubilisierten Membranfraktion zu

präzipitieren. Die solubilisierte Membranfraktion wurde für die Immunpräzipitation entweder mit affinitäts-gereinigtem polyklonalen anti-B56 β Antikörper oder mit einem polyklonalen anti-FLAG Antikörper als Negativkontrolle inkubiert. Mittels EZview™ red protein A Affinitätsmatrix konnten die Antikörper sedimentiert und die präzipitierten Proteine nach Auftrennung in der SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulose im Immunblot mit einem monoklonalen anti-CALEB/NGC Antikörper bzw. einem polyklonalen anti-B56 β Antikörper analysiert werden.

Wie in dem Immunblot zu erkennen ist, konnte B56 β mit dem affinitäts-gereinigten polyklonalen anti-B56 β Antikörper aus der Membranfraktion präzipitiert werden (IP α B56 β), jedoch nicht mit dem polyklonalen Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Abbildung 36). Nur im B56 β -enthaltenden Präzipitat konnte koimmunpräzipitiertes CALEB/NGC gefunden werden. Aufgrund der gezeigten Resultate kann eine Interaktion von B56 β und CALEB/NGC *in vivo* bestätigt werden.

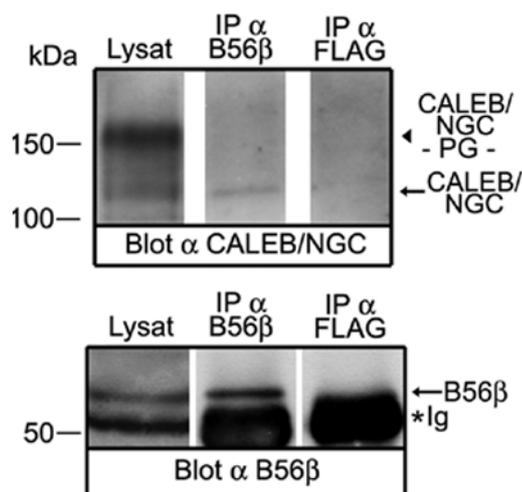


Abbildung 36: B56 β und CALEB/NGC interagieren *in vivo*. Solubilisierte Membranfraktionen von postnatalen Rattenhirnen (P16) wurden zur Immunpräzipitation entweder mit polyklonalen affinitäts-gereinigten anti-B56 β Antikörpern (IP α B56 β) oder mit polyklonalen anti-FLAG Antikörpern (IP α FLAG), Negativkontrolle, inkubiert. B56 β wurde mit anti-B56 β Antikörpern, nicht jedoch mit anti-FLAG Antikörpern (Blot α B56 β , Pfeil) präzipitiert. CALEB/NGC konnte mit B56 β in der IP α B56 β , aber nicht in der IP α FLAG ko-präzipitiert werden (Blot α CALEB/NGC, Pfeil). CALEB/NGC-PG, Proteoglykan-Variante von CALEB/NGC; *Ig, Schwere Kette des für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers.

3.4 Funktionsanalyse der Interaktion von B56 β und CALEB/NGC in primären Neuronen

3.4.1 B56 β kolokalisiert mit CALEB/NGC in den Dendriten primärer Neurone

Die anfängliche Intention bei den „Yeast Two-Hybrid“-Experimenten war es, neue intrazelluläre Interaktionspartner von CALEB/NGC zu identifizieren, die in die durch CALEB/NGC stimulierte Signaltransduktion hin zu erhöhter Dendritenkomplexität involviert sind. Nachdem die Validität der Interaktion von B56 β und CALEB/NGC in der vorliegenden Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden konnte, war es von großem Interesse zu überprüfen, ob B56 β eine Funktion im Prozess der von CALEB/NGC-stimulierten Dendritenkomplexität hat. Um erste Einblicke zu gewinnen, wurde zunächst die endogene Expression von B56 β mit dem Expressionsmuster von CALEB/NGC in primären hippocampalen Neuronen verglichen. Diese wurden an DIV13 fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen anti-CALEB/NGC (Mab anti-NGC) Antikörper sowie einem polyklonalen anti-B56 β Antikörper gefärbt, um die endogene Expression beider Proteine sichtbar zu machen. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergab, dass B56 β (neben dem Soma) auch in einzelnen diskreten punktuellen Anreicherungen („Spots“) auf den größeren Dendriten exprimiert wird. Konfokale Aufnahmen von B56 β -CALEB/NGC-Doppelimmunfluoreszenzen zeigten eine deutliche Kolokalisation von endogenem B56 β und endogenem CALEB/NGC in diesen Spots, die überdies oftmals an dendritischen Verzweigungspunkten erkennbar waren. Interessanterweise wurde in den Dendriten eine Membran-assoziierte Lokalisation der regulatorischen Untereinheit B56 β deutlich, wie Abbildung 37 zeigt, obwohl B56 β kein Transmembranprotein ist. Das könnte auch auf eine Interaktion mit dem Transmembranprotein CALEB/NGC hindeuten. Festzuhalten ist, dass die PP2A-Untereinheit B56 β aufgrund ihrer endogenen Expression in Signalwege eingebunden sein könnte, die für die Dendritendifferenzierung notwendig sind.

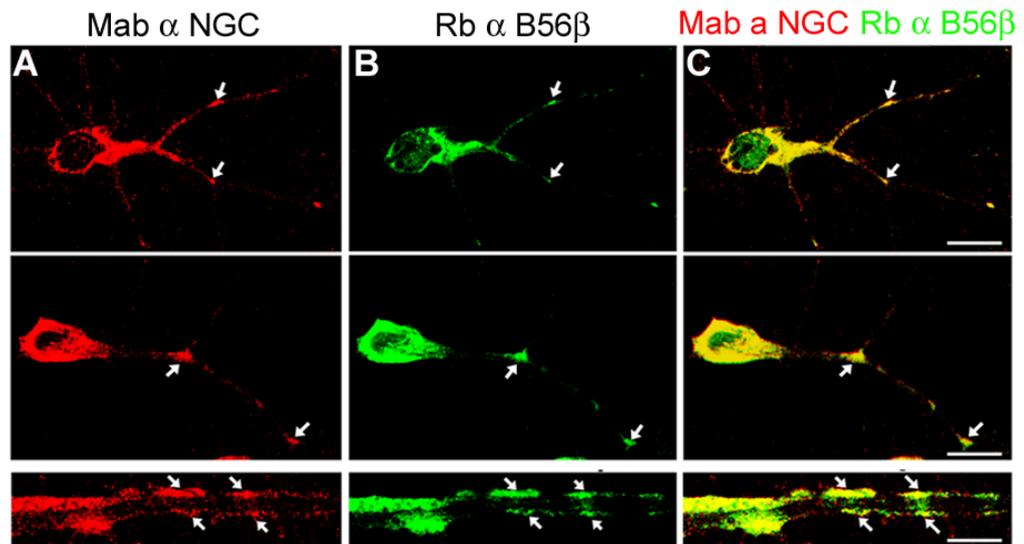


Abbildung 37: B56β kolokalisiert mit CALEB/NGC in primären Neuronen. Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung der Kolokalisation von B56β und CALEB/NGC in primären hippocampalen Neuronen. Primäre hippocampale Neurone wurden an DIV 13 mit (A) monoklonalen anti-CALEB/NGC Antikörpern (Mab α NGC, rot) und (B) polyklonalen anti-B56β Antikörpern (Rb α B56β, grün) gefärbt. (C) Überlagerung beider Immunfärbungen. Dargestellt sind zwei Beispiele von Neuronen (oben und Mitte). Vergrößerung eines Dendritenabschnitts (unten). Die Pfeile zeigen die Kolokalisationsstellen von CALEB/NGC und B56β in den Dendriten. Balken = 10 μ m (oben und Mitte) und 4 μ m (unten).

3.4.2 Die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität wird durch B56β inhibiert

Es konnte eine Kolokalisation von B56β mit CALEB/NGC in den Dendriten primärer hippocampaler Neurone in Kultur gezeigt werden. Zudem wurde demonstriert, dass der von CALEB/NGC-induzierte Effekt auf die Erhöhung dendritischer Verzweigungen von aktivem Akt abhängig ist (Kapitel 3.2.2). Da außerdem aus der Literatur bekannt war, dass die B56β-enthaltende PP2A Akt dephosphorylieren und dabei inaktivieren kann (Rocher et al., 2007), stellte sich die Frage, ob B56β mit der von CALEB/NGC stimulierten Dendritenkomplexität interferieren könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurden primäre hippocampale Neurone an DIV12 mit mCALEBb im p3xFLAG-myc-CMVTM-25 Expressionsvektor und B56β im pCMV-HA Expressionsvektor kotransfiziert und zwei Tage später, nach Fixierung, Permeabilisierung und Färbung, durch Auszählen der dendritischen Endverzweigungen (TNDET) analysiert. Als Kontrolle dienten Neurone, die entweder mCALEBb und EGFP, EGFP und B56β, mCALEBb und PR55 γ oder aber EGFP und PR55 γ koexprimierten.

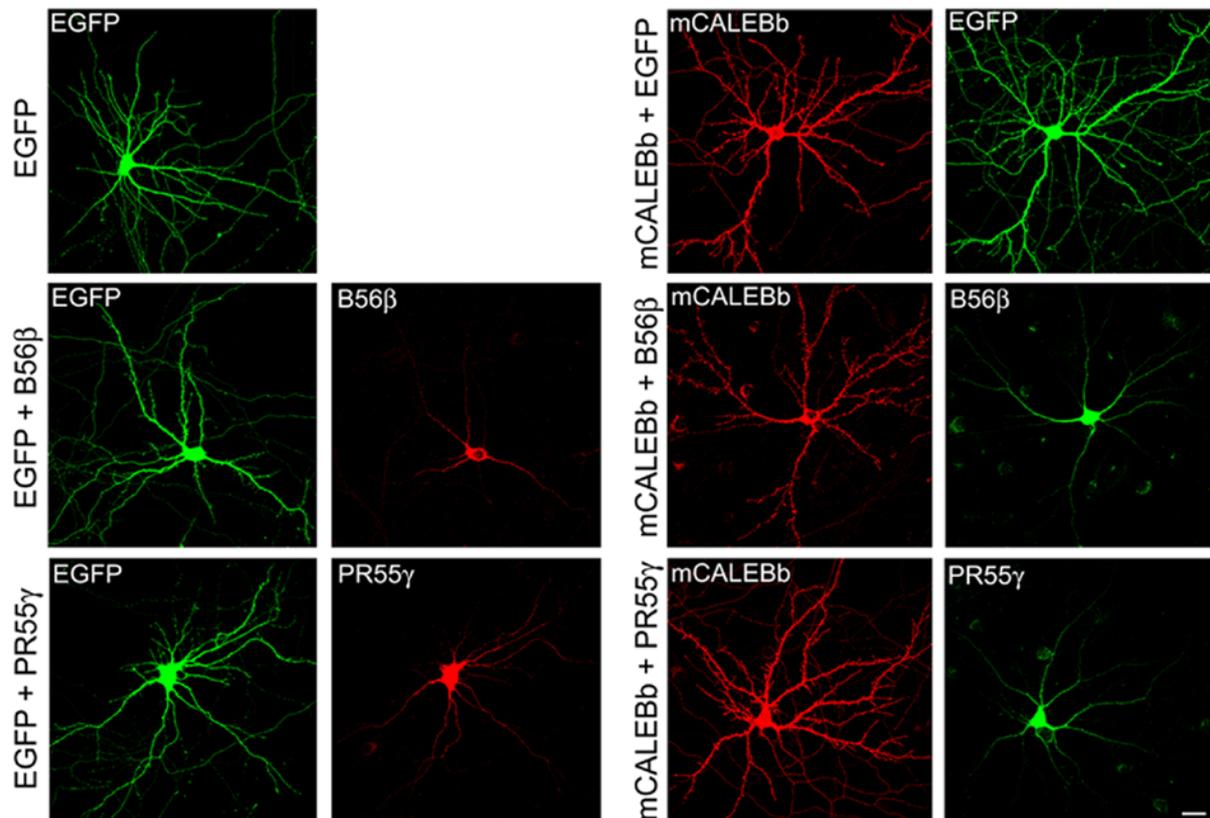


Abbildung 38: Die CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität wird durch B56β inhibiert.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung hippocampaler Neurone, die an DIV12 folgendermaßen transfiziert bzw. kotransfiziert wurden: EGFP, EGFP+B56β, EGFP+PR55γ, mCALEBb+EGFP, mCALEBb+B56β und mCALEBb+PR55γ. B56β und PR55γ waren mit einem HA-„tag“ versehen und wurden mit anti-HA Antikörpern nachgewiesen. EGFP und mCALEBb wurden mit anti-GFP sowie anti-FLAG Antikörpern visualisiert. Darstellung repräsentativer Neurone pro Bedingung. Balken = 10 μm.

Verglichen mit Neuronen, welche mCALEBb und EGFP koexprimierten, zeigten solche, die mCALEBb und B56β koexprimierten, eine verringerte Anzahl dendritischer Verzweigungen und somit auch eine reduzierte Dendritenkomplexität (Abbildung 38). Die TNET war im Vergleich zu den Kontrollzellen (mCALEBb und EGFP) signifikant geringer in Neuronen, die mCALEBb und B56β koexprimierten. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den Neuronen, die EGFP und B56β koexprimierten (Abbildung 39). Um die Spezifität des negativen Einflusses von B56β auf die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität zu überprüfen, wurden mCALEBb und PR55γ bzw. EGFP und PR55γ koexprimiert und die TNET bestimmt. Obwohl PR55γ ebenfalls zur Familie der regulatorischen Untereinheiten der PP2A zählt, zeigte sich, dass PR55γ die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenverzweigung nicht inhibiert (TNET: $28,6 \pm 1,3$ für EGFP, $34,1 \pm 1,6$ für mCALEBb + EGFP, $26,4 \pm 1,5$ für

EGFP + B56 β , $26,0 \pm 1,1$ für mCALEBb + B56 β , $29,2 \pm 1,4$ für EGFP + PR55 γ und $36,4 \pm 1,8$ für mCALEBb + PR55 γ).

Zusammengefasst deuten die erzielten Resultate auf eine spezifische Inhibierung der CALEB/NGC-vermittelten Dendritenkomplexität durch B56 β hin.

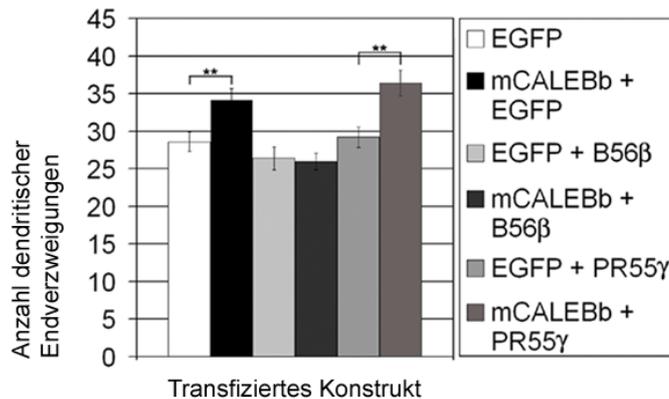


Abbildung 39: Auswertung der Untersuchung des Einflusses von B56 β auf die CALEB/NGC-induzierte Dendritenkomplexität. Darstellung der Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen von Neuronen, die folgendermaßen transfiziert bzw. ko-transfiziert wurden: EGFP, EGFP+B56 β , EGFP+PR55 γ , mCALEBb+EGFP, mCALEBb+B56 β und mCALEBb+PR55 γ , n = 40, **p < 0,01. Die Koexpression von B56 β , aber nicht PR55 γ , inhibierte die durch CALEB/NGC-induzierte Erhöhung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen. Der Fehlerbalken stellt den Standardfehler dar.

3.4.3 Die CALEB/NGC-induzierte Phosphorylierung von dendritischem Akt wird durch B56 β inhibiert

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass die Stimulation der Dendritenkomplexität durch CALEB/NGC von aktivem Akt abhängig ist, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass CALEB/NGC in der Lage sein könnte, die Phosphorylierung der Aminosäure Ser-473 von Akt zu stimulieren. Aus der Literatur war bekannt, dass die Phosphorylierung von Ser-473 zur Aktivierung von Akt beiträgt (Alessi et al., 1996). Von besonderem Interesse war daher die Untersuchung der Menge an phosphoryliertem Akt in hippocampalen Neuronen, welche EGFP, mCALEBb und EGFP, EGFP und B56 β sowie mCALEBb und B56 β exprimierten. Dazu wurden die Neurone mit den entsprechenden Konstrukten an DIV12 transfiziert, fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen anti-phospho-Akt Antikörper

gefärbt, um phosphoryliertes Akt nachzuweisen. Die Spezifität dieses Antikörpers ist in Abbildung 40 gezeigt.

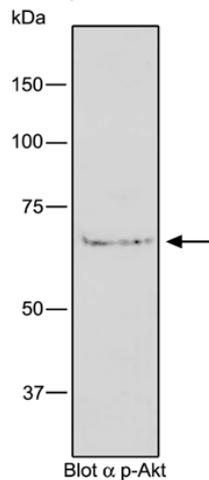


Abbildung 40: Spezifitätsnachweis des verwendeten anti-Phospho-Akt Antikörpers im Immunblot. Detergens-haltige Extrakte hippocampaler Neurone an DIV7 wurden im Immunblot mit dem angegebenen Antikörper inkubiert und analysiert. Der Antikörper erkennt eindeutig eine Bande, die in Höhe von phosphoryliertem Akt (ca. 60 kDa) läuft. Es sind keine unspezifischen Banden im Blot erkennbar.

Eine quantitative Analyse des Phospho-Akt-spezifischen Immunfluoreszenzsignals von Dendriten dieser transfizierten Neurone erfolgte mit Hilfe des Programms Metamorph. Das Ergebnis dieser Quantifizierung zeigte, dass Neurone, die mCALEBb und EGFP koexprimierten, eine signifikant höhere Menge an phosphoryliertem Akt in den Dendriten aufweisen als solche, die EGFP alleine überexprimierten.

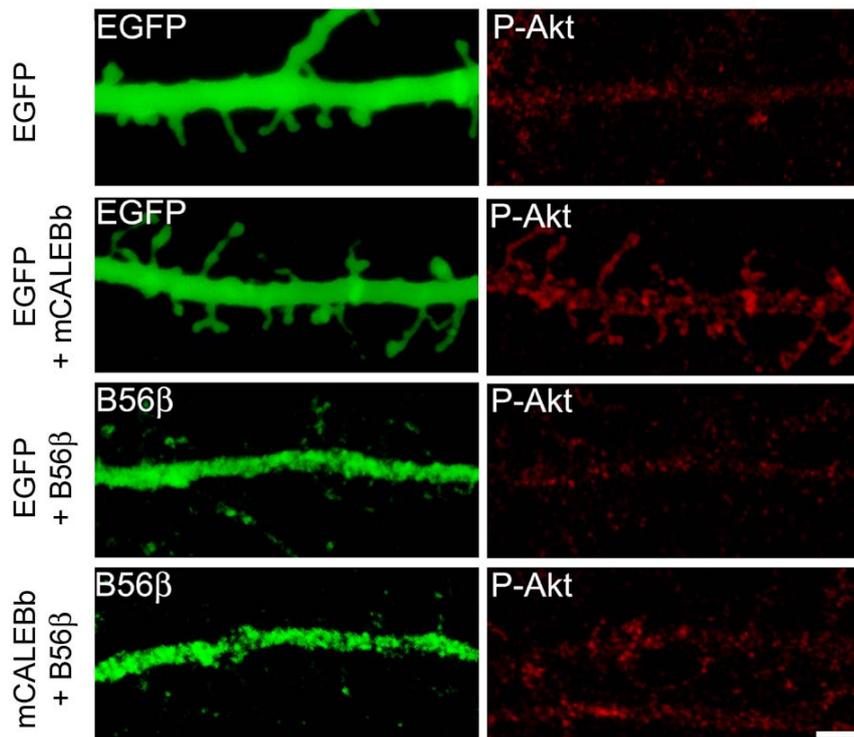


Abbildung 41: CALEB/NGC-induzierte Phosphorylierung von dendritischem Akt wird durch B56β inhibiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EGFP- bzw. HA-B56β oder Phospho-Akt-Färbungen von Dendriten hippocampaler Neurone. Diese wurden an DIV12 mit den folgenden Plasmiden transfiziert bzw. kotransfiziert: EGFP, EGFP+mCALEBb, EGFP+B56β und mCALEBb+B56β. Die Analyse erfolgte nach Färbung mit einem (A) anti-GFP bzw. anti-HA Antikörper (grün) oder (B) anti-Phospho-Akt Antikörper (rot). Balken = 2 µm.

Die Koexpression von B56β und mCALEBb inhibierte die von CALEB/NGC stimulierte Phosphorylierung von Akt, die Fluoreszenzintensität liegt im gleichen Bereich wie die der EGFP-exprimierenden Zellen (normalisierte Durchschnittswerte: $100 \pm 5,9$ für EGFP, $133 \pm 0,5$ für EGFP und mCALEBb, $102 \pm 4,3$ für EGFP ± B56β, sowie $104 \pm 4,8$ für mCALEBb und B56β). Diese Ergebnisse zeigten, dass CALEB/NGC die Phosphorylierung von Akt an der Aminosäure Ser-473 stimuliert und diese Phosphorylierung durch B56β blockiert werden kann.

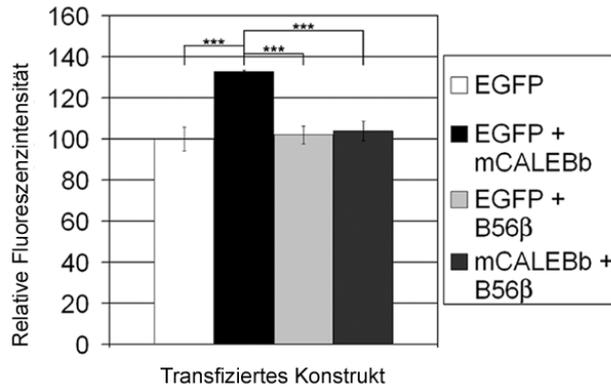


Abbildung 42: Auswertung der Untersuchung des Einflusses von B56β auf die CALEB/NGC-induzierte Phosphorylierung von dendritischem Akt. Darstellung der Quantifizierung relativer Fluoreszenzintensitäten von Phospho-Akt-Färbungen in Dendriten hippocampaler Neurone. Diese wurden an DIV12 mit den folgenden Plasmiden transfiziert bzw. kotransfiziert: EGFP, EGFP+mCALEBb, EGFP+B56β und mCALEBb+B56β. Die Analyse der Fluoreszenzintensitäten erfolgte an DIV12+2 nach Färbung der Zellen mit anti-Phospho-Akt Antikörpern (rot), $n = 26$, $***p < 0,001$. Die Koexpression von B56β mit mCALEBb interferiert mit der durch CALEB/NGC stimulierten Phosphorylierung von Akt. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an.

3.5 Das Punktmutationskonstrukt mCALEBb-T452A ist nicht in der Lage, Dendritenkomplexität zu stimulieren

Unklar war jedoch, ob B56β die CALEB/NGC-induzierte Phosphorylierung von Akt über PP2A-vermittelte direkte Dephosphorylierung von Akt oder über direkte Blockierung von CALEB/NGC reguliert. CALEB/NGC enthält mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen (Ser oder Thr) in den intrazellulären Peptidsegmenten A und B, die als Akzeptorstellen für Phosphat fungieren könnten (Programm NetPhos). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Peptidsegmente A und B für die von CALEB/NGC vermittelte Dendritenkomplexität von großer Bedeutung sind. Es stellte sich daher die Frage, ob B56β molekular an den Phosphorylierungsstellen von CALEB/NGC angreift und die daraus resultierende Dephosphorylierung einen Einfluss auf die von CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität ausübt. Eine Methode, dieses experimentell zu überprüfen, ist die Einführung von Punktmutationen an potentiell phosphorylierbaren Aminosäuren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Phosphopunktmutations-Konstrukte mCALEB-T452A und mCALEBb-T452E entsprechen der kodierenden Sequenz von mCALEBb. Ein Unterschied besteht jedoch darin, dass im Peptidsegment A, der nach den biochemischen Analysen mutmaßlichen Bindungsstelle von B56β an CALEB/NGC, ein Aminosäureaustausch des

Threonin 452 zu Alanin (T452A) bzw. zu Glutamat (T452E) stattgefunden hat. Die Mutante T452A, bei der Threoninrest 452 zu Alanin mutiert wurde, simuliert das dephosphorylierte Threonin, und kann nicht mehr phosphoryliert werden. Durch die Einführung einer Mutation in Form von Glutamin (T452E) wird eine permanente Phosphorylierung simuliert.

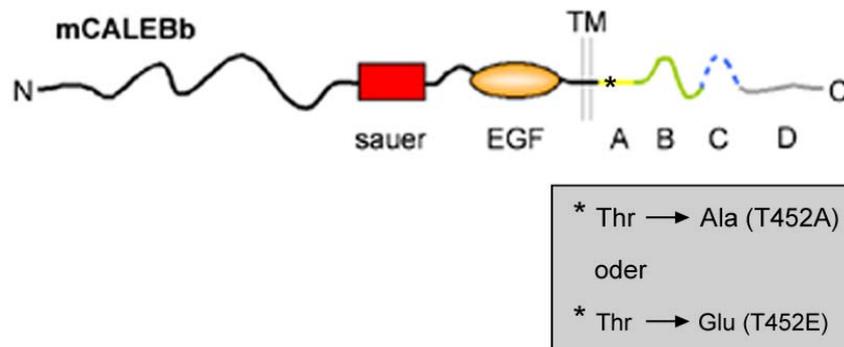


Abbildung 43: Schematische Darstellung der verwendeten Phosphomutationskonstrukte von CALEB/NGC. Die Konstrukte mCALEBb-T452A und mCALEBb-T452E entsprechen der kodierenden Sequenz von mCALEBb mit dem Unterschied, dass im Peptidsegment A ein Aminosäureaustausch des Threonin 452 zu Alanin (T452A) bzw. zu Glutamat (T452E) stattgefunden hat. Mit diesen Mutationen werden eine permanente Phosphorylierung (T452E) bzw. Dephosphorylierung (T452A) simuliert.

Um zu untersuchen, ob die Mutationen am Threonin 452 die von CALEB/NGC stimulierte Dendritenkomplexität beeinflusst, wurden die entsprechenden Phosphomutationskonstrukte, die entweder eine Phosphorylierung oder eine Dephosphorylierung der Aminosäure 452 simulieren, in primäre hippocampale Neurone an DIV12 mit EGFP kotransfiziert. Die so transfizierten Zellen wurden dann nach zwei Tagen in Kultur fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen FLAG bzw. EGFP gefärbt.

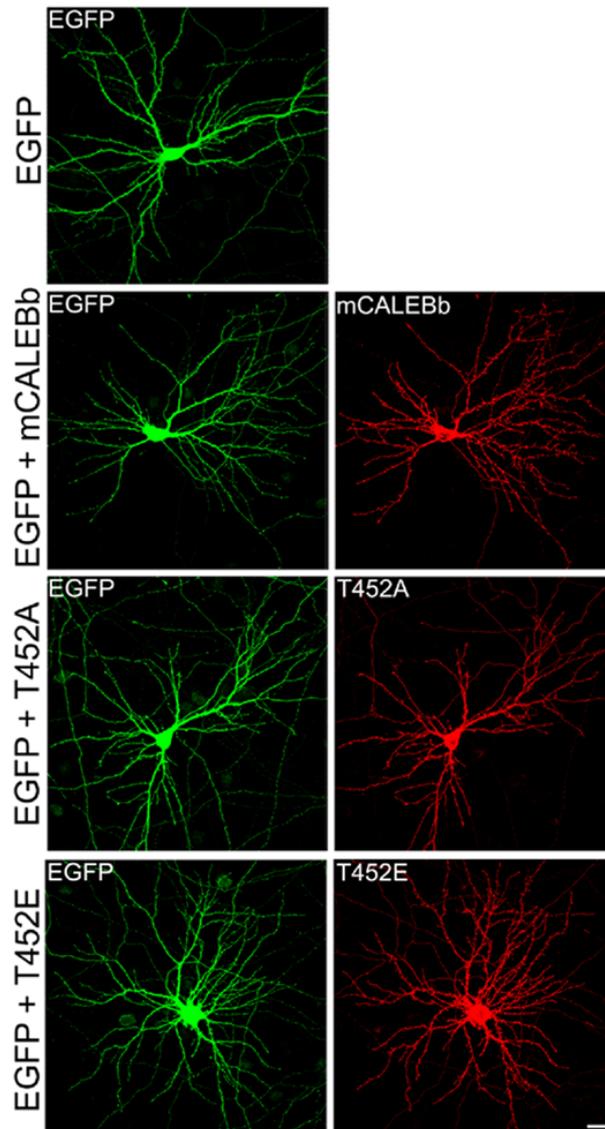


Abbildung 44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von hippocampalen Neuronen, die mit den CALEB/NGC-Phosphomutanten T452A und T452E transfiziert worden sind. Hippocampale Neurone wurden an DIV12 mit den folgenden Plasmiden transfiziert bzw. kotransfiziert: EGFP, EGFP+mCALEBb, EGFP+T452A und EGFP+T452E. Die Zellen wurden mit anti-GFP (grün) bzw. anti-FLAG Antikörpern (rot) gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Neurone für jede Bedingung. Balken = 10 µm.

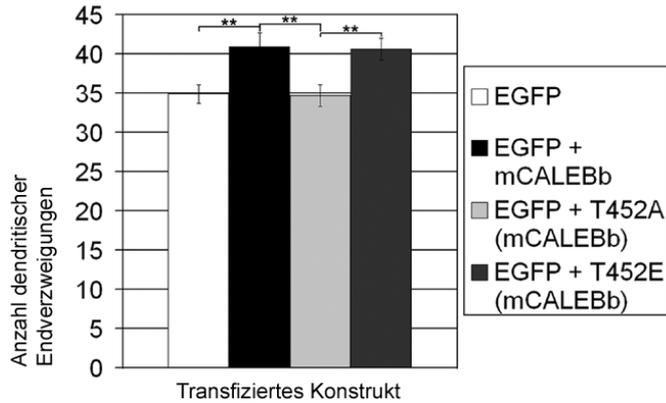


Abbildung 45: Untersuchung der Phosphomutanten mCALEBb-T452A und mCALEBb-T452E im Hinblick auf CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität. Darstellung der Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen nach Transfektion hippocampaler Neurone mit EGFP, EGFP+mCALEBb, EGFP+T452A und EGFP+T452E. Koexpression von T452E und EGFP, aber nicht von T452A und EGFP, führt zu einer erhöhten Dendritenkomplexität im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Neuronen, $n = 40$, $**p < 0,01$. Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Obwohl das Expressionsmuster des Konstruktes mit der Punktmutation T452A dem von mCALEBb in den Dendriten gleicht, konnte es die Dendritenkomplexität nicht wie mCALEBb stimulieren. Die Anzahl der dendritischen Verzweigungen lag signifikant unter der von mCALEBb-exprimierenden Neuronen im Bereich der EGFP-exprimierenden Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu stimulierte das Konstrukt mit der Mutation T452E die Dendritenkomplexität im gleichen Maße wie mCALEBb. Diese Ergebnisse deuten an, dass eine Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 452 wichtig für CALEB/NGC-induzierte Dendritenkomplexität sein könnte.

4 Diskussion

Wachstumsfaktoren und ihre assoziierten Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) sind wichtige Faktoren für die verschiedensten neuronalen Funktionen wie neuronale Polarisierung, Neuritenwachstum und Dendritenreifung während der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS). Die Dendritenmorphogenese hat einen bedeutenden Einfluss auf die Bildung neuronaler Schaltkreise. Die unterschiedliche Ausprägung von Verzweigungen der Dendritenbäume korreliert mit Anzahl und Verteilung synaptischer Eingänge, die von den Neuronen erhalten und integriert werden. Nach dem momentanen Wissensstand ist jedoch über die molekularen Mechanismen, die über das Dendritenwachstum hinaus zur Dendritenbaumkomplexität führen, noch nicht viel bekannt, sie sind jedoch Gegenstand intensiver Forschung. Morphologische Veränderungen eines Neurons resultieren aus Umstrukturierungen des Zytoskeletts. Sie dienen unter anderem der Ausbildung von Dendriten und Synapsen während der Ontogenese, sind aber auch Voraussetzung für die synaptische Plastizität von Synapsen.

Hinweise auf die neuronale Funktion von CALEB/NGC in der Dendritogenese lassen sich aus seiner gehirnspezifischen Expression in dendriten- und synapsenreichen Arealen der Retina und des Cerebellums im Huhn und in Nagern sowie aus früheren Zellkulturexperimenten, in denen Antikörper gegen CALEB/NGC die Neuritenformation in tektalen Neuronen des Huhns inhibierten, ableiten (Schumacher et al., 1997). Die physiologische Funktion von CALEB/NGC ist bislang jedoch weitestgehend unklar. Das hauptsächliche Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Funktion von CALEB/NGC, einem transmembranalen Protein, welches aufgrund struktureller Gesichtspunkte der EGF-Familie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zugeordnet ist, während der frühen Stadien hippocampaler Neuronendifferenzierung. Die Differenzierung dieser Neurone *in vitro* kann in fünf Stadien gegliedert werden, in denen sich Neuriten vom Soma aus erstrecken und in ein einzelnes Axon sowie mehrere Dendriten differenzieren (Dotti et al., 1988; Craig und Banker, 1994). Im fünften Stadium, welches ab dem Zeitpunkt DIV7 (days *in vitro*) nach Ausplattieren beginnt, verlängern und verzweigen sich die neu entstandenen Dendriten und nehmen ihre charakteristische Morphologie an. Basierend auf diesem Entwicklungsstadium wurde die Charakterisierung des Effekts von CALEB/NGC auf die Dendritenmorphologie durchgeführt.

Für die vorliegende Arbeit gilt generell, dass Studien, die aus meinen Publikationen zitiert, jedoch nicht in der vorgelegten Arbeit abgehandelt werden, mit Brandt et al., 2007 bzw. Brandt et al., 2008 angegeben werden.

Um der Frage nach der Bedeutung von CALEB/NGC für die Dendritenentwicklung nachzugehen, wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze verfolgt. Zum einen dienten „gain of function“-Analysen mit Überexpression von mCALEBb-Konstrukten sowie verschiedener mCALEBb-Deletionskonstrukte bzw. Überexpression eines mutmaßlich dominant-negativ wirkenden mCALEBb-Konstruktes der Charakterisierung des Proteins im Hinblick auf seine Funktion bei der Dendritendifferenzierung. Zum anderen ermöglichten „loss of function“-Analysen durch „knockdown“ des endogenen CALEB/NGC-Proteins die Untersuchung der Funktion von CALEB/NGC.

Zunächst wurde an DIV9 in hippocampalen Neuronen der Ratte, einem gut untersuchten Modellsystem zur Untersuchung der Dendritendifferenzierung (Dotti et al., 1988; Banker und Cowan, 1977), die endogene Expression von CALEB/NGC mittels zweier verschiedener Antikörper, die zum einen gegen die extrazelluläre Region, zum anderen gegen den intrazellulären Teil von CALEB/NGC gerichtet waren, untersucht. Es zeigte sich, dass CALEB/NGC von hippocampalen Neuronen exprimiert wird und nicht nur auf Zellkörpern und Axonen, sondern besonders stark auf Dendriten lokalisiert ist. Aufgrund dieser Befunde lag die Vermutung nahe, dass CALEB/NGC an der Ausdifferenzierung von Dendriten beteiligt sein könnte.

4.1 Die Expression von CALEB/NGC in primären hippocampalen Neuronen erhöht die Dendritenkomplexität

Zunächst wurde die Morphologie von CALEB/NGC-exprimierenden Neuronen detailliert analysiert. Die Überexpression von mCALEBb in hippocampalen Neuronen der Ratte zum Zeitpunkt, an dem sich die Dendritenmorphologie ausbildet, zeigte einen sehr deutlichen und signifikanten Effekt, der sich in der starken Zunahme dendritischer Endverzweigungen und damit in komplexeren Dendritenbäumen im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Kontrollneuronen äußerte (siehe 3.1.2). Es konnte in dieser Arbeit erstmals demonstriert werden, dass CALEB/NGC die Dendritenkomplexität von primären hippocampalen Neuronen während des Stadiums der Dendritenentwicklung (ab DIV7) stimuliert. „Gain of function“-

Analysen zeigten, dass die Erhöhung des CALEB/NGC-Spiegels in primären hippocampalen Neuronen durch Transfektion von mCALEBb-kodierenden Plasmiden ausreichend für die Erhöhung der Dendritenkomplexität ist. Dieses wurde über die Anzahl der TNDET („total number of dendritic end tips“) bestimmt und durch Anwendung der Sholl-Analyse bestätigt. Im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Neuronen konnte eine Erhöhung in der Anzahl der dendritischen Endverzweigungen ausgemacht werden. Der in dieser Arbeit untersuchte Effekt von CALEB/NGC korreliert sehr gut mit beschriebenen funktionellen Daten von β -Catenin, einem Protein, das in die Zell-Zell-Interaktion involviert ist, im Hinblick auf Dendritenverzweigung (Yu und Malenka, 2003). β -Catenin ist in der frühen Entwicklung in hohen Mengen in neuronalen Zellfortsätzen vorhanden und bietet über α -Actinin eine direkte Verbindung zum Zytoskelett. Die Überexpression von β -Catenin führt zu einer ähnlich erhöhten Anzahl dendritischer Endverzweigungen wie die Überexpression von mCALEBb. Dagegen wird durch die Überexpression der intrazellulären Domäne von N-Cadherin endogenes β -Catenin gebunden und damit die Interaktion mit funktionellen Partnern verhindert, wodurch es zu einer Verminderung dendritischer Endverzweigungen kommt (Yu und Malenka, 2003). Allerdings konnte von den Autoren Yu und Malenka gezeigt werden, dass intrazelluläres β -Catenin durch neurale Aktivität stabilisiert wird und dabei dendritisches Wachstum beeinflusst. In dieser vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass der Einfluss von CALEB/NGC auf Dendritenkomplexität unabhängig von neuronaler Aktivität ist.

Dieser Effekt ist nicht auf eine vermehrte Primärdendritenbildung zurückzuführen, sondern vielmehr ein Verzweigungseffekt, da die Anzahl der Dendriten höherer Ordnung von CALEB/NGC-exprimierenden Neuronen, verglichen mit EGFP-exprimierenden Neuronen, zunimmt. Das deutet darauf hin, dass CALEB/NGC nicht oder nur partiell an der Ausbildung der Primärdendriten (Dendriten 1. Ordnung) beteiligt ist, da im Vergleich die Anzahl der Primärdendriten bei CALEB/NGC- und EGFP-exprimierenden Neuronen nicht variiert. Maßgeblich erhöht es jedoch die Anzahl der Dendriten 2. und 3. Ordnung des differenzierten Neurons. Als Primärdendriten werden die Dendriten bezeichnet, die direkt aus dem Soma hervorgehen. Somit nimmt CALEB/NGC möglicherweise eine zentrale Aufgabe bei der Ausbildung der Dendriten und damit der Veränderung des dendritischen Netzwerks wahr. So kann eine Erhöhung der Dendritenkomplexität zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für synaptische Aktivierung und damit zu einer gesteigerten Kommunikation führen. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass CALEB/NGC nicht nur in der Dendritendifferenzierung, sondern darüber hinaus in der Spine-Morphogenese zu einem

späteren Zeitpunkt der Entwicklung involviert ist und hier in einem Phänotyp mit erhöhter Spinekomplexität resultiert (Brandt et al., 2007).

Mit den Daten von Jaworski korreliert die Beobachtung, dass die Überexpression von CALEB/NGC die zu Beginn der Dendritendifferenzierung (Stadium 4; Dotti et al., 1988) festgelegte Anzahl von Primärdendriten nicht ändert (Jaworski et al., 2005).

Durch die Sholl-Analyse wurde gezeigt, dass sich der Durchmesser des Dendritenbaumes von CALEB/NGC-exprimierenden Neuronen insgesamt im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Kontrollzellen nicht ändert, was physiologisch sinnvoll ist, da Dendritenzweige ihre entsprechenden Schichtgrenzen respektieren müssen und nicht über eine determinierte endgültige Größe wachsen können. Die Verlängerung eines Dendriten über die normale Dendritengröße hinaus würde das rezeptive Feld eines Neurons vergrößern, so dass es synaptische Eingänge, die normalerweise für andere Neurone bestimmt wären, erhält und verarbeitet (Cline, 2001).

In den letzten Jahren hat sich die RNAi-Technologie (Elbashir et al., 2001a; Caplen et al., 2001) als eine sehr wichtige Methode erwiesen, um die Funktion von Proteinen in Säugetierzellen zu untersuchen. Nachdem bekannt war, dass die Überexpression des CALEB/NGC-Proteins in hippocampalen Neuronen die Zunahme der Dendritenbaumkomplexität bewirkt, stellte sich die Frage nach der Bedeutung von endogenem CALEB/NGC für selbige. Die Überexpression eines Proteins im primären Zellkultursystem stellt eine nicht ganz natürliche Situation dar, daher sollten weiterführende „loss of function“-Analysen die endogene Bedeutung von CALEB/NGC beleuchten. Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit primäre hippocampale Neurone mit spezifischen siRNA- bzw. shRNA-Konstrukten transfiziert, um den endogenen CALEB/NGC-Spiegel zu senken. Ein Nachteil der Methode der RNA-Interferenz mit siRNA-Molekülen ist jedoch, dass die durch Transfektion von siRNAs provozierten „knockdown“-Effekte transient sind, aufgrund des Abbaus der siRNA-Moleküle in den Zellen. Durch die Verwendung von „short hairpin“ RNAs (shRNAs) kann eine stabile Suppression der Genexpression in kultivierten Säugerzellen durch eine kontinuierliche Expression erzielt werden, da hierbei die siRNAs durch die Zellen selber aus der vom geeigneten Expressionsvektor kodierten shRNA hergestellt werden (z.B. pCGLH-Vektor, Chen et al., 2005; Paddison et al., 2002). Insgesamt konnte durch die „knockout“-Analysen festgestellt werden, dass endogenes CALEB/NGC-Protein in hippocampalen Neuronen herunterreguliert werden kann und dass sich die Reduktion des endogenen CALEB/NGC-Spiegels morphologisch eindeutig auf die hippocampalen Neurone auswirkte, was sich in einer

signifikant verminderten Anzahl der dendritischen Endverzweigungen und damit in einer verminderten Dendritenverzweigung äußerte.

Die CALEB/NGC-Defizienz wirkt sich vermutlich so deutlich auf die Morphologie der Neuronen im Hippocampus in Form einer reduzierten Dendritenkomplexität aus, da das Protein in axon- und synapsenreichen Regionen des Nervensystems stark exprimiert wird und während der Dendritogenese entwicklungspezifisch hochreguliert ist (Schumacher et al., 1997; Aono et al., 2000; Inatani et al., 2000). Diese Ergebnisse zeigen erstmals die Bedeutung von CALEB/NGC für die Ausbildung neuronaler Morphologie. Bei den CALEB/NGC „knockdown“-Neuronen kann vermutlich aufgrund der reduzierten Menge an CALEB/NGC ein Signalweg nicht aktiviert werden, der letztlich in Aktin-Umstrukturierungen des Zytoskeletts als Voraussetzung für das Auswachsen von Dendriten resultiert. Während der Dendritogenese befinden sich Neurone in einer dynamischen Phase, die durch hohe Raten von Addition und Retraktion gekennzeichnet ist. Anzunehmen ist, dass durch den „knockdown“ von CALEB/NGC die Aktivierung der Addition von Dendritenzweigen in irgendeiner Form gestört ist und neue Verzweigungen, die Dendriten höherer Ordnung, nicht ausgebildet werden können. Auszuschließen ist aber nicht, dass bereits bestehende Dendriten retrahieren.

Die Verwendung eines mutmaßlich dominant-negativ wirkenden Konstrukts sollte weiterhin Aufschluss über die endogene Funktion von CALEB/NGC geben. Ein dominant-negatives Konstrukt wird als Protein-Mutante beschrieben, dass mit der Funktion des Wildtyp Proteins interferiert. Eingesetzt wurde daher das Deletionskonstrukt „396“, dessen Sequenz von mCALEBb abgeleitet ist. Es fehlt jedoch der gesamte zytoplasmatische Bereich, ausgehend vom Sequenzmotiv „KKLYLL“, welches unmittelbar der Transmembranregion folgt. Hier wurde von der Hypothese ausgegangen, dass durch den fehlenden intrazellulären Teil extrazelluläre Ereignisse wie die Bindung eines putativen Liganden von der intrazellulären Signaltransduktion entkoppelt werden könnten und sich die Überexpression dieses Proteins dann negativ auf die Dendritenkomplexität auswirken könnte. In der Tat äußerte sich die Untersuchung der Überexpression des Konstrukts „396“ in einer deutlichen Reduktion der Dendritenanzahl, die unter der Anzahl der Dendriten EGFP-exprimierender Kontrollneurone lag. Es kann daher angenommen werden, dass das Deletionskonstrukt „396“ tatsächlich mit der endogenen Funktion von CALEB/NGC interferiert. Eine mögliche Erklärung für die Wirkungsweise dieses Deletionsonstrukts ist, dass ein bislang unbekannter Ligand mit der EGF-ähnlichen Domäne von CALEB/NGC interagieren könnte. Aufgrund des fehlenden intrazellulären Bereichs ist die Signaltransduktion nicht mehr gegeben und damit die Umstrukturierung des Zytoskeletts als Voraussetzung für die Ausbildung von Dendriten nicht

möglich. Die Konsequenz wäre, dass ein möglicher Ligand durch die Überexpression von „396“ weggefangen würde und dementsprechend endogenem CALEB/NGC zur Erhöhung der Dendritenbaumkomplexität nicht mehr zur Verfügung steht.

Das Ergebnis dieses Experiments stützt die Ergebnisse der funktionellen Genaktivierung von CALEB/NGC durch „knockdown“. Sowohl die Herunterregulierung des endogenen Proteins als auch die Interferenz eines mutmaßlich dominant-negativ wirkenden Proteins mit dem endogenen Protein führen zu einer Reduzierung der Dendritenkomplexität.

Intrazellulär wird das Transmembranprotein CALEB/NGC in die vier Abschnitte A–D unterteilt, wobei mit dem Protein PIST bislang nur für das Peptidsegment A ein Interaktionspartner identifiziert wurde (Hassel et al., 2003). Das Peptidsegment C wird durch alternatives Spleißen generiert, für die Peptidsegmente B und D sind bislang weder Interaktionspartner noch ist irgendeine Funktion bekannt. Somit ergeben sich verschiedene putative intrazelluläre Bereiche, die eine Signalweiterleitung regeln und so zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts in Form einer Zunahme der Dendritenbaumkomplexität führen können. Die Untersuchung der Überexpressionen verschiedener Deletionskonstrukte, deren Sequenzen von der für mCALEBb kodierenden abgeleitet worden waren, sollte daher erste Hinweise auf die Funktion der einzelnen Peptidsegmente und damit Rückschlüsse auf die Weiterleitung der Signaltransduktion von der Plasmamembran zum Zytoskelett zulassen. Die Konstrukte „388“ und „400“ sind extrazellulär gleich, unterscheiden sich jedoch im intrazellulären Bereich. Die Überexpression des Deletionskonstrukts „388“, welches neben der extrazellulären Domäne intrazellulär nur den Bereich des Peptidsegments A umfasst, führte zu keiner signifikanten Änderung der neuronalen Morphologie im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Kontrollzellen. Aufgrund dieses Resultates wurde davon ausgegangen, dass das Peptidsegment A alleine nicht in der Lage ist, den Effekt von CALEB/NGC auf die Dendritenkomplexität zu vermitteln. Die Überexpression des Deletionskonstruktes „400“, welches zusätzlich zum Peptidsegment A auch noch das Peptidsegment B enthielt, induzierte die Zunahme dendritischer Verzweigungen. Dieser Effekt ähnelt dem der Überexpression des gesamten mCALEBb-Proteins, die Anzahl der dendritischen Endausläufer liegt im gleichen Bereich wie die von mCALEBb. Somit ist bewiesen, dass die Peptidsegmente A und B zusammen die Fähigkeit besitzen, morphologische Veränderungen in Neuronen auszulösen. Die Wichtigkeit dieser Peptidsegmente für die CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität wird durch den Befund gestützt, dass die Überexpression des funktionell dominant-negativ wirkenden Konstrukts „396“ zu einer Reduktion der

Dendritenkomplexität führt, da zu vermuten ist, dass durch den fehlenden zytoplasmatischen Teil von CALEB/NGC intrazelluläre Kaskaden über die Peptidsegmente A und B, die wichtig für die CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität sind, nicht ablaufen können.

Bislang sind von den Mitgliedern der Proteinfamilie von transmembranalen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren fast ausschließlich Funktionen als Liganden für bestimmte Rezeptortyrosinkinasen beschrieben worden (Burden und Yarden, 1997). Als Rezeptoren dieser Liganden wurden Mitglieder der ErbB-Familie von Rezeptortyrosinkinasen (ErbB1-ErbB4) beschrieben. EGF-ähnliche Faktoren werden als Transmembranproteine an der extrazellulären Zelloberfläche proteolytisch durch MMPs („Matrixmetalloproteinases“) oder ADAMs („A Disintegrin And Metalloproteinases“) gespalten, wodurch eine lösliche Ektodomäne freigesetzt wird (zur Übersicht siehe Blobel, 2000). Nach Freisetzung an der Zelloberfläche binden die EGF-ähnlichen Faktoren unterschiedlich an einen oder mehrere der vier Zelloberflächenrezeptoren ErbB1, -2, -3 und -4. Nach Ligandenbindung erfolgt eine Hetero- oder Homodimerisierung der Rezeptoren, die dann intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert. Aufgrund seiner strukturellen Zuordnung zu dieser Proteinfamilie ist CALEB/NGC daher zunächst als potentieller Ligand für Rezeptortyrosinkinasen betrachtet worden.

Eine hypothetische Möglichkeit für den Wirkmechanismus von CALEB/NGC könnte auf CALEB/NGC als Rezeptor hindeuten. Es ist denkbar, dass CALEB/NGC als Rezeptor für einen noch unbekanntem Liganden fungieren und durch Interaktion mit demselben die Signaltransduktion initiieren könnte, die letztlich über die erforderlichen zytoskelettalen Änderungen zur Stimulierung der Dendritenkomplexität führt. Die in dieser Studie dargelegten Daten könnten eine Funktion von CALEB/NGC als Rezeptor andeuten. Die nähere Untersuchung der extrazellulären Domäne durch die Überexpression eines „EGFshedding1“-Deletionskonstrukts, dem im Vergleich zum Gesamtprotein mCALEBb außer der EGF-ähnlichen Domäne der gesamte extrazelluläre Bereich fehlt, resultierte in einer Zunahme der Dendritenkomplexität im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Kontrollneuronen. Dieser Effekt ist dem der Überexpression des Gesamtproteins mCALEBb vom Ausmaß der Verzweigung her gleich, statistisch signifikant und beweist, dass der extrazelluläre Bereich bis hin zur EGF-ähnlichen Domäne für die morphologischen Veränderungen bezüglich der Dendritenkomplexität entbehrlich ist. Schumacher et al. zeigten, dass CALEB/NGC an Tenascin-C und -R im sauren Peptidbereich der

extrazellulären Domäne binden kann (Schumacher et al., 1997; Schumacher et al., 2001; Schumacher und Stübe, 2003). Tenascin-C und -R gehören zur Familie der Tenascine, sind Moleküle der extrazellulären Matrix und besonders durch die Beteiligung an Prozessen wie Zelladhäsion und Neuritenwachstum von Bedeutung im Nervensystem (Chiquet-Ehrismann et al., 1995; Götz et al., 1996; Brümmendorf et al., 1993; Nörenberg et al., 1995; Rathjen et al., 1991). Dieses für die Interaktion mit Tenascin -C und -R notwendige saure Peptidsegment liegt jedoch innerhalb des extrazellulären Bereichs von CALEB/NGC, der für CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität entbehrlich ist. Somit kann eine Beteiligung der Tenascin-C und -R an von CALEB/NGC induzierten Prozessen, die zu einer Stimulierung der Dendritenkomplexität führen, ausgeschlossen werden. Durch die Analyse des „EGFshedding1“-Deletionskonstruktes konnte der Bereich, der für die Bindung eines Liganden in Bezug auf den CALEB/NGC-vermittelten Effekt denkbar ist, auf die EGF-ähnliche Domäne eingegrenzt werden. Weiterführende Experimente mit einem Deletionskonstrukt, dessen EGF-ähnliche Domäne punktmutiert worden war, „EGFmut1“, zeigten, dass die EGF-ähnliche Domäne notwendig für den Effekt ist. Ausgehend von der Anzahl der Endverzweigungen von Neuronen, die mCALEBb überexprimieren, führte die Überexpression des „EGFmut1“-Deletionskonstruktes zu einer Reduktion der Dendritenkomplexität bis auf die Anzahl der Endverzweigungen von EGFP-exprimierenden Kontrollneuronen.

Das könnte darauf hindeuten, dass möglicherweise durch die Mutationen in der EGF-ähnlichen Domäne diese nicht mehr zugänglich für die Bindung eines Liganden ist. Da im Konstrukt „EGFshedding1“ die EGF-ähnliche Domäne vollständig erhalten war und der restliche N-terminale Bereich fehlt, wird die Dendritenkomplexität möglicherweise durch diese Domäne reguliert. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die EGF-ähnliche Domäne im extrazellulären Bereich von CALEB/NGC nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend für die Induktion der Dendritenkomplexität ist. Durch die Überexpression des dominant-negativ wirkenden Konstruktes „396“ wird Dendritenkomplexität inhibiert. Auch die Hypothese, dass dieses Konstrukt möglicherweise einen bislang unbekanntem Liganden bindet und durch das fehlende intrazelluläre Segment eine Signalweiterleitung unterbunden wird, passt zu den Ergebnissen, die eine Notwendigkeit der extrazellulären EGF-ähnlichen Domäne demonstrieren. Bislang ist jedoch kein putativer Ligand für diese Domäne bekannt. Weitere Experimente, beispielsweise „pulldown“-Assays mit anschließender Massenspektrometrie, müssen hier in Zukunft Aufschluss geben. Ein Ligand der EGF-Domäne von CALEB/NGC, welcher extrazellulär die Signaltransduktion bis zur erhöhten

Dendritenverzweigung stimuliert, würde die Hypothese einer Rezeptorfunktion von CALEB/NGC stützen.

Die proteolytische Spaltung und Freisetzung von Transmembranproteinen, auch als Ektodomänen-„Shedding“ bezeichnet, ist eine wichtige post-translationale Modifikation, um die Funktion diverser Gruppen von Zelloberflächenproteinen, wie Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle und Proteoglykane zu regulieren (Hooper et al., 1997; Blobel et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass Zink-abhängige MMPs und ADAMs die proteolytische Spaltung dieser Transmembranproteine vermitteln (Blobel et al., 2000). Vor kurzem wurde das Freisetzen extrazellulärer Segmente von CALEB/NGC im Huhn sowie in Maus publiziert, das durch elektrische neuronale Aktivität induziert wird und die EGF-ähnliche Domäne exponiert. Es wurde postuliert, dass die Spaltung des extrazellulären Segmentes zwischen dem sauren Peptidsegment und der EGF-ähnlichen Domäne stattfindet (Jüttner et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass CALEB/NGC die Dendritenbaumkomplexität hippocampaler Neurone unabhängig von elektrischer Aktivität stimuliert, da Antagonisten verschiedener Ionenkanäle (TTX, D-APV, NF), die neuronale Aktivität vermitteln (Yu und Malenka, 2003), den Effekt von CALEB/NGC auf die Dendritenverzweigung nicht zu blockieren vermochten. Diese Daten korrelieren mit den funktionellen Untersuchungen zur Signaltransduktion, in denen gezeigt wurde, dass der MEK-Inhibitor U0126 den CALEB/NGC-vermittelten Effekt nicht blockieren konnte. Für den MEK-MAPK-Signalweg wurde aber eine aktivitätsabhängige Involvierung in der Dendritenformation beschrieben (Wu et al., 2001; Vaillant et al. 2002).

Dies lässt zum einen die Schlussfolgerung zu, dass ein durch neuronale Aktivität induziertes „Shedding“ des extrazellulären Segmentes von CALEB/NGC nicht notwendig ist, um Dendritenkomplexität zu stimulieren, aber für andere Funktionen wichtig sein könnte. Zum anderen ist es vorstellbar, dass ein „Shedding“ extrazellulärer Segmente, das zu einer exponierten EGF-Domäne führt, durch andere Signalwege stimuliert werden könnte. Gegenwärtig kann die Frage, ob ein „Shedding“ von CALEB/NGC notwendig ist, um die Dendritenkomplexität zu stimulieren, nicht beantwortet werden.

Zusammenfassend kann aufgrund der in dieser vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen des Effektes von CALEB/NGC auf die Dendritenkomplexität davon ausgegangen werden, dass CALEB/NGC die Anzahl der Verzweigungen dendritischer Bäume erhöht und dieser Effekt durch die Reduktion des endogenen CALEB/NGC-Spiegels mittels

RNA Interferenz bzw. durch den Einsatz eines dominant negativen Konstruktes „396“ inhibiert werden kann. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein spezifisches Peptidsegment intrazellulär und die EGF-ähnliche Domäne extrazellulär für diesen Effekt notwendig sind. Die Frage nach einem extrazellulären Liganden für die EGF-Domäne kann gegenwärtig noch nicht beantwortet werden, sie bietet aber einen sehr interessanten Ansatzpunkt für weiterführende Experimente.

Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden im primären Zellkultursystem generiert. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass mittels *in utero* Elektroporation analysiert wurde, ob die für CALEB/NGC beschriebene Funktion auch *in vivo* Bestand hat. Die hierfür notwendigen Experimente wurden in Kooperation mit Dr. Mladen-Roko Rasin und Prof. Dr. Nenad Sestan von der Yale University School of Medicine, USA, durchgeführt. Die *in utero* Elektroporation (IUE) ist eine *in vivo* Methode, bei der im Gegensatz zu transgenen Tieren ein selektiv ausgewähltes Gewebsareal untersucht werden kann. Hierbei kann der Einfluss von Zielgenen auf entwicklungsabhängige Ereignisse durch gezielte Manipulation von einzelnen Zellen im direkten Vergleich zum umgebenden Gewebe betrachtet werden, ohne dabei das Genom des gesamten Organismus zu verändern. Bei der Durchführung dieser Methode wird Plasmid-DNA *in utero* in die Ventrikel embryonaler Mäusehirne injiziert und durch Anlegen von elektrischer Spannung in die gewünschten Ventrikel-Areale dirigiert, wodurch neuronale Vorläuferzellen, die in der Ventrikularzone gebildet werden, elektroporiert werden. Dadurch kann die Wanderung in die zellspezifischen Schichten und auch abnormes Verhalten dokumentiert werden. Der Vorteil dieser Methode liegt in der selektiven Manipulation einzelner Neurone. Durch die Verwendung von Vektoren, die zusätzlich zum gewünschten Expressionsgen unabhängig ein Sensorgen exprimieren, z.B. EGFP, wird die neuronale Morphologie visualisiert.

Parallel zu der von mir vorgelegten Studie und aufbauend auf meinen Daten wurden die folgenden Experimente zur Untersuchung der CALEB/NGC-Funktion *in vivo* durchgeführt. Mittels der IUE-Technik wurden das mCALEBb-Konstrukt, das dominant-negative Deletionskonstrukt „396“ sowie die shRNA-Konstrukte CAL3sh und CAL1sh im Embryonalstadium E15,5 in kortikale Neurone der Schichten II und III *in vivo* transfiziert. Die Analyse der elektroporierten Tiere an P7 bestätigte meine Daten aus der primären Zellkultur in allen Punkten. Während die Dendritenbäume der mCALEB-exprimierenden Neurone deutlich verzweigter im Vergleich zur Kontrolle waren, konnte bei den Zellen, die das dominant-negative Konstrukt „396“ exprimierten, eine deutliche Reduzierung in der

Dendritenkomplexität beobachtet werden. Die Untersuchung von mit spezifischem CAL3sh „knockdown“-Konstrukt elektroporierter Cortices zeigte, dass im Vergleich mit elektroporierten CAL1sh-Kontrollen auch hier eine deutliche Reduktion in der Anzahl der Verzweigungen zu verzeichnen war (Brandt et al., 2007). Die *in vivo* generierten Daten zur Untersuchung der Funktion von CALEB/NGC während der Dendritogenese korrelieren somit eindeutig mit meinen im primären Zellkultursystem erhobenen Daten. Basierend auf diesen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass CALEB/NGC auch *in vivo* entscheidend für die Steuerung der Dendritenkomplexität von pyramidalen Maus-Neuronen ist.

4.2 Der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg ist notwendig für CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität

Die bisherigen Untersuchungen führten zu der Fragestellung, welche Faktoren intrazellulär für die Signalweiterleitung von der Transmembranregion von CALEB/NGC verantwortlich sind und zu den zytoskelettalen Reorganisationen führen, die letztlich in einer veränderten Dendritenmorphologie resultieren. Obwohl einige Protein-Protein Interaktionspartner von CALEB/NGC bekannt sind (Schumacher et al., 1997; Hassel et al., 2003), weiß man noch nichts über Signaltransduktionskaskaden, die intrazellulär zur Aktivierung oder Inhibierung des CALEB/NGC-vermittelten Effektes auf Dendritenkomplexität führen. Zur Untersuchung dieser Frage wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen eingesetzt. Zum einen wurden Signalwege untersucht, die für die Verzweigung von Dendriten bekannt sind und ihre Relevanz für die Dendritenkomplexität von CALEB/NGC analysiert. Zum anderen wurde durch biochemische Analysen die Suche nach einem intrazellulären Interaktionspartner ermöglicht, der CALEB/NGC an die Signaltransduktion anbinden könnte. Die Ergebnisse der Untersuchung bekannter Signalwege in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg eine wichtige Rolle für die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenverzweigung spielt, da pharmakologische Interventionen an verschiedenen Stellen des Signalweges den Effekt teilweise oder vollständig inhibierten. Eine generelle Relevanz des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges für Dendritenverzweigung wurde erst vor kurzer Zeit publiziert (Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005). Jedoch müssen spezielle Aspekte in diesem Signalweg, betreffend einer Feinregulierung zur Etablierung eines speziellen Phänotyps der Dendritenkomplexität vorhanden sein. So wurde von Jaworski et al. (2005)

publiziert, dass durch die Inhibition von mTOR, entweder mit Rapamycin oder durch den Einsatz von anti-mTOR shRNA, basale Dendriten hippocampaler Neurone beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu wird in dieser Arbeit gezeigt, dass CALEB/NGC primär die Verzweigung apikaler Dendriten beeinflusst. Die Daten von Jaworski belegen, dass die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) die Dendritenkomplexität hippocampaler Neurone signifikant erhöht, die Anzahl der Primärdendriten sich jedoch im Vergleich zu Kontrollzellen nicht verändert. Die Autoren postulierten somit keinen Einfluss von PI3K auf die Dendriteninitiation (Jaworski et al., 2005). Dies korreliert mit den in dieser Arbeit generierten Daten, da CALEB/NGC maßgeblich die Dendriten höherer Ordnung (2. und 3. Ordnung), nicht aber die Primärdendriten beeinflusst. Dies steht im Widerspruch zu den Resultaten von Kumar, die zeigten, dass konstitutiv aktive PI3K oder aktives Akt die Anzahl von Primärdendriten erhöht (Kumar et al., 2005). Daher kann darüber spekuliert werden, ob andere Signaltransduktionsproteine, wie z.B. die Proteinkinase C (PKC), oder die kleine GTPase Rac1 in diese Feinregulierung des Dendritenbaumes involviert sind. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Nakanishi in neuronalen Primärzellen aus embryonalen Ratten liefern Hinweise darauf, dass der extrazelluläre Bereich von CALEB/NGC an der Stimulation des Auswachsens von Neuriten beteiligt ist und dieses unter anderem von Proteinkinase C abhängt (Nakanishi et al., 2006). Die entsprechend rekombinant in *E. coli* hergestellten Polypeptide, die verschiedene strukturell unterschiedliche Domänen des extrazellulären Bereichs enthielten, wurden *in vitro* in Bezug auf ihre Domänenspezifischen Funktionen charakterisiert. Nach Zugabe der verschiedenen gereinigten rekombinanten Polypeptide zu neuronalen Primärzellen wurde eine positive Beeinflussung des Axonwachstums über die EGF-ähnliche Domäne gezeigt. Der Einsatz bekannter Inhibitoren der PI3-Kinase sowie der PKC zur Untersuchung intrazellulärer Signalmechanismen führte zu einer Blockierung des Neuritenauswachsens (Nakanishi et al., 2006). In dieser Arbeit konnte durch den Einsatz des pharmakologischen Inhibitors Bisindolylmaleimid I, ein in der Literatur weit verbreiteter Inhibitor zur Untersuchung der Kinase-Aktivität von PKC in zellulären Prozessen (Toullec et al., 1991), auch für die PKC eine Beteiligung an der CALEB/NGC-vermittelten Dendritenkomplexität gezeigt werden. Mit Hypericin (Takahashi et al., 1989) erfolgte jedoch nur eine geringe Blockierung des CALEB/NGC-induzierten Effektes. In einer Studie von Nakanishi wurde PKC-abhängiges Neuritenwachstums von CALEB/NGC durch den Einsatz dieser beiden Inhibitoren gezeigt (Nakanishi et al., 2006). Daher wurden in der vorliegenden Studie diese entsprechenden Inhibitoren verwendet. Die Hemmung der PKC durch Inhibitoren kann auf zwei Arten

erfolgen: 1. die kompetitive Hemmung der katalytischen Domäne, wodurch die Blockierung der Bindungsstelle erfolgt, und 2. die allosterische Hemmung der regulatorischen Domäne, durch die eine Bindung von Co-Faktoren an das Enzym unterbunden wird (Newton, 1996). Während Bisindolylmaleimid I ein selektiver, kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindungsstelle ist und somit die Kinase-Aktivität hemmt, wirkt Hypericin durch die kompetitive Hemmung der regulatorischen Untereinheit der PKC. Aufgrund der Basis unterschiedlicher Aktivatoren werden die PKC-Isotypen in drei Gruppen aufgeteilt: 1. die konventionellen PKCs oder cPKCs (α , β , γ), 2. die neuen PKCs oder nPKCs (δ , ϵ , η , θ , μ) und 3. die atypischen PKCs oder aPKCs (ζ , ι , κ) (Newton, 1997). Im Unterschied zu cPKC und nPKC können aPKC jedoch nicht durch DAG in der regulatorischen Domäne aktiviert werden und sind durch Hypericin, einen Inhibitor der regulatorischen Untereinheit, nicht hemmbar. Im vorliegenden Fall könnte somit über eine Beteiligung der aPKC spekuliert werden, da durch den Einsatz von Hypericin nur cPKC und nPKC blockiert werden konnten, jedoch nicht die aPKC, was möglicherweise den geringfügigen Rückgang in der TNDET von CALEB/NGC nach dem Einsatz von Hypericin erklären könnte.

Verschiedene mögliche Erklärungsansätze, den Mechanismus betreffend, werden im Folgenden erläutert. In Säugerzellen bildet mTOR, eine Serin/Threonin Proteinkinase, zwei heteromere und funktionell unterschiedliche Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2, deren Gemeinsamkeit die gleiche katalytische Untereinheit, die Proteinkinase Target of Rapamycin (TOR), ist (zur Übersicht siehe Bhaskar und Hay, 2007). Die regulatorischen Umstände, welche die Aktivität der beiden unterschiedlichen Komplexe sowie die von Akt/PKB kontrollieren, sind erst in den letzten Jahren in den Fokus der Wissenschaft geraten.

TORC1 und TORC2 sind unter anderem durch die Bindung von mTOR an einen Proteinpartner, Raptor (regulatory associated protein of mTOR) für TORC1 oder Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) für TORC2, definiert. Der Komplex mTORC1 gilt in Mammalia als ein hauptsächlicher Regulator ribosomaler Biogenese und Proteinsynthese (Hay und Sonenberg, 2004; Klann und Dever, 2004). Im Gegensatz dazu reguliert mTORC2 die zytoskelettale Aktinreorganisation und kontrolliert die Aktivität zweier Proteinkinasen, Akt/PKB und PKC α (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004; Sarbassov et al., 2005). Akt phosphoryliert eine Vielzahl bekannter Proteine, die mit dem Aktinzytoskelett interagieren können, so z. B. Rac1 (Kwon et al., 2000) und die Serin/Threonin-Kinase Pak1 (p21-activated kinase 1), welche ebenfalls im Zusammenhang mit Dendritenkomplexität beschrieben wurden (Tang et al., 2000; Hayashi et al., 2002). Während mTORC1 Rapamycin-sensitiv ist, wurde mTORC2 als Rapamycin-unempfindlich beschrieben. Rapamycin wirkt

durch einen „gain of function“-Mechanismus, in welchem er das intrazelluläre Protein FKBP12 bindet und einen Drogen-Rezeptorkomplex bildet, der die Kinaseaktivität von mTORC1 inhibiert. In Dendriten wurden sowohl mTOR als auch die Substrate 4E-BP1 und p70S6K nachgewiesen (Tang et al., 2002).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die von CALEB/NGC-induzierte Dendritenkomplexität durch die Blockade der PI3K mit dem pharmakologischen Inhibitor LY294002 nahezu vollständig inhibiert wird. Dies korreliert auch mit Daten von Leemhuis, die zeigten, dass PI3K wichtig für die Dendritenverzweigung hippocampaler Neurone ist und der Effekt durch den Inhibitor LY294002 blockiert werden konnte (Leemhuis et al., 2004). Die Untersuchungen, Akt mit den Akt-Inhibitoren I und III zu inhibieren, resultierten in einer ähnlichen Abnahme in der Anzahl der dendritischen Endverzweigungen bei mCALEBb-exprimierenden Neuronen wie bei der Blockierung der Signalkaskade durch LY294002. Das eröffnet zunächst die Möglichkeit, dass CALEB/NGC in seiner hypothetischen Funktion als Rezeptor von einem extrazellulären Liganden über die EGF-ähnliche Domäne stimuliert wird und so intrazellulär zur Aktivierung der PI3K führt, die anschließend Akt/PKB aktiviert. Auch mTOR konnte mit dem Inhibitor Rapamycin blockiert werden. Es ist durchaus denkbar, dass ein Signalweg über diesen Proteinkomplex verläuft und die Dendritenkomplexität in Folge unter anderem über die Translation bestimmter Proteine reguliert wird, deren Synthese für das Wachstum des Dendritenbaumes notwendig ist. Bislang weisen die Daten in der Literatur eindeutig auf mTORC1 als Regulator dendritischer Verzweigungen. Eine kürzlich publizierte Arbeit bestätigt die Hypothese, dass die Kontrolle der Proteinsynthese der verantwortliche Mechanismus ist, welcher mTOR an die Dendritenverzweigung von Neuronen anbindet (Jaworski et al., 2005). So wurden Daten gezeigt, dass, wie auch der Effekt der Inhibition der mTOR Aktivität, die funktionelle Suppression der p70S6K-Aktivität durch RNAi-Technik, wie auch die Überexpression konstitutiv aktiver 4E-BP1 zu einem vereinfachten Dendritenbaum hippocampaler Neurone in Kultur führt (Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005). Dieses belegt die Bedeutung von mTOR für Dendritogenese. Bislang konnten jedoch keine individuellen Proteine identifiziert werden, die translational durch mTOR reguliert werden und entscheidend für Dendritogenese sind (zur Übersicht siehe Swiech et al., 2008). Als weitere Möglichkeit ist in Betracht zu ziehen, dass der CALEB/NGC-induzierte Effekt auch über den zweiten Proteinkomplex mTORC2 vermittelt werden könnte, der im Zusammenhang mit Dendritenverzweigung noch recht unbekannt und direkt von Umorganisationen zytoskeletaler Komponenten abhängig ist. Für diese Theorie spricht, dass Neurone, die mCALEBb exprimierten, bei der Applikation von Rapamycin eine

signifikant geringere Anzahl dendritischer Endverzweigungen aufwiesen als mCALEBb-exprimierende Kontrollzellen, im Vergleich mit EGFP-exprimierenden behandelten oder unbehandelten Kontrollzellen und unabhängig von der eingesetzten Rapamycin-Konzentration jedoch immer noch signifikant erhöhte Verzweigungswerte zu verzeichnen waren. Dieses bedeutet, dass der CALEB/NGC-Effekt nicht vollständig auf die Anzahl der Verzweigungen der entsprechenden EGFP-exprimierenden Kontrollzellen zurückgeht und der Einsatz von Rapamycin den Effekt somit nicht komplett blockieren konnte. Obwohl FKBP12 den Proteinkomplex mTORC2 nicht binden kann und mTORC2 als Rapamycin-unempfindlich beschrieben wurde, wurde in einer Studie kürzlich gezeigt, dass eine dauerhafte Applikation von Rapamycin eine Sequestration von freiem mTOR durch den inaktiven FKBP12-Rapamycin-TORC1-Komplex verursacht und damit indirekt zu einer Inhibition von mTORC2 (Sarbasov et al., 2005; Sarbasov et al., 2006) führt. mTOR ist die einzige kritische Untereinheit, die von mTORC1 und mTORC2 geteilt wird und es ist durchaus denkbar, dass sowohl ein bestimmtes Gleichgewicht wie auch eine Konkurrenzsituation mit und um mTOR besteht (Hay, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die mit mCALEBb- und EGFP-Plasmiden transfizierten Neurone für 48 h mit Rapamycin inkubiert, eine 24-stündige Applikation des Inhibitors wurde in PC3-Zellen als ausreichend für die Inhibition des mTORC2-Komplex Aufbaus beschrieben (Sarbasov et al., 2006). Rapamycin führt hier zu einer Reduktion des Spiegels an mTORC2. Dieses könnte eine Erklärung für den verminderten, aber nicht vollständig blockierten Effekt von CALEB/NGC auf die Dendritenkomplexität sein. Bislang ist jedoch nur wenig über den Mechanismus der Regulation von mTORC2 bekannt. Eine mögliche Verbindung zum Aktinzytoskelett könnte jedoch über Rac1 bestehen. Die Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 gelten bekanntermaßen als potentielle Regulatoren des Aktinzytoskeletts und sind damit auch an der neuronalen Morphologie beteiligt. Ihre Effekte auf die Dendritenbildung sind jedoch unterschiedlich, während RhoA inhibierend wirkt, stimulieren Rac1 und Cdc42 die Dendritenbildung (Ahnert-Hilger, 2004; Hayashi et al., 2002). Die ektopische Expression von dominant-negativem Rac führt in kortikalen Neuronen zu einer Reduktion in der Dendritenkomplexität, während umgekehrt die Expression von konstitutiv-aktivem Rac in einer erhöhten Anzahl von Dendriten resultiert (Threadgill, 1997).

Interessanterweise wurde vor kurzem auch für das sezernierte Glykoprotein Reelin, welches hippocampale Dendritenentwicklung über den VLDLR/ApoER2-Dab1-Signalweg vermittelt (Niu et al., 2004), eine Beteiligung am PI3K-Akt-mTOR-Signalweg publiziert (Jossin und Goffinet, 2007). Es wurde postuliert, dass Reelin die p70S6K über den mTORC1-Komplex

aktiviert und weiterhin über den mTORC2-Komplex die Phosphorylierung von Akt an der Aminosäure Serin-473 induziert. Beide Ereignisse sind abhängig von Dab1-Phosphorylierung und Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges.

Weiterhin wäre es denkbar, dass die Signaltransduktion intrazellulär über den PI3K-Akt-mTOR-Signalweg nicht über einen mTOR-Komplex, sondern möglicherweise über beide Komplexe nebeneinander in der Zelle reguliert wird.

Kumar et al., (2005) zeigten, dass in Abhängigkeit von Ras sowohl über den PI3K-Akt- als auch über den MAPK-Signalweg Dendritenmorphologie reguliert werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch demonstriert werden, dass für die komplexe Dendritenverzweigung, welche durch CALEB/NGC induziert wird, der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg, nicht aber der MEK-MAPK-Signalweg von Bedeutung ist.

Die von CALEB/NGC vermittelte Dendritenkomplexität könnte somit auch aus einem Zusammenspiel verschiedener Signalwege resultieren, von denen in dieser Arbeit erstmals der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg als ein bedeutender identifiziert werden konnte. Eine detaillierte Untersuchung der Effektoren dieses Signalweges und der Beteiligung von weiteren Signalproteinen wäre daher für die Zukunft wichtig. Des Weiteren ist die Frage von Interesse, welcher der beiden mTOR-Komplexe für den CALEB/NGC-vermittelten Effekt auf Dendritenkomplexität verantwortlich ist. Denkbar wäre der Einsatz spezifischer siRNAs gegen die beiden unterschiedlichen Proteinpартner von mTOR, Raptor oder Rictor.

4.3 Biochemische Charakterisierung der Interaktion von B56 β und CALEB/NGC

Eine Beteiligung des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges für die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt. Bislang ist jedoch kein Protein bekannt, welches intrazellulär mit CALEB/NGC interagiert und so das Transmembranprotein an den beschriebenen Signalweg molekular ankoppelt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit in einem zweiten Ansatz der Analyse der intrazellulären Signaltransduktion nach neuen Interaktionspartnern gesucht, die an der Signalweiterleitung beteiligt sein könnten. Mit Hilfe des „Yeast Two-Hybrid“-Systems wurde, von dieser Arbeit unabhängig, ein neuer intrazellulärer Interaktionspartner von CALEB/NGC identifiziert: B56 β , eine regulatorische Untereinheit der Protein Phosphatase 2A (PP2A). Die Aufreinigung eines rekombinanten GST-hCALb-cyt-Konstrukts ermöglichte die biochemische Verifizierung der Interaktion von CALEB/NGC mit B56 β . Die Validität der anhand von

„Yeast Two-Hybrid“-Analysen identifizierten Bindung von B56 β an CALEB/NGC mit verschiedenen biochemischen und immunocytochemischen Techniken wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt. B56 β ist eine der regulatorischen B-Untereinheiten des heterotrimeren PP2A-Komplexes (McCright und Virshup, 1995), einer Proteinphosphatase, die einen hauptsächlich Anteil der Serin/Threonin-Phosphatase-Aktivität in vielen Geweben und Zellen ausmacht. Die PP2A ist eine Serin/Threonin-Phosphatase, die aus einer 36 kDa großen katalytischen C Untereinheit, einer 65 kDa strukturellen A Untereinheit sowie einer variablen regulatorischen B Untereinheit (B, B', B''; B''') besteht, welche die Substratspezifität des Enzyms bestimmt. B56 β , eine 56 kDa große B-Untereinheit, wird der B'-Familie regulatorischer Untereinheiten zugeordnet, die von verschiedenen unverwandten Genen codiert werden. Sie ist eine der Isoformen, die stark im Gehirn exprimiert werden. Die subzelluläre Lokalisation der PP2A in Nukleus oder Zytoplasma sowie die Substratspezifität des Komplexes wird durch die verschiedenen spezifischen B-Untereinheiten bestimmt, die das PP2A-Dimer aus den A- und C-Untereinheiten binden. Die mit CALEB/NGC interagierende Untereinheit B56 β ist zytoplasmatisch. Für die PP2A wurden vielfältige zelluläre Eigenschaften, einschließlich Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Apoptose beschrieben (zur Übersicht siehe Janssens und Goris, 2001). Zu den wichtigen Funktionen der PP2A gehört auch die Regulation des Zytoskeletts. Über neurobiologische Funktionen von B56 β ist bislang allerdings nur sehr wenig bekannt.

In einem Blot-Overlay-Assay konnte die Interaktion von rekombinant aufgereinigtem GST-hCALb-cyt-Fusionsprotein und ektopisch in HEK293-Zellen exprimiertem B56 β in dieser Arbeit bestätigt werden. Durch Präzipitations-Experimente mit ektopisch exprimierten Proteinen konnte gezeigt werden, dass CALEB/NGC nicht nur in der Hefe, sondern auch in HEK293-Zellen mit B56 β interagiert. mCALEBb konnte im Kopräzipitat von B56 β nachgewiesen werden, jedoch nicht im Kopräzipitat von PR55 γ , welches als Kontrolle diente. PR55 γ ist ein weiteres Mitglied der B-Familie regulatorischer Untereinheiten der PP2A, jedoch unterschiedlich zu B56 β . Dieses Experiment lässt auf die Spezifität der Interaktion von CALEB/NGC und B56 β schließen. Auf dem Immunblot dieser Präzipitation wie auch auf dem, der die Interaktionsstelle der B56 β mit Hilfe zweier von CALEB/NGC-abgeleiteter Deletionskonstrukte näher charakterisiert, sind mehrere mCALEBb-Banden zu erkennen (siehe Abbildung 33B, 34; Kapitel 3). Im Lysat, welches als Expressionskontrolle des mCALEBb-Proteins diente, sind sowohl die charakteristische CALEB/NGC-Doppelbande in Höhe von ca. 120 kDa zu sehen, als auch die diffuse, breite, charakteristische Bande der

glykosylierten Proteoglykan-Variante von mCALEBb, die bei etwas über 150 kDa zu erkennen ist. Interessanterweise konnte in jedem der durchgeführten Präzipitationsexperimente mittels B56 β die CALEB/NGC-Doppelbande kopräzipitiert werden, die Proteoglykan-Variante konnte jedoch nicht kopräzipitiert werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Proteoglykan-Variante von mCALEBb nicht mit B56 β interagiert und die Interaktion von mCALEBb und B56 β einer entwicklungspezifischen Regulation unterliegt, da CALEB/NGC in der Literatur als entwicklungsabhängig-reguliertes „Part-time“ Proteoglykan beschrieben wird (Aono et al., 2000; Schumacher et al., 1997; Inatani et al., 2000).

4.4 Funktionsanalyse der Interaktion von B56 β und CALEB/NGC

Das HEK293-Zellsystem, in dem die Kopräzipitationen von B56 β und CALEB/NGC durchgeführt wurden, spiegelt nicht die endogenen Bedingungen im Säugerhirn wider, in dem B56 β und CALEB/NGC normalerweise miteinander interagieren. Die Interaktion zwischen endogenem CALEB/NGC und B56 β wurde deshalb in einer Kopräzipitation aus einer Membranpräparation von Rattengehirn am postnatalen Tag 16 gezeigt und konnte somit *in vivo* bestätigt werden. Die Bindungsregion von CALEB/NGC mit der neu identifizierten B56 β wurde mittels Koimmunpräzipitationen von überexprimierten CALEB/NGC-Deletionskonstrukten „388“ (extrazellulärer Teil von mCALEBb, intrazellulär Peptidsegment A) und „400“ (extrazellulär mCALEBb, intrazellulär Peptidsegmente A und B) sowie B56 β charakterisiert, wobei offensichtlich wurde, dass die Bindungsstelle von B56 β in dem juxtamembranären Peptidsegment A von CALEB/NGC lokalisiert ist. Immunfluoreszenz-Studien zeigten eine endogene Kolo-kalisation von B56 β mit CALEB/NGC in Dendriten hippocampaler Neurone. Während CALEB/NGC ein Transmembranprotein ist, handelt es sich bei B56 β um ein zytoplasmatisches Protein (McCright et al., 1996). B56 β -CALEB/NGC-Doppelimmunfluoreszenzen belegten eine deutliche Membran-assoziierte Kolo-kalisation von endogenem B56 β und endogenem CALEB/NGC in diskreten punktuellen Anreicherungen auf den Dendriten, oftmals an dendritischen Verzweigungspunkten. Aufgrund des endogenen Expressionsmusters deuten diese Daten auf eine Beteiligung der PP2A-Untereinheit B56 β in der durch CALEB/NGC-vermittelten Dendritendifferenzierung hin. Weiterhin konnte ich zeigen, dass B56 β nicht nur mit CALEB/NGC in Dendriten kolo-kalisiert, sondern auch mit der Funktion von CALEB/NGC interferiert, indem es CALEB/NGC-stimulierte

Dendritenkomplexität inhibiert. Die Überexpression von mCALEBb und B56 β in hippocampalen Neuronen zeigte einen deutlichen Effekt auf die Dendritenmorphologie im Vergleich mit mCALEBb- und EGFP koexprimierenden Kontrollneuronen, der sich in einer reduzierten Anzahl dendritischer Verzweigungen äußerte. Jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede zu den Neuronen, die EGFP und B56 β koexprimierten. Die spezifische Wirkung von B56 β auf die CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität wurde daraufhin mittels einer weiteren regulatorischen Untereinheit der PP2A, PR55 γ , überprüft. Obgleich PR55 γ ebenfalls zur Familie der regulatorischen Untereinheiten zählt, im Gegensatz zu B56 β allerdings zur B-Familie (zur Übersicht siehe Janssens und Goris, 2001), wurde die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenverzweigung durch PR55 γ nicht inhibiert. Nach diesen Daten scheint B56 β spezifisch die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität zu inhibieren und als negativer Regulator für selbige zu fungieren. Die Überexpression von B56 β in EGFP-transfizierten Neuronen führt zu einem schwachen, aber permanenten Abfall in der Anzahl der Dendriten. Dies könnte zum einen durch eine verstärkte Inhibition von endogen exprimiertem CALEB/NGC durch B56 β oder zum anderen durch Interferenz mit Dendritenkomplexität bewirkenden, CALEB/NGC-unabhängigen Mechanismen begründet sein. Warum jedoch ist endogen exprimiertes B56 β nicht in der Lage, die durch Überexpression von CALEB/NGC stimulierte Dendritenverzweigung zu inhibieren? Eine mögliche und wahrscheinliche Interpretation wäre, dass die Menge an endogenem B56 β Protein nicht ausreicht, um den erhöhten CALEB/NGC-Spiegel zu kompensieren. Mit dieser Interpretation stimmen die Daten überein, dass endogen exprimiertes B56 β nicht ausreichend ist, um CALEB/NGC-induzierte Akt Phosphorylierung zu inhibieren.

B56 β wurde kürzlich als die regulatorische Untereinheit der PP2A identifiziert, welche die Aktivität von Akt durch Dephosphorylierung kontrolliert. Somit kann das Holoenzym als Akt-Phosphatase fungieren (Rocher et al., 2007). Die Überexpression von CALEB/NGC in hippocampalen Neuronen resultiert in einer erhöhten Phosphorylierung von dendritischem Akt, während Koexpression von CALEB/NGC und B56 β die von CALEB/NGC-induzierte Phosphorylierung von Akt vollständig inhibiert. Es konnte zudem gezeigt werden, dass CALEB/NGC den gesamten PP2A-Komplex einschließlich der strukturellen A und der katalytischen C Untereinheit durch B56 β rekrutieren kann (Brandt et al., 2008). Denkbar ist, dass die Interaktion von B56 β und CALEB/NGC eine funktionelle Verbindung zwischen dem PI3K-Akt-mTOR-Signalweg und dem Zytoskelett darstellt. B56 β könnte mit einem Signalweg, der aktives Akt einschließt, interferieren. Als Schlussfolgerung lässt sich daraus

ableiten, dass B56 β mit einem Signalweg interferiert, der von CALEB/NGC getrieben wird und zu stimuliertem Akt führt.

Wie wird die Interaktion von CALEB/NGC und B56 β reguliert? In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die extrazelluläre EGF-ähnliche Domäne ausreichend und notwendig für die Induktion der Dendritenverzweigung durch CALEB/NGC ist. Dies könnte zum einen durch Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade geschehen, die direkt stimulierend auf Dendritenverzweigung wirkt, zum anderen aber auch durch das Aufheben einer intrazellulären Inhibition von CALEB/NGC-vermittelter Dendritenverzweigung. Dafür ist die Identifizierung eines bislang unbekanntem extrazellulären Liganden von großem Interesse, um überprüfen zu können, ob die Interaktion von B56 β und CALEB/NGC extrazellulär über die EGF-ähnliche Domäne reguliert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass CALEB/NGC in der Lage sein könnte, die Phosphorylierung von Akt an der Aminosäure Serin-473 zu stimulieren, da vorher gezeigt wurde, dass die Stimulation der Dendritenkomplexität von CALEB/NGC von aktivem Akt abhängig ist. Die Untersuchung der relativen Fluoreszenzintensitäten von Phospho-Akt-Färbungen von mCALEBb- und EGFP-koexprimierenden Neuronen ergab im Vergleich zu EGFP-transfizierten Kontrollzellen eine signifikante Erhöhung des Phospho-Akt-Signals. Somit ist davon auszugehen, dass CALEB/NGC die Phosphorylierung von Akt stimuliert. Die Koexpression von B56 β und mCALEBb dagegen wirkte sich nicht nur in der Abnahme der Anzahl dendritischer Verzweigungen aus, sondern auch auf die von CALEB/NGC-stimulierte Phosphorylierung von Akt. Diese machte sich durch eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Messung des Phospho-Akt-Signals bis auf Werte im Bereich der Kontrollzellen bemerkbar, die EGFP oder EGFP und B56 β überexprimierten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass CALEB/NGC die Phosphorylierung von Akt an der Aminosäure Ser-473 stimuliert und auf eine Inhibition der von CALEB/NGC-stimulierten Phosphorylierung von Akt durch B56 β schließen. Aus diesen Daten ließ sich jedoch nicht absehen, ob B56 β die CALEB/NGC-induzierte Phosphorylierung von Akt über direkte Dephosphorylierung von Akt oder über eine direkte Blockierung von CALEB/NGC reguliert. CALEB/NGC enthält mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen in den intrazellulären Peptidsegmenten A und B, die in dieser Arbeit als bedeutend für die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenverzweigung gezeigt wurden. Die Bindungsstelle von B56 β an CALEB/NGC wurde im Peptidbereich A identifiziert, was die Möglichkeit eröffnet, dass B56 β Phosphorylierungsstellen in dem betreffenden Peptidsegment dephosphoryliert und

diese Dephosphorylierung dann die von CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität beeinflusst. Dies würde dann einen wichtigen Regulationsmechanismus darstellen.

Die Diversität der regulatorischen Untereinheiten der PP2A, die ubiquitär exprimiert wird, weist auf unterschiedliche physiologische Rollen für individuelle Holoenzyme. In dieser vorliegenden Arbeit konnte B56 β als neuer Interaktionspartner für CALEB/NGC eindeutig bestätigt und beschrieben werden. Es wurde erstmals eine neue Funktion für die regulatorische Untereinheit B56 β der PP2A als negativer Regulator der CALEB/NGC-induzierten Dendritenverzweigung beschrieben.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten lässt sich ein Modell zur Beteiligung des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges und B56 β an der CALEB/NGC-stimulierten Dendritenbaumkomplexität erstellen, das in Abbildung 46 dargestellt ist.

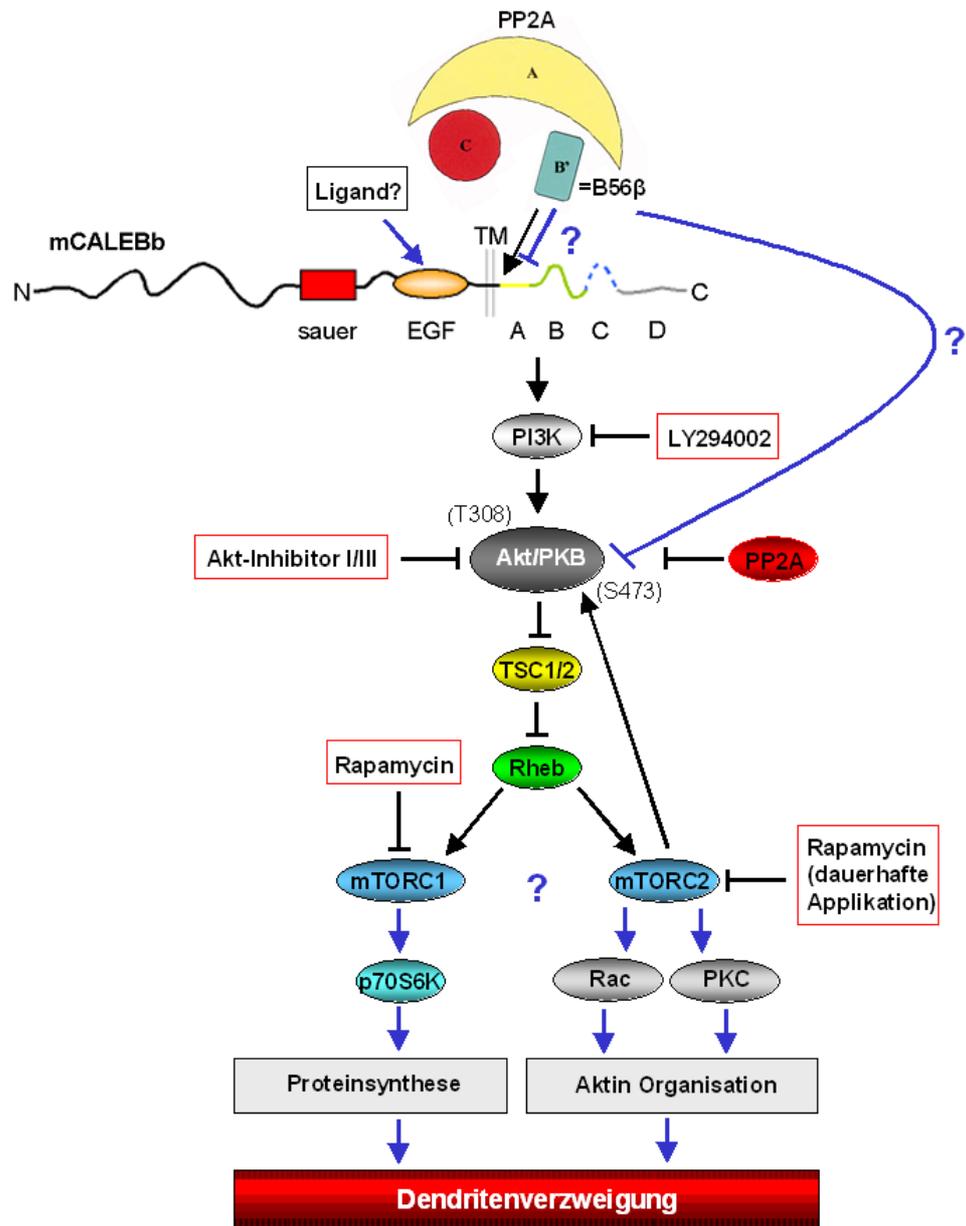


Abbildung 46: Hypothetisches Modell zur Beteiligung des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges und B56β an der CALEB/NGC-stimulierten Dendritenbaumkomplexität. CALEB/NGC stimuliert die Komplexität dendritischer Bäume und wirkt als Rezeptor für einen unbekanntes Liganden, der intrazellulär den PI3K-Akt-mTOR-Signalweg stimuliert. Zum einen könnte Dendritenverzweigung über mTOR-Komplex 1 durch Translation bestimmter für die Dendritenverzweigung wichtiger Proteine reguliert werden. Zum anderen könnte aber auch mTOR-Komplex 2 beteiligt sein und direkt über die Aktivierung anderer Proteine wie beispielsweise Rac1 oder PKC die zytoskeletale Aktin-Organisation beeinflussen, die dann in Umstrukturierungen des Zytoskeletts in Form eines komplexeren Dendritenbaumes resultiert. B56β bindet im Komplex mit der strukturellen A- und der katalytischen C-Untereinheit (Brandt et al., 2008) im zytoplasmatischen intrazellulären Peptidsegment A von CALEB/NGC. B56β wirkt als negativer Regulator der CALEB/NGC-vermittelten Dendritenkomplexität und könnte zum einen CALEB/NGC direkt im intrazellulären Peptidsegment A inhibieren oder mit dem PI3K-Akt-mTOR-Signalweg interferieren, indem es beispielsweise Akt dephosphoryliert, was zu einer verminderten Dendritenkomplexität führt.

4.5 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Befunde tragen zu einem erweiterten Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Ausdifferenzierung von Dendriten und der Funktion von CALEB/NGC bei der Differenzierung von Dendriten bei. So ging aus den Untersuchungen hervor, dass eine bedeutende Funktion von CALEB/NGC die Erhöhung der Komplexität dendritischer Bäume hippocampaler Neurone während der Dendritogenese ist. Für diesen Effekt erwiesen sich extrazellulär die EGF-ähnliche Domäne und intrazellulär der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg als notwendig für die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität. Weiterhin konnte B56 β als intrazellulärer Interaktionspartner und negativer Regulator der CALEB/NGC-vermittelten Dendritenkomplexität identifiziert werden.

In der Diskussion sind bereits einige Fragen angeklungen, die in zukünftigen Arbeiten untersucht werden sollten. Für das weiterführende Verständnis der möglichen Rezeptorfunktion von CALEB/NGC ist die Suche nach einem Liganden, der an die extrazelluläre EGF-ähnliche Domäne bindet, unerlässlich. Eine mögliche Methode wären „pulldown“-Experimente mit anschließender Massenspektrometrie. Weiterhin bleibt zu erforschen, durch welche/s Molekül/e die intrazelluläre Signalkaskade in Bezug auf Dendritenkomplexität letztlich ausgelöst wird und ob, und wenn ja wodurch der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg aktiviert wird. Ferner wäre es von großem Interesse, den PI3K-Akt-mTOR-Signalweg in Bezug auf die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenkomplexität im Hinblick auf die Beteiligung der beiden mTOR-Komplexe 1 und 2 genauer zu analysieren (siRNAs). Die Hinweise, ob die CALEB/NGC-vermittelte Dendritenverzweigung beispielsweise über den mTOR-Komplex 1 und die Translation von Proteinen und/oder über mTOR-Komplex 2 und andere Effektoren wie beispielsweise Akt oder PKC reguliert wird, welche direkt an der Strukturierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind, könnten zum Verständnis der Dendritenverzweigung beitragen.

Für das weiterführende Verständnis der Rolle von B56 β in der CALEB/NGC-stimulierten Dendritenverzweigung wären außerdem Untersuchungen notwendig, die zeigen, ob B56 β beispielsweise durch direkte Interaktion mit dem intrazellulären Peptidsegment A mit der CALEB/NGC-Funktion im Hinblick auf die Komplexität dendritischer Bäume interferiert, oder ob es beispielsweise indirekt in den intrazellulären Signalweg eingreift und so die Funktion von CALEB/NGC reguliert. In ersten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass das Punktmutationskonstrukt mCALEBb-T452A (simuliert permanente Dephosphorylierung) trotz gleichem Expressionsmuster in den Dendriten nicht in der Lage

ist, Dendritenkomplexität wie mCALEBb zu stimulieren. Im Gegensatz dazu stimulierte das Konstrukt mit der Mutation T452E (simuliert permanente Phosphorylierung) die Dendritenkomplexität im gleichen Maße wie mCALEBb. Diese Daten deuten an, dass eine Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 452 für die CALEB/NGC-stimulierte Dendritenkomplexität von Bedeutung sein könnte. Eine Dephosphorylierung durch B56 β könnte somit einen negativen Regulationsmechanismus darstellen, der darüber entscheidet, ob beispielsweise der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg intrazellulär ablaufen kann. Allein aus diesen Daten kann jedoch noch nicht sicher bestimmt werden, ob B56 β CALEB/NGC direkt an der Aminosäure Threonin 452 dephosphoryliert. Für eine Klärung dieser Frage bedarf es weiterer Experimente im Hinblick auf eine direkte oder indirekte Beeinflussung von CALEB/NGC durch B56 β .

5 Literatur

- Ahnert-Hilger, G., Holtje, M., Grosse, G., Pickert, G., Mucke, C., Nixdorf-Bergweiler, B., Boquet, P., Hofmann, F. and Just, I. (2004) Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *J Neurochem*, **90**, 9-18.
- Aizawa, H., Hu, S.C., Bobb, K., Balakrishnan, K., Ince, G., Gurevich, I., Cowan, M. and Ghosh, A. (2004) Dendrite development regulated by CREST, a calcium-regulated transcriptional activator. *Science*, **303**, 197-202.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. and Hemmings, B.A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J*, **15**, 6541-6551.
- 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., 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.
- Atwal, J.K., Massie, B., Miller, F.D. and Kaplan, D.R. (2000) The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron*, **27**, 265-277.
- Baker, R.E., Dijkhuizen, P.A., Van Pelt, J. and Verhaagen, J. (1998) Growth of pyramidal, but not non-pyramidal, dendrites in long-term organotypic explants of neonatal rat neocortex chronically exposed to neurotrophin-3. *Eur J Neurosci*, **10**, 1037-1044.
- Banker, G. and Goslin, K. (1988) Developments in neuronal cell culture. *Nature*, **336**, 185-186.
- Banker, G.A. and Cowan, W.M. (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res*, **126**, 397-342.
- Beretta, L., Gingras, A.C., Svitkin, Y.V., Hall, M.N. and Sonenberg, N. (1996) Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *Embo J*, **15**, 658-664.

- Berezovska, O., McLean, P., Knowles, R., Frosh, M., Lu, F.M., Lux, S.E. and Hyman, B.T. (1999) Notch1 inhibits neurite outgrowth in postmitotic primary neurons. *Neuroscience*, **93**, 433-439.
- Bhaskar, P.T. and Hay, N. (2007) The two TORCs and Akt. *Dev Cell*, **12**, 487-502.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Blobel, C.P. (2000) Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 606-612.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brandt, N., Franke, K., Johannes, S., Buck, F., Harder, S., Hassel, B., Nitsch, R. and Schumacher, S. (2008) B56 β , a regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with CALEB/NGC and inhibits CALEB/NGC-mediated dendritic branching. *Faseb J*.
- 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.
- Bray, D. (1973) Branching patterns of individual sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol*, **56**, 702-712.
- Bray, D. and Chapman, K. (1985) Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone. *J Neurosci*, **5**, 3204-3213.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K. and Price, P.J. (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, **35**, 567-576.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M. and Kidd, T. (1999) Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*, **96**, 795-806.
- Brummendorf, T., Hubert, M., Treubert, U., Leuschner, R., Tarnok, A. and Rathjen, F.G. (1993) The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron*, **10**, 711-727.
- Burden, S. and Yarden, Y. (1997) Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*, **18**, 847-855.

- Cammalleri, M., Lutfjens, R., Berton, F., King, A.R., Simpson, C., Francesconi, W. and Sanna, P.P. (2003) Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14368-14373.
- Campbell, I.D.a.B., P. (1993) Epidermal growth factor-like modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **3**, 385-392.
- Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. and Morgan, R.A. (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9742-9747.
- Chen, J.G., Rasin, M.R., Kwan, K.Y. and Sestan, N. (2005) Zfp312 is required for subcortical axonal projections and dendritic morphology of deep-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17792-17797.
- Chiquet-Ehrismann, R., Hagios, C. and Schenk, S. (1995) The complexity in regulating the expression of tenascins. *Bioessays*, **17**, 873-878.
- Cline, H.T. (2001) Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, **11**, 118-126.
- Craig, A.M. and Banker, G. (1994) Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 267-310.
- Dailey, M.E. and Smith, S.J. (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci*, **16**, 2983-2994.
- Dijkhuizen, P.A. and Ghosh, A. (2005) BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways. *J Neurobiol*, **62**, 278-288.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A. and Banker, G.A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, **8**, 1454-1468.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- 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.
- Gao, F.B. and Bogert, B.A. (2003) Genetic control of dendritic morphogenesis in *Drosophila*. *Trends Neurosci*, **26**, 262-268.
- Gorski, J.A., Zeiler, S.R., Tamowski, S. and Jones, K.R. (2003) Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci*, **23**, 6856-6865.

- Gotz, B., Scholze, A., Clement, A., Joester, A., Schutte, K., Wigger, F., Frank, R., Spiess, E., Ekblom, P. and Faissner, A. (1996) Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *J Cell Biol*, **132**, 681-699.
- Govek, E.E., Newey, S.E. and Van Aelst, L. (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev*, **19**, 1-49.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- 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.
- Hay, N. (2005) The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell*, **8**, 179-183.
- Hay, N. and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, **18**, 1926-1945.
- Hayashi, K., Ohshima, T. and Mikoshiba, K. (2002) Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons. *Mol Cell Neurosci*, **20**, 579-594.
- Hering, H. and Sheng, M. (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 880-888.
- Hoffman, S., Sorkin, B.C., White, P.C., Brackenbury, R., Mailhammer, R., Rutishauser, U., Cunningham, B.A. and Edelman, G.M. (1982) Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J Biol Chem*, **257**, 7720-7729.
- Hooper, N.M. (1997) Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. *Clin Chim Acta*, **266**, 3-12.
- Horch, H.W., Kruttgen, A., Portbury, S.D. and Katz, L.C. (1999) Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron*, **23**, 353-364.
- Hou, L. and Klann, E. (2004) Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci*, **24**, 6352-6361.
- 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.
- Inatani, M., Tanihara, H., Oohira, A., Otori, Y., Nishida, A., Honjo, M., Kido, N. and Honda, Y. (2000) Neuroglycan C, a neural tissue-specific transmembrane chondroitin sulfate

- proteoglycan, in retinal neural network formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**, 4338-4346.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A. and Hall, M.N. (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, **6**, 1122-1128.
- Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (2001) Dendrites. *Genes Dev*, **15**, 2627-2641.
- Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (2003) The control of dendrite development. *Neuron*, **40**, 229-242.
- Janssens, V. and Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, **353**, 417-439.
- 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.
- Jefferies, H.B., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B. and Thomas, G. (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *Embo J*, **16**, 3693-3704.
- Jessell, T.M. and Sanes, J.R. (2000) Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol*, **10**, 599-611.
- Jin, X., Hu, H., Mathers, P.H. and Agmon, A. (2003) Brain-derived neurotrophic factor mediates activity-dependent dendritic growth in nonpyramidal neocortical interneurons in developing organotypic cultures. *J Neurosci*, **23**, 5662-5673.
- Jossin, Y. and Goffinet, A.M. (2007) Reelin signals through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to control cortical development and through mTor to regulate dendritic growth. *Mol Cell Biol*, **27**, 7113-7124.
- Juttner, 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.
- Kaufmann, W.E. and Moser, H.W. (2000) Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex*, **10**, 981-991.
- Kidd, T., Bland, K.S. and Goodman, C.S. (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell*, **96**, 785-794.

- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S. and Tear, G. (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell*, **92**, 205-215.
- 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.
- Klann, E. and Dever, T.E. (2004) Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 931-942.
- Kossel, A.H., Williams, C.V., Schweizer, M. and Kater, S.B. (1997) Afferent innervation influences the development of dendritic branches and spines via both activity-dependent and non-activity-dependent mechanisms. *J Neurosci*, **17**, 6314-6324.
- 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.
- Kuruvilla, R., Ye, H. and Ginty, D.D. (2000) Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons. *Neuron*, **27**, 499-512.
- Kwon, C.H., Zhu, X., Zhang, J. and Baker, S.J. (2003) mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12923-12928.
- Kwon, T., Kwon, D.Y., Chun, J., Kim, J.H. and Kang, S.S. (2000) Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J Biol Chem*, **275**, 423-428.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leemhuis, J., Boutillier, S., Barth, H., Feuerstein, T.J., Brock, C., Nurnberg, B., Aktories, K. and Meyer, D.K. (2004) Rho GTPases and phosphoinositide 3-kinase organize formation of branched dendrites. *J Biol Chem*, **279**, 585-596.
- Luo, L. (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18**, 601-635.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R. and Svoboda, K. (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*, **283**, 1923-1927.
- Markus, A., Patel, T.D. and Snider, W.D. (2002) Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol*, **12**, 523-531.
- Masland, R.H. (2004) Neuronal cell types. *Curr Biol*, **14**, R497-500.

- Massague, J. and Pandiella, A. (1993) Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem*, **62**, 515-541.
- McAllister, A.K. (2000) Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex*, **10**, 963-973.
- McAllister, A.K., Katz, L.C. and Lo, D.C. (1996) Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron*, **17**, 1057-1064.
- McAllister, A.K., Katz, L.C. and Lo, D.C. (1997) Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron*, **18**, 767-778.
- McAllister, A.K., Katz, L.C. and Lo, D.C. (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, **22**, 295-318.
- McAllister, A.K., Lo, D.C. and Katz, L.C. (1995) Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*, **15**, 791-803.
- McCormick, F. (1995) Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Mol Reprod Dev*, **42**, 500-506.
- McCright, B., Rivers, A.M., Audlin, S. and Virshup, D.M. (1996) The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem*, **271**, 22081-22089.
- McCright, B. and Virshup, D.M. (1995) Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits. *J Biol Chem*, **270**, 26123-26128.
- Miller, F.D. and Kaplan, D.R. (2003) Signaling mechanisms underlying dendrite formation. *Curr Opin Neurobiol*, **13**, 391-398.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- 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.
- Newton, A.C. (1996) Protein kinase C: ports of anchor in the cell. *Curr Biol*, **6**, 806-809.
- Newton, A.C. (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 161-167.
- Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C.C., Sheldon, M. and D'Arcangelo, G. (2004) Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron*, **41**, 71-84.

- Norenberg, U., Hubert, M., Brummendorf, T., Tarnok, A. and Rathjen, F.G. (1995) Characterization of functional domains of the tenascin-R (restrictin) polypeptide: cell attachment site, binding with F11, and enhancement of F11-mediated neurite outgrowth by tenascin-R. *J Cell Biol*, **130**, 473-484.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. and Conklin, D.S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, **16**, 948-958.
- Polleux, F., Morrow, T. and Ghosh, A. (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature*, **404**, 567-573.
- Portera-Cailliau, C., Pan, D.T. and Yuste, R. (2003) Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci*, **23**, 7129-7142.
- Rajan, I. and Cline, H.T. (1998) Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J Neurosci*, **18**, 7836-7846.
- Rathjen, F.G. (1991) Neural cell contact and axonal growth. *Curr Opin Cell Biol*, **3**, 992-1000.
- 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.
- Redmond, L., Oh, S.R., Hicks, C., Weinmaster, G. and Ghosh, A. (2000) Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nat Neurosci*, **3**, 30-40.
- Ribar, T.J., Rodriguiz, R.M., Khiroug, L., Wetsel, W.C., Augustine, G.J. and Means, A.R. (2000) Cerebellar defects in Ca²⁺/calmodulin kinase IV-deficient mice. *J Neurosci*, **20**, RC107.
- Rocher, G., Letourneux, C., Lenormand, P. and Porteu, F. (2007) Inhibition of B56-containing protein phosphatase 2As by the early response gene IEX-1 leads to control of Akt activity. *J Biol Chem*, **282**, 5468-5477.
- Rodgers, E.E. and Theibert, A.B. (2002) Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system. *Int J Dev Neurosci*, **20**, 187-197.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sanna, P.P., Cammalleri, M., Berton, F., Simpson, C., Lutjens, R., Bloom, F.E. and Francesconi, W. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurosci*, **22**, 3359-3365.

- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D.M. (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, **14**, 1296-1302.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L. and Sabatini, D.M. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, **22**, 159-168.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. and Sabatini, D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, **307**, 1098-1101.
- Scheibel, A.B. (1983) New brains for old: the waking dream. *Biol Psychiatry*, **18**, 299-302.
- 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.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S. and Rakic, P. (1999) Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science*, **286**, 741-746.
- 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. *J Neurochem*, **102**, 1561-1568.
- Swiech, L., Perycz, M., Malik, A. and Jaworski, J. (2008) Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim Biophys Acta*, **1784**, 116-132.

- Takahashi, I., Nakanishi, S., Kobayashi, E., Nakano, H., Suzuki, K. and Tamaoki, T. (1989) Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **165**, 1207-1212.
- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K. and Nawa, H. (2004) Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J Neurosci*, **24**, 9760-9769.
- Tang, S.J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.C., Sonenberg, N. and Schuman, E.M. (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 467-472.
- Tang, Y., Zhou, H., Chen, A., Pittman, R.N. and Field, J. (2000) The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals. *J Biol Chem*, **275**, 9106-9109.
- Threadgill, R., Bobb, K. and Ghosh, A. (1997) Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron*, **19**, 625-634.
- Tolias, K.F., Bikoff, J.B., Burette, A., Paradis, S., Harrar, D., Tavazoie, S., Weinberg, R.J. and Greenberg, M.E. (2005) The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron*, **45**, 525-538.
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F. and et al. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*, **266**, 15771-15781.
- Vaillant, A.R., Zanassi, P., Walsh, G.S., Aumont, A., Alonso, A. and Miller, F.D. (2002) Signaling mechanisms underlying reversible, activity-dependent dendrite formation. *Neuron*, **34**, 985-998.
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, **11**, 2295-2322.
- 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. *J Biol Chem*, **270**, 26876-26882.
- Whitford, K.L., Dijkhuizen, P., Polleux, F. and Ghosh, A. (2002) Molecular control of cortical dendrite development. *Annu Rev Neurosci*, **25**, 127-149.
- 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, G.Y., Deisseroth, K. and Tsien, R.W. (2001) Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat Neurosci*, **4**, 151-158.
- Yacoubian, T.A. and Lo, D.C. (2000) Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat Neurosci*, **3**, 342-349.
- 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.
- Yu, X. and Malenka, R.C. (2003) Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci*, **6**, 1169-1177.

6 Anhang

6.1 Publikationsverzeichnis

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinschaftlichen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

- Publikationen**
- 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
- Brandt, N.,** Franke, K., Johannes, S., Buck, F., Harder, S., Hassel, B., Nitsch, R., and Schumacher, S. (2008) B56 β , a regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with CALEB/NGC and inhibits CALEB/NGC-mediated dendritic branching. *FASEB J*, 2008 Jul;22(7):2521-33. Epub 2008 Apr 2.
- Posterbeiträge**
- Brandt, N.,** Nitsch R., Schumacher, S.(2008):
6th Forum of European Neuroscience, Geneva – Posterpräsentation
“ Dissecting The Signalling Mechanisms Of CALEB/NGC-Induced Dendritic Tree Complexity”
- Brandt, N.,** Nitsch R., Schumacher, S. (2008):
Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde – Posterpräsentation
“B56 β Interacts With CALEB/NGC And Inhibits CALEB/NGC-Mediated Dendritic Branching”
- Brandt, N.,** Nitsch R., Schumacher, S.(2007):
SFB665 Developmental Disturbances in the Nervous System, International Symposium, Potsdam – Posterpräsentation
“CALEB/NGC Mediates Dendritic Tree Complexity”
- Brandt, N.,** Rasin MR., Vogt, J., Khrulev, S., Sestan, N., Nitsch R., Schumacher, S.(2006):
5th Forum of European Neuroscience, Vienna – Posterpräsentation
“CALEB/NGC Regulates Dendritic Tree Complexity”
- Brandt, N.,** Nitsch R., Schumacher, S.(2006):
Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde – Posterpräsentation
„CALEB/NGC Regulates Dendritic Tree Complexity“

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Professor Dr. Robert Nitsch danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Zell- und Neurobiologie anfertigen zu können, sowie für die Übernahme des Erstgutachtens. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Bereitstellung aller dafür erforderlichen Mittel und die Möglichkeit zur Teilnahme an mehreren Konferenzen im In- und Ausland.

Bei Frau Professor Dr. Constance Scharff möchte ich mich herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Des Weiteren danke ich den Mitgliedern der Prüfungskommission für ihr Entgegenkommen.

Ich danke Dr. Stefan Schumacher für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, die über das übliche Maß hinausgehende Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat und die Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Großer Dank gebührt allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schumacher für ein sehr gutes Arbeitsklima, anregende Diskussionen, technische Unterstützung, aufmunternde Worte, aber auch für viele schöne und lustige Momente. Ganz besonders herzlich möchte ich mich jedoch bei Kristin Franke, Wolfgang Otto, Sascha Johannes sowie Heiko Schadt bedanken. Liebe Kristin, vielen Dank für Dein Durchhaltevermögen während so mancher schlafarmen Nacht, Deine Verlässlichkeit und die gelungenen und willkommenen Ablenkungsmanöver beim Sport.

Meinen Mädels Frau Professor Dr. Anja Bräuer und Beate Geist sei für die abwechslungsreichen Diskussionen und meine gute Unterhaltung zu jeder Tages- und Nachtzeit gedankt. Beate, ich danke Dir für Deine mentale Unterstützung und die manches Mal notwendigen Aufbaumaßnahmen, in welcher Form auch immer. Meine Damen, es war mir eine Ehre!

Allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Zell- und Neurobiologie danke ich für viele Kleinigkeiten und Hilfestellungen, die meinen Laboralltag erleichtert und oftmals erheitert haben, sowie für eine stetige Zufuhr an Nervennahrung. Insbesondere sind dies (in alphabetischer Reihenfolge) Arne Battefeld, Jan Baumgart, Dr. Christine Brandt, Heiko Fuchs, Greta Gölz, Daniel Hechler, Peter Köhler, Dr. Erik Kwidzinski, Lorenza Magno, Dr. Angelika Rappert, Dr. Karl Roth, Agnieszka Rybak, Jutta Schüler, Leslie Schlüter, Dr. Lena Smirnova, Dr. Ulf Strauss, Thorsten Trimbuch und Anja Zimmermann.

Ebenso gebührt mein Dank André Gronau für die unterhaltsamen Kaffeepausen und dafür, dass er mich vor dem Champ-Bestellsystem-Chaos gerettet hat. Marni Pollrich möchte ich herzlichst für die Hilfe in allen organisatorischen Fragestellungen danken, und dafür, dass sie so ein Goldstück ist.

Ich möchte mich zudem bei Prof. Dr. Nenad Sestan und Dr. Roko-Mladen Rasin für ihre ausgesprochene Herzlichkeit bei meinem kurzen, aber eindrucksvollen Aufenthalt in ihrem Labor an der Yale University bedanken.

Mein größter Dank gebührt jedoch meiner Familie, meinem Bruder Florian Brandt, meiner lieben Großmutter Elisabeth Kothe, insbesondere aber meinen wunderbaren Eltern Bärbel und Karl-Peter Brandt, deren vielfältige und bedingungslose Unterstützung von unschätzbarem Wert für meine persönliche und berufliche Entwicklung waren. Ich danke Euch von ganzem Herzen für Euer Vertrauen in mich und den Rückhalt, den Ihr mir insbesondere während meines Studiums und während meiner Promotion gegeben habt.

Lieber Christian, danke für den Halt, den Du mir in meinem Leben gibst. Dein Verständnis und Deine Unterstützung auch über die Distanz Berlin-Hamburg hinweg sowie Dein steter Glaube an ein gutes Ende waren sehr wichtig für mich. Dafür und noch für vieles mehr, gilt mein ganz besonderer Dank.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Nicola Brandt, geboren am 02.04.1979, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt habe.

Berlin, den.....2008

.....

Nicola Brandt