

Universität Ulm
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Direktor: Prof. Dr. med. T. M. Böckers

**Der Einfluss von Abi-1 auf die Entwicklung
primärer hippocampaler Neurone**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von:
Svenja Johannsen
aus Kiel

2008

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

Erstgutachter:

Prof. Dr. Tobias M. Böckers

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Thomas Wirth

Tag der Promotion:

18. April 2008

INHALTSVERZEICHNIS

	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1	EINLEITUNG	1
1.1	Entwicklung eines Neurons	4
1.2	Das Aktin-Zytoskelett	9
1.3	Abl-interactor-1 (Abi-1)	13
1.4	Interaktionspartner von Abi-1	15
1.5	ZIEL DER ARBEIT	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Materialien	21
2.2	Mikrobiologische Methoden	23
2.3	Molekularbiologische Methoden	24
2.4	<i>In situ</i> Hybridisierung	34
2.5	Methoden der eukaryotischen Zellkultur	36
2.6	Methoden der Proteinbiochemie	39
2.7	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	44
2.8	Morphologische Analysen und Analyse der Kolo-kalisation	46
2.9	Darstellung der Messergebnisse und statistische Analyse	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Expression und Lokalisation von endogenem Abi-1 im Gehirn und in neuronalen Zellen der Ratte	49
3.2	Repression von Abi-1 in HeLa-Zellen mittels RNAi	56
3.3	Einfluss von Abi-1 auf die Polarität, die Dendriten und das Aktin-Zytoskelett hippocampaler Neurone	59
3.4	Einfluss von Abi-1 auf synaptische Kontakte hippocampaler Neurone	70
3.5	Einfluss von Abi-1 auf die Interaktionspartner c-Abl, Eps8, Sos1 und WAVE	76
4	DISKUSSION	85

4.1	Abi-1 und seine neuronale Expression und Lokalisation	85
4.2	Abi-1 und die Polarität hippocampaler Neurone	86
4.3	Abi-1 und die Dendriten hippocampaler Neurone	88
4.4	Abi-1 und die Synapsen hippocampaler Neurone	90
4.5	Abi-1 und die kleinen GTPasen der Rho-Familie	92
4.6	Abi-1 und seine Interaktionspartner c-Abl, Eps8, Sos1 und WAVE in Synapsen hippocampaler Neurone	94
4.7	Schlussfolgerung	104
5	ZUSAMMENFASSUNG	106
6	LITERATUR	108
7	DANKSAGUNG	131

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abi-1	<i>Abl interactor 1</i>
AMCA	Aminomethyl-Coumarin-Acetat
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	<i>Abl related gene</i>
ARP2/3	<i>actin related protein 2/3</i>
AS	Aminosäure
bidest. Wasser	zweifach destilliertes Wasser
BSA	Rinderserum Albumin Fraktion V
C	Cytidin / carboxyterminal
C-Abl	zelluläre Abelson Tyrosinkinase
CaMKII	Ca ²⁺ -Calmodulin abhängige Proteinkinase Typ II
CAZ	<i>cytomatrix assembled at the active zone of neurotransmitter release</i>
cbl	<i>casitas B-lineage lymphoma</i>
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cortactin	<i>cortical actin binding protein</i>
DAB	Diaminobenzidinhydrochlorid
DIV	Tage in Kultur (<i>days in vitro</i>)
DMEM	modifiziertes Eagle Medium nach Dulbecco
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E 18	Embryonaltag 18
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECL	<i>enhanced chemiluminiscent reagent</i>
EphB2	EphrinB Rezeptor 2
Eps8	<i>epidermal growth factor receptor substrate 8</i>

F-Aktin	filamentöses Aktin
FKS	fötale Kälberserum
α -Fodrin	<i>spectrin alpha non-erythrcytic 1</i>
G	Guanin
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GDI	Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GKAP	<i>guanylate kinase-associated protein</i>
GluR1	Glutamatrezeptor 1
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRIP1	<i>glucocorticoid receptor interacting protein 1</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
HeLa	Henriette Lacks Zellen
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>
HSPC300	<i>haematopoietic stem progenitor cell 300</i>
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IRSp53	Insulinrezeptorsubstratprotein von 53 kDa
KCNQ3	<i>potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 3</i>
LB	Luria Bertani
MAP2	<i>microtubule associated protein 2</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
N	Amino-
Nap1	Nck assoziiertes Protein 1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
p	Signifikanz-Niveau
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	PSD-95;DlgA und ZO-1
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PiP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat
PIR121	p53 induzierbare mRNA 121
ProSAP	<i>Proline rich synapse associated protein</i>
PRR	Prolinreiche Region
PSD	postsynaptische Dichte
PSD-95	<i>postsynaptic density protein-95</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rezeptor
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Rap1b	<i>Ras related protein 1b</i>
Ras	<i>Roux avian sarcoma</i>
Rho	<i>Ras homologous member</i>
RNAi	RNA Interferenz
Rnase	Ribonuklease
ROK	Rho assoziierte Kinase
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfat
Shank	<i>SH3 domain and ankyrin repeat containing protein</i>
SH3	<i>Src homology domain 3</i>
Sos1	<i>son of sevenless 1</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein

WAVE	<i>WASP family verprolin-homologous</i>
Wnt	<i>wingless Int-1</i>
YFP	gelb fluoreszierendes Protein

1 EINLEITUNG

Im Gehirn werden Informationen aufgenommen, verarbeitet, weitergeleitet und gespeichert. Diese wichtigen Aufgaben des Lernens und Erinnerns werden von einem überaus komplexen Netzwerk aus ungefähr 10^{11} Neuronen bewältigt. Neurone sind polare Zellen, die einen Dendritenbaum zur Aufnahme von Informationen (Afferenz) und ein Axon zur Informationsweitergabe (Efferenz) besitzen. Die Kontaktstellen, an denen die Übertragung der Information von der Senderzelle auf die Empfängerzelle stattfindet, werden Synapsen genannt. Ein Neuron bildet zwischen 1.000 und 30.000 Synapsen aus. Dabei entsteht am Axon des efferenten Neurons die so genannte Präsynapse, während sich die Postsynapse meistens am Dendriten des afferenten Neurons befindet. Diese beiden synaptischen Anteile werden durch den synaptischen Spalt, einem extrazellulären Raum von 20-30 nm Breite, getrennt. Die chemischen Synapsen im Gehirn verwenden Neurotransmitter zur Informationsweitergabe von der Präsynapse an die Postsynapse. Es wird zwischen inhibitorischen (hemmenden) und exzitatorischen (erregenden) Synapsen unterschieden.

Der am häufigsten verwendete Neurotransmitter an exzitatorischen Synapsen ist Glutamat (Scannevin u. Huganir, 2000). Die Präsynapse enthält einen in Vesikeln verpackten Vorrat an Neurotransmittern (Abbildung 1). Auf einen elektrischen Reiz hin setzt die Ca^{2+} -abhängige Freisetzung der Neurotransmitter an der aktiven Zone ein. Dieser Bereich wird als CAZ (*cytomatrix assembled at the active zone of neurotransmitter release*) bezeichnet (Dresbach *et al.*, 2001). Gegenüber der CAZ, durch den synaptischen Spalt getrennt, liegt ein unter der postsynaptischen Membran lokalisiertes elektronendichtes Netzwerk an Proteinen, die postsynaptische Dichte (PSD). Die PSD enthält neben einer Vielzahl an verschiedenen Rezeptortypen, welche durch Gerüstmoleküle (u. a. *proline rich synapse associated protein / SH3 domain and ankyrin repeat containing protein*, ProSAP/Shank) mit dem Zytoskelett der Postsynapse verbunden und vor Ort verankert werden, auch Bestandteile verschiedener Signalkaskaden (Boeckers, 2006). Exzitatorische

Synapsen im Bereich des Hippocampus und des Kortex weisen oft dendritische Dornen auf. Dies sind aktinreiche Ausstülpungen der Dendriten, auch *spines* genannt. Der dendritische Dorn beinhaltet die PSD und ermöglicht eine isolierte Antwort einzelner Synapsen nach Stimulation (Calabrese *et al.*, 2006; Ethell u. Pasquale, 2005; Zhang u. Benson, 2000).

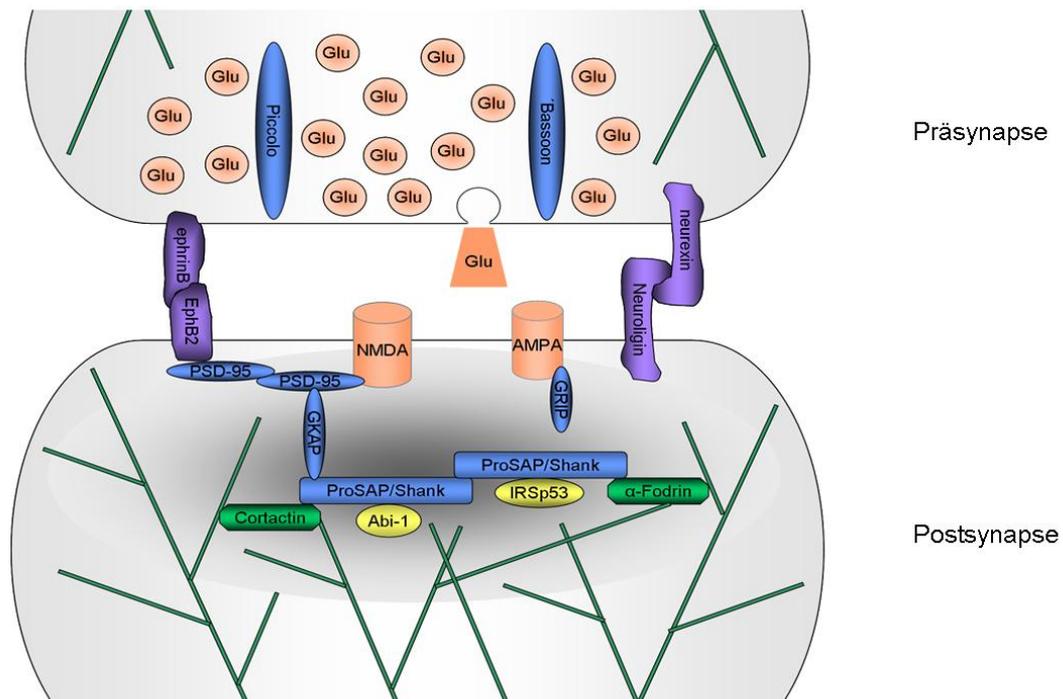


Abbildung 1: Schema einer exzitatorischen Synapse

Abi-1: *Abl interactor 1*; AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure; CAZ: *cytomatrix assembled at the active zone of neurotransmitter release*; Cortactin: *cortical actin binding protein*; EphB2: EphrinB Rezeptor 2; α -Fodrin: *spectrin alpha non-erythrocytic 1*; GKAP: *guanylate kinase-associated protein*; Glu: Glutamat; GRIP: glucocorticoid receptor interacting protein; IRSp53: Insulinrezeptorsubstratprotein von 53 kDa; NMDA: N-Methyl-D-Aspartat; ProSAP/Shank: *proline rich synapse associated protein/SH3 domain and ankyrin repeat containing protein*; PSD: postsynaptische Dichte; PSD-95: *postsynaptic density protein-95*. Rezeptoren und Transmitter sowie transmittergefüllte Vesikel in rot, Gerüstmoleküle in blau, Adhäsionsproteine in lila, Aktin bindende Proteine sowie Aktinfilamente in grün, Modulatoren des Aktin-Zytoskeletts in gelb, CAZ in weiss auf präsynaptischer Seite, PSD in dunkel grau auf der postsynaptischer Seite.

Die Neurotransmitter (Glutamat) werden auf einen elektrischen Reiz hin von der präsynaptischen Seite ausgeschüttet und erreichen über den synaptischen Spalt hinweg die in der postsynaptischen Membran enthaltenen NMDA- und AMPA-Rezeptoren. Die Rezeptoren werden durch Gerüstmoleküle (u. a., ProSAP/Shank) mit dem Aktin-Zytoskelett des dendritischen Dorns verankert.

Zu den von Glutamat aktivierten Rezeptortypen gehören u. a. die ionotropen NMDAR (N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren) und AMPAR (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure Rezeptoren; Hollmann u. Heinemann, 1994). Die Aktivierung der AMPAR bewirkt eine Depolarisation der postsynaptischen Membran durch Na^+ -Ionen-Einstrom. Der NMDAR kann nur durch einen synergistischen Effekt von Glutamat und einer spannungsabhängigen Freisetzung des inaktivierenden Mg^{2+} -Ions aktiviert werden, wodurch Ca^{2+} -Ionen in die Postsynapse einströmen (Nowak *et al.*, 1984). Da damit eine vorherige Aktivierung von AMPAR für die Aktivierung der NMDAR benötigt wird, führt eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Anzahl von AMPAR in der postsynaptischen Membran zu einer Verstärkung bzw. Schwächung der Synapse. Synapsen, die keine AMPAR in der postsynaptischen Membran aufweisen, werden durch die fehlende Aktivierung der vorhandenen NMDAR auch als „stumme Synapsen“ (*silent synapses*) bezeichnet (Bredt u. Nicoll, 2003; Kennedy u. Ehlers, 2006; Malenka u. Bear, 2004; Mayer *et al.*, 1984; Nowak *et al.*, 1984).

Der Ca^{2+} -Anstieg im postsynaptischen Kompartiment wird durch Ausschüttung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher erhöht, um verschiedene intrazelluläre, Ca^{2+} -abhängige Enzyme zu aktivieren, wie z. B. die Ca^{2+} -Calmodulin abhängige Proteinkinase Typ II (CaMKII), die Proteinkinase C und die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK; Malenka *et al.*, 1992; Malenka u. Nicoll, 1999; Fitzjohn u. Collingridge, 2002). Die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden reguliert die Proteinneusynthese und morphologische Veränderungen des dendritischen Dornes (Yuste u. Bonhoeffer, 2001). Im dendritischen Dorn kann die Kalziumkonzentration nach Stimulation lokal erhöht werden und somit die biochemische Antwort auf diese Stimulation vom Rest des Dendriten und anderen dendritischen Dornen separiert werden (Nimchinsky *et al.*, 2002; Rao u. Craig, 2000).

Synapsen dienen nicht nur der Informationsweitergabe zwischen Neuronen, sondern werden auch mit Lernen und Gedächtnisprozessen in Zusammenhang gebracht. So wurde in den letzten Jahrzehnten die Erkenntnis gewonnen, dass sich die Form und die Stabilität von Synapsen bei diesen Prozessen reversibel verändern (Synaptische Plastizität; Bourne u. Harris,

2007). Schädigungen an Synapsen oder Neuronen unterbrechen die Informationsweitergabe und führen zu Störungen des neuronalen Netzwerks. Fehlfunktionen in der Entwicklung oder bei der Stabilisierung des neuronalen Netzwerkes werden in Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen wie Autismus, Alzheimer oder mentale Retardierung gebracht (Pardo u. Eberhardt, 2007; Ramakers, 2002; Selkoe, 2002).

Mentale Retardierung ist gekennzeichnet durch eine Verminderung der kognitiven Fähigkeiten und des angepassten Verhaltens (van Galen u. Ramakers, 2005). Bei Patienten mit mentaler Retardierung werden geringer verzweigte Dendritenbäume, ein Anstieg von morphologisch unreifen, filopodienartigen Synapsen oder ein Verlust an Synapsen beobachtet (Huttenlocher, 1970; Huttenlocher, 1974; Kaufmann u. Moser, 2000; Purpura, 1974). Bei einigen Patienten mit mentaler Retardierung konnten Defekte in den Signalwegen nachgewiesen werden, in denen Proteine der Familie der Rho-GTPasen involviert sind (Benarroch, 2007; Newey *et al.*, 2005). Die kleinen GTPasen der Rho-Familie sind wichtige Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts (Hall, 1998). Durch fehlgesteuerte Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts werden sowohl die Morphologie als auch die Funktionalität von Dendriten und Synapsen beeinträchtigt. Die korrekte Regulation des Aktin-Zytoskeletts ist also wesentlich an der Entwicklung von Neuronen beteiligt (Ramakers, 2002).

1.1 Entwicklung eines Neurons

Ein Modell für das Auswachsen und die Reifung von hippocampalen Neuronen in Kultur wurde 1988 von Dotti *et al.* mittels *live cell imaging* von primären hippocampalen Zellkulturen entwickelt. Nach diesem Modell verläuft die Reifung eines Neurons in Kultur nach einem definierten intrinsischen Programm, welches in fünf Stufen eingeteilt wurde (Abbildung 2). Nach dem Anwachsen der Neurone differenzieren sie sich innerhalb der ersten zwei Tage in Kultur durch Bildung eines Axons zu polarisierten Zellen. Danach erfolgt innerhalb der ersten vier Tage in Kultur die Ausbildung der Dendriten. Die Ausbildung der Synapsen, die Synaptogenese, beginnt nach sieben

Tagen in Kultur und ist mit der Vollendung der Reifung nach ungefähr drei Wochen in Kultur abgeschlossen (Dotti *et al.*, 1988). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit der Entwicklung von Neuronen *in vivo* (Craig u. Banker, 1994).

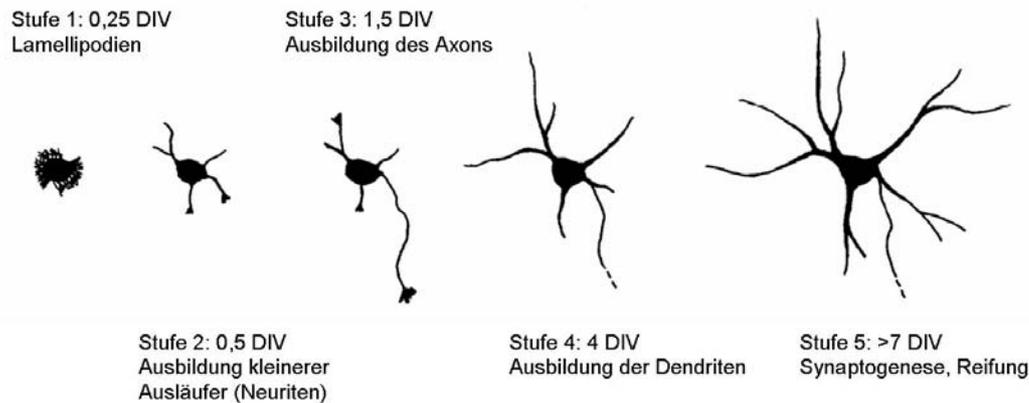


Abbildung 2: Die Entwicklungsstufen eines hippocampalen Neurons *in vitro* (modifiziert nach Dotti *et al.*, 1988).

DIV: days in vitro.

Darstellung der fünf Entwicklungsstufen von Neuronen *in vitro*: Stufe 1 beinhaltet die Anheftung an die externe Matrix und die Ausbildung eines Lamellipodien-Kranzes nach 0,25 DIV (6 h). Während der Stufe 2 erfolgt die Bildung mehrerer kleiner Ausläufer (0,5 DIV; 12 h). Aus einem dieser Ausläufer entwickelt sich in Stufe 3 das Axon (1,5 DIV). In Stufe 4 beginnen die weiteren Ausläufer zu wachsen und werden zu Dendriten (4 DIV). Die Stufe 5 umfasst die Reifung des Neurons, also die weitere Entwicklung des Dendritenbaumes einschließlich der Synaptogenese.

Die Entwicklung der Polarität erfolgt mit der Ausbildung des Axons nach dem Modell von Dotti (Abbildung 2) während der dritten Entwicklungsstufe. Zuvor bildet das Neuron mehrere gleichwertige kurze Ausläufer aus, welche sich ständig verlängern und verkürzen. In der Stufe 3 beginnt ein Ausläufer schneller zu wachsen als die anderen Neuriten (Dotti *et al.*, 1988). Dieser Ausläufer hemmt gleichzeitig das Auswachsen der anderen Neuriten und verhindert damit die Bildung eines weiteren Axons (Andersen u. Bi, 2000; Goslin u. Banker, 1989). Danach bildet sich der schnell wachsende Ausläufer zum Axon und axonspezifische Proteine werden gezielt zum Axon transportiert (Dotti u. Poo, 2003).

Die Ausbildung des Axons erfolgt sowohl durch extrazelluläre Stimuli, wie Gradienten von sezernierten Proteinen (wingless Int-1 (Wnt), *semaphorin 3A* (Logan u. Nusse, 2004; Whitford *et al.*, 2002) als auch durch intrinsische

Signale (Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K), *Roux avian sarcoma* (Ras), *Ras-related C3 botulinum toxin substrate* (Rac), *cell division cycle 42* (Cdc42) und *Ras homologous member* (Rho); Arimura u. Kaibuchi, 2007; Govek *et al.*, 2005; Iijima *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2005). Für die Polarität entscheidende Proteine reichern sich z. T. im Wachstumskegel des Axon-Vorläufers an und stimulieren vor Ort die Entwicklung zum Axon (Shi *et al.*, 2003). Zu diesen Proteinen gehören die PI3K und die GTPasen *ras related protein 1b* (Rap1b) sowie Cdc42 (Schwamborn u. Püschel, 2004).

Nach dem Auswachsen des Axons in Stufe 3 bilden sich in Stufe 4 aus den übrigen Neuriten primäre Dendriten. Dendriten höherer Ordnung gehen von Dendriten niedrigerer Ordnung ab und liegen somit weiter vom Zellkörper entfernt in der Zellperipherie (Dotti *et al.*, 1988). Ein Dendrit kann sich an seiner Spitze Y-förmig verzweigen oder es bildet sich seitlich an einem bereits existierenden Dendrit ein neuer Dendrit aus (Scott u. Luo, 2001). In beiden Fällen entstehen vorher aktinfilamentreiche Vorläuferstrukturen wie Wachstumskegel und Filopodien (Dailey u. Smith, 1996). Je nach dem Fehlen oder Vorhandensein externer Stimuli werden die Filopodien zurückgebildet bzw. stabilisiert und verlängert. Aus den stabilisierten Filopodien kann durch Einsprossung von Mikrotubulin-Zytoskelettbestandteilen ein Dendrit entstehen (Cline, 2001; Van Aelst u. Cline, 2004). Dendriten entstehen *in vivo* vermehrt seitlich an bereits existierenden Dendriten (Dailey u. Smith, 1996).

Auch bei der Ausbildung der Dendriten spielen sowohl extrazelluläre Stimuli, (Neurotrophine, *semaphorins*, *ephrins*; Miller u. Kaplan, 2003; Van Aelst u. Cline, 2004) als auch intrinsische Signale zelluläre Abelson Tyrosinkinase (c-Abl), Rac, Cdc42 und Rho (Govek *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2004) eine Rolle. Zudem können Proteine der PSD (*post-synaptic density-95* (PSD-95), Densin-180 und *glucocorticoid receptor interacting protein 1* (GRIP1) die Dendritogenese beeinflussen (Charych *et al.*, 2006; Hoogenraad *et al.*, 2005; Quitsch *et al.*, 2005; Vessey u. Karra, 2007).

Das Auswachsen der neuronalen Ausläufer wird durch eine vermehrte Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und eine Zunahme der Mikrotubulinbildung ermöglicht (Arimura u. Kaibuchi, 2007; Yu *et al.*, 1994; Yu u. Baas, 1994).

Bei der Synaptogenese erfolgt die Kontaktaufnahme zwischen Axon und Dendrit meistens durch Filopodien (Abbildung 3; Fiala *et al.*, 1998; Saito *et al.*,

1992; Ziv u. Smith, 1996). Diese Strukturen sind aufgrund ihres auf Aktin basierenden Zytoskeletts sehr beweglich und besitzen die Aufgabe, ihre Umgebung zu „sondieren“ (Gupton u. Gertler, 2007). Nachdem Axon und Filopodium in Kontakt gekommen sind, werden an der Kontaktstelle auf der präsynaptischen Seite ein bzw. mehrere *dense core vesicle* inseriert. *Dense core vesicle* enthalten vorgefertigte präsynaptische Elemente, wie z. B. Gerüstmoleküle (Bassoon, Piccolo) und Proteine, welche an der Transmitterfreisetzung beteiligt sind (Zhai *et al.*, 2001). Dass die Proteine schon im vorgefertigten Verband entlang des Axons transportiert werden, beschleunigt den Aufbau einer funktionellen Präsynapse (Ethell u. Pasquale, 2005; Gundelfinger u. tom Dieck, 2000). Die Interaktion der prä- und postsynaptischen Seite wird durch Zelladhäsionsmoleküle wie die Neuroligin-Neurexine und den Cadherinen stabilisiert (Yamagata *et al.*, 2003). Auf der postsynaptischen Seite wird durch Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts aus dem Filopodium ein dendritischer Dorn gebildet (Abbildung 4; Sekino *et al.*, 2007).

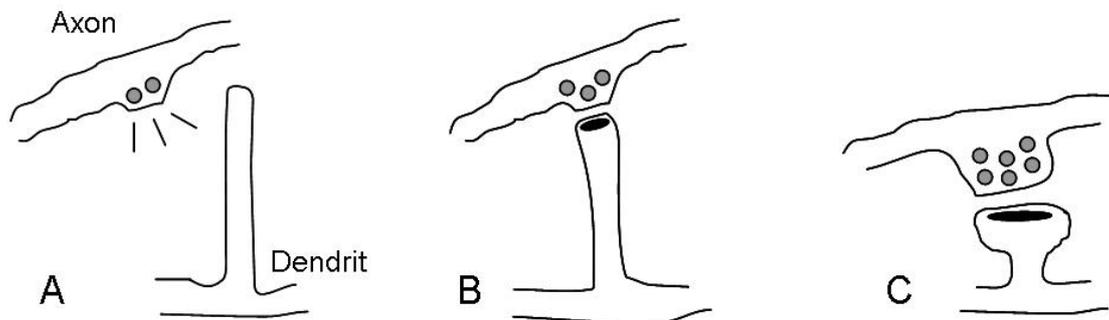


Abbildung 3: Modell der Synaptogenese: (Ein Filopodium als Vorstufe des dendritischen Dorns).

(A) Der axo-dendritische Kontakt erfolgt über ein vom Dendriten ausgebildeten Filopodium. Dabei spielen sekretierte Lockstoffe („*attractans*“) eine Rolle. (B) Der Kontakt zwischen prä- und postsynaptischer Seite wird durch Adhäsionsmoleküle stabilisiert. Durch Inserieren von vorgefertigten „Bauelementen“ werden die CAZ (*cytomatrix assembled at the active zone of neurotransmitter release*) und PSD (postsynaptische Dichte) aufgebaut. Filopodienartige Synapsen besitzen eine geringere Halbwertszeit und benötigen stabilisierende Signale wie synaptische Aktivität, um sich zu beständigeren pilzförmigen Synapsen zu entwickeln. Bei fehlender Stimulation biden sie sich zurück. (C) Die Synapse ist morphologisch gereift. Dies wird durch eine breitere CAZ und PSD sowie der pilzförmigen Morphologie des dendritischen Dorns ersichtlich.

Im Gegensatz zur präsynaptischen Seite, welche einen relativ konstanten Aufbau besitzt, weisen postsynaptische Spezialisierungen große Unterschiede in ihrer molekularen Zusammensetzung auf. Dennoch gibt es auch für die postsynaptische Seite Komplexe von verschiedenen Gerüstmolekülen (*guanylate kinase-associated protein* (GKAP), PSD-95, ProSAP/Shank), welche gemeinsam transportiert und inseriert werden (Gerrow *et al.*, 2006). Allerdings gilt dies nur für einen geringen Anteil der benötigten Proteine. Für viele Proteine sind spezielle Lokalisationsmechanismen vorhanden (Bresler *et al.*, 2001; Bresler *et al.*, 2004; Lee u. Sheng, 2000). Einige Proteine können wahrscheinlich bei Bedarf von vorhandenen mRNAs vor Ort synthetisiert werden (Böckers *et al.*, 2004; Bruckenstein *et al.*, 1990; Garner *et al.*, 1988). Der räumliche Umfang der prä- und der postsynaptischen Seite passt sich einander an (Hering u. Sheng, 2001).

Bei der morphologischen Reifung der postsynaptischen Spezialisierungen aus einem Filopodium treten verschiedene Formen des dendritischen Dorns auf (Abbildung 3). Wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt, entwickelt sich ein Filopodium über die filopodienartige Synapse zur dünnen Synapse und weiter zur stabileren pilzförmigen Synapse (Hering u. Sheng, 2001; Sekino *et al.*, 2007). Zu Beginn der Synaptogenese kommen alle Synapsenmorphologien vor, während im ausgereiften Stadium pilzförmige Synapsen vorherrschend sind. Besonders filopodienartige Synapsen werden vermehrt in frühen Entwicklungsstadien beobachtet (Dunaevsky *et al.*, 1999). Dieser Typ von dendritischem Dorn weist eine hohe Beweglichkeit auf, wodurch die Entwicklung einer Synapse vereinfacht wird (Ziv u. Smith, 1996). Diese Form kann bei fehlender Stimulation verkümmern oder in stimulierender Umgebung sich zu einer pilzförmigen Synapse entwickeln. Die pilzförmige Synapse gilt als stabilster Synapsentyp und ist in der Informationsweiterleitung am effektivsten (Dailey u. Smith, 1996; Kasai *et al.*, 2003; Korkotian u. Segal, 2000; Ziv u. Smith, 1996). Dennoch kann auch sie sich bei fehlender Stimulation morphologisch zurück entwickeln (Bourne u. Harris, 2007). Bei der Reifung vom Filopodium zur pilzförmigen Synapse verkürzt sich der „Hals“ des dendritischen Dorns, während sich am Ende ein „Kopf“ ausbildet, welcher mit zunehmender Reife an Durchmesser gewinnt (Sekino *et al.*, 2007). Die häufig sehr schnellen morphologischen Veränderungen der dendritischen

Dornen werden durch die hohe Dynamik des Aktin-Zytoskeletts ermöglicht (Dunaevsky *et al.*, 1999; Matus *et al.*, 2000; Matus, 2005). Dendritische Dornen enthalten einen Kern aus stabilen Aktinfilamenten und eine geringere Menge an dynamischen Aktinfilamenten, welche die Morphologie der dendritischen Dornen umbilden (Abbildung 5; Halpain, 2000; Smart u. Halpain, 2000). Im pilzförmigen dendritischen Dorn weist der „Kopfbereich“ ein F-Aktin-Netzwerk auf, während der „Halsbereich“ aus langen gebündelten Aktinfilamenten besteht (Abbildung 4; Fifkova u. Delay, 1982; Hirokawa, 1989; Landis u. Reese, 1983).

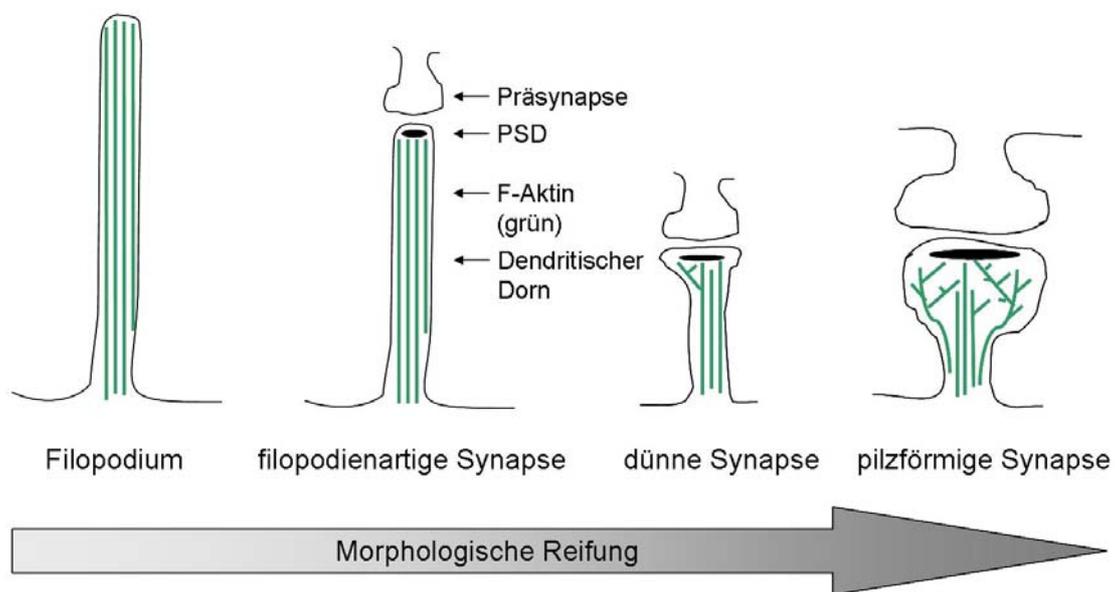


Abbildung 4: Schema der morphologischen Reifung dendritischer Dornen.

Eine schematische Darstellung eines Filopodiums und drei Formen dendritischer Dornen während ihrer morphologischen Reifung: filopodienartige Synapsen, dünne Synapsen und pilzförmige Synapsen. PSD (schwarz): postsynaptische Dichte; F-Aktin (grün): filamentöses Aktin

1.2 Das Aktin-Zytoskelett

Das Zytoskelett befähigt tierische Zellen eine Vielzahl von Formen anzunehmen, koordinierte Bewegungen auszuführen, mechanisch mit ihrer Umwelt in Kontakt zu treten und die „inneren Komponenten“ zu organisieren. Das Zytoskelett besteht aus einem Netzwerk aus Proteinfilamenten. Neuronale Ausläufer weisen ein mikrotubuläres Zytoskelett auf, nur die

Wachstumskegel an der Spitze der Ausläufer sind aus Aktin aufgebaut. Ebenso besitzen Synapsen ein auf Aktin basierendes Zytoskelett (Bradke u. Dotti, 1999; Govek *et al.*, 2005; Matus, 2000; Matus, 2005; Suter u. Forscher, 1998).

Unter physiologischen Bedingungen können globuläre Aktin-Monomere (G-Aktin) reversibel zu doppelsträngigen, helikalen Filamenten (F-Aktin) polymerisieren (Pantaloni *et al.*, 2001). Aktinfilamente besitzen eine strukturelle und kinetische Polarität. Sie weisen ein schnell wachsendes (+)-Ende und ein langsam wachsendes (-)-Ende auf (Welch u. Mullins, 2002).

Aktinfilamente benötigen die Interaktion mit Aktin bindenden Proteinen (ABP), um Lamellipodien bzw. Filopodien auszubilden. Beide Strukturen sind ein Teil von neuronalen Wachstumskegeln und dendritischen Dornen (Abbildung 4 und Abbildung 5; Fischer *et al.*, 1998; Kaverina *et al.*, 2002; Small *et al.*, 1998).

In Lamellipodien sind die Aktinfilamente in einem flächigen Netzwerk angeordnet (Small *et al.*, 2002). Das Netzwerk entsteht durch Bildung neuer Verzweigungen an bereits existierenden Filamenten mit Hilfe von Nukleationsfaktoren. Die Bildung eines Nukleationskerns, so wird die Polymerisation der ersten drei Aktinmonomere bezeichnet, ist energetisch ungünstig, weshalb er von zellulären Nukleationsfaktoren wie dem Arp2/3-Komplex (*actin related protein 2/3-complex*) und dessen Aktivatoren katalysiert werden kann. Der Komplex besteht aus den aktinverwandten Proteinen 2 und 3 sowie fünf weiteren Untereinheiten (Welch *et al.*, 1997). Die Aktivierung des Komplexes erfolgt durch mehrere Aktivatoren, z. B. durch Proteine der Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP)-Familie und der *WASP family verprolin-homologous* (WAVE)-Familie (Ibarra *et al.*, 2005; Weaver *et al.*, 2003). Zusätzlich kann die Keimbildung durch die Mitglieder der Formin-Proteinfamilie bzw. dem neuronalen Nukleationsfaktor *cordon-bleu* initiiert werden (Ahuja *et al.*, 2007; Faix u. Grosse, 2006). Neue Filamente werden im 70°-Winkel an bereits existierende Filamente angebaut, wodurch eine Verzweigung entsteht (Svitkina u. Borisy, 1999). Kappenproteine, die an das (+)-Ende des Filaments binden, führen zu einer frühen Wachstumsbegrenzung der Filamente, wodurch ein dichtes Geflecht entstehen kann (Machesky u. Gould, 1999; Vignjevic *et al.*, 2003).

Filopodien besitzen lange, unverzweigte und gebündelte Aktinfilamente, die uniform orientiert vorliegen und nach außen hin wachsen (Wood u. Martin, 2002). Filopodien bilden sich aus einer verzweigten Aktinstruktur aus, indem Filamente verlängert und gebündelt werden. Dazu ist die Abwesenheit von Kappenproteinen und Nukleationsfaktoren bzw. die Anwesenheit von bündelnden Proteinen notwendig (Vignjevic *et al.*, 2003; Vignjevic *et al.*, 2006). Die bündelnden oder quer vernetzenden Proteine fassen die Filamente zusammen, wodurch Stärke und Dicke des Filopodiums zunehmen (Disanza *et al.*, 2006).

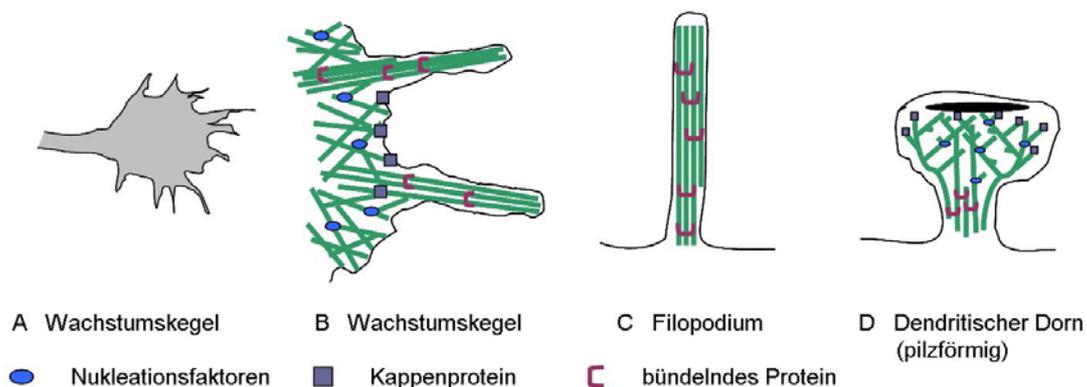


Abbildung 5: Schema der Organisation des Aktin-Zytoskeletts in neuronalen Strukturen.

(A) Wachstumskegel sitzen an den Spitzen wachsender Ausläufer und weisen eine flächige, aufgefächerte Struktur auf. Sie dienen der Erkundung der Umgebung und zeichnen sich durch eine hohe Dynamik ihres Aktin-Zytoskeletts (grün) aus. (B) Das Aktin-Zytoskelett des Wachstumskegels weist die charakteristische Ordnung in einem Lamellipodium auf. Am Rande des Wachstumskegels bilden sich häufig Filopodien aus. (C) Filopodium mit langen, unverzweigten Aktinfilamenten. (D) Das Aktin-Zytoskelett in pilzförmigen dendritischen Dornen ähnelt im „Halsbereich“ Filopodien und im „Kopfbereich“ Lamellipodien.

Lamellipodien weisen Nukleationsfaktoren sowie Kappenproteine auf. Filopodien werden durch bündelnde Proteine gebildet.

Aktin-Dynamik als Antwort auf extrazelluläre Stimuli wird zum Teil über die Familie der Rho-GTPasen vermittelt. Die Familie der Rho-GTPasen ist eine Unterfamilie der Ras-GTPasen und enthält u. a. drei prominente Mitglieder: Cdc42, Rac und Rho (Govek *et al.*, 2005). Die GTPasen sind im GDP-gebundenen Zustand inaktiv und können durch den Austausch von GDP mit GTP durch Guanin-Austauschfaktoren (GEFs) aktiviert werden (Schmidt u. Hall, 2002). Die Inaktivierung erfolgt durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs), welche die hydrolytische Aktivität der GTPase verstärken (Bernards,

2003; Bernardis u. Settleman, 2004). Zusätzlich können Guanin-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) die Dissoziation des GDP blockieren (Hoffman *et al.*, 2000; Zalzman *et al.*, 1999). Die GTPasen liegen im Ruhezustand inaktiv in einem Komplex mit GDIs vor. Nach Stimulation der Zelle lösen sie sich aus diesem Komplex und werden aufgrund ihres isoprenylierten C-Terminus in der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran lokalisiert (Olofsson, 1999; Robbe *et al.*, 2003). Dort können die GTPasen durch GEFs aktiviert werden. Durch die Bindung diverser Effektormoleküle induzieren sie spezifische zelluläre Antworten auf externe Stimuli (Bishop u. Hall, 2000).

Die GTPasen besitzen eine hierarchische Struktur untereinander, so kann Cdc42 Rac aktivieren und beide Proteine können Rho inhibieren (Nobes u. Hall, 1995 a; Sander *et al.*, 1999). In Fibroblasten bewirkt eine Aktivierung von Rac die Bildung und Vergrößerung von Lamellipodien, eine Aktivierung von Cdc42 fördert die Bildung und Verlängerung von Filopodien an der Zellperipherie und Rho begünstigt die Ausbildung von Stressfasern, kontraktilen Aktin-Myosin-Filamenten sowie die Formation und Erhaltung von lokalen Adhäsionen, welche an der Stabilisierung der Zelle beteiligt sind (Hall, 1998; Nobes u. Hall, 1995 b; Ridley u. Hall, 1992). Während früher Entwicklungsstadien lokalisieren Rac, Cdc42 und Rho in den Wachstumskegeln von Neuriten und Rac zusätzlich an Verzweigungspunkten von Neuriten (Santos *et al.*, 2004). Rac und Cdc42 besitzen auf neuronale Ausläufer eine entwicklungs- und wachstumsfördernde Wirkung, während Filopodien und Wachstumskegel unter dem antagonistischen Einfluss von Rho kollabieren (Govek *et al.*, 2005).

Nach der neuronalen Reifung lokalisiert Rho in Dendriten, Rac an axodendritischen Kontaktpunkten auf axonaler Seite und Cdc42 tendentiell stärker in Dendriten als im Axon (Santos *et al.*, 2004). Rho beeinflusst die Länge von dendritischen Dornen negativ, während Rac die Dichte von dendritischen Dornen erhöht (Tashiro *et al.*, 2000). Cdc42 zeigte in den Studien von Tashiro *et al.* (2000) keinen Einfluss auf dendritische Dornen.

1.3 Abl-interactor-1 (Abi-1)

Die Familie der *Abl interactors* (Abi) umfasst drei Mitglieder: Abi-1 (auch *Eps8 SH3 domain binding protein 1*, E3B1), Abi-2 und Abi-3 (auch *New molecule including SH3*, NESH). Die Expression der Proteine der Abi-Familie wurde im Menschen, in der Maus, in der Ratte und in *Drosophila* beschrieben (Courtney *et al.*, 2000; Dai u. Pendergast, 1995; Juang u. Hoffmann, 1999; Miyazaki *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 1995). Für Maus und Mensch wurden für Abi-1 mehrere Splice-Varianten entdeckt (Biesova *et al.*, 1997; Ikeguchi *et al.*, 2001; Taki *et al.*, 1998). Unter den Familienmitgliedern sind sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus hoch konserviert (annähernd 90 % AS-Identität zwischen Abi-1 und Abi-2, Dai u. Pendergast, 1995; Ichigotani *et al.*, 2002; Stradal *et al.*, 2001). Abi-1 *knock out* Mäuse sind embryonal letal (Offenhauser *et al.*, 2004). Abi-2 *knock out* Mäuse zeigen Defizite im Lernen und Gedächtnisleistung sowie eine Reduzierung der Synapsendichte im Hippocampus (Grove *et al.*, 2004).

Abi-1 wurde 1995 von Shi *et al.* als Interaktionspartner und Substrat der Abelson-Tyrosinkinase (Abl, siehe unten) in einer Leukämie-Zelllinie entdeckt. Abi-1 umfasst 476 AS und ist 68 kDa groß (Abbildung 6).



Abbildung 6: Struktur von Abi-1.

WAB: *WAVE binding domain*; SNARE: *Syntaxin1 binding domain*; HHR: *homeobox homology region*; PRR: *proline rich region*; SRR: *serine rich region*; SH3: *Src homology 3 domain*; WAVE: *WASP family verprolin-homologous*.

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Abi-1. N-terminal besitzt Abi-1 eine WAB-Domäne, welche mit der nachfolgenden SNARE-Domäne überlappt. Hinter der nachfolgenden HHR-Domäne liegen verschiedene PRR und eine SRR. C-terminal liegt eine SH3-Domäne.

WAVE-Bindungsdomäne (WAB)

Die *WASP family verprolin-homologous* (WAVE)-Bindungsdomäne (WAB) umfasst die AS 18-79 und vermittelt die Interaktion von Abi-1 mit der *WAVE homology domain* (WHD) von WAVE1 bzw. WAVE2 (AS 32-66; Echarri *et al.*,

2004; Leng *et al.*, 2005). Die WAVE Proteine sind Nukleationsfaktoren. Ihre Aktivität wird durch die Bildung eines multimolekularen Komplexes reguliert (Bompard u. Caron, 2004). Der WAVE1/2-Abi-1-NAP1-PIR121-Komplex aktiviert nach Rac-Aktivierung den Arp2/3-Komplex und führt unter Bildung von F-Aktinverzweigungen zur Lamellipodienausbildung (1.4; Innocenti *et al.*, 2004; Steffen *et al.*, 2004).

Syntaxin-Bindungsdomäne (SNARE)

Die SNARE-Domäne von Abi-1 (AS 54-108) wurde als Bindungsstelle von Syntaxin-1, Mitglied der SNARE-Familie, identifiziert (Ecchari *et al.*, 2004). Syntaxin-1 ist an der Fusion von neurotransmitterhaltigen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran beteiligt und interagiert mit Aktin (Chen u. Scheller, 2001; Thurmond *et al.*, 2003). Ein Teil der SNARE-Domäne (AS 56-79) ermöglicht es Abi-1, Oligomere zu bilden (Echarri *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2001).

Homeobox homology Region (HHR)

Homeobox homology Regionen (AS 109-163) können mit DNA interagieren (Scott *et al.*, 1989). Proepper *et al.* (2007) beschrieben, dass Abi-1 nach NMDA-Stimulation an Tyrosin AS 53 phosphoryliert wird und phosphoryliertes Abi-1 im Kern lokalisiert. Im Kern interagiert Abi-1 mit den Transkriptionsfaktoren Myc und MAX. Eine direkte DNA-Interaktion von Abi-1 mit spezifischen DNA Erkennungssequenzen konnte bisher noch nicht gezeigt werden (Proepper *et al.*, 2007).

Prolinreiche Regionen (PRR)

Abi-1 interagiert mittels der PRR mit der SH3-Domäne von Eps8 (*epidermal growth factor receptor substrate 8*). Durch die Bindung von Abi-1 wird die F-Aktin-Kappenaktivität von Eps8 aktiviert. Zudem interagiert Abi-1 mit Eps8, Sos1 (*son of sevenless 1*) und PI3K in einem Komplex, welcher die RacGEF-Aktivität von Sos1 aktiviert (1.4; Scita *et al.*, 2000; Innocenti *et al.*, 2003). Die Interaktion von Abi-1 mit der Abelson Tyrosinkinase (Abl) wird über die PRR von Abi-1 und der SH3-Domäne von Abl und zusätzlich über die SH3-Domäne von Abi-1 und der PRR von Abl stabilisiert. Abi-1 ist ein Substrat von

Abl. Bisher konnte der Einfluss von Abi-1 auf die Kinaseaktivität von Abl nicht eindeutig bestimmt werden (1.4; Ichigotani *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 1995).

Src Homologie 3 Domäne (SH3)

Für die SH3-Domäne von Abi-1 (AS 417-476) wurden mehrere Interaktionspartner ermittelt. So interagiert Abi-1 über seine SH3-Domäne z. B. mit dem Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) und reguliert durch Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts die Beweglichkeit von Bakterien (Innocenti *et al.*, 2005; Pantaloni *et al.*, 2001). Des Weiteren interagiert die SH3-Domäne mit der PRR der postsynaptischen Gerüstmoleküle ProSAP1/Shank2 und ProSAP2/Shank3 (Abbildung 1; Proepper *et al.*, 2007). Ferner interagiert die Abi-1 SH3-Domäne mit der PRR von Abl (siehe oben bzw. 1.4). Zusätzlich bindet Sos1 an die AS 394-475 von Abi-1 (diese beinhalten die SH3-Domäne von Abi-1). Über die Interaktion mit Sos1 ist Abi-1 an der Aktivierung von Rac beteiligt (1.4; Fan u. Goff, 2000). Ebenfalls an der SH3-Domäne interagiert Abi-1 mit *casitas B-lineage lymphoma* (cbl) und ist über diese Interaktion an der Endozytose des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) beteiligt (Tanos u. Pendergast, 2007).

1.4 Interaktionspartner von Abi-1

Im Folgenden wird auf die Interaktionspartner von Abi-1, welche an Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind, näher eingegangen (Abbildung 5). Zu ihnen zählen die Proteine *WASP family verprolin-homologous* Proteine (WAVE), *son of sevenless 1* (Sos1), *epidermal growth factor receptor substrate 8* (Eps8) und die zelluläre Abelson Tyrosinkinase (c-Abl).

***WASP family verprolin-homologous* Proteine (WAVE)**

Über die Regulierung der Aktivität von WAVE durch den multimolekularen WAVE1/2-Abi-1-NAP1-PIR121-Komplex existieren widersprüchliche Daten (Nap1: Nck assoziiertes Protein 1; PIR121: p53 induzierbare mRNA 121). Innocenti *et al.* beobachteten 2004, dass ein Abi-1-WAVE2-Komplex dieselbe Fähigkeit zur Arp2/3-Komplex Aktivierung aufwies wie der vollständige

WAVE1/2-Abi-1-NAP1-PIR121-Komplex. Der Verlust von Abi-1 oder WAVE mittels RNAi verhinderte in HeLa-Zellen die Bildung und Lokalisation des Komplexes. Eden *et al.* (2002) hingegen beschrieben eine Hemmung der Aktivität eines HSP300C-WAVE1/2-Abi-NAP1-PIR121-Komplexes durch den Abi-NAP1-PIR121-Subkomplex. Die Interaktion mit aktivierten Rac führte zu einer Dissoziation des inaktivierenden Subkomplexes, woraufhin WAVE den Arp2/3-Komplex aktivierte. In diesem Modell zeigt Abi eine hemmende Wirkung auf WAVE. In einigen Versuchen wurde in Zellen nach Abi-1-RNAi Behandlung eine Reduktion der WAVE2-Proteinkonzentration in den Zellen beobachtet (Innocenti *et al.*, 2004; Steffen *et al.*, 2004).

C-Abl interagiert mit WAVE1 und WAVE2. Die Phosphorylierung durch c-Abl aktiviert WAVE2 (Leng *et al.*, 2005; Westphal *et al.*, 2000).

Zusätzlich kann WAVE2 nach Rac Aktivierung durch Interaktion mit Insulinrezeptorsubstratprotein von 53 kDa (IRSp53) den Arp2/3-Komplex aktivieren (Miki *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2003).

WAVE1-RNAi in Neuronen bewirkt eine Reduzierung von reifen Synapsen und eine vermehrte Bildung von Filopodien. WAVE1 *knock out* Mäuse sind embryonal letal (Dahl *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2005). Striatale Neurone der WAVE2 *knock out* Maus zeigen eine Abnahme von Synapsen und eine Zunahme an Filopodien und Ausläufern. Diese Mäuse zeigten verminderte Lern- und Gedächtnisleistungen (Dahl *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006; Soderling *et al.*, 2003). Pilpel u. Segal (2005) beobachteten durch Überexpression von WAVE3 in Neuronen eine Reduzierung der Synapsendichte und eine verstärkte Akkumulation von F-Aktin in den transfizierten Neuronen.

Son of sevenless 1 (Sos1)

Sos1 vermittelt als RasGEF und RacGEF die Signalweiterleitung von aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) über die GTPase Ras zur GTPase Rac, deren Aktivierung zur lokalen Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts führt. Die Koordination dieser dualen GEF-Aktivität erfolgt über die Bildung zweier verschiedener Komplexe. Der eine Komplex besteht aus Sos und *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2), der zweite Komplex wird von Sos, Abi-1, Eps8 und PI3K gebildet, wobei Grb2 und Abi-1 um die Sos Bindungsstelle in der PRR konkurrieren (Innocenti *et al.*, 2002; Nimnual u.

Bar-Sagi, 2002). Durch die Interaktion mit Grb2 wird Sos zu aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen an der Plasmamembran rekrutiert, wo es mit Ras interagiert und Ras als RasGEF aktiviert. Die Aktivierung von Ras führt zu einer Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), ein Produkt ihrer Aktivität ist Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat (PIP3; Nimnual *et al.*, 1998). Eine Phosphorylierung von Sos durch c-Abl führt zur Aktivierung der RacGEF-Aktivität von Sos. Phosphoryliertes Sos bildet zusammen mit Abi-1, Eps8 und PI3K einen Komplex und aktiviert Rac (Sini *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur RasGEF-Aktivität von Sos wird die RacGEF-Aktivität erst durch die Bildung des Komplexes zusammen mit Abi-1, Eps8 und PI3K aktiviert. Abi-1 dient als Adaptermolekül der Stabilisierung des Komplexes (Innocenti *et al.*, 2003). Durch die Interaktion von Eps8 mit F-Aktin wird der Komplex zu Bereichen unter der Plasmamembran rekrutiert, in dem durch Rac-Aktivierung die Bildung von Lamellipodien induziert werden soll (Scita *et al.*, 2001).

Epidermal growth factor substrate 8 (Eps8)

Abi-1 und Eps8 interagieren mit Sos1 und PI3K in einem Komplex, welcher RacGEF-Aktivität besitzt (siehe oben Sos1). Eps8 ist für die Lokalisation dieses Komplexes an Bereichen in der Zellperipherie zuständig, in denen Rac abhängig Lamellipodien ausgebildet werden sollen (Scita *et al.*, 2001).

Zusätzlich wurde Eps8 als ein Kappenprotein von Aktinfilamenten beschrieben. Durch die Bindung an das (+)-Ende von Aktinfilamenten wird die Assoziation von Aktin-Monomeren verhindert und das Filament in seinem Wachstum begrenzt. Die Eps8 Kappenaktivität ist selbstinhibiert und die Autoinhibition wird durch die Bindung von Abi-1 aufgehoben (Disanza *et al.*, 2004; Higgs, 2004).

Durch die Interaktion von Eps8 und IRSp53 verstärkt sich die F-Aktin bündelnde Aktivität der beiden Proteine. Aktiviertes Cdc42 interagiert und lokalisiert den IRSp53-Eps8-Komplex. Durch das Bündeln von Aktinfilamenten werden Filopodien generiert. Untersuchungen mit Eps8 oder IRSp53 RNAi in Zelllinien führten zu einer Abschwächung der Cdc42 induzierten Filopodienbildung (Disanza *et al.*, 2006).

Eps8 *knock out* Mäuse sind unauffällig, normal und fertil, da der Eps8 Verlust durch andere Familienmitglieder ersetzt wird (Scita *et al.*, 1999; Offenhauser

et al., 2004). Eps8 wird allerdings ein fördernder Einfluss auf die Metastasierung von Krebsgewebe zugeschrieben (Funato *et al.*, 2004; Maa *et al.*, 2007; Welsch *et al.*, 2007).

Zelluläre Abelson Tyrosinkinase (c-Abl)

C-Abl gehört zu der Klasse der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Kinaseaktivität von c-Abl liegt autoinhibiert vor. Die Autoinhibierung wird durch Proteinbindungen freigesetzt (Wang, 2004; Woodring *et al.*, 2003). Neben der Kinaseaktivität besitzt c-Abl Bindungsstellen für G- und F-Aktin (Woodring *et al.*, 2002). Abl weist onkogenes Potential auf (Van Etten *et al.*, 1989; Zrihan-Licht *et al.*, 2004). Bei Philadelphia Chromosom positiven Leukämiepatienten ist die Kinaseaktivität von BCR-Abl, einem chimere Fusionsprotein, konstitutiv aktiv. Die hämatopoetischen Zellen dieser Patienten weisen Abi-1-WAVE2 abhängige Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts auf (Li *et al.*, 2007; Van Etten, 1999). Die Kinaseaktivität von c-Abl kann durch STI 571 (CGP15748, Gleevec, *imatinib mesylate*) inhibiert werden (Buchdunger *et al.*, 1996). Abi-1 wird von Abl phosphoryliert. Shi *et al.* (1995) beschrieben, dass Abi-1 einen hemmenden Einfluss auf das transformierende Potential von Abl besitzt. Juang u. Hoffmann (1999) beobachteten hingegen einen positiven Einfluss von Abi-1 auf die Abl Kinaseaktivität in *Drosophila*.

Neben Abi-1 sind auch WAVE und Sos1 Substrate der Abl Kinase (siehe oben, Leng *et al.*, 2005; Sini *et al.*, 2004; Westphal *et al.*, 2000).

In hippocampalen Neuronen hemmt Abl die Aktivität von Rho, welche über die Rho assoziierte Kinase (ROK, auch ROCK) eine Verringerung der Dendritenbaumkomplexität bewirkt (Bito *et al.*, 2000; Hirose *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2000). Zusätzlich beobachteten Jones *et al.* (2004) nach Hemmung von Abl in jüngeren Neuronen von 4,5 DIV- 7 DIV eine Aufhebung der Polarität.

Doppelt *knock out* Mäuse für Abl und ihr Familienmitglied Abl related gene (Arg) sind embryonal letal. Ihre Neurone weisen einen reduzierten Dendritenbaum auf (Koleske *et al.*, 1998; Moresco *et al.*, 2005). Sowohl Abl als auch Arg *knock out* Mäuse weisen keine Veränderungen neuronaler Morphologie auf (Koleske *et al.*, 1998; Moresco *et al.*, 2005; Tybulewicz *et al.*, 1991).

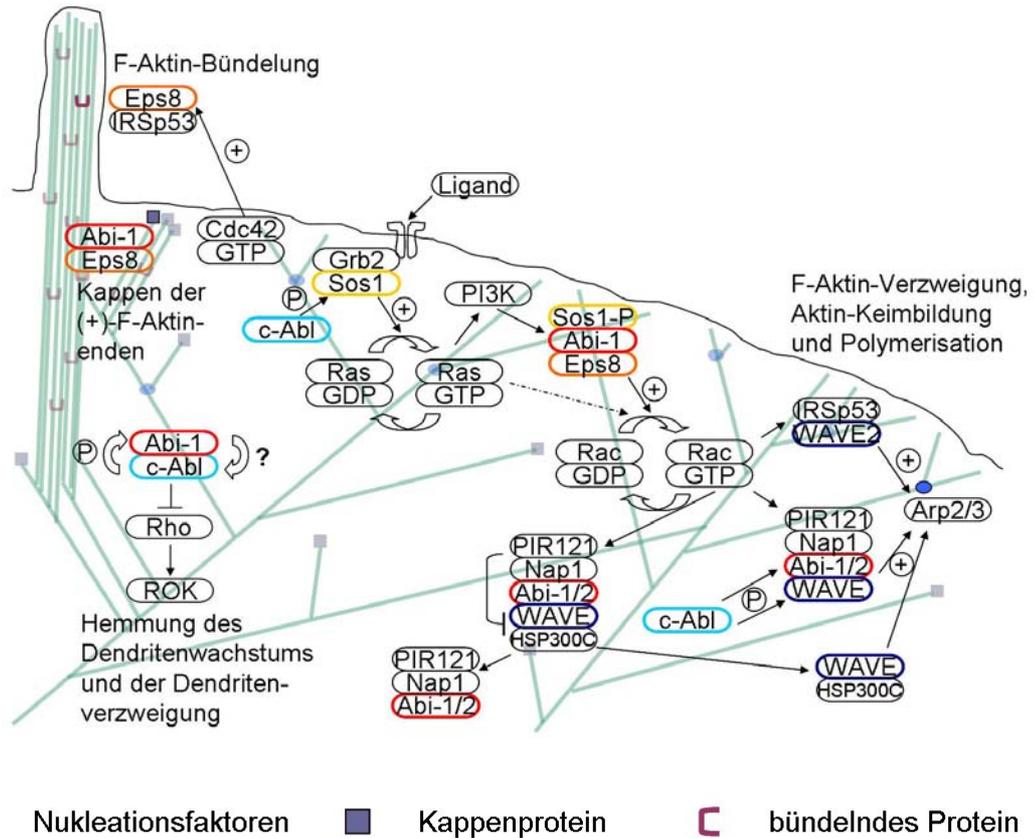


Abbildung 7: Modell bisher bekannter Abi-1-Signalwege mit c-Abl, Eps8, Sos1 und WAVE.

Abi-1 (rot): *Abl interactor 1*; Arp2/3: *actin related protein 2/3*; c-Abl (türkis): zelluläre Abelson Tyrosinkinase; Cdc42: *cell division cycle 42*; Eps8 (orange): *epidermal growth factor receptor substrate 8*; F-Aktin: filamentöses Aktin; GDP: Guanin-5'-diphosphat; Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*; GTP: Guanin-5'-triphosphat; IRSp53: Insulinrezeptorsubstratprotein von 53 kDa; Nap1: Nck assoziiertes Protein 1; PI3K: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat; PIR121: p53 induzierbare mRNA 121; Rac: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*; Ras: *Roux avian sarcoma*; Rho: *Ras homologous member*, ROK: Rho assoziierte Kinase; Sos1 (gelb): *son of sevenless 1*; WAVE (blau): *WASP family verprolin-homologous*.
 Schematische Darstellung der Signalwege, mit denen Abi-1 und seine Interaktionspartner c-Abl, Eps8, Sos1 und WAVE mit den RhoGTPasen Rac, Cdc42 und Rho an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind.

1.5 ZIEL DER ARBEIT

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Abi-1 (*Abl interactor 1*) durch Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts die Entwicklung primärer hippocampaler Neurone beeinflusst. Von Interesse waren dabei die Ausbildung der Polarität und des Dendritenbaumes. Zudem sollte die Frage beantwortet werden, ob Abi-1 eine Rolle bei der Synapsenentwicklung hinsichtlich der Synapsendichte, der morphologischen Reifung und der funktionellen Reifung spielt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Abi-1 an der synaptischen Lokalisation seiner Interaktionspartner c-Abl (zelluläre Abelson Tyrosinkinase), Eps8 (*epidermal growth factor receptor substrate 8*), Sos1 (*son of sevenless 1*) und WAVE (*WASP family verprolin-homologous*) beteiligt ist.

Um den Einfluss von Abi-1 auf die Neurone zu charakterisieren, wurde zur selektiven Hemmung der Abi-1-Expression RNAi von Abi-1 in hippocampalen Neuronenkulturen etabliert und die Auswirkungen von Abi-1-RNAi mit den Auswirkungen einer Überexpression von Abi-1 in hippocampalen Neuronen verglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Zur Gewinnung von Hippocampus Zellen (2.3.5) wurden schwangere Ratten (Charles River) durch eine CO₂ Überdosis getötet (Bockmann/Böckers 0.103).

2.1.2 Chemikalien und biochemische Reagenzien

Die eingesetzten Chemikalien der Firmen AppliChem (Darmstadt), ICN-LabSolutions (Norheim), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Serva (Heidelberg) waren von analytischem Reinheitsgrad. Die Herkunft von Produkten anderer Firmen wird bei der Erwähnung im Methodenteil angegeben.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Elektroporations-Küvetten (BioRad, München)

Gefrier Röhrchen 1.8 ml (Nunc, Wiesbaden)

Hybond (Amersham Biosciences, Freiburg)

Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim)

Petrischalen 94 mm (Nunc, Wiesbaden)

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1 ml (Eppendorf, Hamburg)

Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Hamburg)

Röntgenfilm (Amersham Biosciences, Freiburg)

Sterilfilter 0,22 µm und 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Dassel)

UV Küvette (Hellma, Müllheim)

3MM Whatman Papier (Schleicher & Schuell, Dassel)
Zellkulturflaschen 25 cm² und 75 cm² (Nunc, Wiesbaden)
Zellkulturplatten 6 well und 24 well (Nunc, Wiesbaden)
Zellkulturschalen 94 mm (Nunc, Wiesbaden)
Zellsieb 1,25 µm (Falcon, Gräfelfing-Lochham)
Zentrifugen-Falcons 15 ml und 50 ml (Nunc, Wiesbaden)

2.1.4 Geräte

Bechergläser (50, 100, 500, 1000ml; Schott, Mainz)
Elektroporator (BioRad, München)
Gelkammern (BioRad, München)
Gelträger (BioRad, München)
Glasplatten (BioRad, München)
Heraeus-Zentrifuge (Heraeus-Kendro, Hanau)
Inkubator (37°C – Zellkultur; Heraeus-Kendro, Hanau)
Mikroskop (Zeiss, Oberkochen)
PCR Maschine (Eppendorf, Hamburg)
Pipettboy (Hirschmann, Eberstadt)
Pipetten (P10; P20; P100; P200; P1000; Eppendorf, Hamburg)
Photometer (Beckman Coulter, Krefeld)
Semidry-Blotting Kammer (cti, Idstein)
Spannungsgesät (BioRad, München)
Sterilbank (Nunc, Wiesbaden)
Thermocycler (BioRad, München)
Thermomixer (Eppendorf, Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge pico (Heraeus-Kendro, Hanau)

2.1.5 Elektronische Datenverarbeitungsprogramme

Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Incorporated)
AxioVision Rel. 4.5 (Zeiss, Oberkochen)

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung der *E. coli*

Der verwendete *E.coli*-Stamm DH5 α wurde in sterilem LB-Medium bei 37°C und 200 rpm auf einem Rundschüttler vermehrt. Die Selektion von plasmidhaltigen Bakterien erfolgte durch Zugabe der Antibiotika Ampicillin (75 μ g/ml) oder Kanamycin (50 μ g/ml). Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurde das LB-Medium autoklaviert, nach Abkühlung auf 60°C mit dem Antibiotikum versetzt und in Petrischalen gegossen. Glycerindauerkulturen wurden aus 800 μ l Bakterienkultur (OD₆₀₀ von 0,8) und 200 μ l 100 % Glycerin hergestellt und bei -70°C gelagert.

LB-Medium:	20,0 g	LB-Broth Base (Invitrogen, Karlsruhe)
	ad 1 l	Aqua dest.

LB-Agar:	32,0 g	LB Agar (Invitrogen, Karlsruhe)
	ad 1 l	Aqua dest.

2.2.2 Herstellung elektrisch-kompetenter Bakterien

100 ml steriles 2YT-Medium wurden mit *E.coli* DH5 α Zellen aus einer ÜN-Kultur angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37°C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 vermehrt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Bakterien zentrifugiert (2.000 x g, 10 min, 4°C) und das Pellet in 50 ml eiskaltem Aqua dest. resuspendiert. Die Suspension wurde erneut zweimal in Aqua dest. gewaschen, zentrifugiert (2.000 x g, 10 min, 4°C), und das Pellet mit dem gleichen Volumen an 10 % Glycerin resuspendiert. Aliquots der kompetenten Bakterien von 50 μ l wurden bei -70°C eingefroren und gelagert.

2YT-Medium:	16,0 g	Peptone
	10,0 g	Yeast-Extrakt

5,0 g	NaCl
ad 1 l	Aqua dest.

2.2.3 Transformation elektrisch-kompetenter Bakterien

Aliquots kompetenter Bakterien (2.2.2) wurden auf Eis aufgetaut, mit je 1-2 μ l Ligationsansatz (2.3.7) oder 0,1 μ g Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Küvette (BioRad, München) überführt. Zur Transformation der Bakterien wurde mit Hilfe des Elektroporationsgerätes (BioRad, München) eine Spannung von 1,8 kV angelegt. Nach Überführung der Bakterien in 1 ml SOB-Medium in ein 2 ml Reaktionsgefäß folgte eine Inkubation von 30 min bei 37°C auf dem Schüttler. Nach der Pelletierung der Bakterienzellen durch Zentrifugation (3.500 x g, 3 min, RT) wurden der Überstand bis auf 100 μ l abgenommen, die Zellen darin resuspendiert und auf einer Selektionsagarplatte ausplattiert und anschließend ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

SOB Medium:	20,0 g	Peptone
	5,0 g	Yeast-Extrakt
	0,5 g	NaCl
	ad 1 l	Aqua dest.
	20 mM	MgCl ₂

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* mittels alkalischer Lyse

Von 1 ml ÜN-Kultur wurde nach einem Zentrifugationsschritt (8.000 x g, 3 min, RT) der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zuerst in 200 μ l P1 (Lysepuffer) resuspendiert, nach Zugabe von 200 μ l P2 (alkalischer Lysepuffer) vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l P3 (Neutralisationspuffer) wurde die Suspension anschließend mit

200 µl Chloroform versetzt und gemischt. Nach Zentrifugation der Suspension (12.000 x g, 10 min, RT) wurden 550 µl der oberen, wässrigen Phase mit einem Gemisch aus 1 ml 100 % eiskalten Ethanol und 40 µl einer 3 M Natriumacetatlösung, pH 5,2, versetzt und zentrifugiert (13.000 x g, 30 min, RT). Das DNA-Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol [v/v] gewaschen, bei RT getrocknet und in 10 µl RNase Aqua bidest suspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

P1 (Lysepuffer)	50 mM	Glukose
	25 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	10 mM	EDTA
P2 (alkalischer Lysispuffer)	200 mM	NaOH
	1 %	SDS [m/v]
P3 (Neutralisationspuffer)	3 M	Kaliumacetat
	11,5 %	Essigsäure [v/v]

2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* durch Anionenaustauschersäulen

Für die Sequenzierung wurde Plasmid-DNA aus 4 ml Bakterienkultur mit Hilfe des *Jetquick Plasmid Mini Prep Spin Kits* (Genomed, Löhne) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Endotoxinfreie DNA-Isolierung im größeren Maßstab wurde mit dem *Nucleo-Bond® PC 500 EF-Kit* (Machery-Nagel, Duren) entsprechend den vom Hersteller angegebenen Vorschriften durchgeführt. Die Endotoxin freie DNA wurde u. a. für die Transfektion von eukaryotischen Zellen verwendet (2.5.4 und 2.5.6).

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung von DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgte spektralphotometrisch bei 260 nm gegen Aqua dest. als Referenz.

2.3.4 Restriktionsanalyse

Zur Herstellung von DNA Fragmenten für Ligationen mit spezifischen endständigen Schnittstellen wurden folgende Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben verwendet: *Bgl II*, *Hind III*, *EcoR I* (Fermentas, St. Leon-Rot).

Analytischer Ansatz:	0,2 – 2 µg	DNA
	1 µl	10x Restriktionspuffer
	1 U	Restriktionsendonuklease
	ad 10 µl	Aqua dest.

Präparativer Ansatz:	15 µg	DNA
	oder 50 µl	PCR Produkt
	8 µl	10x Restriktionspuffer
	3 - 4 U	Restriktionsendonuklease
	ad 80 µl	Aqua dest.

Nach Inkubation bei 37°C für 1 – 2 h im Heizblock wurden die Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde als Marker die 100bp *Ladder* bzw. 1kb *Ladder* der Firma Invitrogen (Karlsruhe) mit aufgetrennt. Nach Ethidiumbromid-Färbung wurden die Spaltprodukte unter UV-Beleuchtung ausgewertet.

6x DNA-Probenpuffer:	0,25 %	Bromphenolblau [m/v]
	30 %	Glyzerin [m/v]
	50 mM	EDTA pH 8,0

Ethidiumbromidlösung:	10,0 mg	Ethidiumbromid
	ad 1,0 ml	Aqua dest.; dunkel gelagert

2.3.5 DNA Agarose-Gelelektrophorese

Diese Form der Elektrophorese wurde für die Analyse der durch Restriktions-spaltung oder PCR-Amplifizierung erzeugten DNA-Fragmente verwendet und ermöglichte eine qualitative Aussage über die Größe der aufgetragenen und geschnittenen DNA.

Die Agarose (0,8 – 3,0 % (m/V)) wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach der Zugabe der Ethidiumbromidstammlösung (Roth, Karlsruhe) in einer 1:1.000 fachen Verdünnung wurde die Lösung in einen Gelträger (BioRad, München) gegossen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 90 V durchgeführt und nach Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Beleuchtung ausgewertet und mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (Pharmacia Biotech, Freiburg) dokumentiert.

50x TAE-Puffer pH 8,3:	100,0 ml	EDTA pH 8,0
	42,0 g	Tris
	57,0 ml	Eisessig
	ad 1 l	Aqua dest.

2.3.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente gewünschter Größe wurden nach Elektrophorese anhand der Größenstandards identifiziert, aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des *Jetquick Gel Extraction Spin Kits* (Genomed, Löhne) entsprechend den Anweisungen des Herstellers eluiert.

2.3.7 Ligation und TOPO-Klonierung

Für die enzymatische Verknüpfung einzelner DNA-Fragmente wurde eine T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die T4-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen dem 5'-Phosphat- und dem 3'-Hydroxyl-Ende doppelsträngiger DNA. Das molare Verhältnis Vektor zu Insert betrug 1:3.

Ligationsansatz:	50 – 100 ng	linearisierte Plasmid-DNA + DNA-Insert
	2 µl	Ligase-Puffer 5x
	1 U	T4-DNA-Ligase
	ad 10 µl	Aqua dest.

Der Ligationsansatz wurde entweder bei 14°C ÜN oder für 2 h bei RT inkubiert und anschließend für eine Transformation (2.2.3) eingesetzt.

Mit Hilfe des *TOPO TA cloning* Kits (Invitrogen, Karlsruhe) wurden PCR-Produkte direkt nach der PCR in den mitgelieferten TOPO-Vektor kloniert. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.3.8 Auswahl von Oligonukleotiden

Die Primer für Sequenzierung und PCR (*polymerase chain reaction*) wurden so ausgewählt, dass sie über eine Länge von 17-25 Basen und einem GC-Gehalt von 50 % verfügten.

Primer für Mutageneseexperimente umfassten 43 Basen, wobei die gewünschte Mutationen in die Mitte der Primer eingefügt wurde, so dass auf beiden Seiten 13-14 Basen der richtigen DNA-Sequenz lagen.

Folgende Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen:

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.

Primer für PCR	5'-Sequenz-3'
Abi-1 f	GCAGATGTTACTAGAGGAGGAG
Abi-1 r	GAAACCACCAAGCCCTCC
Aktin f	CAGAAGGAGATCACTGCCCT
Aktin r	CTGATCCACATCTGCTGGAA
Primer für Klonierungen	
Abi-1-RNAi f	GATCCCCAGGCTACAGACAAGAGGAATTCAAG AGATTCCTCTTGTCTGTAGCCTTTTTTGAAA
Abi-1-RNAi r	AGCTTTTCCAAAAAGGCTACAGACAAGAGGA ATCTCTTGAATTCCTCTTGTCTGTAGCCTGGG
Primer für Sequenzierungen	
pSuper retro f	GGAAGCCTTGGCTTTTG
pCMV f	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
Primer für Mutagenese	
RNAi Resistenz f	ACAACACTACATACAAGCGACGGATAAACGCAA AGCTCTAGAAGA
RNAi Resistenz r	TCTTCTAGAGCTTTGCGTTTATCCGTCGCTTG TATGTAGTTGT

2.3.9 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden sowohl DNA-Fragmente selektiv amplifiziert als auch DNA modifiziert. Die Primer (2.3.8) binden am 5'- bzw. 3'-Ende der DNA-Matrize, so dass die thermostabile *Taq*-Polymerase die kurzen Doppelstränge verlängert. Es wurde der *High fidelity PCR-Supermix* (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, er enthält eine *Taq*-Polymerase und eine *Pfu*-Polymerase mit *proofreading*-Aktivität sowie einen dNTP-Mix im entsprechenden Puffer.

PCR-Ansatz: 1 µl DNA template (1 ng/µl)
 1 µl 5'-Primer (50 ng/µl)

1 μ l	3'-Primer (50 ng/ μ l)
47 μ l	<i>High fidelity PCR-Supermix</i>

Die PCR wurde im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Programm durchgeführt.

Tabelle 2: Protokoll einer PCR.

In der Tabelle sind die verschiedenen Schritte einer PCR sowie Temperatur, Dauer und Anzahl der Zyklen dargestellt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	94°C	3 min	1
Denaturierung	94°C	30 s	35
Anlagerung der Primer	58°C	30 s	
Extension	72°C	1 min pro kb	
Extension	72°C	10 min	1

2.3.10 Design des Abi-1-RNAi Konstruktes

Die Auswahl der Zielsequenz für RNAi wurde anhand der Sequenz von Abi-1 (gi:13242309/NM_024397.1, *Rattus norvegicus*) auf zwei unabhängigen Internetseiten (rnaidesigner.invitrogen.com/sirna/design.de und biotools.idtdna.com/rnai/rnai.aspx) mit speziell dafür angebotenen Suchmaschinen durchgeführt. Nur folgende Sequenz wurde für Abi-1 von beiden Suchprogrammen ausgewählt: 5'-AGGCTACAGACAAGAGGAA-3'. Die Sequenz ist spezifisch für Abi-1.

Die Oligonukleotide zum Klonieren des Abi-1-RNAi Konstruktes wurden nach folgendem Schema gestaltet:

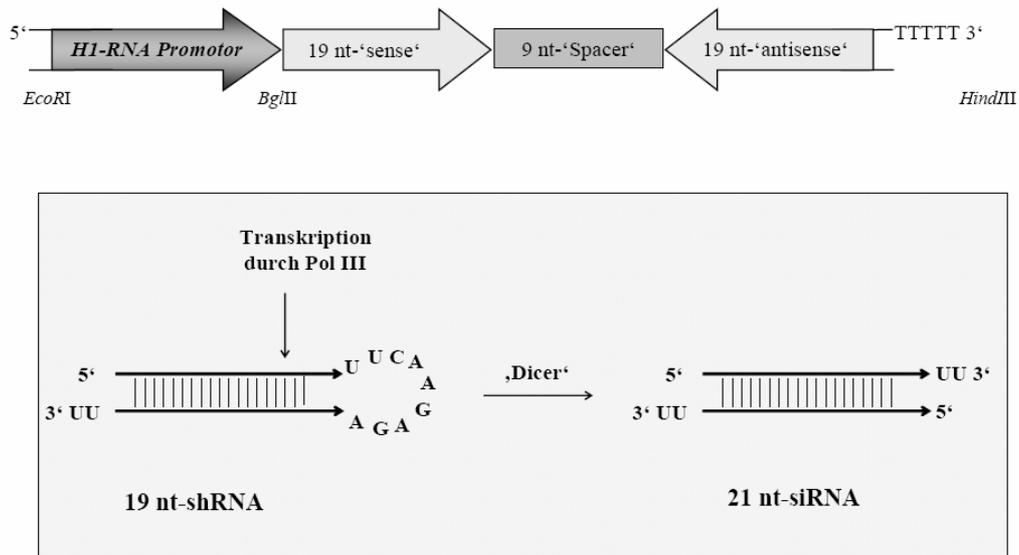


Abbildung 8: Schematische Übersicht über das pSUPER RNAi System™ (OligoEngine, Seattle, USA).

Der pSuper-Vektor enthält eine siRNA-Expressionskassette (siehe Abb.1), dem H1-Promotor folgt die genspezifische siRNA-Sequenz. Diese setzt sich aus einer 19 nt langen Sequenz zusammen, die homolog zur Zielsequenz ist und von einem 9 nt langen Zwischenstück (*loop*) vom reversen Komplement derselben Sequenz getrennt wird. Fünf aufeinander folgende Thymidin-Nukleotide bilden das Terminationssignal. Das Transkript faltet sich auf sich selbst zurück, dadurch entsteht eine kurze Haarnadelstruktur-RNA (*short hairpin RNA* = shRNA), die durch das Dicer-Enzym zur funktions-tüchtigen siRNA prozessiert wird.

Tabelle 3: Übersicht über das Design der Abi-1 spezifischen Oligonukleotid-Inserts (64 bp) des hergestellten pSUPER Vektors (RNAiAbi-1).

N: Name, T: Terminator, BgIII, HindIII: Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsendonukleasen

N	BgIII	Sense	loop	antisense	T	HindIII
S	5'-gatcccc	aggctacagacaagag gaa	ttcccgaga	ttcctctgtctgtagc ct	tttt	ggaaa-3'
as	3'-ggg	tccgatgtctgttcctt	aagtctct	aaggagaacaga catcgga	aaaaa	cctttcga-5'

Jeweils 150 pmol der komplementären Oligonukleotide wurden zur Ausbildung von H-Brücken untereinander mit 24 µl Aqua dest. gemischt und 4 min bei 90°C und 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurde die Lösung auf 4°C abgekühlt und für die Ligation (2.3.7) in den pSuper retro neo GFP Vektor (OligoEngine, Seattle, USA) eingesetzt.

2.3.11 Ortsgerichtete Mutagenese

Mittels des *QuikChange®II Site-Directed Mutagenesis* Kit (Stratagene, Amsterdam, NL) wurde in eine DNA-Sequenz eine oder mehrere Punktmutationen eingefügt. Dabei wurden zwei zueinander komplementäre Primer (2.3.8) mit der gewünschten Mutation nach Angaben des Herstellers verwendet.

PCR-Ansatz:	40 ng	Template
	5 µl	Reaktionspuffer 10x
	1,25 µl	5'-Primer (100 ng/µl)
	1,25 µl	3'-Primer (100 ng/µl)
	1 µl	d-NTP-Mix
	ad 50 µl	Aqua dest.
	1 µl	Pfu Polymerase (2,5 U)

Die PCR-Abläufe sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Protokoll einer PCR des QuikChange®II Site-Directed Mutagenesis Kit

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	30 s	1
Denaturierung	95°C	30 s	18
Anlagerung der Primer	55°C	1 min	
Extension	68°C	1 min pro kb (6 min)	

Anschließend wurde nach Herstellerangaben die methylierte, nicht-mutierte DNA mittels 1 µl (10 U) *Dpn I* für 1 h bei 37°C gespalten. Daraufhin wurden 2 µl des Ansatzes in kompetente Zellen transformiert (2.2.3). Nach Isolierung der rekombinanten DNA aus den Bakterien wurde mittels Sequenzierung der Erfolg der Mutagenese überprüft.

Diese Methode wurde dazu verwendet, eine RNAi resistente Abi-1 Konstrukt herzustellen (MutAbi-1myc), indem sieben Nukleotide in der RNAi-Bindungssequenz konservativ ausgetauscht wurden (Abbildung 9). Durch eine Verhinderung der Bindung von der siRNA an die mutierte Abi-1-Sequenz kann die Proteinexpression durch Abi-1-RNAi nicht inhibiert werden.

Abi-1-Sequenz

```
TAC ATA CAG GCT ACA GAC AAG AGG AAA GCT CT
TAC ATA CAA GCG ACG GAT AAA CGC AAA GCT CT
```

mutierte Abi-1-Sequenz

Abbildung 9: Schematische Darstellung der veränderten Abi-1-Sequenz in dem RNAi resistenten MutAbi-1myc.

Durch sieben konservative Austausche in der Abi-1-Nukleotidsequenz (109-141 bp) wurde eine Anlagerung der Abi-1-siRNA verhindert. RNAi-Bindungsstelle in Fettdruck.

2.3.12 Sequenzierung von DNA-Proben

Die Sequenzierungen wurden mit jeweils 2 µg DNA von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden folgende Primer (2.3.8) verwendet:

pSuper retro f: 5'-GGAAGCCTTGGCTTTTG-3'

pCMV f : 5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'

2.3.13 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA von kultivierten HeLa-Zellen und Hippocampuskulturen (2.5) wurde unter Verwendung des RNeasy Kits (Quiagen, Hilden) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers isoliert und mit RNase freier DNase

(Quiagen, Hilden) behandelt, um evtl. noch nach der Aufreinigung vorhandene DNA zu entfernen.

2.3.14 Reverse Transkription

Mittels Hexameren mit zufälliger Sequenz und M-MLV reverser Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) wurde Gesamt-RNA (2.3.13) in cDNA überführt.

400 ng Gesamt-RNA wurden zunächst auf 16,2 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und 5 min bei 65°C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe der restlichen Komponenten (Invitrogen, Karlsruhe) wurden folgende Inkubationen durchgeführt: 10 min 25°C, 50 min 37°C, 5 min 97°C und 20 min auf Eis.

Ansatz:	400 ng	Gesamt-RNA
	ad 16,2 µl	Aqua dest.
	6 µl	first strand buffer 5x
	3 µl	DTT 0,1 M
	1,2 µl	random hexamere 2 µg/µl
	2,4 µl	d-NTP-Mix 10 mM
	1,2 µl	M-MLV Reverse Transkriptase 200U/µl

2.4 *In situ* Hybridisierung

Schockgefrorenes Gewebe wurde bei -20°C am Kryostaten 20 µm dick geschnitten. Die Hybridisierung erfolgte direkt auf den Schnitten unter Verwendung des folgenden Oligonukleotids: AGCTGCGCCAGGGGCTGCTGGCCCCGAGTGGGCGG; (Abi-1, bp 823-787).

2.4.1 Herstellung und Aufreinigung der radioaktiv markierten Sonde

Die Sonden wurden mit ^{32}S -dATP radioaktiv markiert.

Ansatz:	1 μl	10x Terminale Transferasepuffer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
	1 μl	Oligonukleotid (40 ng/ μl)
	2 μl	Aqua dest.
	45 μl	^{32}S -dATP
	1,5 μl	Terminal Transferase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Nach Inkubation für 4 h bei 37°C und einem Zentrifugationsschritt (2 000 x g, 1 min, RT) wurde der Ansatz mit 38 μl Aqua dest. versetzt und mit Hilfe einer *Micro Bio-Spin P-30 Tris Chromatography column* (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.4.2 Hybridisierung der Gewebeschnitte

10 μl radioaktiv markierte Oligonukleotide wurden mit 60 μl Salmon Testes DNA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gemischt und 5 min bei 37°C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 600 μl Hybridisierungscocktail mit 200 mM DTT und 30 μl tRNA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden 60 μl Hybridisierungslösung auf einen Schnitt gegeben und ein zweiter Schnitt luftblasenfrei über diesen platziert. Nach Inkubation ÜN bei 42°C wurden folgende Waschschrte durchgeführt: 15 min in 1x SSC bei RT, fünfmal 15 min in Waschpuffer bei 50°C, 15 min in Waschpuffer bei RT zum Abkühlen und dreimal 2 min bei RT in 1x SSC. Daraufhin folgten diverse Inkubationsschritte: 15 s bei RT in 50 % Ethanol, 15 s bei RT in 70 % Ethanol, 15 s bei RT in 96 % Ethanol, 15 s bei RT in 100 % Ethanol. Nach Trocknen der Schnitte wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Entwicklung der Filme erfolgte nach 8-24 Tagen.

Hybridisierungscocktail:	10 ml	Formamid (deion.)
	4,0 ml	20x SSC
	2,0 ml	0,2 M PBS
	0,2 ml	50x Denhardt's Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
	1,0 ml	20 % N-Lauroyl-Sarcosin
	2,0 g	Dextransulfat
	Waschpuffer:	100 ml
	2,0 ml	β -Mercaptoethanol
	ad 2 l	Aqua dest.

2.5 Methoden der eukaryotischen Zellkultur

2.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

In dieser Arbeit wurden „HeLa“-Zellen verwendet. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um Epithelzellen eines Zervixkarzinoms von einer Patientin namens Henriette Lacks. Die Zellen sind vom humanen Papillomvirus befallen. Die Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ, Braunschweig) erworben.

Die Kultivierung der HeLa Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C, einer wassergesättigten Atmosphäre von Luft und 5 % CO₂ in DMEM (GIBCO, Karlsruhe) (10 % FKS (Hyclone, Logan, USA), 1 % Glutamin (GIBCO, Karlsruhe) [v/v]). Die Arbeiten wurden steril durchgeführt.

Zweimal pro Woche, bevor die HeLa Zellen Konfluenz erreichten, wurden die Zellen passagiert. Dabei wurden die Zellen mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺; GIBCO, Karlsruhe) gewaschen und mittels Trypsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin) bei 37°C vom Boden der Kultur-Flasche abgelöst. Bei der Zugabe von DMEM (supplementiert) wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 in eine neue Flasche passagiert.

2.5.2 Einfrieren eukaryotischer Zelllinien

Trypsinierte HeLa-Zellen (75 mm Kulturflaschen, vor Konfluenz) wurden zentrifugiert (1.000 x g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (DMEM mit 10 % FKS und 10 % DMSO) zu 1.000.000 Zellen/ml resuspendiert. 1 ml Aliquots wurden in Gefrieröhrchen überführt und stufenweise mit Hilfe eines Cryogefäßes (Nalgene, Neerijse, B) auf -70°C heruntergekühlt. Die weitere Lagerung der Zelllinien erfolgte über flüssigen Stickstoff bei -196°C.

2.5.3 Auftauen von eukaryotischen Zelllinien

Aliquots gefrorener Zellsuspensionen wurden bei RT aufgetaut, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 10 ml DMEM (10 % FKS, 1 % Glutamin) versetzt. Nach Zentrifugation (1.000 x g, 3 min, RT) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in DMEM (10 % FKS, 1 % Glutamin) resuspendiert und in Kultur gebracht (2.5.1).

2.5.4 Transfektion eukaryotischer Zelllinien

Polyfect (Quiagen, Hilden) wurde zur Transfektion eukaryotischer Zelllinien verwendet. Die Transfektion wurde entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Nach 72 h wurden die Zellen entweder fixiert, um Fluoreszenzaufnahmen zu erstellen (2.7.1), oder lysiert, um Gesamt-RNA (2.3.13) oder Gesamt-Protein (2.6.1) zu isolieren.

2.5.5 Präparation von hippocampalen Primärneuronen

Unter sterilen Bedingungen wurden 24-well Zellkulturschalen mit 13 mm Deckgläschen mit 500 µl Poly-L-Lysin (0,05 mg/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) überschichtet. Nach Inkubation der Platten für 1 h bei 37°C wurde das Poly-L-Lysin abgenommen, die Platten dreimal mit Aqua dest. gewaschen und bis zum Gebrauch steril gelagert.

Eine trächtige Ratte (E 18) wurde mit einer Überdosis CO₂ getötet, die Embryonen entnommen und diese dekapitiert. Nach der Präparation der Gehirne wurden diese in eine mit HBSS (PAA, Cölbe) gefüllte Petrischale gelegt, unter einem Binokular (Schott, Mainz) nach Entfernung der Dura mater die Hippocampi entnommen und diese in ein 15 ml Falcon mit HBSS überführt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilbank. Nach dreimaligem Waschen der Hippocampi mit 10 ml HBSS wurde der Puffer bis auf 1,8 ml abgesaugt und mit 200 µl 2,5 % Trypsinlösung (Biochrom AG, Berlin) versetzt. Anschließend wurden die Hippocampi 20 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran folgte ein fünfmaliges Waschen mit 10 ml HBSS, wobei der Puffer beim letzten Waschschrift bis auf einen Rest von 1,6 ml abgesaugt wurde und der verbliebene Puffer mit 400 µl 0,05 % DNase I Lösung zu einer Endkonzentration von 0,01 % versetzt wurde. Die Auflösung des Gewebeverbandes erfolgte indem die Hippocampi 10-20fach durch eine 1000 µl Pipettenspitze gezogen wurden. Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein Nylonsieb (Maschenweite: 125 µm, Falcon, Gräfelfing-Lochham) in ein 50 ml Falcon filtriert. Durch das Sieb wurden 18 ml DMEM (supplementiert) der Zellsuspension zugefügt. Nach der Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim) wurde die Zellsuspension auf ein Endvolumen von 40.000 Zellen pro 500 µl/well eingestellt. Nach 24 h wurde das DMEM vollständig durch Neurobasalmedium (GIBCO, Karlsruhe) (supplementiert) ersetzt. Die Kultivierung der hippocampalen Neurone erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C, einer wassergesättigten Atmosphäre von Luft und 5 % CO₂.

Poly-L-Lysin	5 mg ad 100 ml	Poly-L-Lysin HBSS Puffer
DMEM supplementiert:	10 % 1 % 1 %	FKS [v/v] Glutamin [v/v] Penicillin/Streptomycin [v/v]

Neurobasal supplementiert:	2 %	B27 [v/v]
	1 %	Glutamin [v/v]
	1 %	Penicillin/Streptomycin [v/v]

2.5.6 Transfektion neuronaler Primärzellkulturen an 3 DIV und 7 DIV

Die neuronale Transfektion wurde mit Optifect (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Konditioniertes Medium wurde von den Zellen abgenommen und gesammelt. Danach wurden die Zellen zweimal mit 650 μ l HBSS Puffer gewaschen und anschließend mit 500 μ l Neurobasal (supplementiert mit B27 und Glutamin) versetzt. Für ein well wurden 50 μ l Neurobasal (ohne Supplementierung) mit 3 μ l Optifect versetzt und 5 min inkubiert. 1 μ g DNA wurde mit 50 μ l Neurobasal (ohne Supplementierung) gemischt und dies zur Optifect-Neurobasal-Mischung gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurden 100 μ l in ein well gegeben und die Zellen 6 h im Inkubator gestellt. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 ml HBSS Puffer gewaschen. Anschließend wurde das zuvor gesammelte konditionierte Medium wieder auf die Zellen gegeben.

Bei einer Kotransfektion wurde jeweils 1 μ g DNA der beiden Konstrukte zusammen in 50 μ l Neurobasal (ohne Supplementierung) gemischt. Die eingesetzte Menge an Optifect betrug 3 μ l.

2.6 Methoden der Proteinbiochemie

2.6.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Auf Petrischalen mit 94 mm Durchmesser ausgesähte Zellen wurden zwei Mal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 200 μ l 2x SDS-Probenpuffer mit einem Zellschaber abgekratzt und lysiert. Die Zellsuspension wurde bei 95°C 5 min erhitzt und für SDS-Page und nachfolgendem Western Blot eingesetzt (2.6.3 und 2.6.4).

SDS-Probenpuffer Stammlösung:	4 g	SDS
	22 ml	Gyzerin
	16 ml	1M Tris HCl pH 6,8
	10 ml	Mercaptoethanol
	3 ml	Bromphenolblau 1 %
2x SDS-Probenpuffer:	2 ml	SDS-Probenpuffer Stammlösung
	2 ml	1 M Tris HCl pH 6,8
1 M Tris HCL pH 6,8:	121,14 g	Tris
	ad 800 ml	Aqua dest. pH 6,8 mit HCl einstellen
		Aqua dest.
	ad 1 l	

2.6.2 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Die Proteinkonzentration in den Proteinlysaten (2.6.1) wurde mit leichten Modifikationen nach Chapdelaine *et al.* (2001) bestimmt.

Sowohl 10 µl Gesamt-Protein Probe wie auch 10 µl BSA Lösung (Fraktion V, Sigma-Aldrich, Taufkirchen), in 2x SDS-Probenpuffer gelöst, mit Konzentrationen von 4 µg/µl bis 0,125 µg/µl, und 10 µl 2x SDS-Probenpuffer als Leerwert wurden 5 min bei 95°C denaturiert und in Doppelbestimmungen auf einen Streifen Cellulose Acetat-Folie (Satorius, Göttingen) aufgetragen. Die Membran wurde getrocknet, durch Methanol gezogen und 10 min in der Amidoschwarz Färbelösung inkubiert. Danach wurde die Membran mehrere Male mit Entfärberlösung gewaschen, getrocknet, mit 1 ml Auflöselösung versetzt und 30 min bei 50°C inkubiert. Die Proben wurden nach Durchmischen bei 620 nm gegen den Leerwert im Multiskan RC (Labsystems, Quickborn) gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand der Eichkurve bestimmt.

Amidoschwarz Färbelösung:	0.5 g	Amidoschwarz
	45 ml	Methanol
	45 ml	Aqua dest.
	10 ml	Eisessig
Entfärberlösung:	47,5 ml	Methanol
	47,5 ml	Aqua dest.
	5 ml	Eisessig
Auflöselösung:	80 ml	Ameisensäure
	10 ml	Essigsäure
	10 g	Trichloressigsäure

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Proteine in einem denaturierenden Acrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in eine Laufkammer (BioRad, München) eingespannt, der Kamm entfernt und die Laufkammer mit 1x Laufpuffer gefüllt. Die lysierten Proben (2.6.1) wurden 5 min bei 95°C denaturiert. Je 15 µg Protein und der Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) wurden auf das Gel aufgetragen. Es wurde eine konstante Spannung von 160 V angelegt. Die Auftrennung wurde beendet, wenn die unterste Bande des Markers das Ende des Gels erreicht hatte.

10 % Trenngel:	4,0 ml	Aqua dest.
	3,3 ml	30 % Acrylamid-Bis Lösung (29:1)
	2,5 ml	1,5 M Tris pH 8,8
	0,1 ml	SDS 10 % [m/v]
	0,1 ml	APS 10 % [m/v]
	0,004 ml	TEMED

Sammelgel:	2,1 ml	Aqua dest.
	0,5 ml	30 % Acrylamid-Bis Lösung (29:1)
	0,38 ml	1 M Tris pH 6,8
	0,03 ml	SDS 10 % [m/v]
	0,03 ml	APS 10 % [m/v]
	0,003 ml	TEMED
1,5 M Tris HCL pH 8,8:	181,5 g	Tris
	ad 900 ml	Aqua dest.
		pH 8,8 mit HCl einstellen
	ad 1 l	Aqua dest.
1 M Tris HCL pH 6,8:	121,14 g	Tris
	ad 800 ml	Aqua dest.
		pH 6,8 mit HCl einstellen
	ad 1 l	Aqua dest.
5x Laufpuffer:	15,1 g	Tris
	94,0 g	Glyzin
	ad 900 ml	Aqua dest.
	50 ml	SDS 10 %
	ad 1 l	Aqua dest.
10 % SDS:	10 g	SDS
	ad 100 ml	Aqua dest

2.6.4 Western Blot

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden für die immunchemische Charakterisierung mittels des semi-dry blotting Verfahrens auf eine Polyvenyldifluorid- (PVDF-) Membran (Hybond, Amersham Biosciences, Freiburg) transferiert und mittels Chemilumineszenz über Peroxidase gekoppelte 2. Antikörper nachgewiesen.

Die Membranen wurden für 30 s in Methanol aktiviert und anschließend, wie auch das Gel und die Whatmanpapiere, in 1x Blotpuffer getränkt. An der Anode der Blotkammer (cti, Idstein) wurden die Komponenten wie folgt luftblasenfrei platziert: Anode der Blotkammer, 2 Whatmanpapiere, PVDF-Membran, Gel, 2 Whatmanpapiere, Kathode der Blotkammer. Es wurde eine konstante Stromstärke von 1 mA/cm² für 1h angelegt. Nach dem Transfer wurde die Membran zum Blockieren mit 5 % Magermilchpulver in PBS 30 min bei RT inkubiert. Nach Waschen der Membran mit 1x PBS wurde sie mit dem 1. Antikörper, verdünnt in 1x PBS und ÜN bei 4°C inkubiert. Bevor die Membran mit dem 2. Antikörper für 1 h bei RT inkubiert wurde, wurden diverse Waschschrirte durchgeführt (5 min 1x PBS, zweimal 5 min PBS + 0,1 % Tween 20 und zweimal 5 min 1x PBS). Die Membran wurde erneut gewaschen (5 min 1x PBS, zweimal 5 min PBS + 0,1 % Tween 20 und zweimal 5 min 1x PBS) und in einer 1:1 Mischung der jeweiligen Lösungen A und B (SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate Pierce, Bonn) für 2 min inkubiert. Im Dunkeln wurde der Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham Biosciences, Freiburg) aufgelegt, der nach der Expositionszeit (10 s bis 1 h) entwickelt wurde.

Primäre Antikörper:

Anti-Abi-1 ms (MBL Woburn, USA) 1:1.000

Anti-Aktin ms (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 1:10.000

Anti-Eps8 rb (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) 1:500

Anti-Sos1 rb (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) 1:750

Anti-WAVE rb (Chemicon International, Hofheim) 1:750

Anti-c-Abl rb (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) 1:200

Anti-ProSAP2 gp (Pineda, Berlin) 1:1.000

Sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper:

Anti-Maus Immunoglobuline/HRP (Dako, Glostrup, DK) 1:1.500

Anti-Kaninchen Immunoglobuline/HRP (Dako, Glostrup, DK) 1:1.500

Anti-Meerschweinchen Immunoglobuline/HRP (Dako, Glostrup, DK) 1:1.500

12,5x Blotpuffer:	75,71 g	Tris
	12,5 g	SDS ultrapure
	ad 1 l	Aqua dest.
1x Blotpuffer:	16 ml	Blotpuffer 12,5x
	ad 160 ml	Aqua dest.
	40 ml	Methanol
10x PBS pH 7,4:	90,0 g	NaCl
	1,22 g	KH ₂ PO ₄
	8,15 g	Na ₂ HPO ₄
	ad 1 l	Aqua dest.

2.6.5 PSD-Präparation

Die Präparation der postsynaptischen Dichte (PSD) wurde nach Carlin *et al.* (1980) und Cotman *et al.* (1974) durchgeführt. Mit Hilfe einer Reihe von Zentrifugationsschritten wurde aus dem Gehirn (Gesamthirnllysate) einer Ratte die PSD-Fraktion isoliert. Zur Feststellung einer Anreicherung eines Proteins zur PSD hin wurden bei allen Schritten Proben der einzelnen Fraktionen entnommen und im Anschluß mit einem Western Blot (3.4.4) analysiert.

2.7 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

2.7.1 Fluoreszenz-Immunfärbung eukaryotischer Zellen

Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen auf dem Deckgläschen einmal mit PBS gewaschen und 10 min mit eiskalten 4 % PFA fixiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach einer 30 minütigen Inkubation mit der Blockierlösung wurde 1 h lang mit dem 1. Antikörper, verdünnt in Blockierlösung, in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Zellen in PBS gewaschen und 1 h mit dem

2. Antikörper, verdünnt in Blockierlösung, in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS und Aqua dest. wurden die Zellen in einer Mowiollösung eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

Primäre Antikörper:

Anti-Abi-1 ms (MBL, Woburn, USA) 1:200
Anti-Bassoon ms (Stressgen/Biomol, Hamburg) 1:800
Anti-MAP2 ms (Chemicon International, Hofheim) 1:500
Anti-KCNQ3 rb (Alomone Labs/ICS, München) 1:500
Anti-myc ms (Roche, Mannheim) 1:500
Anti-Eps8 rb (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) 1:300
Anti-Sos1 rb (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) 1:100
Anti-WAVE rb (Chemicon International, Hofheim) 1:250
Anti-c-Abl rb (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) 1:120
Anti-GluR1 rb (Upstate/Biomol, Hamburg) 1:100
Anti-ProSAP2 gp (Pineda, Berlin) 1:400

Sekundäre, Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper:

Alexa Fluor 488 Anti-Maus (Molecular Probes, Eugene, USA) 1:1.000
Alexa Fluor 568 Anti-Maus (Molecular Probes, Eugene, USA) 1:1.000
Alexa Fluor 568 Anti-Kaninchen (Molecular Probes, Eugene, USA) 1:1.000
AMCA Anti-Maus (Dianova, Hamburg) 1:100
Alexa 568 gekoppeltes Phalloidin (Molecular Probes, Eugene, USA) 1:40

PFA 4 %:

4 g Paraformaldehyd (PFA) wurden zusammen mit 45 ml Aqua dest. auf 60°C erwärmt und bis zur Löslichkeit mit 5N NaOH versetzt. Die klare Lösung wurde abgekühlt, auf 50 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und mit 50 ml 2x PB-Puffer vermischt.

2x PB-Puffer:	5,7 g	NaH ₂ PO ₄
	9,3 g	Na ₂ HPO ₄
	ad 500 ml	Aqua dest.

Blockierlösung:	2,0 g	BSA
	1,0 ml	Pferdeserum
	1,0 ml	Triton X 10 %
	ad 100 ml	1x PBS

Mowiol-Lösung:

12 g Mowiol® 4-88 (Calbiochem, Darmstadt) wurden in 30 ml Aqua dest. unter Rühren gelöst, 60 ml 0,2 M Tris pH 8,5 zugeben, die Lösung auf pH 8,5 eingestellt, ad 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und ÜN bei RT gerührt. Am nächsten Tag wurde die Lösung 45 min auf 90°C erhitzt und auf 50°C abgekühlt. Daraufhin wurden 30 g Glycerin eingerührt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.8 Morphologische Analysen und Analyse der Kolo-kalisation

2.8.1 Bestimmung der Anzahl der Dendriten

Die Anzahl der Dendriten eines Neurons wurde an GFP transfizierten oder GFP-kotransfizierten Neuronen bestimmt. Die Zellen wurden mittig im Bildausschnitt platziert und bei 400x Vergrößerung mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop2, Zeiss, Oberkochen) und der AxioVision Rel.4.5 Software (Zeiss, Oberkochen) aufgenommen. Alle im Bild liegenden Dendriten wurden gezählt. Es wurde definiert: ein primärer Dendrit geht direkt vom Zellkörper ab, ein sekundärer Dendrit geht von einem primären Dendrit ab, ein tertiärer Dendrit zweigt von einem sekundären Dendrit ab und ein quartärer Dendrit geht von einem tertiären Dendrit ab. Für alle Untersuchungsgruppen wurden insgesamt 20 Zellen aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen ausgewertet.

2.8.2 Bestimmung der Synapsendichte

Neuronale Zellen wurden nach 7 Tagen in Kultur transfiziert (2.5.6), nach 3 Tagen fixiert und anschließend das präsynaptische Markerprotein Bassoon immunzytochemisch angefärbt (2.7.1). Die Synapsen von mindestens 3 primären Dendriten wurden gezählt und die Länge des untersuchten Dendriten-Abschnittes wurde mit Hilfe der AxioVision Rel. 4.5 Software gemessen. Die Synapsendichte wurde aus dem Quotienten der Anzahl der Synapsen und der Länge des Abschnittes ermittelt und als Synapsenanzahl / 10 μm angegeben. Es wurden für jedes Konstrukt insgesamt 20 Zellen aus 3 unabhängigen Versuchen ausgewertet.

2.8.3 Bestimmung der Synapsenmorphologie

Hippocampale Neurone wurden nach 7 Tagen in Kultur transfiziert (2.5.6), nach 3 Tagen fixiert. Danach wurde das präsynaptische Markerprotein Bassoon immunzytochemisch angefärbt (2.7.1) und die Fluoreszenz dokumentiert (2.8.1). Die Synapsen wurden aufgrund des Abstandes zum Dendriten und der Fläche der Bassoon Markierung nach Entwicklungsstadien in drei Klassen eingeteilt: filopodienartige, dünne und pilzförmige Synapsen. Für jede Versuchsgruppe wurden mindestens 300 Synapsen von insgesamt 4 Zellen aus 3 von einander unabhängigen Versuchen ausgewertet. Die Werte wurden prozentual angegeben.

2.8.4 Kolokalisationsstudien

Zur Untersuchung der Kolokalisation zweier Proteine wurden Hippocampusneurone nach 7 Tagen in Kultur transfiziert (2.5.6) und nach 3 Tagen fixiert. Anschließend erfolgte eine immunzytochemische Markierung (2.7.1) der zwei Proteine. Eine Kolokalisation lag bei Überlappung der beiden Signale, die eine Formähnlichkeit der Markierung aufwiesen, vor. Es wurden bei der Bestimmung der Kolokalisation von Bassoon mit der GluR1-Untereinheit für

die jeweiligen Synapsenmorphologien 100 Bassoon-Signale an mindestens 4 Zellen aus 3 von einander unabhängigen Versuchen ausgewertet. Zur Bestimmung der Kolokalisation von Bassoon mit c-Abl, Eps8, Sos1 bzw. WAVE wurden 500 Bassoon-Signale an insgesamt 20 Zellen aus 3 von einander unabhängigen Versuchen ausgewertet.

2.9 Darstellung der Messergebnisse und statistische Analyse

Alle in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurden mindestens dreifach durchgeführt. Die Ergebnisse von repräsentativen Experimenten sind in Form der Mittelwerte \pm Standardabweichung gezeigt.

Zum Vergleich zwischen den Gruppen wurde nach der Prüfung auf Normalverteilung ein *t*-Test durchgeführt. Für die Kolokalisation von Bassoon und GluR1 wurde ein χ^2 -Test durchgeführt, da aufgrund des z. T. verhältnismäßig geringen Vorkommens einzelner Synapsenmorphologien unterschiedliche Anzahlen an Zellen ausgewertet wurden. Zur Kennzeichnung der statistisch signifikanten Befunde wurde die Sternsymbolik verwendet, die direkt in die Abbildungen eingetragen wurde ($p < 0,01$: *; $p < 0,001$: **; $p < 0,0001$: ***).

3 ERGEBNISSE

Bei einem Hefe-2-Hybrid-Screen wurde *Abl interactor 1* (Abi-1) als ein neuer Interaktionspartner des postsynaptischen Gerüstmoleküls *proline rich synapse associated protein 2/SH3 domain and ankyrin repeat containing protein 3* (ProSAP2/Shank3) identifiziert (Proepper *et al.*, 2007). Abi-1 ist an Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts regulatorisch beteiligt (1.3). Da die Entwicklung von Neuronen von einem funktionierenden, dynamischen Aktin-Zytoskelett abhängt, wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Rolle Abi-1 bei der strukturellen Entwicklung von hippocampalen Neuronen in Kultur spielt.

3.1 Expression und Lokalisation von endogenem Abi-1 im Gehirn und in neuronalen Zellen der Ratte

Die Expression und Lokalisation von Abi-1 wurde im Gehirn der Ratte und in primären hippocampalen Neuronen *in vitro* untersucht. Dazu wurde an Hirnschnitten mittels *in situ* Hybridisierung die Expression der Abi-1-mRNA dargestellt. Außerdem wurde die Abi-1-Expression in hippocampalen Zellen auf mRNA- und Proteinebene analysiert und die Lokalisation von endogenem Abi-1 in Hippocampuszellen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten untersucht. Dabei wurde die Lokalisation von Abi-1 sowohl an das mit Phalloidin markierte Aktin-Zytoskelett als auch in Synapsen im Vergleich zu dem präsynaptischen Marker Bassoon sowie dem postsynaptischen Marker ProSAP2/Shank3 immunzytochemisch gezeigt. Um festzustellen, ob Abi-1 in der postsynaptischen Dichte (PSD) angereichert und verankert vorliegt, wurde versucht, Abi-1 in den anfallenden subzellulären Fraktionen einer biochemischen Präparation der PSD nachzuweisen.

3.1.1 Verteilung der Abi-1-mRNA im Gehirn der Ratte während der Entwicklung

Die Expression der Abi-1-mRNA in den einzelnen Hirnregionen wurde anhand von *in situ* Hybridisierungen an horizontalen und sagittalen Rattengehirnschnitten während der postnatalen Entwicklung untersucht. Zu allen untersuchten Zeitpunkten wurde die Expression von Abi-1-mRNA nachgewiesen, wobei eine besonders hohe Transkriptionsrate im Cerebellum (Ce), Gyrus dentatus (Gy) des Hippocampus (Hi) und im Cortex (Co) vorlag (Abbildung 10).

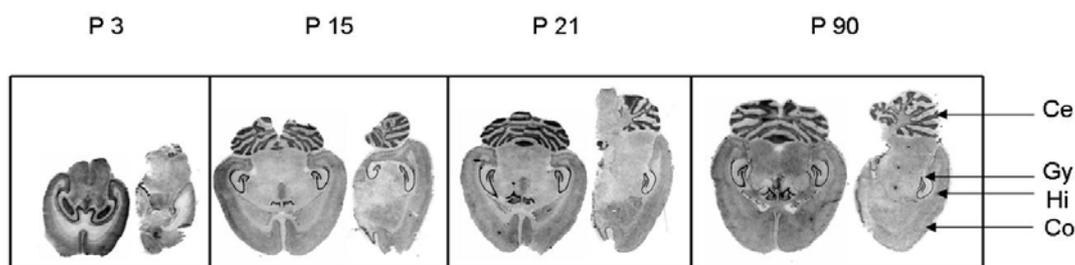


Abbildung 10: *In situ* Hybridisierung zum Nachweis von Abi-1-mRNA an horizontalen (jeweils links) und sagittalen (jeweils rechts) Rattengehirnschnitten während der postnatalen Entwicklung.

Abi-1: *Abl interactor 1*; P 3: postnatal Tag 3

Abi-1-mRNA wurde insbesondere im Cerebellum (Ce), Gyrus dentatus (Gy) des Hippocampus (Hi) und im Cortex (Co) exprimiert.

3.1.2 Abi-1-mRNA-Expression in kultivierten hippocampalen Neuronen

Um die Expression von endogener Abi-1-mRNA während der Entwicklung in hippocampalen Neuronen *in vitro* zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA von Hippocampuskulturen unterschiedlichen Alters isoliert und eine „Reverse Transkription“ durchgeführt. Anschließend folgte eine PCR mit spezifischen Primern für Abi-1 und Aktin. Es wurden jeweils gleiche Mengen der PCR aufgetragen; Aktin diente als interne Ladungskontrolle (Abbildung 11).

Abi-1-mRNA wurde bereits an 0 DIV (*days in vitro*), also direkt nach der Präparation der Zellen, exprimiert. Der Abi-1-mRNA-Spiegel stieg mit zunehmender Kultivierungsdauer der Neurone leicht an.

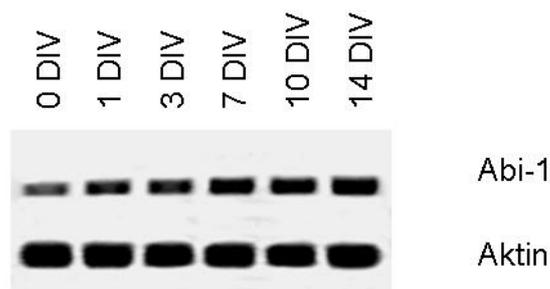


Abbildung 11: Expression der Abi-1-mRNA in primären hippocampalen Neuronen mit zunehmender Kulturdauer.

Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Die Expression der endogenen Abi-1-mRNA stieg mit zunehmendem Alter leicht an. Aktin diente als interne Ladungskontrolle. Abi-1-Proteinexpression in kultivierten hippocampalen Neuronen.

3.1.3 Abi-1-Proteinexpression in kultivierten hippocampalen Neuronen

Zur Untersuchung der Expression von endogenem Abi-1-Protein wurden Proteine aus Hippocampuskulturen unterschiedlichen Alters extrahiert und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Aktin diente als interne Ladungskontrolle.

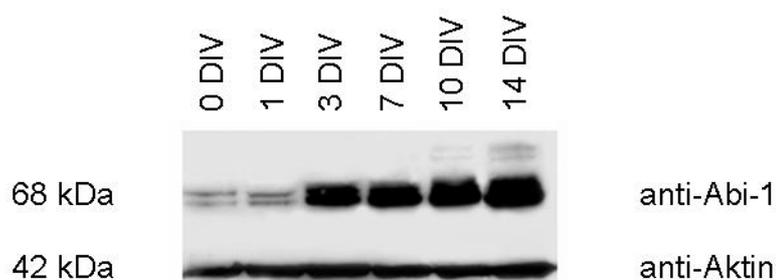


Abbildung 12: Abi-1-Proteinexpression in primären hippocampalen Neuronen mit zunehmender Kulturdauer.

Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Die endogene Abi-1-Proteinexpression nahm zwischen 1 DIV und 3 DIV stark und bis 14 DIV deutlich zu. Aktin diente als interne Ladungskontrolle.

Endogenes Abi-1-Protein war in den Zellen bereits vor Ausplattierung an 0 DIV nachweisbar (Abbildung 12). Mit zunehmender Kulturdauer nahm die Intensität des Abi-1-Signals zu. Besonders markant war der sprunghafte Anstieg des Abi-1-Proteins zwischen 1 DIV und 3 DIV. Ab 10 DIV wurden

zwei weitere, höhere Banden, die vermutlich auf Phosphorylierungsereignisse durch die Abl Tyrosinkinase zurückzuführen sind, sichtbar.

3.1.4 Lokalisation von Abi-1 in hippocampalen Neuronen

Um die Lokalisation von endogenem Abi-1 in Hippocampuszellen *in vitro* zu untersuchen, wurden hippocampale Neurone nach unterschiedlicher Kulturdauer fixiert und Abi-1 immunzytochemisch angefärbt (2.7.1).

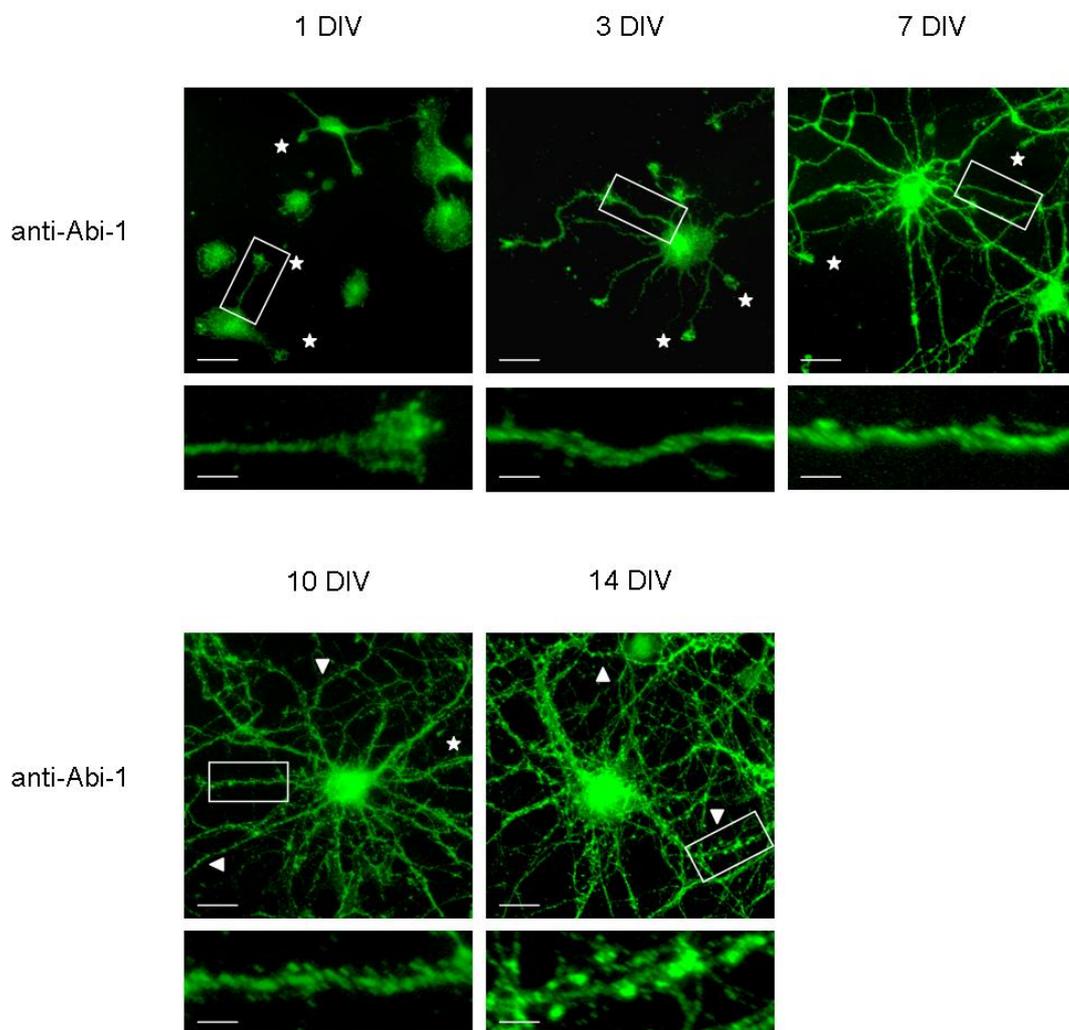


Abbildung 13: Entwicklungsabhängige Lokalisation von endogenem Abi-1 in primären hippocampalen Neuronen.

Abi-1 wurde immunzytochemisch nachgewiesen. (Balken: 20 µm, Balken im Ausschnitt: 5 µm). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Abi-1 lokalisierte zunächst punktförmig in Neuriten. Eine Anreicherung des Signals fand in Wachstumskegeln (Sterne) und in der späteren Entwicklung in Synapsen (Pfeile) statt.

Bereits in 1 DIV alten Neuronen zeigte sich ein punktförmiges Abi-1-Signal in den Neuriten (Abbildung 13). Das Abi-1-Signal war in den Wachstumskegeln angereichert (Stern). Ab 10 DIV lokalisierte Abi-1 zusätzlich in synaptischen Strukturen (Pfeil). Die Intensität des Abi-1-Signals in Synapsen nahm in der weiteren Entwicklung weiter zu (Pfeil 14 DIV).

3.1.5 Lokalisation von Abi-1 am Aktin-Zytoskelett

Wie bereits dargestellt, lokalisierte das endogene Abi-1 in Wachstumskegeln, Filopodien und Synapsen (3.1.4). Da alle diese Strukturen über ein Aktin basiertes Zytoskelett verfügen, wurde untersucht, ob Abi-1 mit F-Aktin kolokalisierte. Dazu wurden hippocampale Neurone 1 DIV fixiert und Abi-1 immunzytochemisch und F-Aktin mittels Fluoreszenz gekoppeltem Phalloidin markiert (Abbildung 14). Anreicherungen sowohl des Phalloidin-Signals als auch des endogenen Abi-1-Signals überlagerten sich in den Randbereichen von Lamellipodien (Kreis) und Filopodien (Pfeil) sowie in Wachstumskegeln (Stern). Die Lokalisation in Wachstumskegeln erfolgte im Axon und in Dendriten. Somit kolokalisierte Abi-1 mit dem Aktin-Zytoskelett.

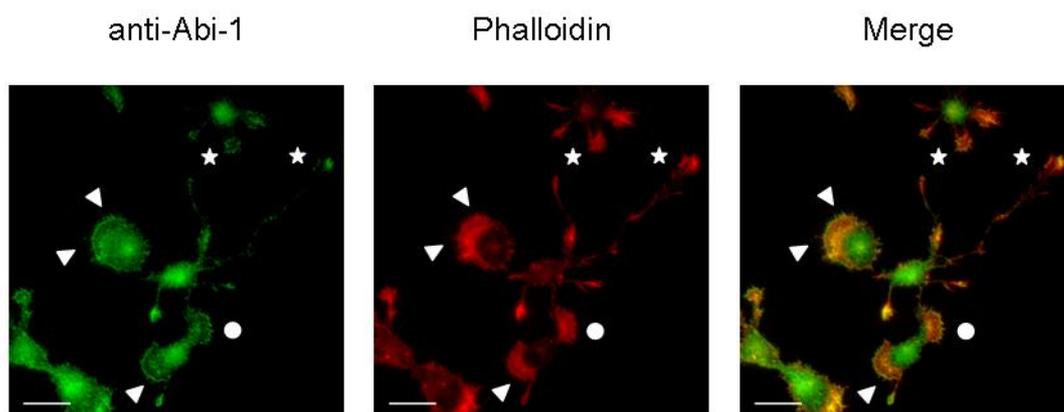


Abbildung 14: Lokalisation von endogenem Abi-1 (grün) im Vergleich zum Aktin-Zytoskelett (rot) in hippocampalen Neuronen 1 DIV.

Abi-1 wurde immunzytochemisch und das Aktin-Zytoskelett mittels Phalloidin-Färbung nachgewiesen. (Balken: 20 µm). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Anreicherungen des endogenen Abi-1-Signals kolokalisierten am Rand von Lamellipodien (Kreis) und von Filopodien (Pfeil) sowie in den Wachstumskegeln (Stern) mit dem Aktin-Zytoskelett.

3.1.6 Lokalisation von Abi-1 in synaptischen Strukturen

Um festzustellen, in welchem Teil der Synapse Abi-1 lokalisiert, wurden an Neuronen immunzytochemische Färbungen von prä- und postsynaptischen Proteinen (Markern) durchgeführt. Für die Kolokalisationsstudien von Abi-1 mit dem präsynaptischen Protein Bassoon bzw. dem postsynaptischen Protein ProSAP2/Shank3 wurden hippocampale Neurone 17 Tage in Kultur gehalten und anschließend die endogenen Proteine mit den entsprechenden Antikörpern immunzytochemisch angefärbt.

Die Doppelfärbung von Abi-1 mit Bassoon (Abbildung 15) zeigte eine Überlappung der beiden Signale im Bereich der Synapsen, während es bei der Doppelfärbung von Abi-1 mit ProSAP2/Shank3 (Abbildung 16) zu einer Überlagerung der Signale im Bereich der dendritischen Dornen kam. Diese Ergebnisse deuten auf eine postsynaptische Lokalisation von Abi-1 hin.

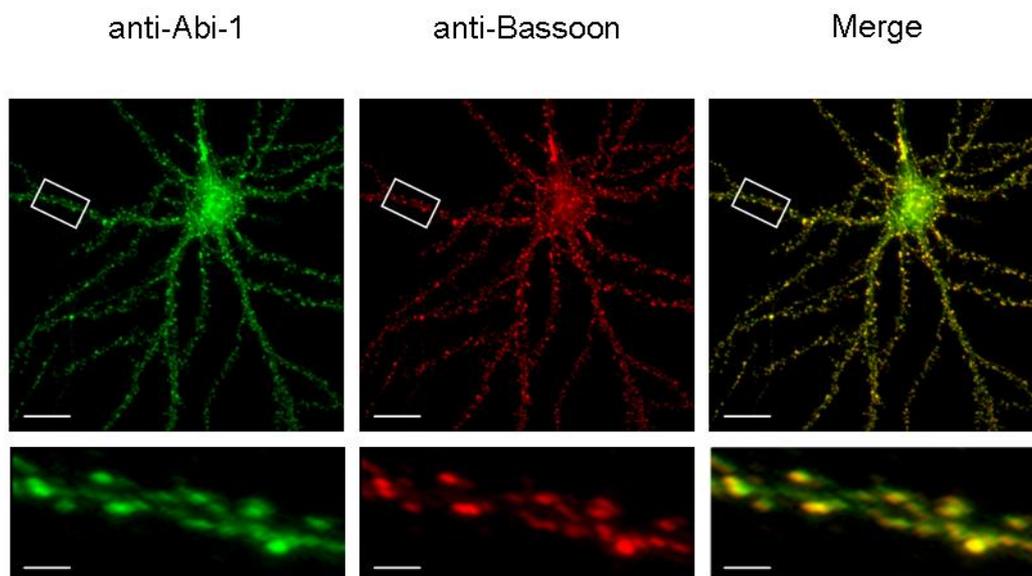


Abbildung 15: Lokalisation von endogenem Abi-1 (grün) im Vergleich zu präsynaptischem Bassoon (rot) in primären hippocampalen Neuronen 17 DIV.

Abi-1 und Bassoon wurden immunzytochemisch nachgewiesen. (Balken: 20 µm, Balken im Ausschnitt: 3 µm). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Abi-1 kolokalisierte mit dem präsynaptischen Markerprotein Bassoon.

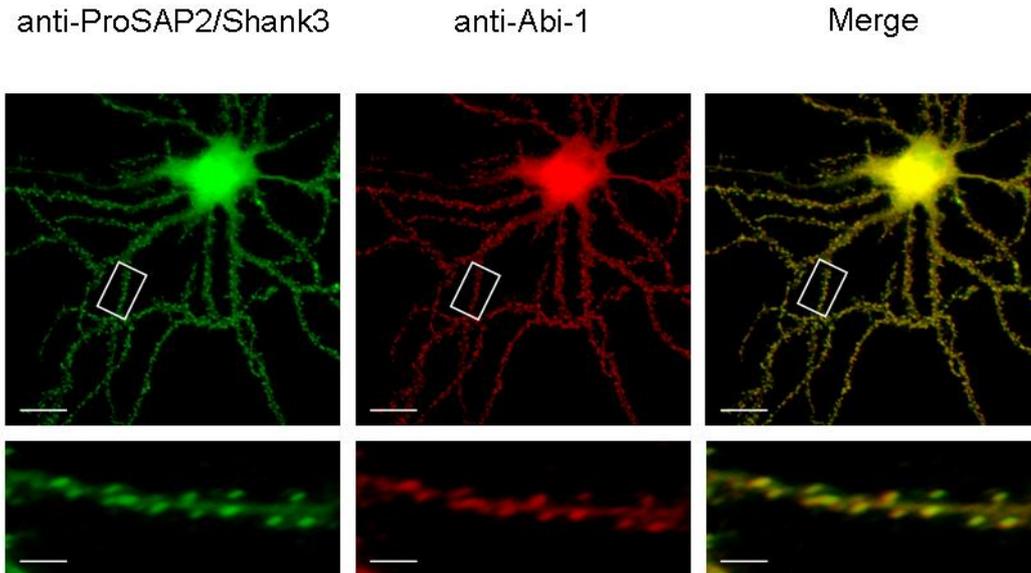


Abbildung 16: Lokalisation von endogenem Abi-1 (rot) im Vergleich zu postsynaptischem ProSAP2/Shank3 (grün) in primären hippocampalen Neuronen 17 DIV.

Abi-1 und ProSAP2/Shank3 wurden immunzytochemisch nachgewiesen. (Balken: 20 µm, Balken im Ausschnitt: 3 µm). Abi-1: *Abl interactor 1*; ProSAP2/Shank3: *proline rich synapse associated protein 2/SH3 domain and ankyrin repeat containing protein 3*; DIV: *days in vitro*. Es fand eine Überlagerung des Abi-1 und des postsynaptischen ProSAP2-Signals statt.

3.1.7 Lokalisation von Abi-1 in neuronalen Subfraktionen

Um festzustellen, ob Abi-1 auch biochemisch in der postsynaptischen Dichte (PSD) angereichert und ein fester Bestandteil der PSD ist, wurde eine biochemische Präparation der PSD durchgeführt und die anfallenden subzellulären Fraktionen mittels Western Blotting auf Abi-1 hin untersucht (2.6.3 - 2.6.5). Als interne methodische Kontrolle diente die Detektion des PSD-Proteins ProSAP2/Shank3, welches eine deutliche Anreicherung in der PSD-Fraktion zeigte (Abbildung 17).

Auch Abi-1 war in der PSD-Fraktion angereichert. Wie bereits in Abbildung 12 zu sehen, sind auch hier die möglichen Phosphorylierungsbanden von Abi-1 zu erkennen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Abi-1 in der PSD angereichert und dort fest verankert ist.

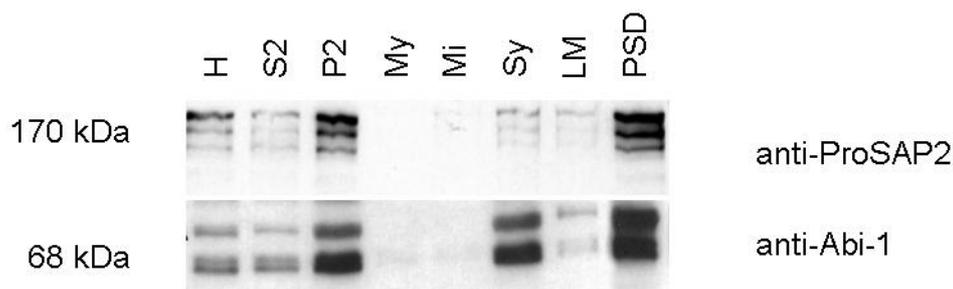


Abbildung 17: Nachweis von Abi-1- und ProSAP2-Protein in verschiedenen Subfraktionen einer PSD-Präparation.

H: Homogenat; S2: lösliche Fraktion; P2: unlösliche Fraktion; My: Myelin Fraktion; Mi: Mitochondrien Fraktion; Sy: Synaptosomen Fraktion; LM: Fraktion der leichten Membranen; PSD: PSD-Fraktion; Abi-1: *Abl interactor 1*; ProSAP2/Shank3: *proline rich synapse associated protein 2/SH3 domain and ankyrin repeat containing protein 3*.

Anhand der Anreicherung des Proteins ProSAP2 in der PSD wurde die PSD-Präparation methodisch kontrolliert. Abi-1 war besonders stark in der PSD-Fraktion angereichert.

3.2 Repression von Abi-1 in HeLa-Zellen mittels RNAi

Um den Einfluss von Abi-1 auf hippocampale Neurone zu untersuchen, wurde die RNAi-Technologie verwendet, um die Expression von endogenem Abi-1 zu reduzieren. Dazu wurden zunächst HeLa-Zellen, die Abi-1 endogen exprimieren, mit Abi-1-RNAi transfiziert und in diesem System zunächst die Effektivität des Abi-1-RNAi-Konstrukts ermittelt.

3.2.1 Reduktion der Abi-1-mRNA durch RNAi in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit dem Ausgangs-RNAi-Vektor (pSuper) als Kontrolle und dem Abi-1-RNAi-Konstrukt transfiziert. Nach drei Tagen wurde aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert und nach einer RT eine PCR mit Abi-1 spezifischen Primern durchgeführt. Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen wurde zusätzlich Aktin amplifiziert. Wie in Abbildung 18 ersichtlich, führte die Transfektion des Abi-1-RNAi-Konstruktes in HeLa-Zellen zu einer deutlichen Verminderung der Abi-1-mRNA-Expression.

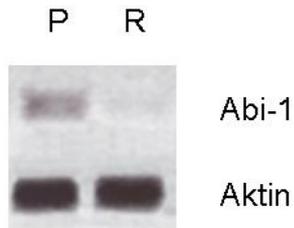


Abbildung 18: Änderung der Expression endogener Abi-1-mRNA in HeLa-Zellen durch Abi-1-RNAi.

P: pSuper (Kontrolle); R: Abi-1-RNAi. Abi-1: *Abl interactor 1*.

Abi-1-RNAi führte zu einer deutlichen Reduktion der Abi-1-mRNA in HeLa-Zellen. Es konnte eine etwa 80%ige Transfektionsrate mit den Konstrukten pSuper bzw. Abi-1-RNAi erreicht werden.

3.2.2 Repression von Abi-1-Protein in HeLa-Zellen

Um anschließend die Effektivität der Reduktion des Abi-1-Proteins zu untersuchen, wurde aus HeLa-Zellen, welche drei Tage zuvor mit pSuper oder Abi-1-RNAi transfiziert wurden, Gesamtprotein extrahiert und mittels SDS-Gel-elektrophorese aufgetrennt (Abbildung 19). Das Aktin-Signal diente wiederum als interne Ladungskontrolle. Im Gegensatz zur Kontrolle (pSuper) wurde bei gleicher Ladungsmenge nach Abi-1-RNAi-Transfektion deutlich weniger Abi-1-Protein detektiert. Die endogene Proteinexpression von Abi-1 in HeLa-Zellen wurde damit stark durch Abi-1-RNAi reduziert.

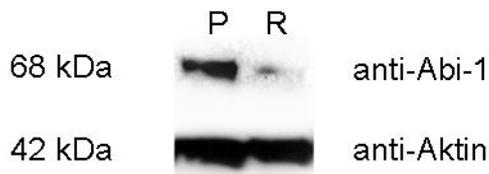


Abbildung 19: Hemmung der Abi-1-Proteinexpression durch Abi-1-RNAi in HeLa-Zellen.

P: pSuper (Kontrolle); R: Abi-1-RNAi. Abi-1: *Abl interactor 1*.

Die Abi-1-RNAi führte zu einer deutlichen Abnahme des Abi-1-Proteinspiegels in HeLa-Zellen. Es konnten etwa 80 % der Zellen mit pSuper bzw. Abi-1-RNAi transfiziert werden.

3.2.3 Darstellung der Repression von Abi-1 in HeLa-Zellen mittels Immunzytochemie

Eine weitere Möglichkeit, die Effektivität der Abi-1-RNAi zu testen, ist die immunzytochemische Färbung von Abi-1 in Abi-1-RNAi transfizierter Zellen. Dazu wurden Zellen drei Tage nach Transfektion fixiert und Abi-1 immunzytochemisch angefärbt (Abbildung 20). Der Vorteil dieser Methode ist, dass so einzelne Zellen untersucht werden können, und damit kein Hintergrundsignal aus untransfizierten Zellen stören kann.

Alle beobachteten Abi-1-RNAi transfizierte Zellen zeigten im Gegensatz zur Kontrolle ein kaum zu detektierendes Abi-1-Signal. Dies wies erneut darauf hin, dass Abi-1-RNAi effektiv die endogene Abi-1-Proteinexpression reduzierte.

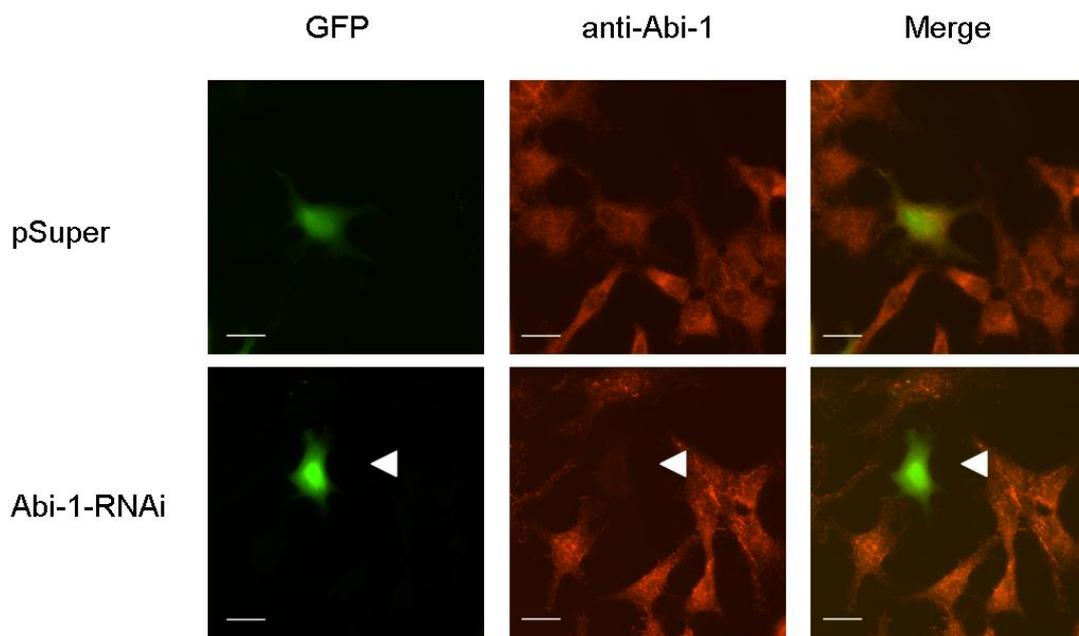


Abbildung 20: Immunzytochemische Färbung von Abi-1 (rot) in transfizierten HeLa-Zellen.

Transfektion mit dem Ausgangsvektor pSuper bzw. mit Abi-1-RNAi (pSuper). (Balken: 20 µm). Abi-1: *Abl interactor 1*.

Die Repression des Abi-1-Proteinspiegels durch Abi-1-RNAi zeigte sich durch einen deutlichen Rückgang der Abi-1 Färbungsintensität.

3.3 Einfluss von Abi-1 auf die Polarität, die Dendriten und das Aktin-Zytoskelett hippocampaler Neurone

Die Untersuchung des Einflusses von Abi-1 auf die Zellmorphologie wurde an hippocampalen Zellen durchgeführt, die zum einen 3 DIV und zum anderen 7 DIV transfiziert und jeweils drei Tage später fixiert wurden. Aufgrund der verminderten Transfektionsraten von primären hippocampalen Neuronen wurde die Effektivität von Abi-1-RNAi hier nur durch immunzytochemische Färbungen bestimmt, da bei anderen Methoden durch die nicht transfizierten Zellen ein zu hohes Hintergrundsignal auftrat. Die durch die Veränderung der Abi-1-Konzentration in den Zellen auftretenden Phänotypen wurden mit Hilfe der homogenen GFP-Verteilung in den transfizierten Zellen und immunzytochemischen Färbungen untersucht. Anhand veränderter Phänotypen konnte auch die Spezifität der RNAi gezeigt werden. Weiterhin wurde der Einfluss von Abi-1 auf die Polarität der Zellen und auf das Aktin-Zytoskelett mittels immunzytochemischen Färbungen analysiert.

3.3.1 Einfluss von Abi-1 auf den Phänotyp hippocampaler Neurone

Um den Einfluss von Abi-1 auf den Phänotyp hippocampaler Neurone aus der Ratte *in vitro* zu untersuchen, wurden die Zellen nach drei bzw. sieben Tagen in Kultur transfiziert und nach drei weiteren Tagen fixiert und immunzytochemisch angefärbt. Transfizierte Zellen wurden anhand der GFP-Expression identifiziert.

Die Expression von Abi-1-RNAi verringerte effektiv den Abi-1-Proteinspiegel in primären hippocampalen Neuronen beider Kulturzeiten (Abbildung 21 und Abbildung 22, Pfeil). Interessanterweise wiesen die RNAi transfizierten Zellen im Gegensatz zur Kontrolle einen Phänotyp mit einem stärker verzweigten Dendritenbaum auf.

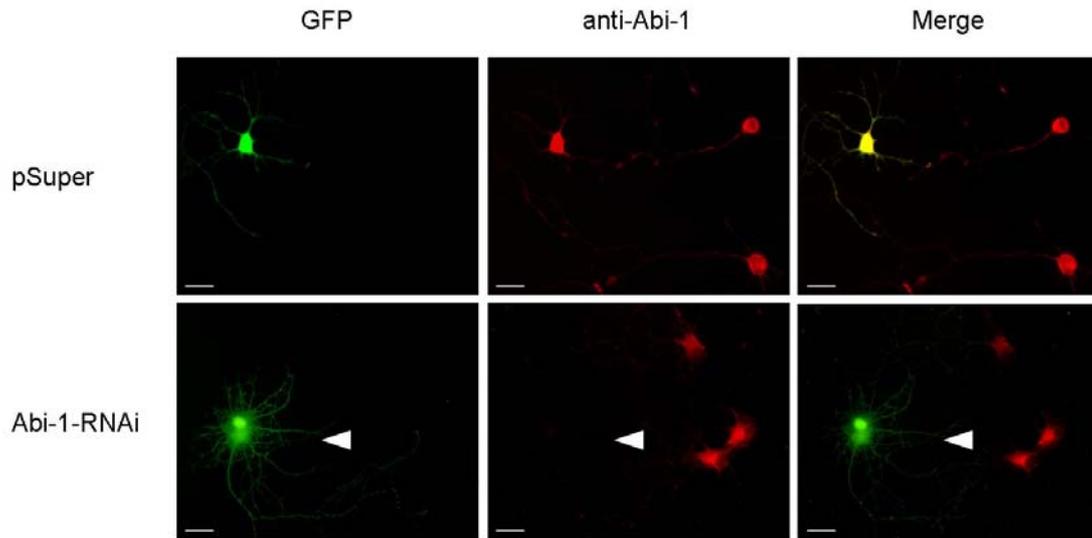


Abbildung 21: Immunzytochemische Färbung von Abi-1 (rot) in transfizierten primären hippocampalen Neuronen 6 DIV.

Transfektion mit dem Ausgangsvektor pSuper bzw. mit Abi-1-RNAi (pSuper) 3 DIV. (Balken: 20 µm). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Eine effektive Hemmung der Abi-1-Expression in primären hippocampalen Neuronen 6 DIV mittels Abi-1-RNAi zeigte sich durch das fehlende Abi-1-Signal.

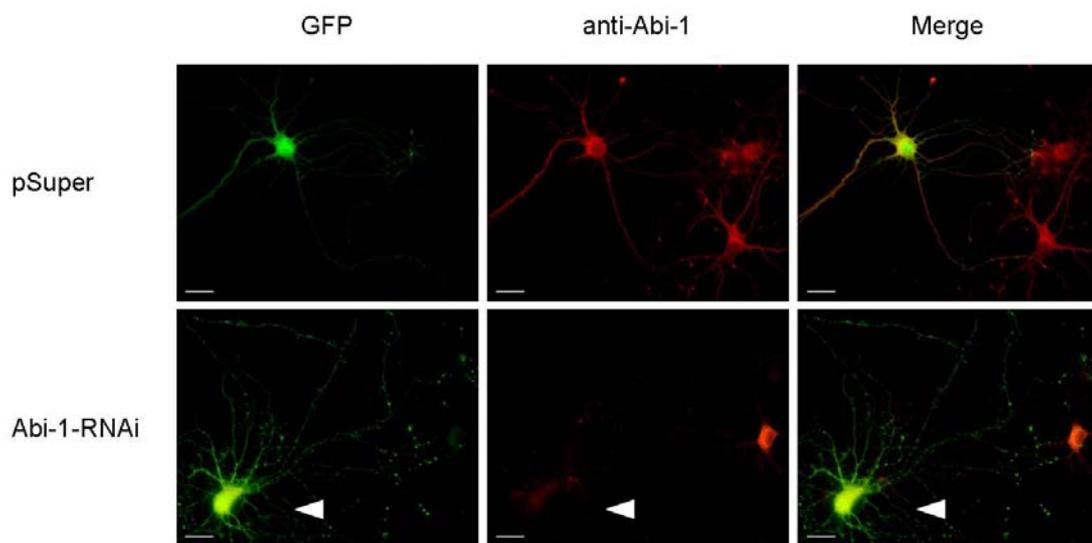


Abbildung 22: Immunzytochemische Färbung von Abi-1 (rot) in transfizierten primären hippocampalen Neuronen 10 DIV.

Transfektion mit dem Ausgangsvektor pSuper bzw. mit Abi-1-RNAi (pSuper) 7 DIV. (Balken: 20 µm). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Eine effektive Hemmung der Abi-1-Expression in primären hippocampalen Neuronen 10 DIV mittels Abi-1-RNAi zeigte sich durch ein reduziertes Abi-1-Signal.

Zellen, die Abi-1 aufgrund der Transfektion des Abi-1myc-Konstruktes überexprimierten, zeichneten sich durch einen vereinfachten Dendritenbaum aus (Abbildung 23 und Abbildung 24).

Um die Spezifität von Abi-1-RNAi zu testen, wurde ein RNAi resistentes Konstrukt, MutAbi-1myc, kloniert („Rescue-Experiment“). Dazu wurden an der RNAi-Zielsequenz sieben Nukleotide in der Abi-1-Sequenz konservativ ausgetauscht (2.3.11), wodurch die Expression dieses Abi-1 durch RNAi nicht verhindert werden kann.

Bei der Doppeltransfektion mit Abi-1-RNAi (pSuper) und MutAbi-1myc (pCMVmyc) wurde der vereinfachte Dendritenbaum des Abi-1-Überexpressionsphänotyps zu beiden Untersuchungszeitpunkten ausgebildet (Abbildung 23 und Abbildung 24). Der Abi-1-RNAi Phänotyp kann also durch gleichzeitige Überexpression von Abi-1 gerettet werden. Damit ergibt sich ein starker Hinweis auf die Spezifität des Abi-1-RNAi Phänotyps.

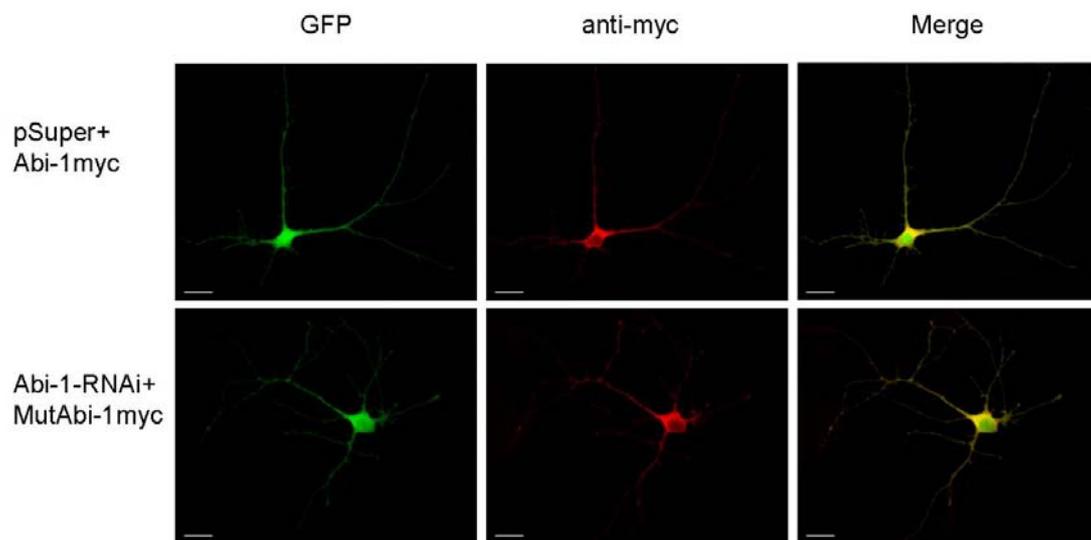


Abbildung 23: Immunzytochemische Färbung transfizierter Hippocampusneurone 6 DIV.

Transfektion mit pSuper und Abi-1myc bzw. Abi-1-RNAi (pSuper) und MutAbi-1myc (pCMVmyc) 3 DIV. (Balken: 20 µm). Abi-1: *Abi interactor 1*; DIV: *days in vitro*. Doppeltransfizierte Neurone, die Abi-1 überexprimierten, wiesen als Phänotyp einen vereinfachten Dendritenbaum auf. Bei einer Doppeltransfektion von Abi-1-RNAi mit dem RNAi resistenten MutAbi-1myc trat derselbe Phänotyp wie bei der Abi-1 Überexpression auf.

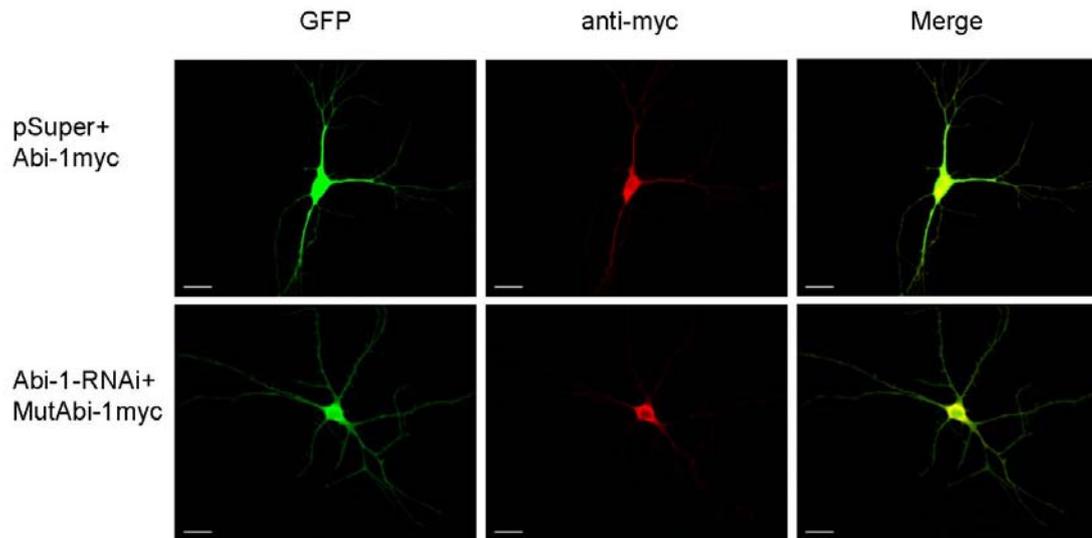


Abbildung 24: Immunzytochemische Färbung transfizierter Hippocampusneurone 10 DIV.

Transfektion mit pSuper und Abi-1myc bzw. Abi-1-RNAi (pSuper) und MutAbi-1myc (pCMVmyc) 7 DIV. (Balken: 20 µm). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*. Doppeltransfizierte Neurone, die Abi-1 überexprimierten, wiesen als Phänotyp einen vereinfachten Dendritenbaum auf. Bei einer Doppeltransfektion von Abi-1-RNAi mit dem RNAi resistenten MutAbi-1myc trat derselbe Phänotyp wie bei der Abi-1 Überexpression auf.

3.3.2 Einfluss von Abi-1 auf die Polarität hippocampaler Neurone

Um zu untersuchen, ob Abi-1 die Ausbildung des Axons und der Dendriten beeinflusst, wurden drei Tage alte Hippocampusneurone mit der Vektorkontrolle pSuper und Abi-1-RNAi bzw. pSuper und Abi-1myc transfiziert. Die Zellen wurden drei Tage nach der Transfektion fixiert und der dendritische Marker MAP2 (*Microtubulin associated protein 2*) und der axonale Marker KCNQ3 (*potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 3*; Chung *et al.*, 2006) immunzytochemisch angefärbt.

Die Färbungen ergaben, dass sowohl bei Abi-1-Repression (Abi-1-RNAi) als auch bei Überexpression von Abi-1 (pSuper+Abi-1myc) bzw. in der Kontrolle (pSuper) nur ein Axon, welches KCNQ3 positiv war, ausgebildet wurde (Abbildung 25). Wie auch schon die vorherigen Fluoreszenzaufnahmen (Abbildungen 13 und Abbildung 14) zeigten, führte die Reduzierung von Abi-1 zu einer Zunahme der Dendriten, während die Überexpression zu weniger Dendriten führte. Die Dendriten waren in allen Gruppen bis auf die Spitzen

und filopodienartigen Strukturen MAP2 positiv. Die Polarität der Neurone an sich wurde allerdings nicht durch *Abi-1* beeinflusst.

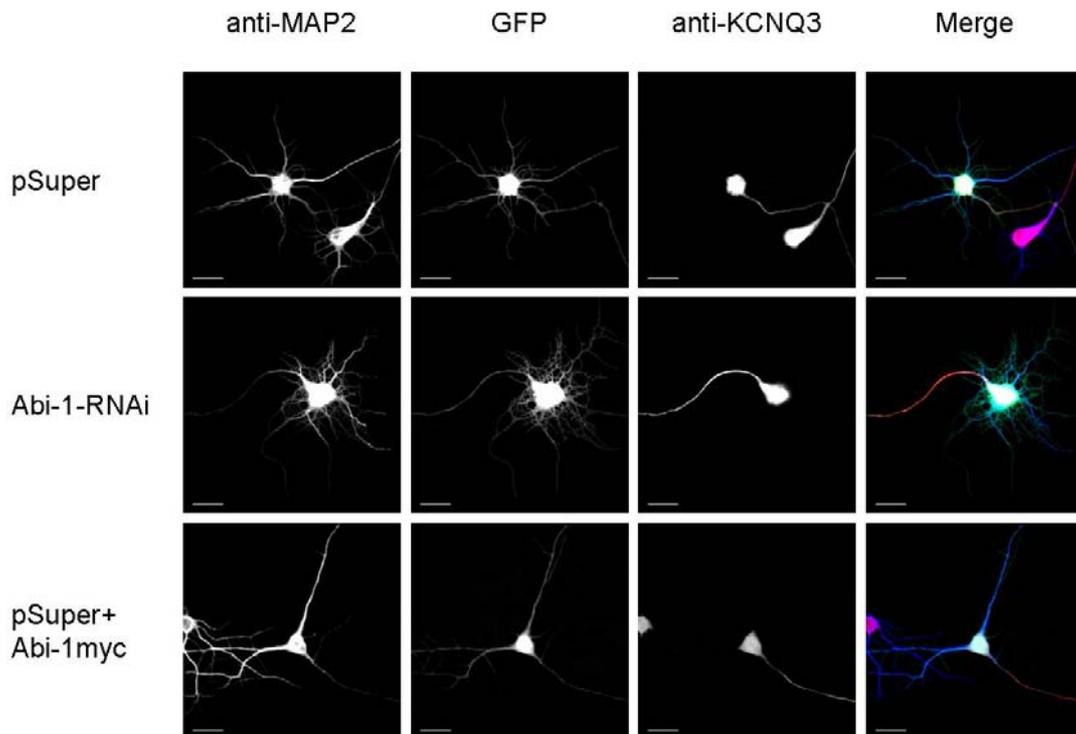


Abbildung 25: Immunzytochemische Färbung transfizierter hippocampaler Neurone 6 DIV mit dem dendritischen Marker MAP2 (blau) und dem axonalen Marker KCNQ3 (rot) zur Untersuchung der Zellpolarität.

Transfektion mit pSuper, *Abi-1*-RNAi (pSuper) bzw. pSuper+*Abi-1myc*. (Balken: 20 µm). *Abi-1*: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*; MAP2: *Microtubulin associated protein 2*.

Die Polarität der primären Neurone wurde weder durch die Überexpression von *Abi-1* (pSuper+*Abi-1myc*) noch die Reduktion der *Abi-1*-Expression (*Abi-1*-RNAi) beeinflusst.

3.3.3 Einfluss von *Abi-1* auf die Dendritenanzahl hippocampaler Neurone

Um die Auswirkungen von *Abi-1* auf die Anzahl von Dendriten zu untersuchen, wurden hippocampale Neurone 3 DIV und Neurone 7 DIV transfiziert und nach drei weiteren Tagen fixiert. Die Anzahl der Verzweigungen wurde an GFP positiven Dendriten bestimmt, weshalb bei der Überexpression von myc-markierten Proteinen (pCMVmyc, *Abi-1myc* bzw. Mut*Abi-1myc*) pSuper zur GFP-Expression mittransfiziert wurde.

In Abbildung 26 ist die totale Verzweigung 6 DIV dargestellt. Abi-1-RNAi transfizierte Zellen besaßen etwa zweieinhalbmal mehr Dendriten als die Vektorkontrollen (pSuper, pSuper+pCMVmyc). Abi-1 überexprimierende Zellen (pSuper+Abi-1myc, pSuper+MutAbi-1myc) wiesen dagegen etwa die Hälfte an Dendriten der Kontrollzellen auf. Neurone, die mit Abi-1-RNAi und MutAbi-1myc transfiziert waren, zeigten ebenso wie Abi-1 überexprimierende Neurone eine Halbierung der Anzahl der Verzweigungen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen, die in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern (Abbildung 21 bis Abbildung 24) gemacht wurden.

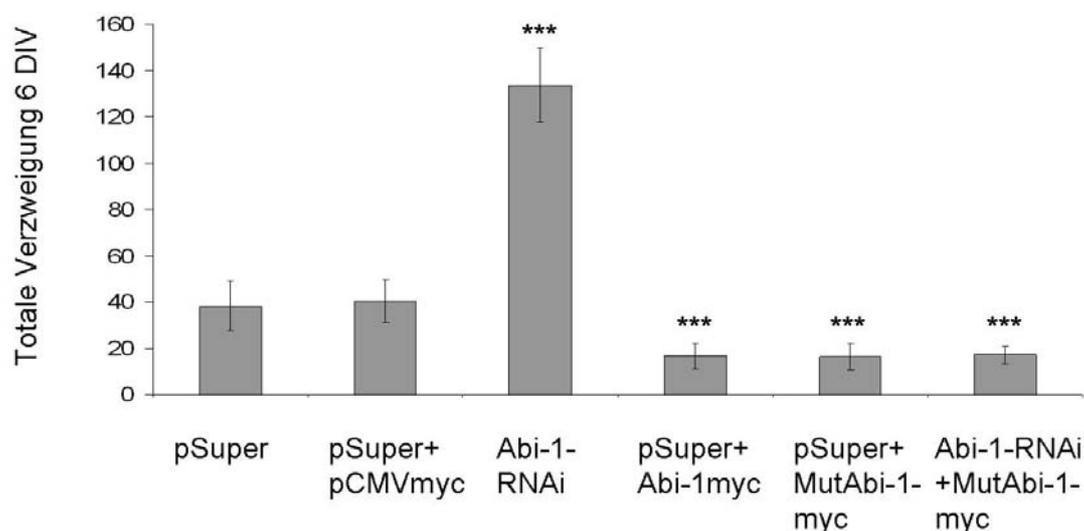


Abbildung 26: Totale Verzweigung transfizierter hippocampaler Neurone 6 DIV.

Transfektion mit pSuper, pSuper+pCMVmyc, Abi-1-RNAi (pSuper), pSuper+Abi-1myc, pSuper+MutAbi-1myc (pCMVmyc) bzw. Abi-1-RNAi (pSuper)+MutAbi-1myc (pCMVmyc). (Mittelwert aus $n = 20 \pm$ Standardabweichung. Mit dem t -Test wurde die totale Verzweigung der transfizierten Zellen mit der jeweiligen Vektorkontrolle verglichen. $p < 0,0001$: ***). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Die Reduktion von Abi-1-Protein führte zu einer Zunahme der Verzweigungen (Abi-1-RNAi), während die Überexpression von Abi-1 (pSuper+Abi-1myc bzw. pSuper+MutAbi-1myc) in einer Abnahme der Verzweigung resultierte. Bei der Doppeltransfektion von Abi-1-RNAi mit dem RNAi resistenten MutAbi-1myc trat wie bei der Abi-1 Überexpression eine Verringerung der Verzweigung auf.

In Abbildung 27 ist die totale Verzweigung 10 DIV alter Neurone dargestellt. Wie bereits in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 22 und Abbildung 24 angedeutet, besaßen Abi-1-RNAi transfizierte Zellen etwa fünfmal mehr Dendriten als die Vektorkontrollen (pSuper, pSuper+pCMVmyc, pEGFP). Abi-1 überexprimierende Zellen (pSuper+Abi-1myc (pCMVmyc),

Abi-1-GFP (pEGFP), pSuper+MutAbi-1myc (pCMVmyc)) wiesen dagegen eine Verringerung der Dendriten um mehr als die Hälfte auf im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppen. Auch bei den 10 DIV alten Zellen zeigten die Abi-1-RNAi und MutAbi-1myc transfizierten Neurone eine Verringerung der Dendriten ähnlich der Abi-1-Überexpression.

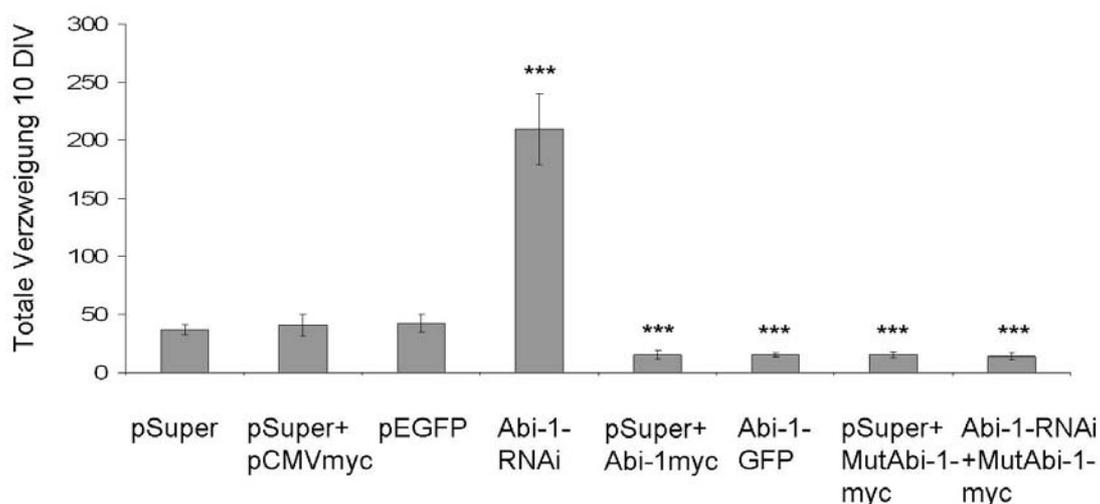


Abbildung 27: Totale Verzweigung transfizierter hippocampaler Neurone 10 DIV.

Transfektion mit pSuper, pSuper+pCMVmyc, pEGFP, Abi-1-RNAi (pSuper), pSuper+Abi-1myc, Abi-1-GFP (pEGFP), pSuper+MutAbi-1myc (pCMVmyc) bzw. Abi-1-RNAi (pSuper)+MutAbi-1myc (pCMVmyc) 7 DIV. (Mittelwert aus $n = 20 \pm$ Standardabweichung. Mit dem *t*-Test wurde die totale Verzweigung der transfizierten Zellen mit der jeweiligen Vektorkontrolle verglichen. $p < 0,0001$: ***) Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Die Reduktion von Abi-1-Protein führte zu einer Zunahme der Verzweigungen (Abi-1-RNAi), während Überexpression von Abi-1 (pSuper+Abi-1myc, Abi-1-GFP bzw. pSuper+MutAbi-1myc) in einer Abnahme der Verzweigung resultierte. Bei der Doppeltransfektion von Abi-1-RNAi mit dem RNAi resistenten MutAbi-1myc trat wie bei der Abi-1 Überexpression eine Verringerung der Verzweigung auf.

Um zu analysieren, ob die primären, sekundären und tertiären Dendriten sich durch die Transfektion in gleichem Maße änderten, wurde die Anzahl der Dendriten der jeweiligen Ordnungen für die verschiedenen Gruppen gezählt (Abbildung 28 und Abbildung 29).

Bei den 6 DIV Zellen zeigte sich, dass durch die Transfektion mit Abi-1-RNAi die Anzahl der primären Dendriten etwa verdoppelt wurde, während sich die Anzahl der sekundären etwa verdreifachte und die der tertiären sich etwa verfünffachte. Bei der Überexpression von Abi-1 halbierte sich die Anzahl aller Dendriten.

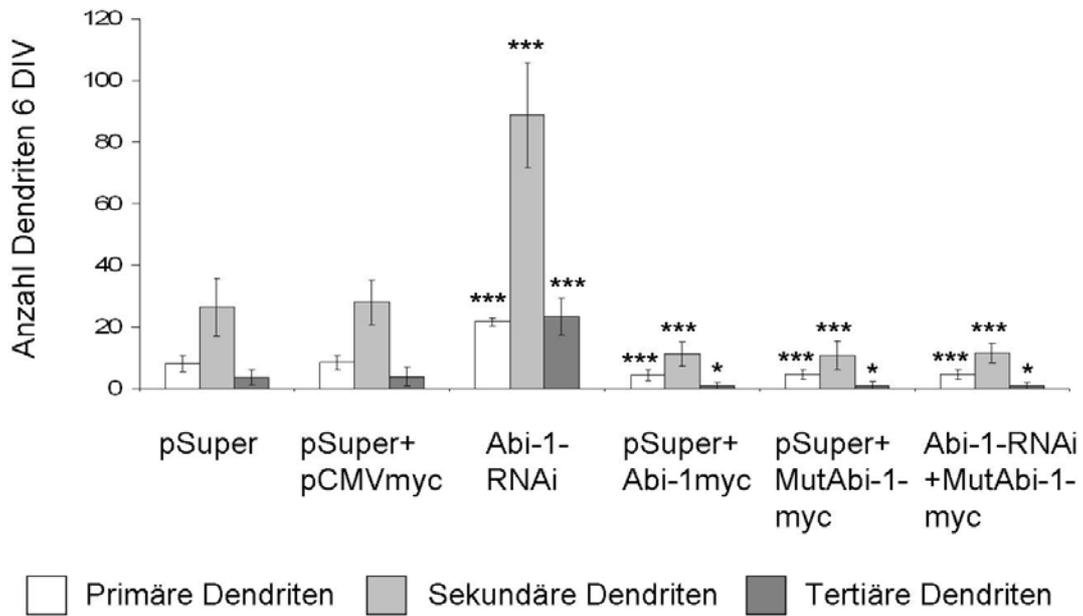


Abbildung 28: Anzahl primärer, sekundärer und tertiärer Dendriten von transfizierten hippocampalen Neuronen 6 DIV.

Transfektion mit pSuper, pSuper+pCMVmyc, Abi-1-RNAi (pSuper), pSuper+Abi-1myc, pSuper+MutAbi-1myc (pCMVmyc) bzw. Abi-1-RNAi (pSuper)+MutAbi-1myc (pCMVmyc). (Mittelwert aus $n = 20 \pm$ Standardabweichung. Mit dem *t*-Test wurde die totale Verzweigung der transfizierten Zellen mit der jeweiligen Vektorkontrolle verglichen. $p < 0,01$: *; $p < 0,0001$: ***). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Die Reduktion von Abi-1-Protein führte zu einer Zunahme der Verzweigungen (Abi-1-RNAi) aller Dendriten. Die Überexpression von Abi-1 (pSuper+Abi-1myc bzw. pSuper+MutAbi-1myc) bewirkte eine Abnahme aller Verzweigungen. Bei der Doppeltransfektion von Abi-1-RNAi mit dem RNAi resistenten MutAbi-1myc trat ebenfalls eine Verringerung der Verzweigung auf. Dabei wurden primäre, sekundäre und tertiäre Dendriten aller transfizierten Zellen im selben Ausmaß beeinflusst, lediglich die Anzahl der tertiären Dendriten der Abi-1-RNAi transfizierten Zellen stieg stärker an.

Bei den 7 DIV RNAi transfizierten Zellen veränderte sich die Anzahl der primären Dendriten kaum, während sich die Anzahl der sekundären etwa vervierfachte und die der tertiären sich sogar verzehnfachte. Nur Abi-1-RNAi transfizierte Zellen dieses Alters wiesen quartäre Dendriten auf. Bei der Überexpression von Abi-1 halbierte sich die Anzahl der primären Dendriten, die Anzahl der sekundären Dendriten wurde mehr als halbiert und die der tertiären gedrittelt.

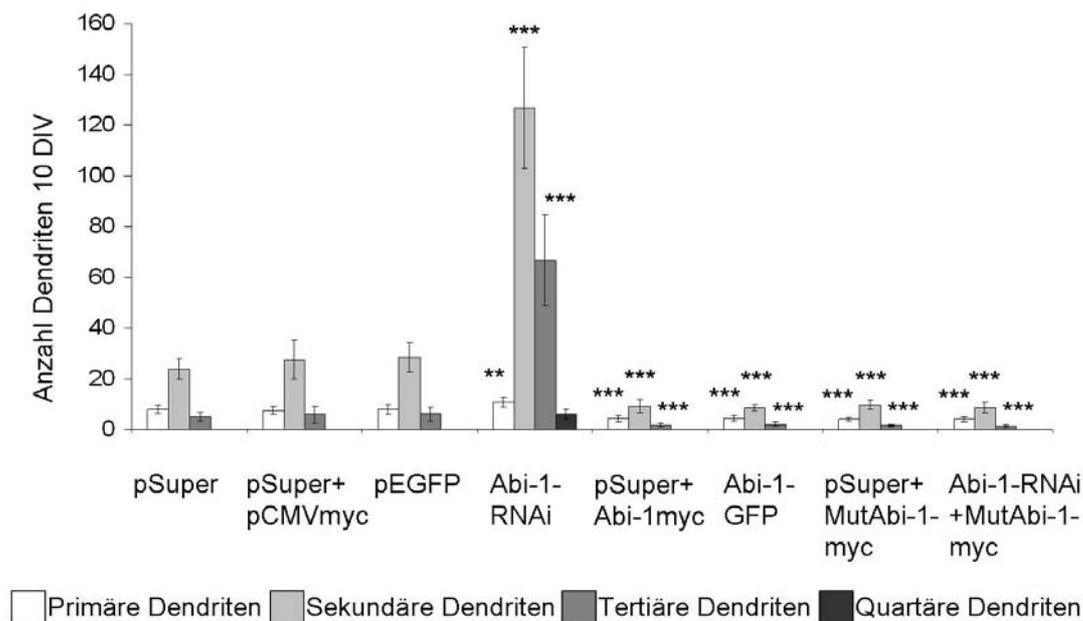


Abbildung 29: Anzahl primärer, sekundärer, tertiärer und quartärer Dendriten von transfizierten hippocampalen Neuronen 10 DIV.

Transfektion mit pSuper, pSuper+pCMVmyc, pEGFP, Abi-1-RNAi (pSuper), pSuper+Abi-1myc, Abi-1-GFP (pEGFP), pSuper+MutAbi-1myc (pCMVmyc) bzw. Abi-1-RNAi (pSuper)+MutAbi-1myc (pCMVmyc) 7 DIV. (Mittelwert aus $n = 20 \pm$ Standardabweichung. Mit dem *t*-Test wurde die totale Verzweigung der transfizierten Zellen mit der jeweiligen Vektorkontrolle verglichen. $p < 0,001$: **, $p < 0,0001$: ***). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Die Reduktion von Abi-1-Protein führte zu einer Zunahme der Verzweigungen (Abi-1-RNAi) aller Dendriten. Die Überexpression von Abi-1 (pSuper+Abi-1myc, Abi-1-GFP bzw. pSuper+MutAbi-1myc) bewirkte eine Abnahme aller Verzweigungen. Bei der Doppeltransfektion von Abi-1-RNAi mit dem RNAi resistenten MutAbi-1myc trat ebenfalls eine Verringerung der Verzweigung auf. Dabei wurden primäre Dendriten aller transfizierten Zellen in geringerem Ausmaß beeinflusst als die übrigen Dendriten. Bei Abi-1-RNAi transfizierten Zellen stiegen die tertiären und quartären Dendriten stärker an als die sekundären Dendriten.

3.3.4 Einfluss von Abi-1 auf das Aktin-Zytoskelett hippocampaler Neurone

Der Einfluss von Abi-1 auf das Aktin-Zytoskelett wurde mit Hilfe einer Markierung von F-Aktin mittels Phalloidin untersucht. Dazu wurden Hippocampusneurone nach 3 DIV bzw. 7 DIV transfiziert und nach drei weiteren Tagen fixiert. F-Aktin, welches v. a. in den Wachstumskegeln, Filopodien und postsynaptischen Dornen vorhanden ist, wurde mit Fluoreszenz gekoppeltem Phalloidin markiert (Abbildung 30 und Abbildung 31).

Eine Absenkung der endogenen Abi-1-Expression durch RNAi (Abi-1-RNAi) führte in den 6 DIV Neuronen zu einer Zunahme von Phalloidin positiven

Zytoskelettstrukturen. Insbesondere schien auch die Intensität in den Wachstumskegeln und den Filopodien erhöht. Bei Zellen, die *Abi-1* überexprimierten (pSuper+*Abi-1-myc*), fiel eine schwächere Phalloidin-markierung auf. Diese Ergebnisse decken sich mit den oben genannten Ergebnissen zur Dendritenanzahl (3.3.3).

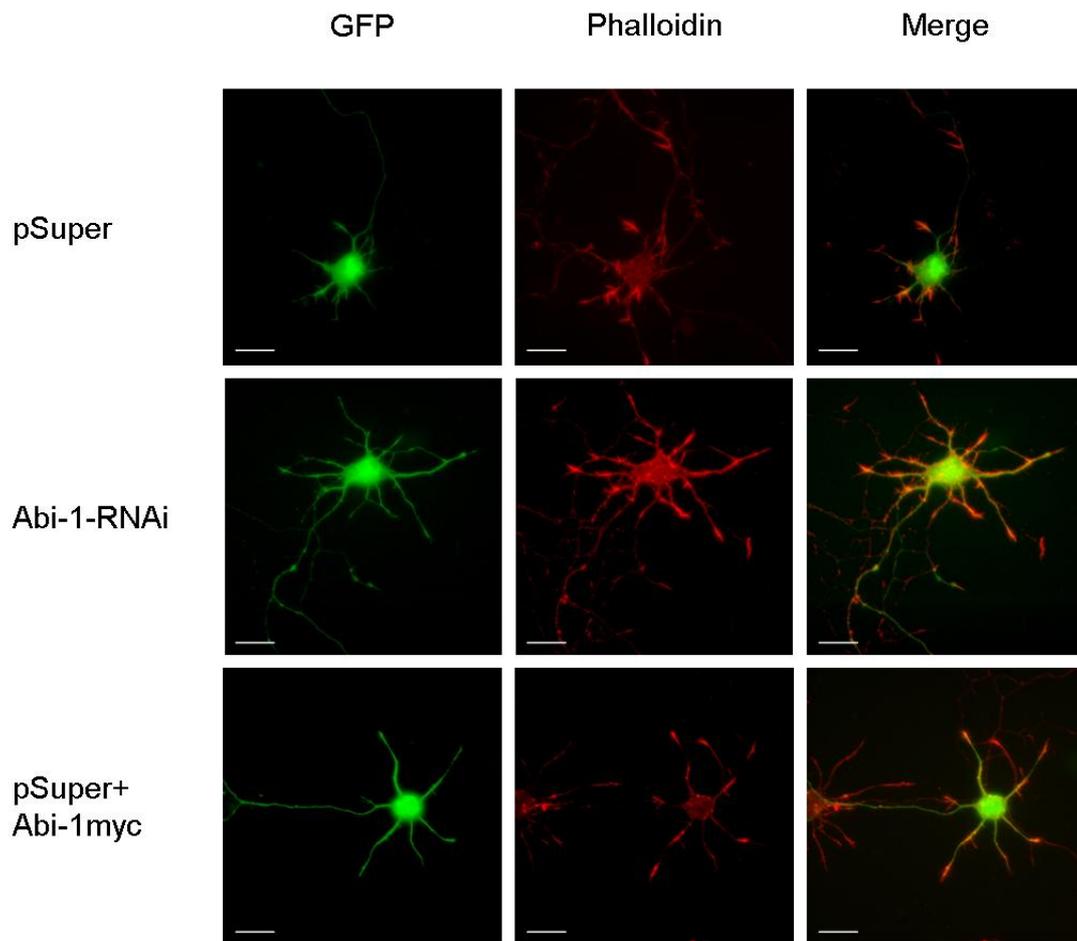


Abbildung 30: Phalloidin-Färbung (rot) transfizierter hippocampaler Neurone 6 DIV zur Untersuchung des Aktin-Zytoskeletts.

Transfektion mit pSuper, *Abi-1*-RNAi (pSuper) bzw. pSuper+*Abi-1myc* 3 DIV. (Balken: 20 μ m). *Abi-1*: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Abi-1 Überexpression führte zu einem reduziertem Phalloidin-Signal, *Abi-1*-RNAi bewirkte eine Zunahme des Signals sowie seiner Intensität.

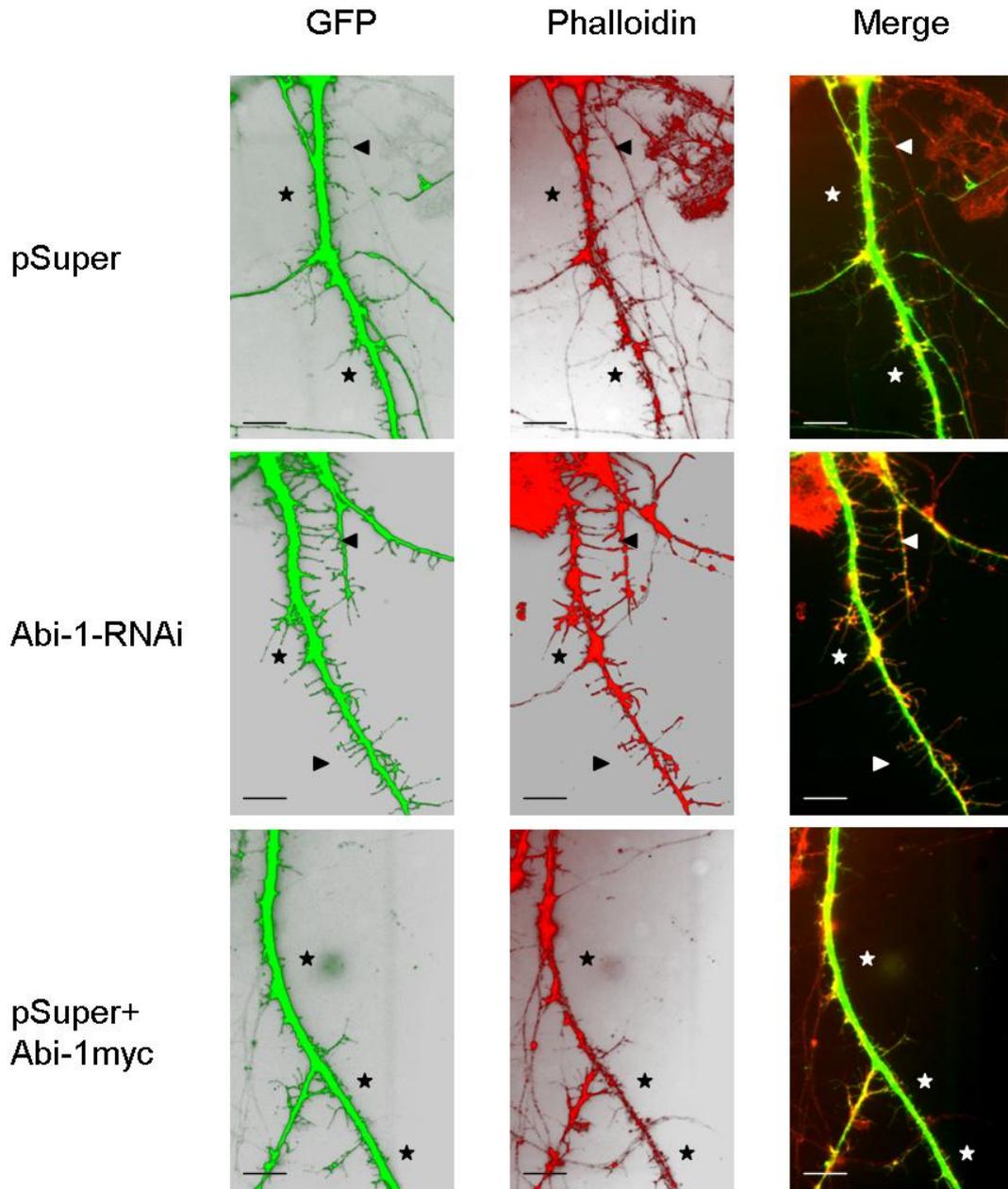


Abbildung 31: Phalloidin-Färbung (rot) transfizierter hippocampaler Neurone 10 DIV zur Untersuchung des Aktin-Zytoskeletts.

Transfektion mit pSuper, Abi-1-RNAi (pSuper) bzw. pSuper+Abi-1myc 7 DIV. (Balken: 7,5 µm; Pfeil = Filopodien, Stern = postsynaptische Dornen). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*. RNAi von Abi-1 führte zu einer Zunahme Phalloidin positiver Filopodien, während Abi-1-Überexprimierung zu mehr postsynaptischen Dornen führte.

Bei den 10 DIV hippocampalen Neuronen wurden insbesondere dendritische Spezialisierungen wie Filopodien und postsynaptische Dornen untersucht. Die Zellen der Kontrollgruppe (pSuper) wiesen sowohl Phalloidin positive Filopodien (Pfeil) als auch Phalloidin positive postsynaptische Dornen (Stern) auf.

Bei Abi-1-RNAi zeigten sich mehr Areale mit Filopodien, bei Abi-1myc kamen häufiger Areale vor, in denen postsynaptische Dornen angereichert waren.

3.4 Einfluss von Abi-1 auf synaptische Kontakte hippocampaler Neurone

Um zu untersuchen, ob Abi-1 neben der Dendritogenese auch die Synaptogenese sowie die morphologische Ausreifung der Synapsen beeinflusst, wurden hippocampale Neurone wie in Kapitel 3.3 an 7 DIV transfiziert, fixiert und zusätzlich das präsynaptische Markerprotein Bassoon immunzytochemisch angefärbt. Anschließend wurde der Einfluss von Abi-1 auf die Synapsendichte (Synapsen / 10 μm) und die Synapsenmorphologie analysiert. Um zusätzlich erste Hinweise auf die Funktionalität der Synapsen zu erhalten, wurde die Kollokalisierung der AMPAR-Untereinheit GluR1 mit Bassoon in den transfizierten Zellen ausgewertet.

3.4.1 Einfluss von Abi-1 auf Synapsen

Wie bei den Untersuchungen des dendritischen Phänotyps wurden hippocampale Neurone an 7 DIV transfiziert und nach drei Tagen fixiert. Danach wurde das präsynaptische Markerprotein Bassoon immunzytochemisch angefärbt.

Die Reduktion von Abi-1 (Abi-1-RNAi) führte zu einer Verringerung Bassoon positiver Synapsen (Abbildung 32). Häufiger als in der Kontrolle (pSuper) traten filopodienartige Synapsen auf (Pfeil). Überexpression von Abi-1 (Abi-1-GFP) führte zu deutlich mehr Synapsen, die häufig ein prägnanteres Bassoon-Signal aufwiesen.

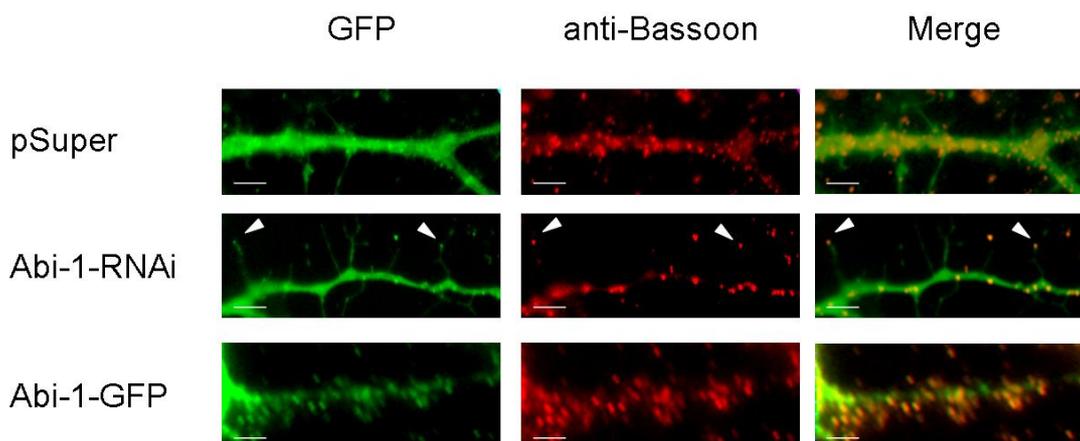


Abbildung 32: Immunzytochemische Färbung transfizierter hippocampaler Neurone gegen präsynaptisches Bassoon (rot) zur Untersuchung der Synapsenmorphologie. Transfektion mit pSuper, Abi-1-RNAi (pSuper) bzw. Abi-1-GFP (pEGFP) 7 DIV. (Balken: 5 μ m; Pfeil = filopodienartige Synapsen). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*. Abi-1-RNAi transfizierte Zellen zeigten mehr filopodienartige Synapsen, während Abi-1 überexprimierende Zellen mehr und reifere Synapsen aufwiesen.

3.4.2 Einfluss von Abi-1 auf die Synapsendichte

Die Synapsendichte (Synapsen / 10 μ m Dendritenlänge) wurde bestimmt, indem Bassoon positive Synapsen gezählt und die Längen dieser Dendritenabschnitte gemessen wurden. Zusätzlich zu den transfizierten hippocampalen Neuronen wurden 20 nicht transfizierte, immunzytochemisch Bassoon markierte Neurone ausgewertet (Kontrolle).

Alle mit Vektorkontrollen transfizierten Neurone (pSuper bzw. pEGFP) wiesen eine ähnliche Anzahl von etwa 6 Synapsen / 10 μ m wie untransfizierte Neurone (Abbildung 33) auf. Durch die Transfektion von Abi-1-RNAi wurde die Synapsendichte auf etwa 4 Synapsen / 10 μ m verringert, während die Überexpression von Abi-1 (Abi-1-GFP bzw. pSuper+MutAbi-1myc) zu einer Synapsendichte von etwa 10 Synapsen / 10 μ m führte. Die Doppeltransfektion von Abi-1-RNAi und MutAbi-1myc bewirkte dieselbe Erhöhung der Synapsendichte wie bei der Abi-1-Überexpression.

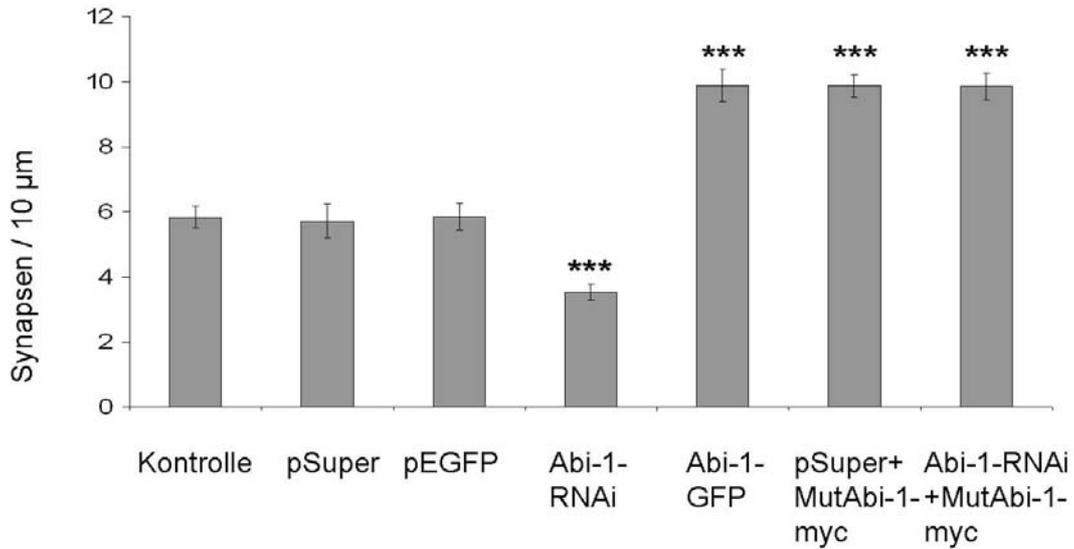


Abbildung 33: Auswertung der Synapsendichte / 10 µm an transfizierten hippocampalen Neuronen 10 DIV.

Untransfizierte Neurone als Kontrolle. Transfektion mit pSuper, pEGFP, Abi-1-RNAi (pSuper), Abi-1-GFP (pEGFP), pSuper+MutAbi-1myc (pCMVmyc) bzw. Abi-1-RNAi (pSuper)+MutAbi-1myc (pCMVmyc) 7 DIV. (Mittelwert aus $n = 20 \pm$ Standardabweichung. Mit dem *t*-Test wurde die totale Verzweigung der transfizierten Zellen mit der jeweiligen Vektorkontrolle verglichen. $p < 0,0001$: ***). Abi-1: *Abi interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Abi-1-RNAi verringerte die Synapsendichte / 10 µm fast um die Hälfte, während die Abi-1 Überexpression (Abi-1-GFP, pSuper+MutAbi-1myc) die Synapsendichte fast verdoppelte. Bei der Doppeltransfektion von Abi-1-RNAi mit dem RNAi resistenten MutAbi-1myc erhöhte sich wie bei der Abi-1 Überexpression die Synapsendichte.

3.4.3 Einfluss von Abi-1 auf die Synapsenmorphologie

Da in den Fluoreszenzaufnahmen mit Bassoon-Markierung der Synapsen (Abbildung 32) nicht nur eine Veränderung der Synapsendichte, sondern auch eine Veränderung der Synapsenmorphologie auffällig war, folgten Untersuchungen zur Synapsenmorphologie. Hippocampale Neurone wurden nach 7 DIV transfiziert, nach drei Tagen fixiert und anschließend das prä-synaptische Markerprotein Bassoon immunzytochemisch angefärbt. Anhand des Abstandes zum Dendriten und der Größe des Bassoon-Signals wurden die Synapsen der transfizierten Zellen in drei Gruppen (filopodienartige, dünne und pilzförmige Synapsen) eingeteilt. Die Ergebnisse der Auszählung sind in Abbildung 34 zusammengefasst.

Durch Reduktion der Abi-1-Expression nach Transfektion mit Abi-1-RNAi lagen alle drei Synapsengruppen nahezu im selben Verhältnis vor. Filopodienartige Synapsen traten sechsmal häufiger auf als bei den Kontrollen (pSuper bzw. pEGFP), wo nur 5 % aller Synapsen filopodienartige Synapsen waren. Zellen, die Abi-1 überexprimierten (Abi-1-GFP bzw. pSuper+MutAbi-1myc) wiesen keine filopodienartigen Synapsen auf. Pilzförmige Synapsen traten im Vergleich mit den Kontrollen fast doppelt so häufig auf, womit der Anteil dünner Synapsen im Vergleich zur Kontrolle etwas niedriger war. Die Doppeltransfektion von Abi-1-RNAi und MutAbi-1myc führte zu einer Verteilung ähnlich der der Abi-1-Überexpression.

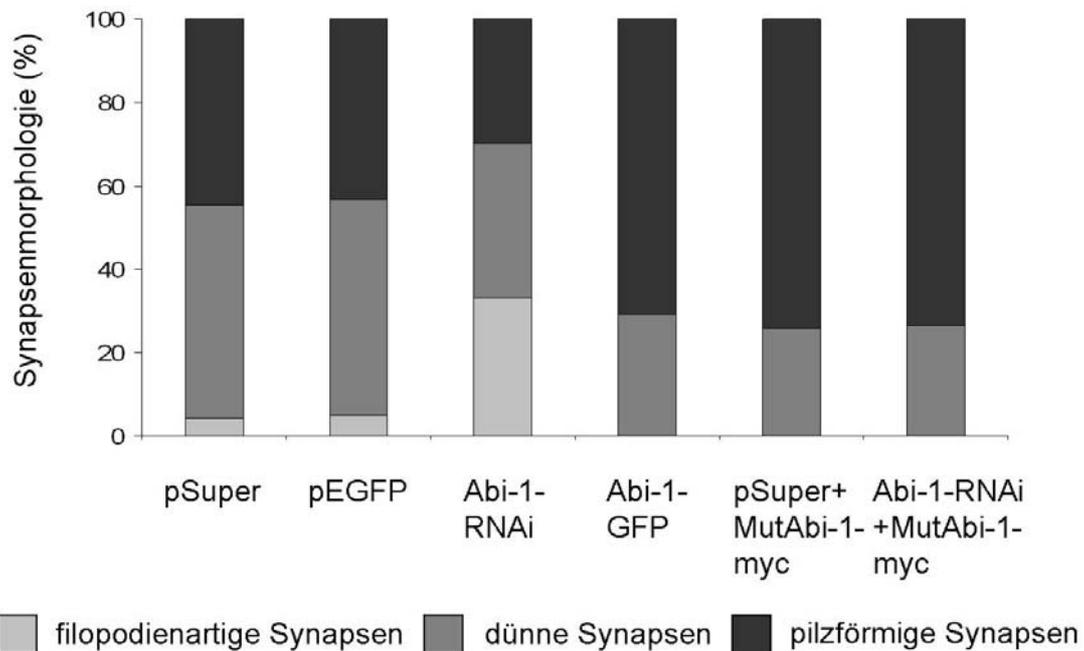


Abbildung 34: Auswertung der Synapsenmorphologie an transfizierten hippocampalen Neuronen 10 DIV.

Transfektion mit pSuper, pEGFP, Abi-1-RNAi (pSuper), Abi-1-GFP (pEGFP), pSuper+MutAbi-1myc (pCMVmyc) bzw. Abi-1-RNAi (pSuper)+MutAbi-1myc (pCMVmyc) 7 DIV. (prozentuale Angabe des Mittelwerts aus n > 300 Synapsen). Abi-1: *Abi interactor 1*; DIV: *days in vitro*.

Abi-1-RNAi erhöhte den Anteil an filopodienartigen Synapsen. Zellen, die Abi-1 überexprimierten (Abi-1-GFP, pSuper+MutAbi-1myc) wiesen mehr pilzförmige Synapsen und keine filopodienartigen Synapsen auf. Bei der Doppeltransfektion von Abi-1-RNAi mit dem RNAi resistenten MutAbi-1myc erhöhte sich wie bei der Abi-1 Überexpression der Anteil an pilzförmigen Synapsen.

3.4.4 Einfluss von Abi-1 auf die Lokalisation der AMPAR-Untereinheit GluR1 an Synapsen

Ob Abi-1 neben der Induktion von morphologischen Veränderungen (4.6.1-3) möglicherweise auch die Funktionalität von Synapsen beeinflusst, wurde in einem ersten Schritt anhand der Lokalisation der AMPAR-Untereinheit GluR1 (Glutamatrezeptor 1) an Bassoon positiven Synapsen verschiedener Synapsenmorphologie untersucht. Dazu wurden hippocampale Neurone an 7 DIV mit pSuper, Abi-1-RNAi bzw. pSuper und Abi-1myc transfiziert und nach drei Tagen fixiert. Anschließend wurden Bassoon und die GluR1-Untereinheit des AMPAR immunzytochemisch angefärbt.

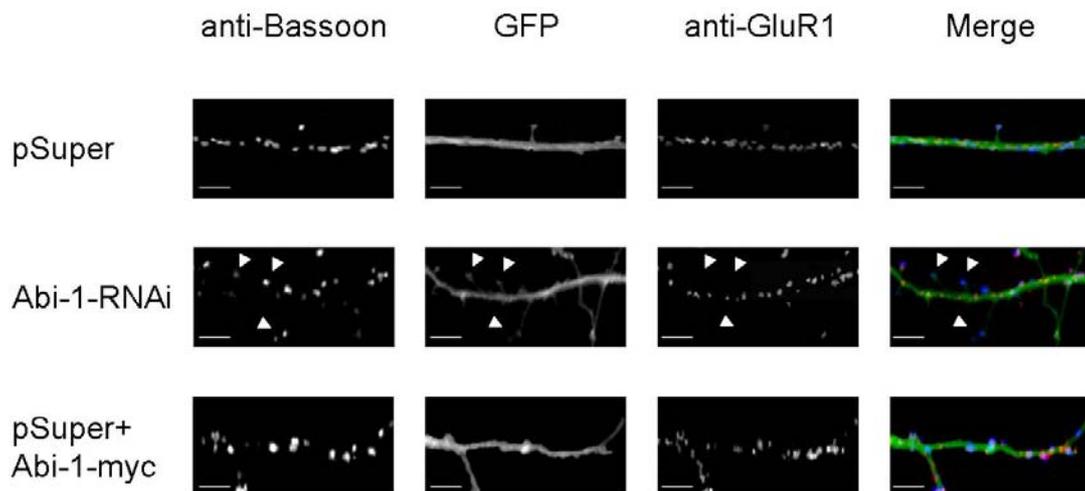


Abbildung 35: Immunzytochemische Färbung transfizierter hippocampaler Neurone mit dem präsynaptischen Bassoon (blau) und der AMPAR-Untereinheit GluR1 (rot) 10 DIV zur Untersuchung der Kolokalisation von Bassoon und GluR1.

Transfektion mit pSuper, Abi-1-RNAi (pSuper) bzw. pSuper+Abi-1myc 7 DIV. (Balken: 5 µm). Abi-1: *Abl interactor 1*; DIV: *days in vitro*. GluR1: Glutamatrezeptor 1.

Außer bei den filopodienartigen Synapsen schienen durch Veränderung der Abi-1 Expression keine Änderung der Kolokalisation von GluR1 und Bassoon zu erfolgen. (Pfeile zeigen auf filopodienartige Synapsen ohne GluR1 Anwesenheit).

Da eine Verringerung der Kolokalisation von Bassoon und GluR1 in filopodienartigen Synapsen von Abi-1-RNAi transfizierten Neuronen in den Fluoreszenzaufnahmen (Abbildung 35) auftrat, folgte eine Auswertung der Kolokalisierung von Bassoon mit GluR1 für die verschiedenen Synapsenklassen in transfizierten hippocampalen Neuronen (Abbildung 36).

Unabhängig vom transfizierten Konstrukt wiesen alle dünnen und pilzförmigen Synapsen eine Kolokalisationsrate von Bassoon und GluR1 um etwa 80 % auf. Filopodienartige Synapsen in pSuper transfizierten Neuronen wiesen eine kaum geringere Kolokalisation von Bassoon und GluR1 auf, während die Kolokalisation in filopodienartigen Synapsen in Abi-1-RNAi transfizierten Neuronen auf 50 % reduziert war. Da bei Abi-1-RNAi transfizierten Zellen filopodienartige Synapsen häufiger auftraten, besaßen weniger Synapsen dieser Transfektionsgruppe eine GluR1-Untereinheit, während bei den Abi-1 überexprimierenden Zellen durch das Fehlen von filopodienartigen Synapsen und einer höheren Synapsendichte mehr GluR1 positive Synapsen vorhanden waren.

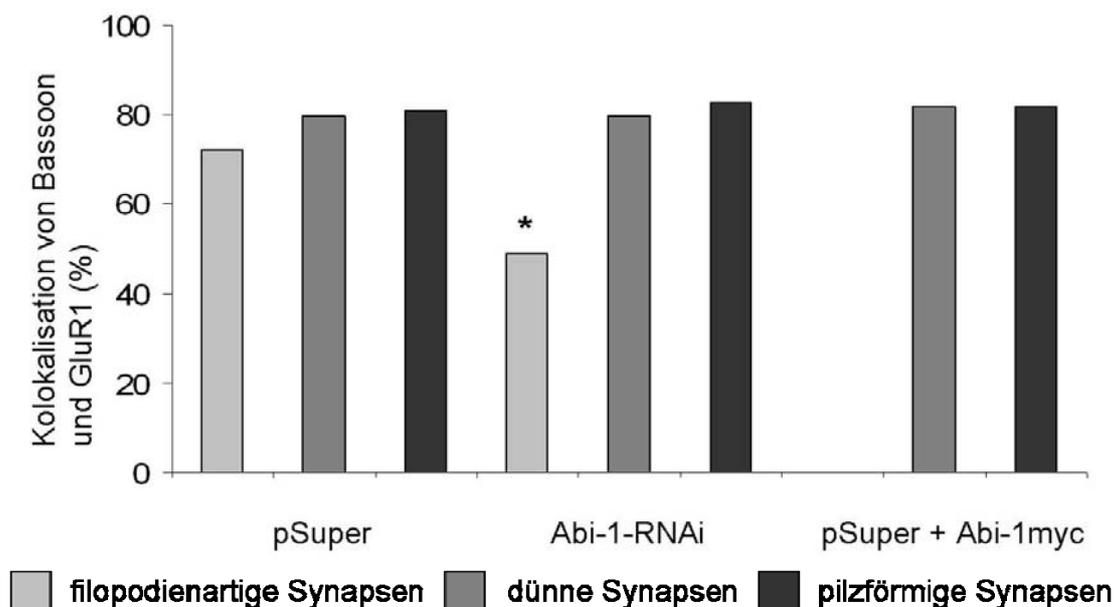


Abbildung 36: Auswertung der Kolokalisation von Bassoon und AMPAR-Untereinheit GluR1 in Synapsen unterschiedlicher Morphologie in transfizierten hippocampalen Neuronen 10 DIV.

Transfektion mit pSuper, Abi-1-RNAi (pSuper) bzw. pSuper+Abi-1myc 7 DIV. (n > 100 Synapsen, Mit dem Chi²-Test wurde die Kolokalisation von GluR1 und Bassoon der transfizierten Zellen mit der jeweiligen Vektorkontrolle verglichen. p < 0,01: *). Abi-1: *Abi interactor 1*; DIV: *days in vitro*; GluR1: Glutamatrezeptor 1.

Dünne und pilzförmige Synapsen wiesen unabhängig von der Abi-1-Proteinexpression eine Kolokalisationsrate um 80 % auf. In der Kontrollgruppe lag das Kolokalisationslevel in filopodienartigen Synapsen nur gering unterhalb der anderen Synapsengruppen, während es bei filopodienartigen Synapsen in RNAi behandelten Neuronen zu einer Verringerung der Kolokalisation auf 50 % kam.

3.5 Einfluss von Abi-1 auf die Interaktionspartner c-Abl, Eps8, Sos1 und WAVE

Es wurde untersucht, ob die bereits charakterisierten Interaktionspartner von Abi-1, nämlich c-Abl (zelluläre Abelson Tyrosinkinase), Eps8 (*epidermal growth factor receptor substrate 8*), Sos1 (*son of sevenless 1*) und WAVE (*WASP family verprolin-homologous*) in hippocampalen Neuronen exprimiert werden und wie Abi-1 in Synapsen lokalisieren. Die synaptische Lokalisation der Interaktionspartner wurde mittels immunzytochemischen Färbungen und ihrer Anreicherung in anfallenden subzellulären Fraktionen einer biochemischen Präparation der postsynaptischen Dichte (PSD) bestimmt. Zusätzlich wurde analysiert, ob die Lokalisation der Interaktionspartner an Synapsen und somit die Kollokalisierung mit Bassoon abhängig von Abi-1 war.

3.5.1 Endogene Proteinexpression von c-Abl, Eps8, Sos1 und WAVE in kultivierten hippocampalen Neuronen

Zur Bestimmung der endogenen Proteinexpression der Interaktionspartner von Abi-1 in hippocampalen Neuronen wurde Gesamtprotein nach unterschiedlicher Kulturdauer extrahiert und durch SDS-Elektrophorese aufgetrennt.

Alle Proteine wurden bereits ab dem Tag der Präparation (0 DIV) exprimiert (Abbildung 37). Während die Proteinexpression von c-Abl und WAVE bereits ab 0 DIV mit zunehmender Kultivierungsdauer anstieg, nahm die Expression von Eps8 und Sos1 erst ab 3 DIV zu.

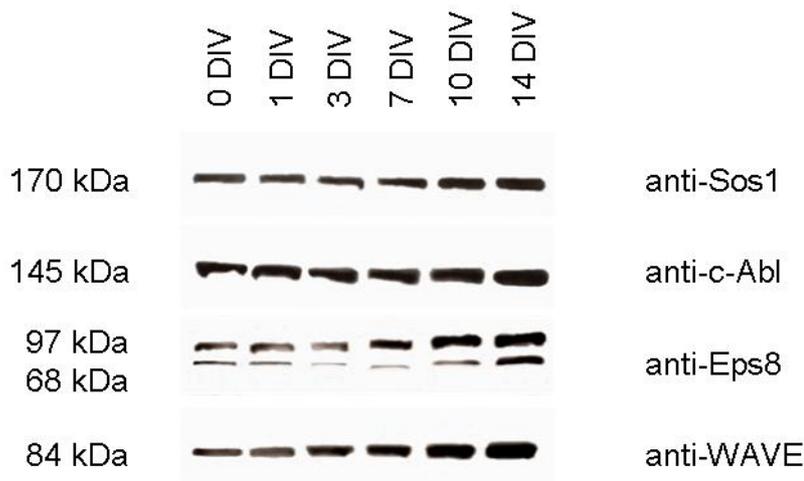


Abbildung 37: Proteinexpression von endogenem Sos1, c-Abl, Eps8 und WAVE, den Interaktionspartnern von Abi-1, in primären hippocampalen Neuronen mit zunehmender Kulturdauer.

C-Abl: zelluläre Abelson Tyrosinkinase; DIV: *days in vitro*; Eps8: *epidermal growth factor receptor substrate 8*; Sos1: *son of sevenless 1*; WAVE: *WASP family verprolin-homologous*.

Die Sos1- und die Eps8-Proteinexpression stieg ab 3 DIV an. Die Expression von c-Abl- und WAVE-Protein nahm ab 0 DIV in Hippocampuskultur zu.

3.5.2 Lokalisation von c-Abl, Eps8, Sos1 und WAVE in synaptischen Strukturen

Um die Lokalisation von endogenem c-Abl, Eps8, Sos1 bzw. WAVE in Hippocampusneuronen zu untersuchen, wurden in 17 DIV Zellen der jeweilige Interaktionspartner von Abi-1 und das präsynaptische Protein Bassoon immunzytochemisch angefärbt.

Eps8 (Abbildung 39) und WAVE (Abbildung 41) wiesen eine punktförmige Verteilung auf, während das Sos1-Signal schwach punktförmig verteilt vorlag (Abbildung 40). Ein Teil der Signale der Proteine Eps8, Sos1 bzw. WAVE kolokalisierten mit dem präsynaptischen Marker Bassoon, waren also an der Präsynapse lokalisiert. C-Abl zeigte im Gegensatz zu den anderen drei untersuchten Interaktionspartnern eine homogene Verteilung mit punktförmigen Anreicherungen, an denen c-Abl mit Bassoon kolokalisierte (Abbildung 38).

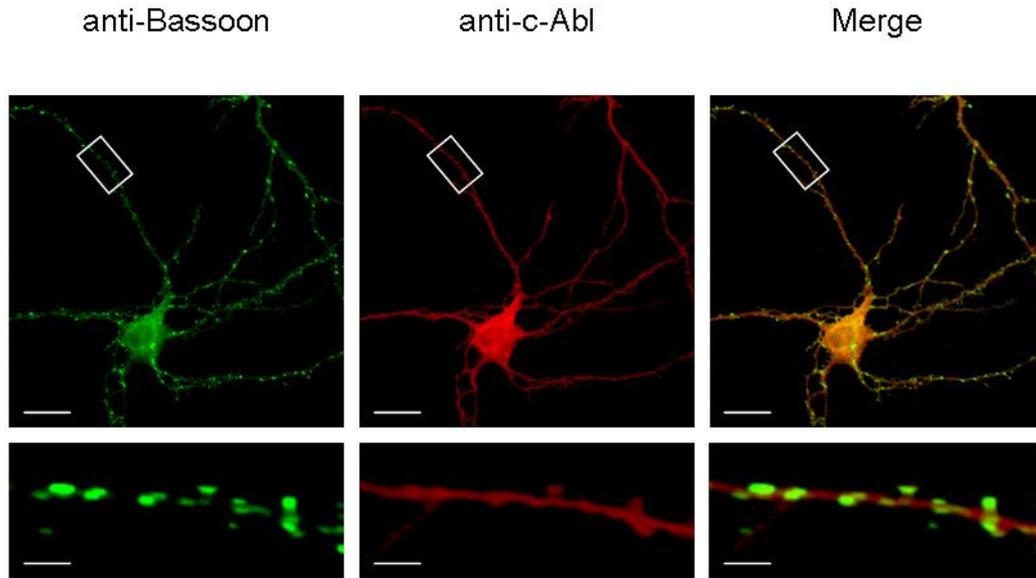


Abbildung 38: Lokalisation von endogenem c-Abl (rot) im Vergleich zu präsynaptischem Bassoon (grün) in primären hippocampalen Neuronen 17 DIV.
 c-Abl und Bassoon wurden immunzytochemisch nachgewiesen. (Balken: 20 μm , Balken im Ausschnitt: 3 μm). C-Abl: zelluläre Abelson Tyrosinkinase; DIV: *days in vitro*.
 C-Abl kolokalisierte mit Bassoon in hippocampalen Neuronen an 17 DIV.

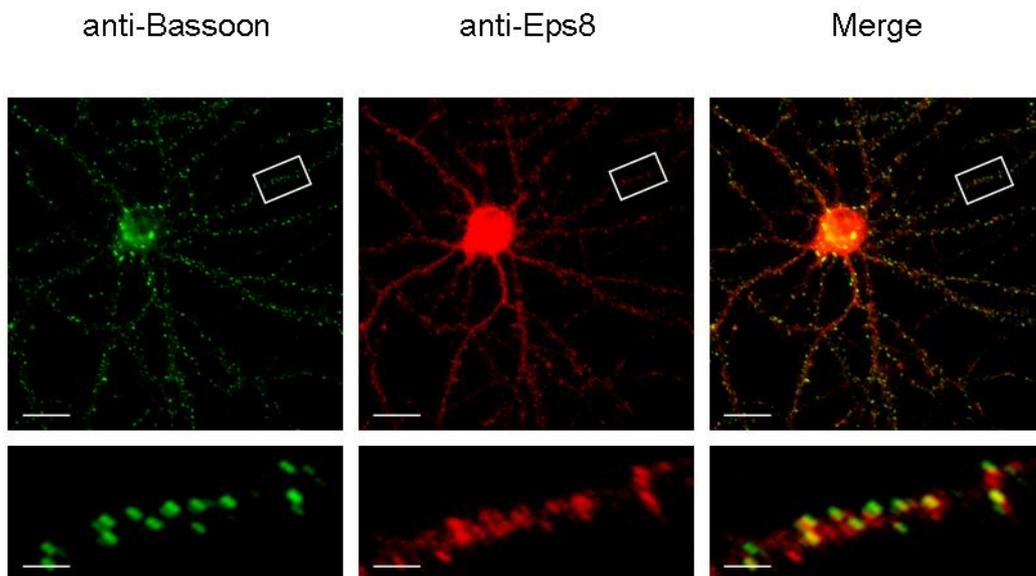


Abbildung 39: Lokalisation von endogenem Eps8 (rot) im Vergleich zu präsynaptischem Bassoon (grün) in primären hippocampalen Neuronen 17 DIV.
 Eps8 und Bassoon wurden immunzytochemisch nachgewiesen. (Balken: 20 μm , Balken im Ausschnitt: 3 μm). DIV: *days in vitro*; Eps8: *epidermal growth factor receptor substrate 8*.
 Eps8 kolokalisierte mit Bassoon.

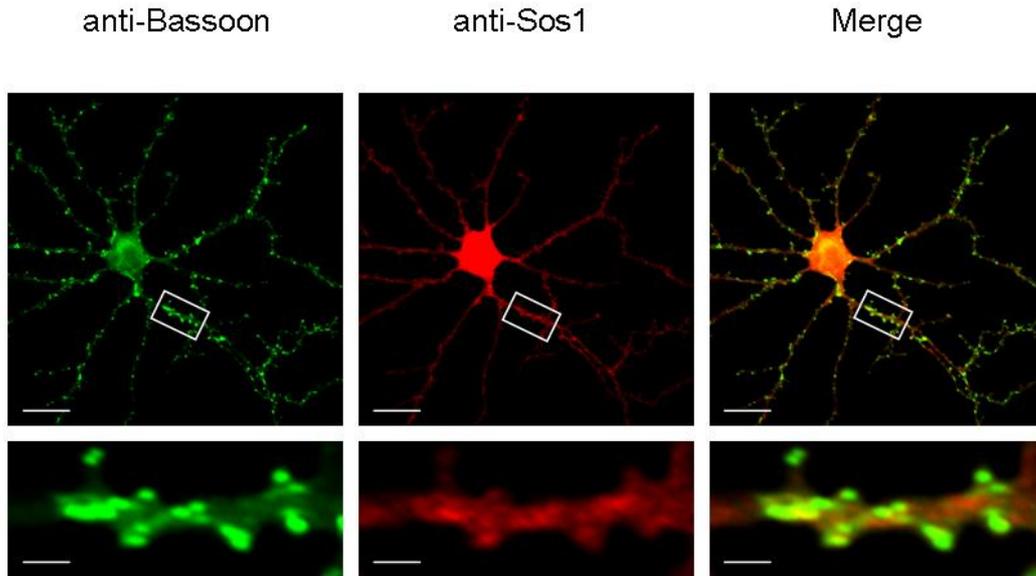


Abbildung 40: Lokalisation von endogenem Sos1 (rot) im Vergleich zu präsynaptischem Bassoon (grün) in primären hippocampalen Neuronen 17 DIV. Sos1 und Bassoon wurden immunzytochemisch nachgewiesen. (Balken: 20 μm , Balken im Ausschnitt: 3 μm). DIV: *days in vitro*; Sos1: *son of sevenless 1*. Sos1 kolokalisierte mit dem präsynaptischen Markerprotein Bassoon.

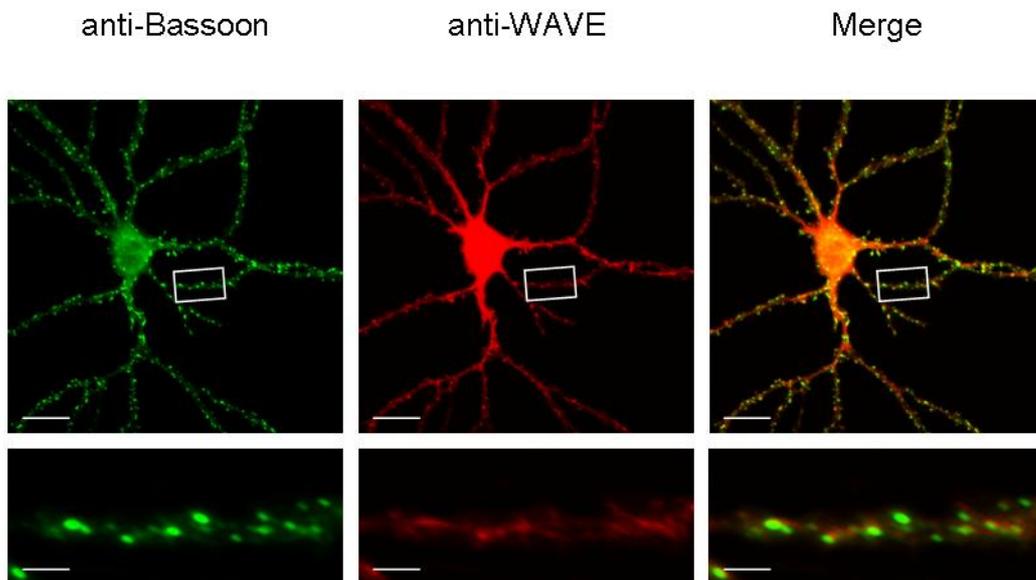


Abbildung 41: Lokalisation von endogenem WAVE (rot) im Vergleich zu präsynaptischem Bassoon (grün) in primären hippocampalen Neuronen 17 DIV. WAVE und Bassoon wurden immunzytochemisch nachgewiesen. (Balken: 20 μm , Balken im Ausschnitt: 3 μm). DIV: *days in vitro*; WAVE: *WASP family verprolin-homologous*. WAVE und Bassoon kolokalisierten in 17 DIV hippocampalen Neuronen.

3.5.3 Lokalisation von c-Abl, Eps8, Sos1 und WAVE in neuronalen Subfraktionen

Um festzustellen, welche der Interaktionspartner (c-Abl, Eps8, Sos1 bzw. WAVE) fest in der PSD integriert sind, wurde eine biochemische Präparation der PSD durchgeführt und anschließend die jeweiligen subzellulären Fraktionen mittels Western-Blotting auf die jeweiligen Interaktionspartner hin untersucht.

Wie in Abbildung 42 dargestellt, konnte Sos1-Protein in der PSD-Fraktion nicht detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass Sos1 zwar an Synapsen lokalisiert, aber kein fester Bestandteil der PSD ist. Eps8 ließ sich in geringen Mengen in der PSD-Fraktion nachweisen; WAVE-Protein wurde in der PSD-Fraktion detektiert. Beide Proteine waren allerdings in dieser Fraktion nicht angereichert. Eps8 und WAVE scheinen nicht fest in der PSD integriert zu sein. C-Abl war in der PSD-Fraktion allerdings deutlich angereichert und ist somit fest in der PSD integriert.

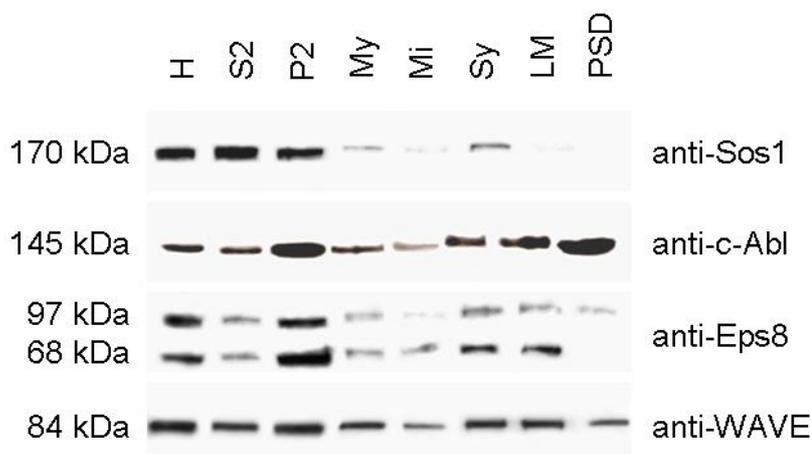


Abbildung 42: Nachweis von c-Abl-, Eps8-, Sos1- und WAVE-Protein in verschiedenen Fraktionen einer PSD-Präparation.

H: Homogenat; S2: lösliche Fraktion; P2: unlösliche Fraktion; My: Myelin Fraktion; Mi: Mitochondrien Fraktion; Sy: Synaptosomen Fraktion; LM: Fraktion der leichten Membranen; PSD: PSD-Fraktion; c-Abl: zelluläre Abelson Tyrosinkinase; Eps8: *epidermal growth factor receptor substrate 8*; Sos1: *son of sevenless 1*; WAVE: *WASP family verprolin-homologous*. Sos1 war nicht in der PSD-Fraktion vorhanden. Eps8 und WAVE waren in der PSD-Fraktion zu detektieren, allerdings waren ihre Signale in dieser Fraktion nicht stark angereichert. Nur c-Abl lag in der PSD-Fraktion stark angereichert vor.

3.5.4 Einfluss von Abi-1 auf die Lokalisation der Interaktionspartner c-Abl, Eps8, Sos1 und WAVE in Synapsen

Um zu untersuchen, ob Abi-1 einen Einfluss auf die Lokalisation seiner Interaktionspartner (c-Abl, Eps8, Sos1 bzw. WAVE) in Synapsen besitzt, wurden hippocampale Neurone 7 DIV transfiziert (pSuper, Abi-1-RNAi bzw. Abi-1-GFP) und nach drei Tagen fixiert. Anschließend wurde das präsynaptische Protein Bassoon zusammen mit jeweils einem der Interaktionspartner immunzytochemisch angefärbt

Eine Veränderung der Koloalisationsrate war bei keinem der Interaktionspartner direkt aus den Fluoreszenzaufnahmen heraus zu erkennen (c-Abl Abbildung 43, Eps8 Abbildung 44, Sos1 Abbildung 45, WAVE Abbildung 46, siehe auch Abbildung 47).

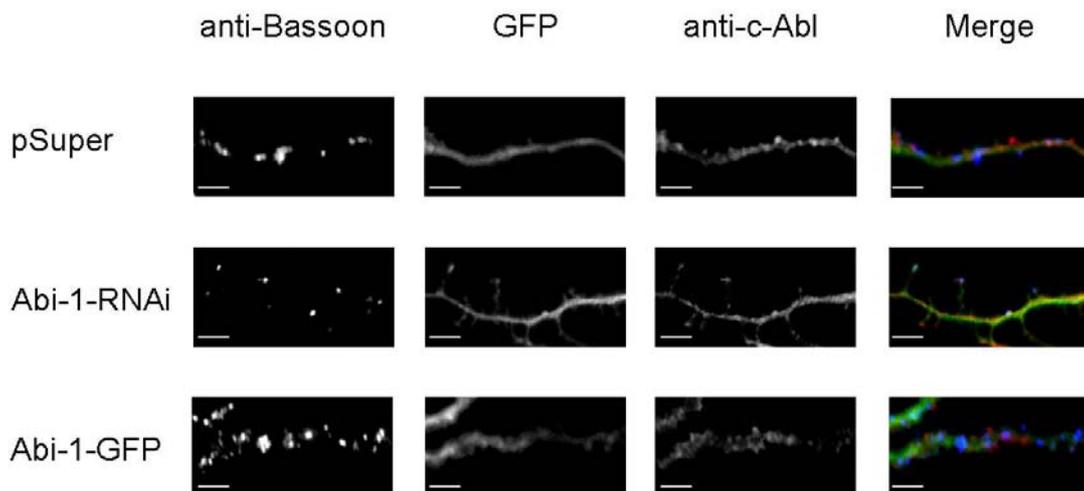


Abbildung 43: Immunzytochemische Färbung transfizierter hippocampaler Neurone mit dem präsynaptischen Bassoon (blau) und endogenem c-Abl (rot) 10 DIV zur Untersuchung der Koloalisation von Bassoon und c-Abl.

Transfektion mit pSuper, Abi-1-RNAi (pSuper) bzw. Abi-1-GFP (pEGFP) 7 DIV. (Balken: 5 µm). C-Abl: zelluläre Abelson Tyrosinkinase; DIV: *days in vitro*.

Eine Veränderung der Lokalisation von c-Abl in Synapsen durch Abi-1 war nicht ersichtlich. Bassoon wurde als präsynaptisches Markerprotein verwendet.

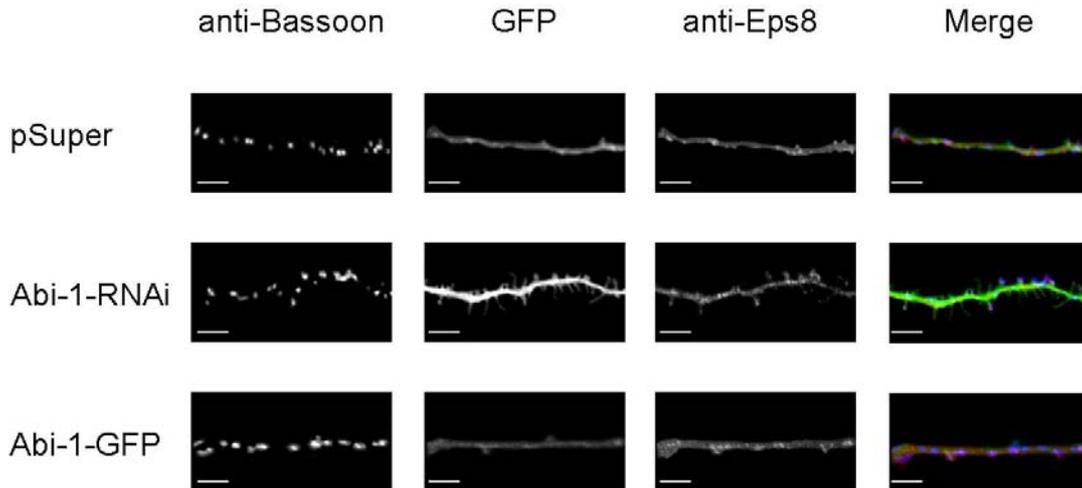


Abbildung 44: Immunzytochemische Färbung transfizierter hippocampaler Neurone mit dem präsynaptischen Bassoon (blau) und endogenem Eps8 (rot) 10 DIV zur Untersuchung der Koloalisation von Bassoon und Eps8.

Transfektion mit pSuper, Abi-1-RNAi (pSuper) bzw. Abi-1-GFP (pEGFP) 7 DIV. (Balken: 5 µm). DIV: *days in vitro*; Eps8: *epidermal growth factor receptor substrate 8*. Eine Veränderung der Lokalisation von Eps8 in Synapsen durch Abi-1 war nicht ersichtlich. Bassoon wurde als präsynaptisches Markerprotein verwendet.

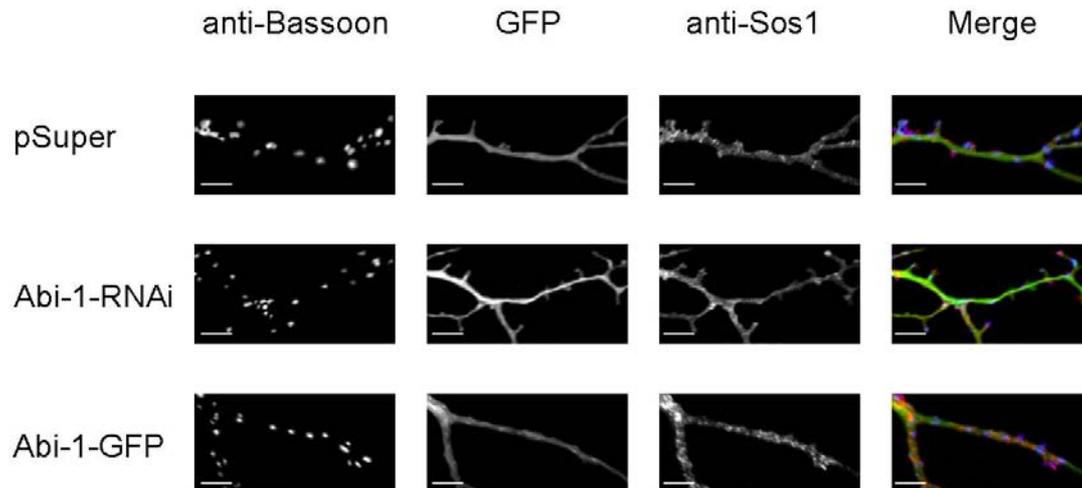


Abbildung 45: Immunzytochemische Färbung transfizierter hippocampaler Neurone mit dem präsynaptischen Bassoon (blau) und endogenem Sos1 (rot) 10 DIV zur Untersuchung der Koloalisation von Bassoon und Sos1.

Transfektion mit pSuper, Abi-1-RNAi (pSuper) bzw. Abi-1-GFP (pEGFP) 7 DIV. (Balken: 5 µm). DIV: *days in vitro*; Sos1: *son of sevenless 1*. Eine Veränderung der Lokalisation von Sos1 in Synapsen durch Abi-1 war nicht ersichtlich. Bassoon wurde als präsynaptisches Markerprotein verwendet.

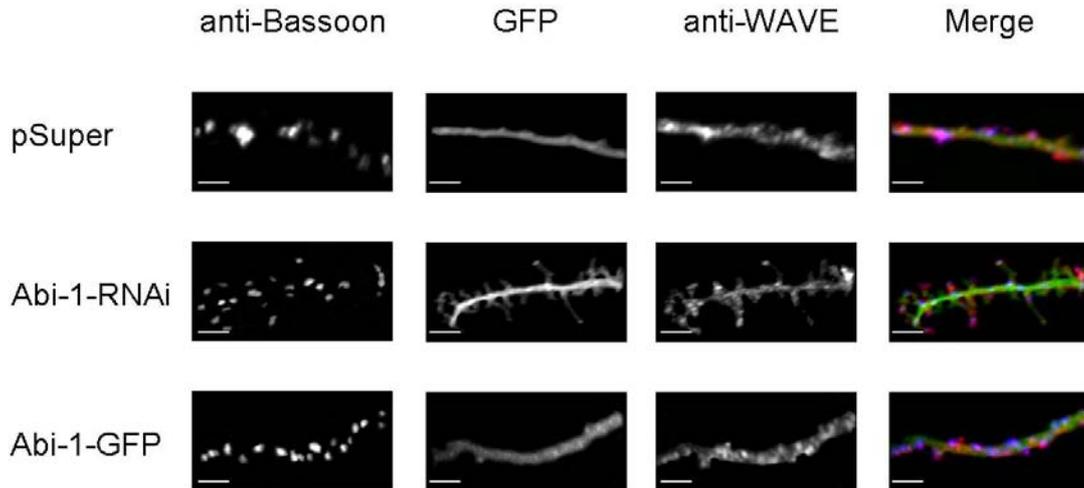


Abbildung 46: Immunzytochemische Färbung transfizierter hippocampaler Neurone mit dem präsynaptischen Bassoon (blau) und endogenem WAVE (rot) 10 DIV zur Untersuchung der Kollokalisierung von Bassoon und WAVE.

Transfektion mit pSuper, Abi-1-RNAi (pSuper) bzw. Abi-1-GFP (pEGFP) 7 DIV. (Balken: 5 µm). DIV: *days in vitro*; WAVE: *WASP family verprolin-homologous*. Eine Veränderung der Lokalisation von WAVE in Synapsen durch Abi-1 war nicht ersichtlich. Bassoon wurde als präsynaptisches Markerprotein verwendet.

Anhand der transfizierten und immunzytochemisch angefärbten Zellen wurde die Kollokalisationsrate von Bassoon und c-Abl, Eps8, Sos1 bzw. WAVE durch Auszählen ermittelt.

Dabei zeigte sich, dass die Reduktion von Abi-1-Protein (Abi-1-RNAi) den Anteil an Synapsen, bei denen Bassoon und Eps8 kolokalisierten, erhöhte (Abbildung 47). In den Abi-1 überexprimierenden Zellen (Abi-1-GFP) waren Bassoon-Signale hingegen seltener mit Eps8 kolokalisiert. Die Analyse der Kollokalisierung von c-Abl und Bassoon ergab eine Erhöhung der Kollokalisationsrate von Bassoon und c-Abl in Abi-1-RNAi transfizierten Neuronen, während die Überexpression von Abi-1 (Abi-1-GFP) zu einer selteneren Kollokalisationsrate führte. Die Kollokalisierung von Bassoon und WAVE bzw. Bassoon und Sos1 in den transfizierten Neuronen blieb unabhängig von dem transfizierten Konstrukt (pSuper, Abi-1-RNAi, Abi-1-GFP) konstant.

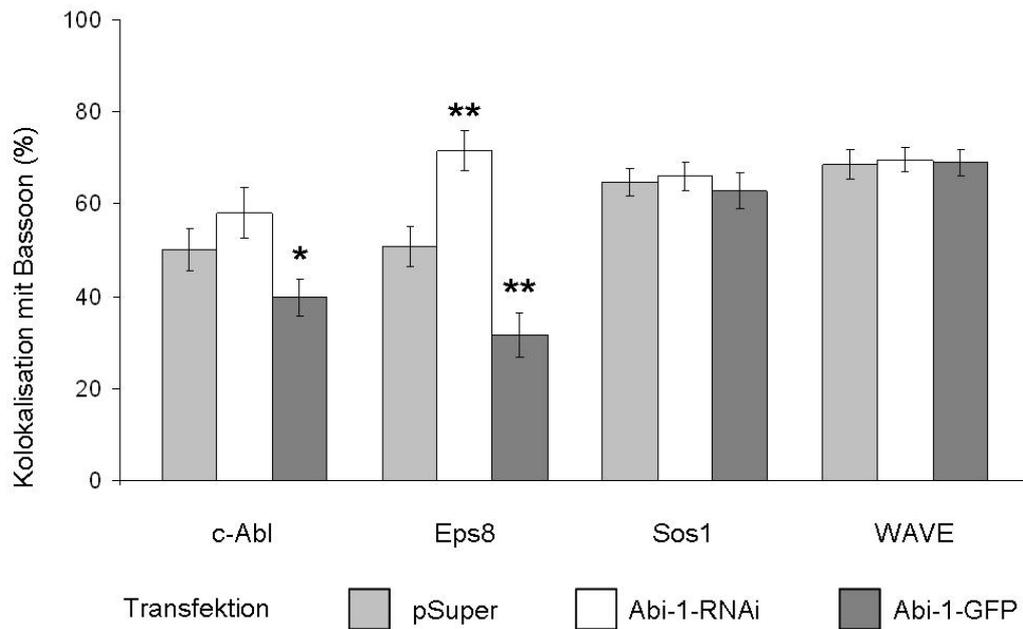


Abbildung 47: Auswertung der Kokalisation von Bassoon und den Abi-1-Interaktionspartnern c-Abl, Eps8, Sos1 bzw. WAVE in transfizierten hippocampalen Neuronen 10 DIV.

Transfektion mit pSuper, Abi-1-RNAi (pSuper) bzw. Abi-1-GFP (pEGFP) 7 DIV. (Mittelwert aus $n = 20 \pm$ Standardabweichung. Mit dem *t*-Test wurde die Kokalisation der transfizierten Zellen mit der jeweiligen Vektorkontrolle verglichen. $p < 0,01$: *; $p < 0,001$: **). Abi-1: *Abl interactor 1*; c-Abl: zelluläre Abelson Tyrosinkinase; DIV: *days in vitro*; Eps8: *epidermal growth factor receptor substrate 8*; Sos1: *son of sevenless 1*; WAVE: *WASP family verprolin-homologous*.

Abi-1 beeinflusste die Lokalisation von c-Abl und Eps8 an Synapsen negativ, während Abi-1 die Lokalisation von Sos1 und WAVE an Synapsen nicht beeinflusste.

Abi-1 beeinflusste also die Lokalisation der Interaktionspartner Sos1 bzw. WAVE nicht und die Lokalisation von c-Abl bzw. Eps8 an der Synapse negativ.

4 DISKUSSION

Die korrekte Ausbildung und Umbildung der dendritischen und synaptischen Morphologie ist eine Voraussetzung für ein funktionierendes neuronales Netzwerk. Diese Prozesse basieren u. a. auf Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit Abi-1 (*Abl interactor 1*), das an Reorganisationen des Aktin-Zytoskelett beteiligt und ein neu beschriebener Interaktionspartner des Gerüstmoleküls der postsynaptischen Dichte (PSD) ProSAP2/Shank3 (*proline rich synapse associated protein 2 / SH3 domain and ankyrin repeat containing protein 3*) ist, die Entwicklung von hippocampalen Neuronen beeinflusst.

4.1 Abi-1 und seine neuronale Expression und Lokalisation

Die Lokalisation von Abi-1 im Gehirn der Maus wurde 2000 durch Courtney *et al.* beschrieben. Sie zeigten eine starke Expression der Abi-1 mRNA mittels *in situ* Hybridisierung in den Hirnarealen des Hippocampus, Gyrus dentatus und des Cerebellums. Diese Hirnregionen werden mit Lernvorgängen assoziiert (Stark *et al.*, 2002). Wie in Abbildung 11 dargestellt, konnten diese Ergebnisse auf die Abi-1-mRNA-Expression im postnatalen Gehirn der Ratte übertragen werden. Die *in situ* Markierung von Abi-1 an Rattengehirnschnitten ergaben eine stärkere Abi-1-mRNA-Expression in lern- und gedächtnisrelevanten Strukturen wie z. B. dem Hippocampus.

In hippocampalen Kulturen der Ratte wurde von Courtney *et al.* (2000) die Lokalisation eines überexprimierten Abi-1-EYFP-Proteins in Wachstumskegeln beschrieben sowie eine synaptische Lokalisation vermutet. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch endogenes Abi-1-Protein in Neuronen in Wachstumskegeln und zusätzlich am Rand von Lamellipodien und Filopodien in hoher Konzentration detektiert werden konnte (Abbildung 13). Die Lokalisation von Abi-1 in Filopodien und Lamellipodien wurde bereits für Zelllinien und Fibroblasten beschrieben (Stradal *et al.*, 2001)

und weist auch auf eine Kolo-kalisierung von Abi-1 mit F-Aktin (filamentöses Aktin) Anreicherungen in primären hippocampalen Neuronen hin. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit durch eine Reihe von Untersuchungen nachgewiesen werden, dass Abi-1 in hippocampalen Neuronen postsynaptisch lokalisiert (Abbildung 15 und Abbildung 16) und zudem ein Bestandteil der postsynaptischen Dichte ist (Abbildung 17).

Sowohl Abi-1-mRNA als auch Abi-1-Protein wurden vom ersten untersuchten Zeitpunkt an von kultivierten Neuronen exprimiert. Im Gegensatz zur mRNA-Expression nimmt die Proteinexpression von Abi-1 z. T. sprunghaft zu (Abbildung 12). Die Zunahme der Abi-1-Expression ab 3 DIV (*days in vitro*) könnte damit zusammenhängen, dass in diesem Entwicklungsstadium die Neurone mit der Ausbildung von Dendriten beginnen. Dies geschieht durch die Ausbildung von Wachstumskegeln und Filopodien zur Wegfindung (Dotti *et al.*, 1988), und genau dort liegt Abi-1 stark angereichert vor, wie in Abbildung 13 gezeigt werden konnte. Ab 10 DIV und stärker an 14 DIV werden im Western-Blot weitere Abi-1-Banden detektiert. Das Auftreten von unterschiedlich großen Abi-1-Proteinen wurde bereits beschrieben (Suetsugu *et al.*, 2006) und wird mit Hyperphosphorylierungsereignissen in Verbindung gebracht (Courtney *et al.*, 2000; Proepper *et al.*, 2007). Durch Phosphorylierungsereignisse werden Proteinfunktionen wie Aktivität und Lokalisation reguliert (Pawson u. Scott, 2005). So konnten Proepper *et al.* (2007) zeigen, dass nach Stimulation der Neuronenkultur nur phosphoryliertes Abi-1 in der Lage ist, in den Zellkern zu gelangen, wo es an der Transkriptionsregulation beteiligt ist. Das Auftreten der weiteren Banden korreliert zeitlich mit dem Reifen der Synapsen (Dotti *et al.*, 1988). Abi-1 übernimmt nun zusätzlich zur Regulation von Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts eine signalweiterleitende Funktion (Proepper *et al.*, 2007).

4.2 Abi-1 und die Polarität hippocampaler Neurone

Laut den Beobachtungen von Dotti *et al.* (1988) entwickelt sich ein Neuron nach 1,5 DIV mit der Ausbildung des Axons zu einer polarisierten Zelle. Ein Ausläufer beginnt, stärker zu wachsen, und bildet axonale Charakteristika aus

(Craig u. Banker, 1994). Obwohl die Ausbildung der Polarität laut Dotti *et al.* (1988) nach 4 DIV abgeschlossen ist, konnten Bradke u. Dotti (2000 b) zeigen, dass die Dendriten auch noch nach 5 DIV das Potential besitzen, sich zu einem Axon zu entwickeln, nachdem das ursprüngliche Axon durchtrennt wurde. Der Rest des ehemaligen Axons nimmt dendritische Charakteristika an. Zusätzlich wird die Polarität von Neuronen durch Störungen des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst. So führt die Behandlung von hippocampalen Neuronen nach 1,5 DIV mit Cytochalasin D, welches eine Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts bewirkt, zu einem Verlust der Polarität (Bradke u. Dotti, 1999; Bradke u. Dotti, 2000 a). Eine Hemmung der Abl Tyrosinkinase von 4,5-7 DIV in hippocampalen Neuronen führt ebenfalls zum Verlust der Polarität (Jones *et al.*, 2004). Es scheint neben der Axogenese auch eine spätere Stabilisierung der Polarität von Bedeutung zu sein. Die Untersuchungen zur Polarität in dieser Arbeit wurden mit Neuronen 6 DIV durchgeführt, welche ab 3 DIV durch Transfektion veränderten intrinsischen Abi-1-Proteinleveln ausgesetzt wurden, und somit sich von der Stufe 3 (Entwicklung der Polarität) zur Stufe 4 (Entwicklung der Dendriten) entwickeln (Abbildung 2 und Abbildung 25). Weder die Überexpression noch eine Senkung der Abi-1 Proteinkonzentration mittels RNAi führte zu Störungen im Erhalt der Polarität. Beeinflusst wird die Entwicklung der Polarität u. a. intrinsisch durch Proteine, die Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts regulieren. Als differenzierungsfördernde intrinsische Prozesse wurden z. B. die Aktivierung von Rac (*Roux avian sarcoma*) als auch die Rac-abhängige Aktivierung der PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase), welche an der Aktivierung von Rap1b (*Ras related protein 1b*) und nachfolgender Cdc42-Aktivierung (*cell division cycle 42*) beteiligt ist, beschrieben (Lundquist, 2003; Nikolic, 2002; Schwamborn u. Püschel, 2004; Shi *et al.*, 2003). Obwohl Abi-1 in Fibroblasten an der Aktivierung von Rac und PI3K beteiligt ist (Abbildung 7), scheint Abi-1 nicht an den Signalwegen, welche die Ausbildung und Erhaltung der Polarität in hippocampalen Neuronen steuern, beteiligt zu sein. Zusätzlich konnte eine Immunreaktivität für endogenes Abi-1 in Wachstumskegeln aller Ausläufer beobachtet werden (Abbildung 13). Proteine, welche die Differenzierung zum Axon intrinsisch steuern, reichern sich hingegen besonders in den Wachstumskegeln des Axon-Vorläufers an (Arimura u. Kaibuchi, 2007).

4.3 Abi-1 und die Dendriten hippocampaler Neurone

Dendriten dienen der Kontaktaufnahme und bilden den postsynaptischen Anteil von Synapsen aus. Über die Ausmaße des Dendritenbaums bestimmt ein Neuron die Anzahl an Neuronen, mit denen es interagieren kann, und die Anzahl der Synapsen, die es ausbilden kann. Eine Veränderung der Dendritenverzweigung beeinflusst also auch die Funktionalität der Neuronen, da die Erreichbarkeit bestimmter Neuronengruppen oder die Anzahl der erreichbaren Neuronen sich verändert.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Abi-1-Expression mittels Abi-1-RNAi zu einer Zunahme der dendritischen Verzweigungen und Überexpression von Abi-1-Protein zu einer Verringerung der Anzahl der Dendriten sowohl an 6 DIV als auch an 10 DIV führte (Abbildung 26 und Abbildung 27). Die Änderung der Dendritenanzahl wies bei den jeweiligen Transfektionsgruppen nicht nur in der totalen Verzweigung, sondern auch in den verschiedenen Dendriten-Ordnungen immer dieselbe positive bzw. negative Tendenz auf (Abbildung 28 und Abbildung 29). Die Neurone in den Kontrollgruppen hingegen bildeten zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine relativ konstante Anzahl von 7-8 Dendriten aus. Dotti *et al.* (1988) beschrieben eine ähnliche Anzahl an Dendriten für die von ihnen untersuchten Kontrollgruppen.

Jones *et al.* (2004) zeigten, dass an 7 DIV primäre Dendriten eine langsamere Wachstumsrate als sekundäre Dendriten aufwiesen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass in den älteren Neuronen der Einfluss von Abi-1 auf die Ausbildung primärer Dendriten nicht mehr so stark ist wie in jüngeren Neuronen (Abbildung 28 und Abbildung 29). Laut Jones *et al.* (2004) wurde die aktive Ausbildung neuer Dendriten verhindert. Die Überexpression von Abi-1 führte sowohl in Neuronen 6 DIV als auch in Neuronen 10 DIV zur Reduktion der Anzahl der Dendriten verschiedener Ordnungen auf ähnliche Werte (Abbildung 28 und Abbildung 29). Dabei könnte es sich um einen Dendriten-„Grundstock“ handeln, der nicht mehr aktiv verändert zu werden scheint. Leider wurden von Jones *et al.* (2004) nur relative Werte bezogen auf die Kontrollgruppe angegeben. Die Wirkung auf die Dendritenausbildung durch Abi-1-RNAi könnte deshalb stärker gewesen sein, weil alle neuen

Dendriten aktiv ausgebildet wurden. Ältere Neurone der RNAi-Gruppe bildeten mehr Dendriten aus als jüngere Neurone. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ältere Neurone über mehr „Ressourcen“ verfügen als jüngere Neurone.

Im Vergleich zu Neuronen nach 6 DIV nahmen bei Neuronen nach 10 DIV die Anzahl der Dendriten der tertiären und quartären Ordnung stärker zu. Ein steigendes Alter der Kultur ist durch die Ausbildung von Dendriten höherer Ordnung gekennzeichnet. Die Neuronen sondieren dann nicht mehr die direkte Umgebung vom Zellkörper sondern mehr die Umgebung der Zellperipherie.

Wie die Untersuchungen des Zytoskeletts zeigten, nahmen bei RNAi transfizierten Neuronen nicht nur die MAP2 (*Microtubule associated protein 2*) positiven Dendriten, zu (Abbildung 25). Zusätzlich konnte mittels Phalloidin-färbung die Ausbildung aktinreicher Strukturen nachgewiesen werden (Abbildung 30 und Abbildung 31). Im Gegensatz zu *Abi-1* überexprimierenden Neuronen wiesen Neurone der RNAi-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle mehr Aktinfilamentanreicherungen auf, welche intensiver durch Phalloidin angefärbt wurden. Somit beeinflusst *Abi-1* die Organisation des Aktin-Zytoskeletts in Neuronen.

Filopodien sind sowohl Vorläuferstrukturen für Dendriten als auch für die dendritischen Dornen von Synapsen. Die Ausbildung von Filopodien wurde besonders in jungen Neuronen beobachtet. In dieser Entwicklungsstufe sind die Filopodien instabil und werden häufig nach ihrer Ausbildung wieder eingezogen. Die Ausbildung von Dendriten erfolgt laut Jones *et al.* (2004) durch eine lokale Instabilität des Aktin-Zytoskeletts, z. B. durch Rho-Aktivierung (*Ras homologous member*). Eine Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts durch Gabe des Polymerisationsinhibitors Cytochalasin B führt zu Einsprossungen von Mikrotubulin in die peripheren Wachstumskegel und damit zum Auswachsen der Dendriten (Forscher und Smith, 1988; Yoshimura *et al.*, 2006). Eine Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts hingegen führt laut Matus (2005) zur Ausbildung pilzförmiger Synapsen.

4.4 Abi-1 und die Synapsen hippocampaler Neurone

Die Ausbildung reifer synaptischer Kontakte ist eine Voraussetzung für die Informationsweitergabe und –speicherung durch das neuronale Netzwerk. Für die Funktionalität der Synapse ist nicht nur die Lokalisation von Rezeptoren in der Membran, sondern auch die Ausbildung einer reifen Morphologie des dendritischen Dorns wichtig (Sala, 2002). Abi-1 scheint an der morphologischen Reifung der Synapsen beteiligt zu sein, da bei einer Überexpression von Abi-1 verstärkt pilzförmige Synapsen gebildet wurden, während unter Abi-1-RNAi mehr filopodienartige Synapsen auftraten (Abbildung 32 und Abbildung 34). Die Morphologie der Synapse ist nicht nur bestimmend für die Stabilität der Synapse, sondern auch für ihre Funktion (Tada u. Sheng, 2006). Laut Korkotian u. Segal (2000) ist die Antwort des Dendriten auf Glutamat bei filopodienartigen Synapsen im Vergleich zu pilzförmigen Synapsen verzögert und schwächer. Dieser Effekt kommt durch die unterschiedlichen Morphologien der dendritischen Dornen zustande. Filopodienartige Synapsen weisen einen längeren Halsbereich und zugleich einen schmaleren Kopfbereich auf als pilzförmige dendritische Dornen (Harris *et al.*, 1992). Die Größe des Kopf-bereiches korreliert mit der Menge an intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} -Ionen und somit mit der Stärke der synaptischen Antwort (Korkotian u. Segal, 2000). Durch den längeren Halsbereich wird mehr Ca^{2+} im Kopf zurückbehalten als bei einem kürzeren Halsstück (Noguchi *et al.*, 2005). Pilzförmige Synapsen werden als „Gedächtnis“-Synapsen und filopodienartige Synapsen als „Lern“-Synapsen bezeichnet (Bourne u. Harris, 2007). Diese Einteilung erfolgte aufgrund der Beobachtungen, dass pilzförmige Synapsen zu späteren Entwicklungsstadien dominieren und diese Morphologie beständiger zu sein scheint. Im Gegensatz dazu werden filopodienartige Synapsen zu Beginn der Synaptogenese gebildet und treten in späteren Entwicklungsstadien nur noch selten auf. Sie weisen eine hohe Dynamik und somit eine erhöhte Instabilität auf (Dailey u. Smith, 1996; Harris u. Kater, 1994; Ziv u. Smith, 1996).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Abi-1-RNAi transfizierten Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe die Synapsendichte verringert und bei Abi-1 überexprimierenden Neuronen erhöht war (Abbildung 33). Die hohe

Instabilität filopodienartiger Synapsen könnte dazu führen, dass die filopodienartigen Synapsen zurückgebildet werden und sich dadurch die Synapsendichte in der RNAi-Gruppe reduziert. Die erhöhte Synapsendichte bei der Abi-1 Überexpression könnte aus der erhöhten Bildung pilzförmiger Synapsen resultieren, da pilzförmige Synapsen eine stabile Form besitzen. Zusätzlich weisen pilzförmige Synapsen eine grössere PSD auf als filopodienartige Synapsen, was eine Erhöhung der Anzahl der inserierten Rezeptoren ermöglicht (Nusser *et al.*, 1998; Racca *et al.*, 2000; Takumi *et al.*, 1999).

Für die Funktionalität der Synapsen sind NMDAR (N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren) und AMPAR (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure Rezeptoren) wichtig (Durand *et al.*, 1996). Durch eine vorherige Aktivierung von AMPAR und der Bindung von Glutamat werden NMDAR aktiviert (Pickard *et al.*, 2000). Deshalb wurde die Funktionalität der hippocampalen Neurone anhand des immunzytologischen Nachweises der Lokalisation von GluR1 (Glutamatrezeptor 1), einer Untereinheit des AMPAR, in Synapsen untersucht. Mutationen im C-Terminus des GluR1 verhindern die funktionelle Lokalisation in Synapsen (Hayashi *et al.*, 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Anwesenheit der Untereinheit in dünnen und pilzförmigen Synapsen unabhängig der Abi-1 Expression konstant war (Abbildung 47). Nur bei den filopodienartigen Synapsen der Abi-1-RNAi-Transfektionsgruppe konnte eine deutliche Reduzierung der Lokalisation der GluR1-Untereinheit an Synapsen im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Matsuzaki *et al.* (2001) beschrieben, dass filopodienartige Synapsen keine AMPAR besitzen, sondern diese erst im Laufe der morphologischen Reifung zur pilzförmigen Synapse aufweisen. Rao *et al.* (1998) beschreiben, dass AMPAR in hippocampalen Neuronen ab 9 DIV in Synapsen lokalisieren. In den Untersuchungen von Nusse *et al.* (1998) waren 17 % der Synapsen AMPAR negativ. In dieser Arbeit waren ungefähr 20 % der untersuchten Synapsen ohne AMPAR (Abbildung 36). Nach den vorliegenden Ergebnissen sind Synapsen, welche sich von dem morphologischen Stadium der filopodienartigen Synapse weiterentwickelt haben, reif und funktionell.

Da Abi-1 überexprimierende Neurone eine höhere Synapsendichte mit erhöhtem Anteil an pilzförmigen Synapsen aufweisen, sind die Neurone stärker und

stabiler untereinander vernetzt. Im Gegensatz dazu ist bei Abi-1-RNAi behandelten Neuronen die Synapsendichte reduziert und ein größerer Anteil der Synapsen besteht aus Filopodium-Synapsen, welche seltener mit GluR1 besetzt sind. Dadurch könnte die Hemmung der Abi-1-Expression in einer verringerten Funktionalität dieser Neurone resultieren, was mit elektro-physiologischen Experimenten untersucht werden könnte. Einen Hinweis auf die Auswirkungen der gefundenen Ergebnisse auf das neuronale Netzwerk liefert die Abi-2 *knock out* Maus, welche sowohl Defizite des Kurzzeit- als auch des Langzeitgedächtnisses zeigen (Grove *et al.*, 2004). Abi-2 *knock out* Mäuse, welche im Vergleich zu Abi-1 *knock out* Mäusen lebensfähig sind, weisen Veränderungen der Synapsen in den Bereichen des Kortex und des Hippocampus auf. Während die Synapsen der Pyramidalneurone der Schicht III eine leichte Verschiebung der Synapsenmorphologie zu Ungunsten der pilzförmigen Synapsen bei gleichbleibender Synapsendichte in den Abi-2 defizienten Tieren zeigten, kam es bei den hippocampalen Neuronen fast zu einer Halbierung der Synapsendichte. Da bei den hippocampalen Neuronen im Vergleich zu den Neuronen des Kortex nicht auf die Synapsenmorphologie eingegangen wurde, besteht die Möglichkeit, dass die Hemmung der Abi-2-Expression in hippocampalen Neuronen der *knock out* Mäuse nur zu einer verringerten Synapsendichte und zu keinen Veränderungen der Synapsenmorphologie führte, im Unterschied zu den Ergebnissen dieser Arbeit nach Hemmung der Abi-1 Proteinexpression in hippocampalen Neuronen. In diesem Fall könnte es zu Verstärkungen der Lerndefizite unter Abi-1 Proteinverlust kommen. Grove *et al.* (2004) spekulierten, dass Defekte in Rac-abhängigen Signalwegen zu dem beobachteten Phänotyp führen könnten.

4.5 Abi-1 und die kleinen GTPasen der Rho-Familie

Die neuronale Entwicklung wird durch die GTPasen der Rho-Familie beeinflusst (Govek *et al.*, 2005). Abi-1 ist mit seinen Interaktionspartnern c-Abl (zelluläre Abelson Tyrosinkinase), Eps8 (*epidermal growth factor receptor substrate 8*), Sos1 (*son of sevenless 1*) und WAVE (*WASP family verprolin-homologous*) ein Teil der Rho-GTPasen-Signalwege (Innocenti *et al.*, 2004;

Jones *et al.*, 2004; Sini *et al.*, 2004). Die GTPase Cdc42 reguliert die Entwicklung der Polarität und die Ausbildung von Filopodien, welche als Vorläuferstrukturen von Dendriten und Synapsen angesehen werden (Hall, 1998; Schwamborn u. Püschel, 2004). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, besaß Abi-1 keinen Einfluss auf die Polarität von Neuronen (Abbildung 25). Eine vermehrte Filopodienbildung unter Abi-1-RNAi-Behandlung (Abbildung 31) könnte zu einer Zunahme der Anzahl der Dendriten zu den beiden untersuchten Zeitpunkten führen (Abbildung 26 und Abbildung 27), indem auch nach 10 DIV aus Filopodien verstärkt Dendriten anstatt Synapsen gebildet werden. Bei der Überexpression von Abi-1 wurde eine verminderte Anzahl an Dendriten nach 6 DIV und 10 DIV festgestellt (Abbildung 26 und Abbildung 27), während die Synapsendichte nach 10 DIV erhöht war (Abbildung 33). Dies könnte bedeuten, dass vermittelt durch Abi-1 aus Filopodien verstärkt Synapsen gebildet werden, während die Entstehung von Dendriten unterdrückt wird.

Für die GTPase Rho konnte gezeigt werden, dass Rho die Dendritenbildung hemmt, zu einer reduzierten Synapsendichte und einer Verkürzung der dendritischen Dornen führt (Jones *et al.*, 2004; Tashiro *et al.*, 2000). Während eine Verringerung der Synapsendichte dem Abi-1-RNAi-Phänotyp ähnelt (Abbildung 32 und Abbildung 33), trat eine verringerte Dendritenanzahl bei der Überexpression von Abi-1 auf (Abbildung 26 und Abbildung 27). Tashiro *et al.* (2000) beschrieben außerdem eine Erhöhung der Synapsendichte durch erhöhte Rac-Aktivität. Zusätzlich beeinflusst Rac das Wachstum von neuronalen Ausläufern positiv (Govek *et al.*, 2005). Eine vermehrte Synapsenbildung trat in den hier vorliegenden Versuchen durch eine Überexpression von Abi-1 auf (Abbildung 32 und Abbildung 33), während die Anzahl der Dendriten durch eine Reduktion der Abi-1-Proteinexpression mittels RNAi zunahm (Abbildung 26 und Abbildung 27). Die auftretenden Phänotypen können also nicht eindeutig mit nur einer GTPase in Verbindung gebracht werden. Dies könnte bedeuten, dass für die Ausbildung der Effekte auf Dendriten und Synapsen hippocampaler Neurone durch Abi-1 getrennte Mechanismen bzw. unterschiedliche Interaktionen von Abi-1 verantwortlich sein könnten.

4.6 Abi-1 und seine Interaktionspartner c-Abl, Eps8, Sos1 und WAVE in Synapsen hippocampaler Neurone

WAVE (*WASP family verprolin-homologous*)

Der Abi-WAVE-Signalweg nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation der Aktin-Polymerisierung ein (Stradal *et al.*, 2004). Die WAVE Proteine werden im Gehirn exprimiert und lokalisieren in Synapsen (Choi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Pilpel u. Segal, 2005). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten damit übereinstimmend die Expression und synaptische Lokalisation von WAVE in hippocampalen Neuronen, und zusätzlich eine feste Integration von WAVE in der PSD (Abbildung 38, Abbildung 41 und Abbildung 42).

WAVE und Abi-1 interagieren in einem multimolekularen Komplex zusammen mit PIR121 (p53 induzierbare mRNA 121) und Nap1 (Nck assoziiertes Protein 1; Eden *et al.*, 2002; Gautreau *et al.*, 2004; Innocenti *et al.*, 2004; Steffen *et al.*, 2004). Eine Aktivierung des Komplexes durch aktiviertes Rac führt zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (*actin related protein 2/3-complex*; Innocenti *et al.*, 2004). Der Arp2/3-Komplex erhöht die Anzahl der Verzweigung von Aktinfilamenten und begünstigt dadurch die Ausbildung von lamellipodienartigen Strukturen, wie sie u. a. im Kopfbereich pilzförmiger dendritischer Dornen vorkommen (Machesky u. Gould, 1999; Matus, 2000; Weaver *et al.*, 2003). Die verstärkte Ausbildung pilzförmiger Synapsen in Abi-1 überexprimierenden Zellen könnte u. a. auf eine starke Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch einen Abi-1-WAVE-Komplex hindeuten. Unter Abi-1-RNAi Bedingungen hingegen bildeten sich seltener pilzförmige Synapsen aus. Es wurde von verschiedenen Gruppen berichtet, dass durch die Hemmung der Abi-1-Expression mittels RNAi die Bildung des Komplexes gestört wurde. Zusätzlich wurde eine Reduktion der endogenen WAVE-Proteinlevel beobachtet (Kheir *et al.*, 2005; Kunda *et al.*, 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss von Abi-1 auf die synaptische Lokalisation von WAVE ergab, dass die synaptische Lokalisation von WAVE unter veränderten Abi-1-Proteinexpressionen im Vergleich zur Kontrolle unverändert war (Abbildung 47). Zusätzlich konnte keine Reduktion

des WAVE-Signals in den Abi-1-RNAi transfizierten Neuronen beobachtet werden (Abbildung 46).

Sowohl über den Einfluss von Abi-1 auf die Aktivität des WAVE-Komplexes als auch über den Einfluss von WAVE auf Synapsen hippocampaler Neurone sind widersprüchliche Daten gezeigt worden. Abi-1 wird sowohl ein aktivierender als auch ein hemmender Einfluss zugeschrieben (Eden *et al.*, 2002; Innocenti *et al.*, 2004; Steffen *et al.*, 2004). Die Hemmung der WAVE1-Expression in hippocampalen Neuronen in Kultur sowie WAVE1 *knock out* Mäuse zeigen eine reduzierte Synapsendichte (Kim *et al.*, 2006). Die Expression eines dominant negativen WAVE2 Konstruktes in hippocampalen Neuronenkulturen führt ebenfalls zu einer Verringerung der Synapsendichte und der Grösse der dendritischen Dornen (Choi *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu beschreiben Pilpel u. Segal (2005) eine Senkung der Synapsendichte durch die Überexpression von WAVE1 und WAVE3 Konstrukten in hippocampalen Neuronen. Während Choi *et al.* (2005) ihre Neurone an 13-15 DIV transfizierten und nach 16-17 DIV untersuchten, verwendeten Kim *et al.* (2006) Neurone 8 DIV für die Transfektion und untersuchten sie nach 12 DIV. Pilpel u. Segal (2005) transfizierten die Neurone an 7-8 DIV und werteten die Veränderungen nach 11-14 DIV aus. Ein unterschiedliches Alter der Neuronenkulturen kann also nicht Ursache der widersprüchlichen Daten über den Einfluss von WAVE1 auf die Synapsendichte sein. In dieser Arbeit wurden die Neurone ähnlich wie bei Kim *et al.* (2006) und Pilpel u. Segal (2005) an 7 DIV und nach 10 DIV ausgewertet. Eine Reduktion der Synapsendichte zeigte sich in der Abi-1-RNAi-Transfektionsgruppe. Ausgehend von den Beobachtungen, dass ein Fehlen von Abi-1 eine Instabilität des WAVE-Komplexes bewirkt, könnte in Abi-1-RNAi transfizierten Neuronen der WAVE-Komplex inaktiv sein. Allerdings wurde zusätzlich eine WAVE-Proteinreduktion beschrieben. Dies zeigte sich in den hier vorgestellten Untersuchungen nicht. Auch hatte weder eine Hemmung der Abi-1-Expression noch eine Überexpression von Abi-1 einen Einfluss auf die synaptische Lokalisation von WAVE. Dies könnte in dem Fall der RNAi-Gruppe damit erklärt werden, dass durch die RNAi-Technologie die selektive Hemmung der Proteinexpression kaum vollständig gelingt und Restmengen an Abi-1 ausreichend für die Aufrechterhaltung der Abi-1 Funktion im WAVE-Komplex gewesen sein

könnten. Zusätzlich ist eine Interaktion von Abi-2 mit WAVE1 beschrieben worden, so dass der Verlust an Abi-1 vielleicht durch Abi-2 ausgeglichen wurde (Eden *et al.*, 2002). Eine genaue Aussage kann nach den vorliegenden Daten nicht getroffen werden.

Sos1 (*son of sevenless 1*) und Eps8 (*epidermal growth factor receptor substrate 8*)

Im Gegensatz zu der Interaktion mit WAVE ist die Interaktion mit Sos1 und Eps8 bislang nur für Abi-1 und nicht für Abi-2 beschrieben worden (Biesova *et al.*, 1997; Scita *et al.*, 1999). Eine neuronale Expression und synaptische Lokalisation der Proteine ist zuvor beschrieben worden und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Proepper *et al.*, 2007; Abbildung 37, Abbildung 39 und Abbildung 40). Sos1 liegt im Gegensatz zu Eps8 nicht fest integriert in der PSD vor (Abbildung 42). Dies könnte darauf hindeuten, dass Eps8 eine zusätzliche Funktion in Synapsen zu der Bildung eines Komplexes mit Sos1 und Abi-1 ausübt. Ein weiterer Hinweis darauf liefert die Untersuchung zum Einfluss von Abi-1 auf die synaptische Lokalisation seiner Interaktionspartner. Während die synaptische Lokalisation von Sos1 unter veränderten Abi-1 Proteinleveln gleich bleibt, zeigt Eps8 eine Modulation seiner synaptischen Lokalisation durch Abi-1 (Abbildung 47).

Sos1 besitzt sowohl RasGEF als auch RacGEF-Aktivität. Rac übt einen positiven Einfluss auf die Ausbildung der Synapsendichte aus (Tashiro *et al.*, 2000). Die RacGEF-Aktivität wird durch die Bildung eines Komplexes mit Eps8, Abi-1 und PI3K sowie vorheriger Phosphorylierung von Sos1 durch c-Abl (zelluläre Tyrosinkinase) aktiviert (Sini *et al.*, 2004). Abi-1 ist für die Bildung und Stabilität des Komplexes wichtig, die Lokalisation erfolgt durch Eps8 (Fan u. Goff, 2000; Scita *et al.*, 1999; Scita *et al.*, 2001). Die Überexpression von Abi-1 resultiert in einer erhöhten Rac-Aktivität (Innocenti *et al.*, 2002). Die Erhöhung der Synapsendichte in Abi-1-überexprimierenden Neuronen könnte durch eine verstärkte Aktivierung von Rac durch den Sos1-Abi-1-Eps8-PI3K-Komplex zustande kommen. Doch obwohl eine synaptische Lokalisation von Sos1 und Eps8 gezeigt wurde, gibt es bisher keine Daten, ob die Aktivierung von Ras oder Rac durch Sos1 in der Synaptogenese oder der

morphologischen Reifung eine Rolle spielt. Es wäre möglich, dass Rac durch andere RacGEFs wie z. B. Kalirin aktiviert wird (Rabiner *et al.*, 2005).

Eps8 und Abi-1 interagieren unabhängig von der Bildung des Sos1-Komplexes miteinander. Durch die Interaktion der beiden Proteine wird die Kappenaktivität von Eps8, die im ungebundenen Zustand autoinhibiert vorliegt, freigesetzt. Als Kappenprotein bindet Eps8 an die (+)-Enden von Aktinfilamenten und verhindert die weitere Polymerisierung von Aktinmonomeren (Diszanza *et al.*, 2004; Higgs, 2004). Dadurch wird das Längenwachstum der Aktinfilamente eingeschränkt. Die Anwesenheit von Kappenproteinen ist für die Ausbildung lamellipodienartiger Strukturen, die Abwesenheit von Kappenproteinen für die Ausbildung filopodienartiger Strukturen nötig (Vignjevic *et al.*, 2003; Vignjevic *et al.*, 2006). Während der Kopfbereich von pilzförmigen dendritischen Dornen eine lamellipodienartige Struktur besitzt, weist das Aktin-Zytoskelett im Halsbereich von filopodienartigen dendritischen Dornen und in Filopodien lange, gebündelte Aktinfilamente auf (Fifkova u. Delay, 1982; Hirokawa, 1989; Landis u. Reese, 1983). Die Überexpression von Abi-1 könnte zu einer gesteigerten Interaktion zwischen Abi-1 und Eps8 führen. Dadurch würde die Kappenaktivität von Eps8 verstärkt freigesetzt und könnte an der morphologischen Reifung der dendritischen Dornen zur pilzförmigen Synapse führen. Durch die gesteigerte Aktivierung könnte ein geringerer Bedarf an Eps8 in Synapsen entstehen, was eine Erklärung für die geringere synaptische Lokalisation von Eps8 in Abi-1 überexprimierenden Neuronen sein könnte (Abbildung 47). Durch die Inhibition der Abi-1-Expression in Abi-1-RNAi transfizierten Neuronen könnte die F-Aktin-Kappenaktivität von Eps8 aufgrund der fehlenden Interaktion mit Abi-1 nicht aus der Autoinhibition freigesetzt werden. Eventuelle Restmengen an Abi-1 könnten für eine ausreichende Aktivierung von Eps8 nicht genügen, weshalb dann eine stärkere synaptische Lokalisation von Eps8 in Abi-1-RNAi transfizierten Neuronen auftritt.

Neben seiner Kappenaktivität weist Eps8 auch eine Aktinfilament bündelnde Aktivität auf. Diese Aktivität wird durch die Interaktion mit IRSp53 (Insulinrezeptorsubstratprotein von 53 kDa) verstärkt (Diszanza *et al.*, 2006). IRSp53 ist ein PSD-Protein und interagiert u. a. mit PSD-95 und wie Abi-1 mit den

ProSAP/Shank Proteinen sowie WAVE2 (Bockmann *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005; Miki *et al.*, 2000; Miki u. Takenawa, 2002; Soltau *et al.*, 2002; Soltau *et al.*, 2004). Eine Überexpression von IRSp53 in hippocampalen Neuronen führt zu einer höheren Synapsendichte, während die Hemmung der IRSp53-Expression mittels RNAi zu einer Reduktion der Synapsendichte und der Grösse der dendritischen Dornen führt (Choi *et al.*, 2005). Aktiviertes Rac führt alternativ über die Interaktion von IRSp53 und WAVE2 zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (siehe oben). Aktiviertes Cdc42 hingegen verstärkt die Aktivierung der F-Aktin bündelnden Funktion von IRSp53 und Eps8 (Disanza *et al.*, 2006). Eine Hemmung der Abi-1-Expression in hippocampalen Neuronen führt zu einer verstärkten synaptischen Lokalisation von Eps8 (Abbildung 47). Im dendritischen Dorn könnte Eps8 nun mit IRSp53 interagieren, da Abi-1 als Interaktionspartner fehlt bzw. stark reduziert ist. Die verstärkte bündelnde Aktivität der beiden Proteine könnte zu der Ausbildung und Stabilisierung filopodienartiger Strukturen wie in filopodienartigen dendritischen Dornen und Filopodien führen, die unter Abi-1-RNAi Behandlung verstärkt auftraten (Abbildung 31). Ein Einfluss auf die Ausbildung des neuronalen Dendritenbaums durch IRSp53 wurde von Choi *et al.* (2005) allerdings nicht beschrieben.

C-Abl (zelluläre Abelson Tyrosinkinase)

Die Lokalisation von c-Abl in hippocampalen Neuronen wurde von Jones *et al.* (2004) beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass c-Abl synaptisch lokalisiert und fest in die PSD integriert ist (Abbildung 38 und Abbildung 42). Während ein Einfluss von c-Abl auf den neuronalen Dendritenbaum von Jones *et al.* (2004) beschrieben wurde, gibt es bisher keine Daten über den Einfluss von c-Abl auf Synapsen. Die Hemmung von c-Abl mit STI571 in hippocampalen Neuronen in Kultur führt zu einer Vereinfachung des Dendritenbaums, während die Transfektion eines konstitutiv aktiven c-Abl-Konstruktes (CA-Abl) die Anzahl MAP2 (*microtubule associated protein 2*) positiver Dendriten steigerte (Jones *et al.*, 2004). Die Transfektion der Neurone mit dem konstitutiv aktiven c-Abl Konstrukt bzw. die Hemmung von c-Abl mit STI571 fand an 5 DIV und die Untersuchung der Dendritenbäume nach 7 DIV statt, wobei nur die Anzahl primärer und sekundärer Dendriten

ausgewertet wurden. Jones *et al.* (2004) beobachteten eine 42%ige Reduktion primärer Dendriten und eine 45%ige Reduktion sekundärer Dendriten durch STI571. CA-Abl hingegen führte zu 20 % mehr primären Dendriten, die Anzahl der sekundären Dendriten wurde nicht verändert. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen eine starke Beeinflussung der primären Dendriten zu diesem Zeitpunkt. Abi-1 führte zu einer Verdopplung der Anzahl der primären Dendriten und einer Verdreifachung der sekundären Dendriten, während die Überexpression von Abi-1 zu einer Halbierung der Anzahl primärer und sekundärer Dendriten führte. Die Hemmung von c-Abl durch STI571 bewirkt eine ähnliche Veränderung der Dendritenzahl wie die Überexpression von Abi-1 (Abbildung 28).

Eine Hemmung der c-Abl-Kinaseaktivität durch STI571-Behandlung führt zu einer generellen Schwächung der Intensität der Phalloidin-Färbung (Jones *et al.*, 2004). Eine Schwächung von Aktinfilamentanreicherungen konnte auch in Abi-1 überexprimierenden Neuronen gezeigt werden (Abbildung 30). Dies und die Ergebnisse zur Anzahl der Dendriten deuten darauf hin, dass Abi-1 einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität von c-Abl besitzt. Shi *et al.* (1995) und Ikeguchi *et al.* (2001) beschrieben ebenfalls eine Inhibition der Aktivität von c-Abl durch Abi-1. In *Drosophila* hingegen zeigte Juang u. Hoffmann (1999) einen positiven Einfluss von Abi-1 auf die c-Abl-Kinaseaktivität.

Der Effekt von CA-Abl auf die Morphologie der Neurone - eine verstärkte Bildung von Dendriten, ähnlich dem in dieser Arbeit gezeigten Abi-1-RNAi-Phänotyp (Abbildung 26 und Abbildung 27) - kommt durch lokale Destabilisierungen des Aktin-Zytoskeletts und unabhängig von der Stabilität des Mikrotubulin Zytoskeletts zustande (Jones *et al.*, 2004). Der Effekt von Abi-1 auf die Anzahl neuronaler Dendriten war stärker als die beschriebenen Effekte von c-Abl. Dies könnte u. a. daran liegen, dass bei Jones *et al.* (2004) die Neurone einen Tag kürzer behandelt wurden. Vielleicht verfügt Abi-1 auch über zusätzliche, c-Abl unabhängige Möglichkeiten der Aktin-Zytoskelettstabilisierung.

Modell der Abi-1-Signalwege

Die vorherigen Abschnitte zusammenfassend werden im Folgenden Modelle der Abi-1-Signalwege unter Abi-1-Überexpression- bzw. Abi-1-RNAi-Bedingungen (Abbildung 48 und Abbildung 49) vorgestellt. Dabei finden nur Interaktionen, die an den Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind, Berücksichtigung (1.4).

Abi-1 überexprimierende Neurone zeichneten sich durch eine Verringerung der Anzahl der Dendriten und einer Zunahme der Synapsendichte bei verstärkter Ausbildung pilzförmiger dendritische Dornen aus. Eine Hemmung der Dendritenbildung könnte dadurch verursacht werden, dass durch die verstärkte Bildung von Abi-1-Protein es vermehrt zur Interaktion zwischen Abi-1 und Eps8 kommt, wodurch die F-Aktin-Kappenaktivität von Eps8 häufiger aktiviert würde (Abbildung 48). Die Aktivierung der Eps8-Kappenaktivität hemmt das Längenwachstum von Aktinfilamenten und somit auch die Filopodienbildung. Die Abwesenheit von Kappenproteinen ermöglicht die Formierung von Lamellipodien. Zusätzlich verhindert eine Bindung von Abi-1 eine Interaktion von Eps8 mit IRSp53. Der Eps8-IRSp53-Komplex bündelt Aktinfilamente und fördert dadurch die Bildung von filopodienartigen Strukturen. Des Weiteren führt eine Rho-Aktivierung zu einer Senkung der Dendritenanzahl. C-Abl hemmt die Rho-Aktivität. Abi-1 könnte eine inhibierende Wirkung auf c-Abl ausüben und dadurch zu einer verstärkten Rho-Aktivität führen.

Pilzförmige dendritische Dornen besitzen im Gegensatz zu filopodienartigen Synapsen eine lamellipodienartige Strukturierung des Aktin-Zytoskeletts. Lamellipodien zeichnen sich durch einen hohen Verzweigungsgrad der Aktinfilamente aus. Der Arp2/3-Komplex führt als Nukleationsfaktor zu einer Verzweigung von Aktinfilamenten. Zusätzlich zur fehlenden Kappenaktivität von Eps8 könnte eine Überexpression von Abi-1 zu einer verstärkten Aktivierung des Arp2/3-Komplexes führen. Abi-1 bildet mit Sos1, PI3K und Eps8 einen Komplex, der RacGEF-Aktivität besitzt. RacGTP aktiviert den WAVE-Komplex, welcher wiederum den Arp2/3-Komplex aktiviert. Abi-1 wird eine stabilisierende und aktivierende Wirkung auf den WAVE-Komplex zugeschrieben. Abi-1 könnte also die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch die

Bildung von Komplexen sowohl mit WAVE als auch mit Sos1-Eps8 verstärken.

Abi-1-Überexpression – reduzierte Dendritenzahl, erhöhte Synapsendichte und verstärktes Vorkommen pilzförmiger Synapsen

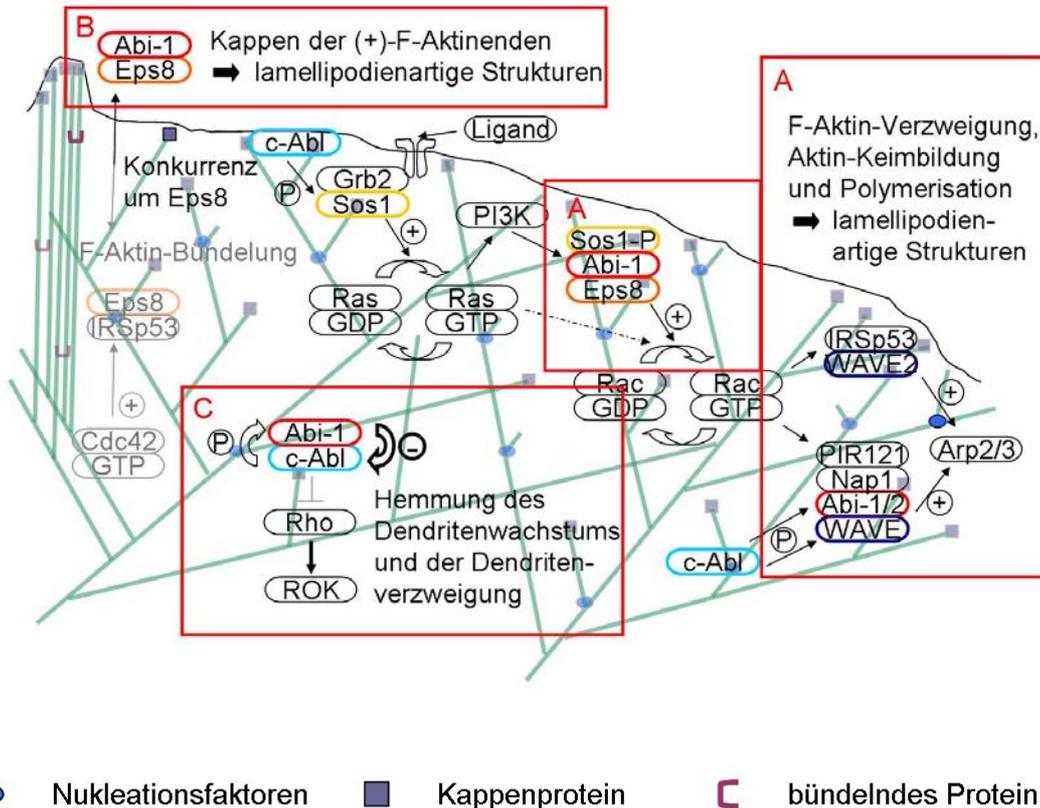


Abbildung 48: Modell der Abi-1-Signalwege unter Abi-1-Proteinüberexpression.

Abi-1 (rot): *Abl interactor 1*; Arp2/3: actin related protein 2/3; c-Abl (türkis): zelluläre Abelson Tyrosinkinase; Cdc42: *cell division cycle 42*; Eps8 (orange): *epidermal growth factor receptor substrate 8*; F-Aktin: filamentöses Aktin; GDP: Guanin-5'-diphosphat; Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*; GTP: Guanin-5'-triphosphat; IRSp53: Insulinrezeptorsubstratprotein von 53 kDa; Nap1: Nck assoziiertes Protein 1; PI3K: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat; PIR121: p53 induzierbare mRNA 121; Rac: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*; Ras: *Rous avian sarcoma*; Rho: *Ras homologous member*; ROK: Rho assoziierte Kinase; Sos1 (gelb): *son of sevenless 1*; WAVE (blau): *WASP family verprolin-homologous*.

Abi-1 überexprimierende Neurone wiesen eine verringerte Anzahl an Dendriten auf. Die Synapsendichte war erhöht und pilzförmige Synapsen traten häufiger auf. A: Eine vermehrte Bildung und Aktivierung sowohl des Sos1-Komplexes (Sos1, Eps8, PI3K, Abi-1) als auch des WAVE-Komplexes (PIR121, Nap1, Abi-1/2, WAVE) könnte zu einer verstärkten Aktivierung des Arp2/3-Komplexes führen. Der Arp2/3-Komplex bewirkt die Ausbildung von F-Aktin-Verzweigungen und somit die Lamellipodienbildung. Pilzförmige Synapsen besitzen eine lamellipodienartige Strukturierung des Aktin-Zytoskeletts. B: Lamellipodien entstehen unter Anwesenheit von F-Aktin-Kappenproteinen, da diese die Filamentlänge des Aktins einschränken. Eps8 besitzt F-Aktin-Kappenaktivität, welche durch die Bindung von Abi-1 aktiviert wird. Filopodien werden durch Aktin bündelnde Proteine stabilisiert. Durch eine häufigere Bindung von Abi-1 an Eps8 durch die erhöhten Abi-1-Proteinmengen könnte es seltener zu einer Interaktion von Eps8 und IRSp53 kommen. Eps8 und IRSp53 besitzen F-Aktin bündelnde Aktivität. Durch die seltener Aktivierung der bündelnden Aktivität könnte es zu einer Instabilisierung von Filopodien kommen, wodurch die Entstehung von Dendriten erschwert sein könnte. C: Die geringere Anzahl an Dendriten könnte zusätzlich durch einen

inhibierenden Einfluss von Abi-1 auf c-Abl entstehen. C-Abl hemmt die Rho-Aktivität, die zu einer Verringerung der Anzahl der Dendriten führt. Durch eine Inhibition der hemmenden Wirkung von c-Abl auf Rho durch Abi-1 könnte es zu einer verstärkten Rho-Aktivität kommen.

Eine Reduktion der Abi-1-Proteinexpression mittels RNAi führte zu einer Zunahme der Anzahl der Dendriten und Filopodien. Weiterhin war die Synapsendichte verringert. Filopodienartige dendritische Dornen traten vermehrt und pilzförmige dendritische Dornen seltener auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass filopodienartige Strukturen vermehrt gebildet und stabilisiert werden. Filopodien entstehen in der Abwesenheit von F-Aktin-Kappenproteinen und der Anwesenheit von F-Aktin bündelnden Proteinen. Die Hemmung der Abi-1-Proteinexpression könnte dazu führen, dass die F-Aktin-Kappenaktivität von Eps8, die durch die Bindung von Abi-1 aktiviert wird, inaktiv bleiben könnte. Stattdessen würde Eps8 vermehrt mit IRSp53 interagieren. Der Eps8-IRSp53-Komplex besitzt F-Aktinbündelnde Aktivität. Die Häufigkeit der Interaktion mit IRSp53 könnte dadurch erhöht sein, dass Eps8 nun weder einzeln mit Abi-1 noch mit Abi-1, Sos1 und PI3K zusammen (Sos1-Komplex) interagieren könnte, da der Sos1-Komplex durch Abi-1 stabilisiert wird. Der Sos1-Komplex weist RacGEF-Aktivität auf. Der Verlust des Sos1-Komplexes könnte allerdings durch andere RacGEFs ausgeglichen werden. Auch der WAVE-Komplex könnte mit Abi-2 als Bestandteil weiterhin existieren, so dass eine Verminderung der Arp2/3-Aktivierung verhindert werden könnte. Wie bereits vorher erwähnt, könnte Abi-1 auch die hemmende Wirkung von c-Abl auf die Rho-Aktivität inhibieren. Durch ein Fehlen von Abi-1 könnte c-Abl verstärkt die Rho-Aktivität hemmen, wodurch es so zu einer vermehrten Dendritenbildung kommt.

Abi-1-RNAi – verstärkte Bildung von Filopodien, Dendriten und filopodienartiger Synapsen, reduzierte Synapsendichte

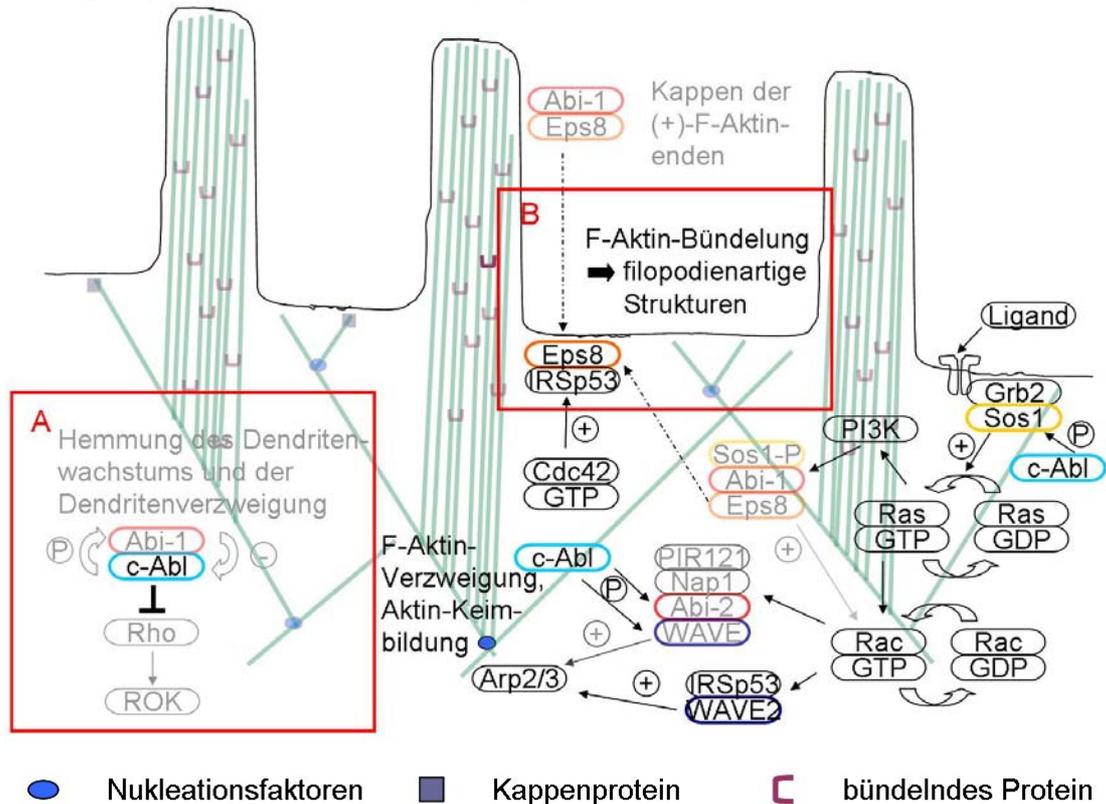


Abbildung 49: Modell der Abi-1-Signalwege unter Abi-1-RNAi Behandlung.

Abi-1 (rot): *Abi interactor 1*; Arp2/3: actin related protein 2/3; c-Abl (türkis): zelluläre Abelson Tyrosinkinase; Cdc42: *cell division cycle 42*; Eps8 (orange): *epidermal growth factor receptor substrate 8*; F-Aktin: filamentöses Aktin; GDP: Guanosin-5'-diphosphat; Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*; GTP: Guanin-5'-triphosphat; IRSp53: Insulinrezeptorsubstratprotein von 53 kDa; Nap1: Nck assoziiertes Protein 1; PI3K: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat; PIR121: p53 induzierbare mRNA 121; Rac: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*; Ras: *Roux avian sarcoma*; Rho: *Ras homologous member*, ROK: Rho assoziierte Kinase; Sos1 (gelb): *son of sevenless 1*; WAVE (blau): *WASP family verprolin-homologous*.

Eine Reduzierung der Abi-1-Proteinexpression bewirkte eine vermehrte Dendriten- und Filopodienbildung sowie eine Verringerung der Synapsendichte. Es traten verstärkt filopodienartige Synapsen auf. A: Eine Erhöhung der Anzahl der Dendriten könnte durch eine fehlende Inhibierung von c-Abl durch Abi-1 verursacht werden. Somit könnte c-Abl verstärkt die Aktivität von Rho hemmen, wodurch der negative Einfluss von Rho auf die Anzahl von Dendriten abgeschwächt werden könnte. B: Da Abi-1 den Sos1-Komplex (Sos1, Abi-1, PI3K, Eps8) stabilisiert, könnte die Bildung dieses Komplexes durch den Abi-1-Verlust verhindert werden. Weiterhin könnte es durch die fehlende Bindung von Abi-1 an Eps8 dazu kommen, dass die F-Aktin-Kappenaktivität von Eps8 nicht aktiviert werden würde, was die Ausbildung von Filopodien begünstigt. Da die eben genannten Interaktionen von Eps8 nicht zu Stande kommen würden, könnte es zu einer verstärkten Bildung des Eps8-IRSp53-Komplexes kommen. Der Eps8-IRSp53-Komplex besitzt F-Aktin bündelnde Aktivität und stabilisiert Filopodien. Aus den stabilisierten Filopodien könnten Dendriten entstehen. Ebenso könnte durch die Stabilisierung filopodienartiger Strukturen die morphologische Reifung der Synapsen unterdrückt werden.

Wie in Abbildung 47 gezeigt, beeinflusst Abi-1 die synaptische Lokalisation von Eps8 und c-Abl. Die auftretenden Phänotypen könnten im Zusammenhang mit der Veränderung der Interaktionen von Abi-1 mit Eps8 bzw. c-abl stehen.

4.7 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass endogenes Abi-1 während der Entwicklung hippocampaler Neurone in Kultur in aktinreichen Strukturen wie Wachstumskegeln und Filopodien und später auch in Synapsen lokalisiert. Abi-1 ist danach ein Bestandteil der PSD. Während Abi-1 keinen Einfluss auf die Polarität der Neurone besitzt, beeinflusst Abi-1 die Ausbildung von Dendriten und Aktinfilamentanreicherungen negativ (Abbildung 50). Die Synapsendichte und die Ausbildung pilzförmiger, reifer Synapsen werden von Abi-1 gefördert. Abi-1 ist nicht für die synaptische Lokalisation seiner Interaktionspartner c-Abl, Eps8, Sos1 und WAVE verantwortlich. Allerdings sinkt die synaptische Lokalisation von Eps8 und c-Abl in Abi-1 überexprimierenden Neuronen. Die Veränderungen der neuronalen Morphologie durch Abi-1 beruhen auf einem regulatorischen Einfluss auf Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts. Der Einfluss auf die Ausbildung der Dendriten könnte mit einer inhibierenden Wirkung von Abi-1 auf c-Abl erklärt werden und somit durch eine verstärkte Rho-Aktivität bewirkt werden, während der Einfluss auf die Synapsen z. B. durch die Interaktion mit Eps8 entstehen könnte.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass Abi-1 für die korrekte morphologische Ausreifung von Neuronen von großer Bedeutung ist. Darüber hinaus kann somit geschlossen werden, dass auch die Funktionalität der Neurone durch Abi-1 beeinflusst wird.

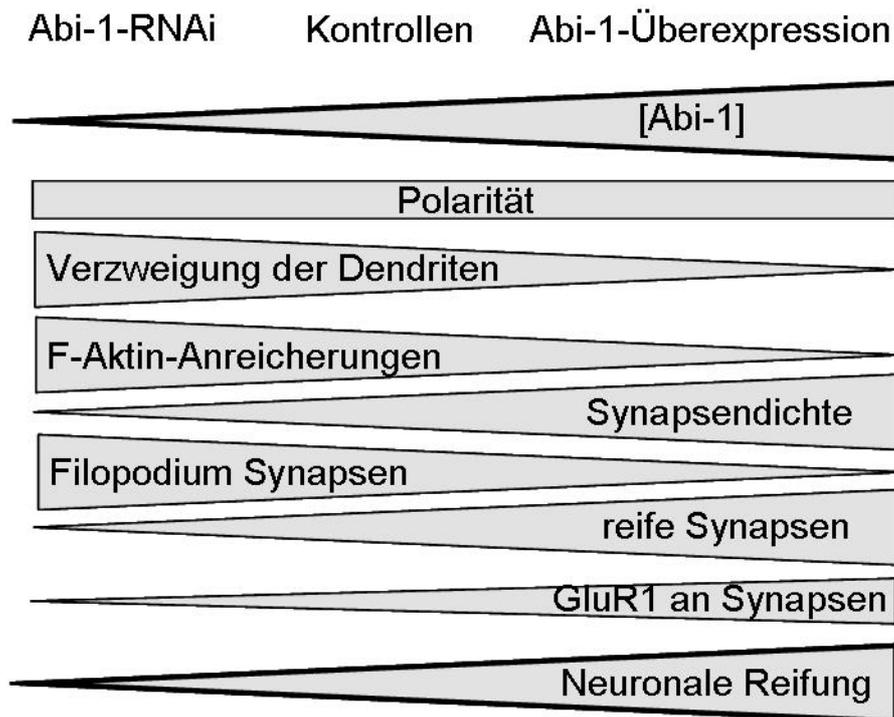


Abbildung 50: Schematische Darstellung des Einflusses von Abi-1 auf die Entwicklung hippocampaler Neurone in Kultur.

Abi-1 besaß keinen Einfluss auf die Polarität der Neurone. Die Anzahl der Dendriten wurde von Abi-1 in 6 DIV und 10 DIV hippocampalen Neuronen wie auch Aktinfilamentanreicherungen verringert. Abi-1 beeinflusste die Synapsendichte positiv und verstärkte die morphologische Ausreifung der Synapsen. Die Lokalisation der AMPAR-Untereinheit GluR1 wurde durch Abi-1 begünstigt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahrzehnten rückten auch aufgrund ihrer immensen Bedeutung die Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung in den Fokus der Forschung. Für diese Vorgänge ist die Integrität des neuronalen Netzwerkes des Gehirns von entscheidender Bedeutung. Fehlfunktionen werden mit Einschränkungen der mentalen Fähigkeiten in Verbindung gebracht (mentale Retardierungen). Für die Funktionalität des neuronalen Netzwerkes sind Prozesse wie die Ausbildung der Polarität, des Dendritenbaums und der Synapsen sowie der Erhalt dieser Strukturen essentiell. Bei all diesen Prozessen ist das Aktin-Zytoskelett der Neurone involviert. Proteine, die an der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind, besitzen somit einen starken Einfluss auf die Entwicklung von Neuronen.

Abl interactor 1 (Abi-1) wurde als ein neuer Interaktionspartner des postsynaptischen Gerüstmoleküls *proline rich synapse associated protein 2/SH3 domain and ankyrin repeat containing protein 3* (ProSAP2/Shank3) identifiziert. Da Abi-1 in anderen Zellmodellen bereits eine Rolle in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts zugeschrieben werden konnte, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Abi-1 einen Einfluss auf die Entwicklung hippocampaler Neurone besitzt. Dazu wurden Ergebnisse einer Überexpression des Abi-1-Proteins mit Ergebnissen einer Abi-1-Proteinreduzierung mittels RNAi in hippocampalen Neuronen in Kultur miteinander verglichen. Zusätzlich wurde untersucht, ob Abi-1 einen Einfluss auf die Lokalisation seiner Interaktionspartner *WASP family verprolin-homologous* Proteine (WAVE), *son of sevenless1* (Sos1), *epidermal growth factor substrate 8* (Eps8) und zelluläre Abelson Tyrosinkinase (c-Abl) in Synapsen besitzt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Abi-1 in hippocampalen Neuronen in Kultur in aktinreichen Strukturen wie Wachstumskegeln, Filopodien und in älteren Neuronen zusätzlich in Synapsen lokalisiert. Während Abi-1 keinen Einfluss auf den Erhalt der Polarität in jungen Neuronen ausübt, zeigt Abi-1-Überexpression einen hemmenden Einfluss auf

die Ausbildung von Dendriten und Aktinfilamentanreicherungen. Abi-1-RNAi führt hingegen zu einer Erhöhung der Anzahl der Dendriten und starken lokalen Aktinfilamentanreicherungen. Zusätzlich zum dendritischen Phänotyp bewirkt die Überexpression von Abi-1 in älteren Neuronen sowohl eine erhöhte Synapsendichte als auch eine verstärkte morphologische Reifung der dendritischen Dornen. Unter Abi-1-RNAi reduziert sich die Synapsendichte, filopodienartige dendritische Dornen treten anteilig vermehrt auf. Es ist bekannt, dass in jüngeren Neuronen verstärkt Filopodien und Dendriten ausgebildet werden. Im Laufe der Reifung geht die Aktivität der Filopodienbildung zurück und die Bildung von Synapsen nimmt zu. Filopodienartige dendritische Dornen werden als morphologisch unreif angesehen, während pilzförmige dendritische Dornen eine reife Morphologie aufweisen. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass Abi-1 einen starken Einfluss auf die Entwicklung hippocampaler Neurone besitzt, und die Überexpression von Abi-1 zu einer früheren Reifung der Neurone/Synapsen führt. Der genaue Mechanismus dieses Einflusses konnte noch nicht geklärt werden. Allerdings könnte die Interaktion zwischen Abi-1 und Eps8 bzw. c-Abl eine wichtige Rolle spielen. Abi-1-RNAi führt zu einer negativen Beeinflussung der Eps8 Lokalisation in Synapsen, während die Lokalisation von c-Abl und Eps8 in Synapsen durch eine Abi-1-Überexpression verstärkt wird. Die Interaktion von Abi-1 und Eps8 aktiviert die Fähigkeit von Eps8, die schnell wachsenden Enden von Aktinfilamenten zu kappen, was zu einer vermehrten Bildung von Aktinfilamentnetzwerken führt. c-Abl fördert über die Inhibition von Rho die Ausbildung von Dendriten. Durch die Interaktion mit Abi-1 könnte die Inhibition von Rho durch c-Abl gehemmt werden und somit die Ausbildung von Dendriten unterdrückt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine Abi-1-Überexpression die Reifung der Neurone fördert, während eine Hemmung der Abi-1-Proteinexpression zu einer fehlenden Reife führt. Somit ist eine ausbalancierte Abi-1-Proteinexpression wichtig für den Erhalt einer physiologischen Entwicklung hippocampaler Neurone.

6 LITERATUR

- AHUJA R, PINYOL R, REICHENBACH N, CUSTER L, KLINGENSMITH J, KESSELS MM, QUALMANN B: Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*. 131: 337-50 (2007)
- ANDERSEN SS und BI GQ: Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays*. 22: 172-9 (2000)
- ARIMURA N und KAIBUCHI K: Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 8: 194-205 (2007)
- BENARROCH EE: Rho GTPases: role in dendrite and axonal growth, mental retardation, and axonal regeneration. *Neurology*. 68: 1315-8 (2007)
- BERNARDS A: GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta*. 1603: 47-82 (2003)
- BERNARDS A und SETTLEMAN J: GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol*. 14: 377-85 (2004)
- BIESOVA Z, PICCOLI C, WONG WT: Isolation and characterization of e3B1, an eps8 binding protein that regulates cell growth. *Oncogene*. 14: 233-41 (1997)
- BISHOP AL und HALL A: Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*. 348: 241-55 (2000)
- BITO H, FURUYASHIKI T, ISHIHARA H, SHIBASAKI Y, OHASHI K, MIZUNO K, MAEKAWA M, ISHIZAKI T, NARUMIYA S: A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron*. 26: 431-41 (2000)
- BOCKERS TM, SEGGER-JUNIUS M, IGLAUER P, BOCKMANN J, GUNDELFINGER ED, KREUTZ MR, RICHTER D, KINDLER S,

-
- KREIENKAMP HJ: Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Mol Cell Neurosci.* 26: 182-90 (2004)
- BOCKMANN J, KREUTZ MR, GUNDELFINGER ED, BOCKERS TM: ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53. *J Neurochem.* 83: 1013-7 (2002)
- BOECKERS TM: The postsynaptic density. *Cell Tissue Res.* 326: 409-22 (2006)
- BOMPARD G und CARON E: Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J Cell Biol.* 166: 957-62 (2004)
- BOURNE J und HARRIS KM: Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol.* 17: 381-6 (2007)
- BRADKE F und DOTTI CG: The role of local actin instability in axon formation. *Science.* 283: 1931-4 (1999)
- BRADKE F und DOTTI CG: Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 10: 574-81 (2000)
a
- BRADKE F und DOTTI CG: Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Curr Biol.* 10: 1467-70 (2000) b
- BREDT DS und NICOLL RA: AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron.* 40: 361-79 (2003)
- BRESLER T, RAMATI Y, ZAMORANO PL, ZHAI R, GARNER CC, ZIV NE: The dynamics of SAP90/PSD-95 recruitment to new synaptic junctions. *Mol Cell Neurosci.* 18: 149-67 (2001)
- BRESLER T, SHAPIRA M, BOECKERS T, DRESBACH T, FUTTER M, GARNER CC, ROSENBLUM K, GUNDELFINGER ED, ZIV NE:

-
- Postsynaptic density assembly is fundamentally different from presynaptic active zone assembly. *J Neurosci.* 24: 1507-20 (2004)
- BRUCKENSTEIN DA, LEIN PJ, HIGGINS D, FREMEAU RT, JR.: Distinct spatial localization of specific mRNAs in cultured sympathetic neurons. *Neuron.* 5: 809-19 (1990)
- BUCHDUNGER E, ZIMMERMANN J, METT H, MEYER T, MULLER M, DRUKER BJ, LYDON NB: Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 56: 100-4 (1996)
- CALABRESE B, WILSON MS, HALPAIN S: Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda).* 21: 38-47 (2006)
- CARLIN RK, GRAB DJ, COHEN RS, SIEKEVITZ P: Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol.* 86: 831-45 (1980)
- CHAPDELAINE P, VIGNOLA K, FORTIER MA: Protein estimation directly from SDS-PAGE loading buffer for standardization of samples from cell lysates or tissue homogenates before Western blot analysis. *Biotechniques.* 31: 478, 480, 482 (2001)
- CHARYCH EI, AKUM BF, GOLDBERG JS, JORNSTEN RJ, RONGO C, ZHENG JQ, FIRESTEIN BL: Activity-independent regulation of dendrite patterning by postsynaptic density protein PSD-95. *J Neurosci.* 26: 10164-76 (2006)
- CHEN YA und SCHELLER RH: SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 98-106 (2001)
- CHOI J, KO J, RACZ B, BURETTE A, LEE JR, KIM S, NA M, LEE HW, KIM K, WEINBERG RJ, KIM E: Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *J Neurosci.* 25: 869-79 (2005)

-
- CHUNG HJ, JAN YN, JAN LY: Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 8870-5 (2006)
- CLINE HT: Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 11: 118-26 (2001)
- COTMAN CW, BANKER G, CHURCHILL L, TAYLOR D: Isolation of postsynaptic densities from rat brain. *J Cell Biol.* 63: 441-55 (1974)
- COURTNEY KD, GROVE M, VANDONGEN H, VANDONGEN A, LAMANTIA AS, PENDERGAST AM: Localization and phosphorylation of Abl-interactor proteins, Abi-1 and Abi-2, in the developing nervous system. *Mol Cell Neurosci.* 16: 244-57 (2000)
- CRAIG AM und BANKER G: Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci.* 17: 267-310 (1994)
- DAHL JP, WANG-DUNLOP J, GONZALES C, GOAD ME, MARK RJ, KWAK SP: Characterization of the WAVE1 knock-out mouse: implications for CNS development. *J Neurosci.* 23: 3343-52 (2003)
- DAI Z und PENDERGAST AM: Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev.* 9: 2569-82 (1995)
- DAILEY ME und SMITH SJ: The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci.* 16: 2983-94 (1996)
- DISANZA A, CARLIER MF, STRADAL TE, DIDRY D, FRITTOLI E, CONFALONIERI S, CROCE A, WEHLAND J, DI FIORE PP, SCITA G: Eps8 controls actin-based motility by capping the barbed ends of actin filaments. *Nat Cell Biol.* 6: 1180-8 (2004)
- DISANZA A, MANTOANI S, HERTZOG M, GERBOTH S, FRITTOLI E, STEFFEN A, BERHOERSTER K, KREIENKAMP HJ, MILANESI F, DI

-
- FIGLIORE PP, CILIBERTO A, STRADAL TE, SCITA G: Regulation of cell shape by Cdc42 is mediated by the synergic actin-bundling activity of the Eps8-IRSp53 complex. *Nat Cell Biol.* 8: 1337-47 (2006)
- DOTTI CG, SULLIVAN CA, BANKER GA: The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 8: 1454-68 (1988)
- DOTTI CG und POO MM: Neuronal polarization: building fences for molecular segregation. *Nat Cell Biol.* 5: 591-4 (2003)
- DRESBACH T, QUALMANN B, KESSELS MM, GARNER CC, GUNDELFINGER ED: The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol Life Sci.* 58: 94-116 (2001)
- DUNAEVSKY A, TASHIRO A, MAJEWSKA A, MASON C, YUSTE R: Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 13438-43 (1999)
- DURAND GM, KOVALCHUK Y, KONNERTH A: Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature.* 381: 71-5 (1996)
- ECHARRI A, LAI MJ, ROBINSON MR, PENDERGAST AM: Abl interactor 1 (Abi-1) wave-binding and SNARE domains regulate its nucleocytoplasmic shuttling, lamellipodium localization, and wave-1 levels. *Mol Cell Biol.* 24: 4979-93 (2004)
- EDEN S, ROHATGI R, PODTELEJNIKOV AV, MANN M, KIRSCHNER MW: Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature.* 418: 790-3 (2002)
- ETHELL IM und PASQUALE EB: Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol.* 75: 161-205 (2005)
- FAIX J und GROSSE R: Staying in shape with formins. *Dev Cell.* 10: 693-706 (2006)

-
- FAN PD und GOFF SP: Abl interactor 1 binds to sos and inhibits epidermal growth factor- and v-Abl-induced activation of extracellular signal-regulated kinases. *Mol Cell Biol.* 20: 7591-601 (2000)
- FAN PD, CONG F, GOFF SP: Homo- and hetero-oligomerization of the c-Abl kinase and Abelson-interactor-1. *Cancer Res.* 63: 873-7 (2003)
- FIALA JC, FEINBERG M, POPOV V, HARRIS KM: Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci.* 18: 8900-11 (1998)
- FIFKOVA E und DELAY RJ: Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol.* 95: 345-50 (1982)
- FISCHER M, KAECH S, KNUTTI D, MATUS A: Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron.* 20: 847-54 (1998)
- FITZJOHN SM und COLLINGRIDGE GL: Calcium stores and synaptic plasticity. *Cell Calcium.* 32: 405-11 (2002)
- FORSCHER P und SMITH SJ: Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J Cell Biol.* 107: 1505-16 (1988)
- FUNATO Y, TERABAYASHI T, SUENAGA N, SEIKI M, TAKENAWA T, MIKI H: IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. *Cancer Res.* 64: 5237-44 (2004)
- GARNER CC, TUCKER RP, MATUS A: Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature.* 336: 674-7 (1988)
- GAUTREAU A, HO HY, LI J, STEEN H, GYGI SP, KIRSCHNER MW: Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 4379-83 (2004)

-
- GERROW K, ROMORINI S, NABI SM, COLICOS MA, SALA C, EL HUSSEINI A: A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron*. 49: 547-62 (2006)
- GOSLIN K und BANKER G: Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol*. 108: 1507-16 (1989)
- GOVEK EE, NEWAY SE, VAN AELST L: The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev*. 19: 1-49 (2005)
- GROVE M, DEMYANENKO G, ECHARRI A, ZIPFEL PA, QUIROZ ME, RODRIGUIZ RM, PLAYFORD M, MARTENSEN SA, ROBINSON MR, WETSEL WC, MANESS PF, PENDERGAST AM: ABI2-deficient mice exhibit defective cell migration, aberrant dendritic spine morphogenesis, and deficits in learning and memory. *Mol Cell Biol*. 24: 10905-22 (2004)
- GUNDELFINGER ED und TOM DS: Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain. *Naturwissenschaften*. 87: 513-23 (2000)
- GUPTON SL und GERTLER FB: Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci STKE*. 2007: re5 (2007)
- HALL A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 279: 509-14 (1998)
- HALPAIN S: Actin and the agile spine: how and why do dendritic spines dance? *Trends Neurosci*. 23: 141-6 (2000)
- HARRIS KM, JENSEN FE, TSAO B: Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci*. 12: 2685-705 (1992)

-
- HARRIS KM und KATER SB: Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci.* 17: 341-71 (1994)
- HAYASHI Y, SHI SH, ESTEBAN JA, PICCINI A, PONCER JC, MALINOW R: Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science.* 287: 2262-7 (2000)
- HERING H und SHENG M: Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci.* 2: 880-8 (2001)
- HIGGS HN: There goes the neighbourhood: Eps8 joins the barbed-end crowd. *Nat Cell Biol.* 6: 1147-9 (2004)
- HIROKAWA N: The arrangement of actin filaments in the postsynaptic cytoplasm of the cerebellar cortex revealed by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *Neurosci Res.* 6: 269-75 (1989)
- HIROSE M, ISHIZAKI T, WATANABE N, UEHATA M, KRANENBURG O, MOOLENAAR WH, MATSUMURA F, MAEKAWA M, BITO H, NARUMIYA S: Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J Cell Biol.* 141: 1625-36 (1998)
- HOFFMAN GR, NASSAR N, CERIONE RA: Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell.* 100: 345-56 (2000)
- HOLLMANN M und HEINEMANN S: Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17: 31-108 (1994)
- HOOGENRAAD CC, MILSTEIN AD, ETHELL IM, HENKEMEYER M, SHENG M: GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nat Neurosci.* 8: 906-15 (2005)

-
- HUTTENLOCHER PR: Dendritic development and mental defect. *Neurology*. 20: 381 (1970)
- HUTTENLOCHER PR: Dendritic development in neocortex of children with mental defect and infantile spasms. *Neurology*. 24: 203-10 (1974)
- IBARRA N, POLLITT A, INSALL RH: Regulation of actin assembly by SCAR/WAVE proteins. *Biochem Soc Trans*. 33: 1243-6 (2005)
- ICHIGOTANI Y, FUJII K, HAMAGUCHI M, MATSUDA S: In search of a function for the E3B1/Abi2/Arhbp1/NESH family (Review). *Int J Mol Med*. 9: 591-5 (2002)
- IJIMA M, HUANG YE, DEVREOTES P: Temporal and spatial regulation of chemotaxis. *Dev Cell*. 3: 469-78 (2002)
- IKEGUCHI A, YANG HY, GAO G, GOFF SP: Inhibition of v-Abl transformation in 3T3 cells overexpressing different forms of the Abelson interactor protein Abi-1. *Oncogene*. 20: 4926-34 (2001)
- INNOCENTI M, TENCA P, FRITTOLI E, FARETTA M, TOCCHETTI A, DI FIORE PP, SCITA G: Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac. *J Cell Biol*. 156: 125-36 (2002)
- INNOCENTI M, FRITTOLI E, PONZANELLI I, FALCK JR, BRACHMANN SM, DI FIORE PP, SCITA G: Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *J Cell Biol*. 160: 17-23 (2003)
- INNOCENTI M, ZUCCONI A, DISANZA A, FRITTOLI E, ARECES LB, STEFFEN A, STRADAL TE, DI FIORE PP, CARLIER MF, SCITA G: Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol*. 6: 319-27 (2004)
- INNOCENTI M, GERBOTH S, ROTTNER K, LAI FP, HERTZOG M, STRADAL TE, FRITTOLI E, DIDRY D, POLO S, DISANZA A, BENESCH S, FIORE PP, CARLIER MF, SCITA G: Abi1 regulates the

-
- activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nat Cell Biol.* 7: 969-76 (2005)
- JONES SB, LU HY, LU Q: Abl tyrosine kinase promotes dendrogenesis by inducing actin cytoskeletal rearrangements in cooperation with rho family small GTPases in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 24: 8510-21 (2004)
- JUANG JL und HOFFMANN FM: Drosophila abelson interacting protein (dAbi) is a positive regulator of abelson tyrosine kinase activity. *Oncogene.* 18: 5138-47 (1999)
- KASAI H, MATSUZAKI M, NOGUCHI J, YASUMATSU N, NAKAHARA H: Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26: 360-8 (2003)
- KAUFMANN WE und MOSER HW: Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex.* 10: 981-91 (2000)
- KAVERINA I, KRYLYSHKINA O, SMALL JV: Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol.* 34: 746-61 (2002)
- KENNEDY MJ und EHLERS MD: Organelles and Trafficking Machinery for Postsynaptic Plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 29: 325-62 (2006)
- KHEIR WA, GEVREY JC, YAMAGUCHI H, ISAAC B, COX D: A WAVE2-Abi1 complex mediates CSF-1-induced F-actin-rich membrane protrusions and migration in macrophages. *J Cell Sci.* 118: 5369-79 (2005)
- KIM Y, SUNG JY, CEGLIA I, LEE KW, AHN JH, HALFORD JM, KIM AM, KWAK SP, PARK JB, HO RS, SCHENCK A, BARDONI B, SCOTT JD, NAIRN AC, GREENGARD P: Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature.* 442: 814-7 (2006)

-
- KOLESKE AJ, GIFFORD AM, SCOTT ML, NEE M, BRONSON RT, MICZEK KA, BALTIMORE D: Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation. *Neuron*. 21: 1259-72 (1998)
- KORKOTIAN E und SEGAL M: Structure-function relations in dendritic spines: is size important? *Hippocampus*. 10: 587-95 (2000)
- KUNDA P, CRAIG G, DOMINGUEZ V, BAUM B: Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol*. 13: 1867-75 (2003)
- LANDIS DM und REESE TS: Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *J Cell Biol*. 97: 1169-78 (1983)
- LEE SH und SHENG M: Development of neuron-neuron synapses. *Curr Opin Neurobiol*. 10: 125-31 (2000)
- LENG Y, ZHANG J, BADOUR K, ARPAIA E, FREEMAN S, CHEUNG P, SIU M, SIMINOVITCH K: Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 1098-103 (2005)
- LI Y, CLOUGH N, SUN X, YU W, ABBOTT BL, HOGAN CJ, DAI Z: Bcr-Abl induces abnormal cytoskeleton remodeling, beta1 integrin clustering and increased cell adhesion to fibronectin through the Abl interactor 1 pathway. *J Cell Sci*. 120: 1436-46 (2007)
- LOGAN CY und NUSSE R: The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20: 781-810 (2004)
- LUNDQUIST EA: Rac proteins and the control of axon development. *Curr Opin Neurobiol*. 13: 384-90 (2003)
- MAA MC, LEE JC, CHEN YJ, CHEN YJ, LEE YC, WANG ST, HUANG CC, CHOW NH, LEU TH: Eps8 facilitates cellular growth and motility of

-
- colon cancer cells by increasing the expression and activity of focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 282: 19399-409 (2007)
- MACHESKY LM und GOULD KL: The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol.* 11: 117-21 (1999)
- MALENKA RC, LANCASTER B, ZUCKER RS: Temporal limits on the rise in postsynaptic calcium required for the induction of long-term potentiation. *Neuron.* 9: 121-8 (1992)
- MALENKA RC und NICOLL RA: Long-term potentiation--a decade of progress? *Science.* 285: 1870-4 (1999)
- MALENKA RC und BEAR MF: LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 44: 5-21 (2004)
- MATSUZAKI M, ELLIS-DAVIES GC, NEMOTO T, MIYASHITA Y, IINO M, KASAI H: Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci.* 4: 1086-92 (2001)
- MATUS A, BRINKHAUS H, WAGNER U: Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses. *Hippocampus.* 10: 555-60 (2000)
- MATUS A: Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science.* 290: 754-8 (2000)
- MATUS A: Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr Opin Neurobiol.* 15: 67-72 (2005)
- MAYER ML, WESTBROOK GL, GUTHRIE PB: Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature.* 309: 261-3 (1984)
- MIKI H, YAMAGUCHI H, SUETSUGU S, TAKENAWA T: IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature.* 408: 732-5 (2000)

-
- MIKI H und TAKENAWA T: WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac. *Biochem Biophys Res Commun.* 293: 93-9 (2002)
- MILLER FD und KAPLAN DR: Signaling mechanisms underlying dendrite formation. *Curr Opin Neurobiol.* 13: 391-8 (2003)
- MIYAZAKI K, MATSUDA S, ICHIGOTANI Y, TAKENOUCI Y, HAYASHI K, FUKUDA Y, NIMURA Y, HAMAGUCHI M: Isolation and characterization of a novel human gene (NESH) which encodes a putative signaling molecule similar to e3B1 protein. *Biochim Biophys Acta.* 1493: 237-41 (2000)
- MORESCO EM, DONALDSON S, WILLIAMSON A, KOLESKE AJ: Integrin-mediated dendrite branch maintenance requires Abelson (Abl) family kinases. *J Neurosci.* 25: 6105-18 (2005)
- NAKAGAWA H, MIKI H, NOZUMI M, TAKENAWA T, MIYAMOTO S, WEHLAND J, SMALL JV: IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J Cell Sci.* 116: 2577-83 (2003)
- NAKAYAMA AY, HARMS MB, LUO L: Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 20: 5329-38 (2000)
- NEWHEY SE, VELAMOOR V, GOVEK EE, VAN AELST L: Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J Neurobiol.* 64: 58-74 (2005)
- NIKOLIC M: The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol.* 34: 731-45 (2002)
- NIMCHINSKY EA, SABATINI BL, SVOBODA K: Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol.* 64: 313-53 (2002)

-
- NIMNUAL A und BAR-SAGI D: The two hats of SOS. *Sci STKE*. 2002: E36 (2002)
- NIMNUAL AS, YATSULA BA, BAR-SAGI D: Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science*. 279: 560-3 (1998)
- NISHIMURA T, YAMAGUCHI T, KATO K, YOSHIZAWA M, NABESHIMA Y, OHNO S, HOSHINO M, KAIBUCHI K: PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol*. 7: 270-7 (2005)
- NOBES CD und HALL A: Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans*. 23: 456-9 (1995) a
- NOBES CD und HALL A: Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 81: 53-62 (1995) b
- NOGUCHI J, MATSUZAKI M, ELLIS-DAVIES GC, KASAI H: Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. *Neuron*. 46: 609-22 (2005)
- NOWAK L, BREGESTOVSKI P, ASCHER P, HERBET A, PROCHIANTZ A: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*. 307: 462-5 (1984)
- NUSSER Z, LUJAN R, LAUBE G, ROBERTS JD, MOLNAR E, SOMOGYI P: Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron*. 21: 545-59 (1998)
- OFFENHAUSER N, BORGONOVO A, DISANZA A, ROMANO P, PONZANELLI I, IANNOLO G, DI FIORE PP, SCITA G: The eps8 family of proteins links growth factor stimulation to actin reorganization generating functional redundancy in the Ras/Rac pathway. *Mol Biol Cell*. 15: 91-8 (2004)

-
- OLOFSSON B: Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal.* 11: 545-54 (1999)
- PANTALONI D, LE CLAINCHE C, CARLIER MF: Mechanism of actin-based motility. *Science.* 292: 1502-6 (2001)
- PARDO CA und EBERHART CG: The neurobiology of autism. *Brain Pathol.* 17: 434-47 (2007)
- PAWSON T und SCOTT JD: Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci.* 30: 286-90 (2005)
- PICKARD L, NOEL J, HENLEY JM, COLLINGRIDGE GL, MOLNAR E: Developmental changes in synaptic AMPA and NMDA receptor distribution and AMPA receptor subunit composition in living hippocampal neurons. *J Neurosci.* 20: 7922-31 (2000)
- PILPEL Y und SEGAL M: Rapid WAVE dynamics in dendritic spines of cultured hippocampal neurons is mediated by actin polymerization. *J Neurochem.* 95: 1401-10 (2005)
- PROEPPER C, JOHANNSEN S, LIEBAU S, DAHL J, VAIDA B, BOCKMANN J, KREUTZ MR, GUNDELFINGER ED, BOECKERS TM: Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation. *EMBO J.* 26: 1397-409 (2007)
- PURPURA DP: Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science.* 186: 1126-8 (1974)
- QUITSCH A, BERHORSTER K, LIEW CW, RICHTER D, KREIENKAMP HJ: Postsynaptic shank antagonizes dendrite branching induced by the leucine-rich repeat protein Densin-180. *J Neurosci.* 25: 479-87 (2005)
- RABINER CA, MAINS RE, EIPPER BA: Kalirin: a dual Rho guanine nucleotide exchange factor that is so much more than the sum of its many parts. *Neuroscientist.* 11: 148-60 (2005)

-
- RACCA C, STEPHENSON FA, STREIT P, ROBERTS JD, SOMOGYI P:
NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the
hippocampal CA1 area. *J Neurosci.* 20: 2512-22 (2000)
- RAMAKERS GJ: Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of
cognition. *Trends Neurosci.* 25: 191-9 (2002)
- RAO A, KIM E, SHENG M, CRAIG AM: Heterogeneity in the molecular
composition of excitatory postsynaptic sites during development of
hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 18: 1217-29 (1998)
- RAO A und CRAIG AM: Signaling between the actin cytoskeleton and the
postsynaptic density of dendritic spines. *Hippocampus.* 10: 527-41
(2000)
- RIDLEY AJ und HALL A: The small GTP-binding protein rho regulates the
assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to
growth factors. *Cell.* 70: 389-99 (1992)
- ROBBE K, OTTO-BRUC A, CHARDIN P, ANTONNY B: Dissociation of GDP
dissociation inhibitor and membrane translocation are required for
efficient activation of Rac by the Dbl homology-pleckstrin homology
region of Tiam. *J Biol Chem.* 278: 4756-62 (2003)
- SAITO Y, MURAKAMI F, SONG WJ, OKAWA K, SHIMONO K, KATSUMARU
H: Developing corticorubral axons of the cat form synapses on
filopodial dendritic protrusions. *Neurosci Lett.* 147: 81-4 (1992)
- SALA C: Molecular regulation of dendritic spine shape and function.
Neurosignals. 11: 213-23 (2002)
- SANDER EE, TEN KLOOSTER JP, VAN DELFT S, VAN DER KAMMEN RA,
COLLARD JG: Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance
between both GTPases determines cellular morphology and migratory
behavior. *J Cell Biol.* 147: 1009-22 (1999)

-
- SANTOS DS, SCHUBERT V, DOTTI CG: RhoA, Rac1, and cdc42 intracellular distribution shift during hippocampal neuron development. *Mol Cell Neurosci.* 27: 1-7 (2004)
- SCANNEVIN RH und HUGANIR RL: Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci.* 1: 133-41 (2000)
- SCHMIDT A und HALL A: Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* 16: 1587-609 (2002)
- SCHWAMBORN JC und PUSCHEL AW: The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci.* 7: 923-9 (2004)
- SCITA G, NORDSTROM J, CARBONE R, TENCA P, GIARDINA G, GUTKIND S, BJARNEGARD M, BETSHOLTZ C, DI FIORE PP: EPS8 and E3B1 transduce signals from Ras to Rac. *Nature.* 401: 290-3 (1999)
- SCITA G, TENCA P, FRITTOLI E, TOCCHETTI A, INNOCENTI M, GIARDINA G, DI FIORE PP: Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J.* 19: 2393-8 (2000)
- SCITA G, TENCA P, ARECES LB, TOCCHETTI A, FRITTOLI E, GIARDINA G, PONZANELLI I, SINI P, INNOCENTI M, DI FIORE PP: An effector region in Eps8 is responsible for the activation of the Rac-specific GEF activity of Sos-1 and for the proper localization of the Rac-based actin-polymerizing machine. *J Cell Biol.* 154: 1031-44 (2001)
- SCOTT EK und LUO L: How do dendrites take their shape? *Nat Neurosci.* 4: 359-65 (2001)
- SCOTT MP, TAMKUN JW, HARTZELL GW, III: The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta.* 989: 25-48 (1989)
- SEKINO Y, KOJIMA N, SHIRAO T: Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem Int.* 51: 92-104 (2007)

-
- SELKOE DJ: Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 298: 789-91 (2002)
- SHI SH, JAN LY, JAN YN: Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell*. 112: 63-75 (2003)
- SHI Y, ALIN K, GOFF SP: Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes Dev*. 9: 2583-97 (1995)
- SINI P, CANNAS A, KOLESKE AJ, DI FIORE PP, SCITA G: Abl-dependent tyrosine phosphorylation of Sos-1 mediates growth-factor-induced Rac activation. *Nat Cell Biol*. 6: 268-74 (2004)
- SMALL JV, ROTTNER K, KAVERINA I, ANDERSON KI: Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta*. 1404: 271-81 (1998)
- SMALL JV, STRADAL T, VIGNAL E, ROTTNER K: The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol*. 12: 112-20 (2002)
- SMART FM und HALPAIN S: Regulation of dendritic spine stability. *Hippocampus*. 10: 542-54 (2000)
- SODERLING SH, LANGEBERG LK, SODERLING JA, DAVEE SM, SIMERLY R, RABER J, SCOTT JD: Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 1723-8 (2003)
- SOLTAU M, RICHTER D, KREIENKAMP HJ: The insulin receptor substrate IRSp53 links postsynaptic shank1 to the small G-protein cdc42. *Mol Cell Neurosci*. 21: 575-83 (2002)
- SOLTAU M, BERHORSTER K, KINDLER S, BUCK F, RICHTER D, KREIENKAMP HJ: Insulin receptor substrate of 53 kDa links postsynaptic shank to PSD-95. *J Neurochem*. 90: 659-65 (2004)

-
- STARK CE, BAYLEY PJ, SQUIRE LR: Recognition memory for single items and for associations is similarly impaired following damage to the hippocampal region. *Learn Mem.* 9: 238-42 (2002)
- STEFFEN A, ROTTNER K, EHINGER J, INNOCENTI M, SCITA G, WEHLAND J, STRADAL TE: Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* 23: 749-59 (2004)
- STRADAL T, COURTNEY KD, ROTTNER K, HAHNE P, SMALL JV, PENDERGAST AM: The Abl interactor proteins localize to sites of actin polymerization at the tips of lamellipodia and filopodia. *Curr Biol.* 11: 891-5 (2001)
- STRADAL TE, ROTTNER K, DISANZA A, CONFALONIERI S, INNOCENTI M, SCITA G: Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14: 303-11 (2004)
- SUETSUGU S, KURISU S, OIKAWA T, YAMAZAKI D, ODA A, TAKENAWA T: Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J Cell Biol.* 173: 571-85 (2006)
- SUTER DM und FORSCHER P: An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol.* 8: 106-16 (1998)
- SVITKINA TM und BORISY GG: Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol.* 145: 1009-26 (1999)
- TADA T und SHENG M: Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 16: 95-101 (2006)
- TAKI T, SHIBUYA N, TANIWAKI M, HANADA R, MORISHITA K, BESSHO F, YANAGISAWA M, HAYASHI Y: ABI-1, a human homolog to mouse Abl-interactor 1, fuses the MLL gene in acute myeloid leukemia with t(10;11)(p11.2;q23). *Blood.* 92: 1125-30 (1998)

-
- TAKUMI Y, RAMIREZ-LEON V, LAAKE P, RINVIK E, OTTERSEN OP:
Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in
hippocampal synapses. *Nat Neurosci.* 2: 618-24 (1999)
- TANOS BE und PENDERGAST AM: Abi-1 forms an epidermal growth factor-
inducible complex with Cbl: role in receptor endocytosis. *Cell Signal.*
19: 1602-9 (2007)
- TASHIRO A, MINDEN A, YUSTE R: Regulation of dendritic spine morphology
by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho.
Cereb Cortex. 10: 927-38 (2000)
- THURMOND DC, GONELLE-GISPERT C, FURUKAWA M, HALBAN PA,
PESSIN JE: Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the
interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-
ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein)
complex. *Mol Endocrinol.* 17: 732-42 (2003)
- TYBULEWICZ VL, CRAWFORD CE, JACKSON PK, BRONSON RT,
MULLIGAN RC: Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a
homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell.* 65: 1153-63
(1991)
- VAN AELST L und CLINE HT: Rho GTPases and activity-dependent dendrite
development. *Curr Opin Neurobiol.* 14: 297-304 (2004)
- VAN ETTEN RA, JACKSON P, BALTIMORE D: The mouse type IV c-abl
gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability
is associated with cytoplasmic localization. *Cell.* 58: 669-78 (1989)
- VAN ETTEN RA: Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-
Abl. *Trends Cell Biol.* 9: 179-86 (1999)
- VAN GALEN EJ und RAMAKERS GJ: Rho proteins, mental retardation and
the neurobiological basis of intelligence. *Prog Brain Res.* 147: 295-317
(2005)

-
- VESSEY JP und KARRA D: More than just synaptic building blocks: scaffolding proteins of the post-synaptic density regulate dendritic patterning. *J Neurochem.* 102: 324-32 (2007)
- VIGNJEVIC D, YARAR D, WELCH MD, PELOQUIN J, SVITKINA T, BORISY GG: Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J Cell Biol.* 160: 951-62 (2003)
- VIGNJEVIC D, PELOQUIN J, BORISY GG: In vitro assembly of filopodia-like bundles. *Methods Enzymol.* 406: 727-39 (2006)
- WANG JY: Controlling Abl: auto-inhibition and co-inhibition? *Nat Cell Biol.* 6: 3-7 (2004)
- WEAVER AM, YOUNG ME, LEE WL, COOPER JA: Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol.* 15: 23-30 (2003)
- WELCH MD, DEPACE AH, VERMA S, IWAMATSU A, MITCHISON TJ: The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol.* 138: 375-84 (1997)
- WELCH MD und MULLINS RD: Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18: 247-88 (2002)
- WELSCH T, ENDLICH K, GIESE T, BUCHLER MW, SCHMIDT J: Eps8 is increased in pancreatic cancer and required for dynamic actin-based cell protrusions and intercellular cytoskeletal organization. *Cancer Lett.* 255: 205-18 (2007)
- WESTPHAL RS, SODERLING SH, ALTO NM, LANGE BERG LK, SCOTT JD: Scar/WAVE-1, a Wiskott-Aldrich syndrome protein, assembles an actin-associated multi-kinase scaffold. *EMBO J.* 19: 4589-600 (2000)
- WHITFORD KL, DIJKHUIZEN P, POLLEUX F, GHOSH A: Molecular control of cortical dendrite development. *Annu Rev Neurosci.* 25: 127-49 (2002)

-
- WOOD W und MARTIN P: Structures in focus--filopodia. *Int J Biochem Cell Biol.* 34: 726-30 (2002)
- WOODRING PJ, LITWACK ED, O'LEARY DD, LUCERO GR, WANG JY, HUNTER T: Modulation of the F-actin cytoskeleton by c-Abl tyrosine kinase in cell spreading and neurite extension. *J Cell Biol.* 156: 879-92 (2002)
- WOODRING PJ, HUNTER T, WANG JY: Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *J Cell Sci.* 116: 2613-26 (2003)
- XIAO W, POIRIER MA, BENNETT MK, SHIN YK: The neuronal t-SNARE complex is a parallel four-helix bundle. *Nat Struct Biol.* 8: 308-11 (2001)
- YAMAGATA M, SANES JR, WEINER JA: Synaptic adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol.* 15: 621-32 (2003)
- YAMAZAKI D, FUJIWARA T, SUETSUGU S, TAKENAWA T: A novel function of WAVE in lamellipodia: WAVE1 is required for stabilization of lamellipodial protrusions during cell spreading. *Genes Cells.* 10: 381-92 (2005)
- YOSHIMURA T, ARIMURA N, KAIBUCHI K: Signaling networks in neuronal polarization. *J Neurosci.* 26: 10626-30 (2006)
- YU W, AHMAD FJ, BAAS PW: Microtubule fragmentation and partitioning in the axon during collateral branch formation. *J Neurosci.* 14: 5872-84 (1994)
- YU W und BAAS PW: Changes in microtubule number and length during axon differentiation. *J Neurosci.* 14: 2818-29 (1994)
- YUSTE R und BONHOEFFER T: Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 24: 1071-89 (2001)

-
- ZALCMAN G, DORSEUIL O, GARCIA-RANEA JA, GACON G, CAMONIS J:
RhoGAPs and RhoGDIs, (His)stories of two families. *Prog Mol Subcell Biol.* 22: 85-113 (1999)
- ZHAI RG, VARDINON-FRIEDMAN H, CASES-LANGHOFF C, BECKER B,
GUNDELFINGER ED, ZIV NE, GARNER CC: Assembling the
presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor
vesicle. *Neuron.* 29: 131-43 (2001)
- ZHANG W und BENSON DL: Development and molecular organization of
dendritic spines and their synapses. *Hippocampus.* 10: 512-26 (2000)
- ZIV NE und SMITH SJ: Evidence for a role of dendritic filopodia in
synaptogenesis and spine formation. *Neuron.* 17: 91-102 (1996)
- ZRIHAN-LICHT S, AVRAHAM S, JIANG S, FU Y, AVRAHAM HK: Coupling of
RAFTK/Pyk2 kinase with c-Abl and their role in the migration of breast
cancer cells. *Int J Oncol.* 24: 153-9 (2004)

7 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt

Prof. Dr. Tobias M. Böckers für die interessante Aufgabenstellung, die weit genug gefasst war, mir nicht die Freiheit bei der Ausgestaltung der Arbeit zu nehmen. Du hast mir die Möglichkeit gegeben, in deinem Labor zu arbeiten und zu wachsen.

Prof. Dr. Thomas Wirth für die kurzfristige Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Meinem Betreuer Dr. Christian Pröpper für seine Unterstützung und das Überlassen von Teilaspekten „seines“ Proteins.

Ursula Pika-Hartlaub und Renate Zienecker für die Unterstützung bei technischen Fragen, Wolfgang Potschuweit für die Behebung von Computerproblemen sowie allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Mein spezieller Dank gilt Dr. Ulrike Schaz, die immer mit unendlicher Geduld und Freundlichkeit für mich dagewesen ist. Deine Bereitschaft, jederzeit mit mir zu diskutieren, dein Interesse an der Entwicklung meiner Arbeit sowie die vielen Aufmunterungen, wenn die Dinge mal nicht so laufen, habe ich besonders zu schätzen gelernt.

Dr. Silke Berger für die Beratung bei Fragen zur Statistik.

Melanie Pook für die hilfreichen Kommentare zu meiner Arbeit und ebenso für die vielen unterhaltsamen Sushi-Abende.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester Sandra sowie Sönke und Mathilde. Danke, dass ihr diese aufregende Zeit geduldig mit mir zusammen durchgestanden habt.

Publikationen

Proepper C, **Johannsen S**, Liebau S, Dahl J, Vaida B, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Boeckers TM

Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation. EMBO J. 26 (5): 1397-409 (2007)

Johannsen S*, Duning K*, Pavenstaedt HJ, Kremerskothen J und Boeckers TM

Temporal-spatial expression and biochemical properties of the memory-related protein KIBRA. (eingereicht bei J comp neurol)

* Diese Autoren leisteten den gleichen Beitrag für diese Veröffentlichung

Posterbeiträge:

23.Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg 2006:

„Influence of Abi-1 on the actin cytoskeleton in hippocampal neurons“.

7. Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen 2007:

„Influence of Abi-1 on synaptogenesis and synaptic morphology of hippocampal neurons“.

24.Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg 2007:

„Influence of Abi-1 on the synaptic localization of Eps8, WAVE, Sos1 and c-Abl in hippocampal neurons“.