

**Die mAbp1-defiziente Maus:  
ein Modellsystem für kardiale  
und neuronale Erkrankungen**

Dissertation  
zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Fakultät für Chemie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Simone Wienand**

Mai 2006

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Wienands möchte ich im Besonderen für die Bereitstellung des Themas sowie die ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während meiner Doktorarbeit danken.

Vielen Dank auch Dr. Cora Thiel für die gemeinsame Arbeit an den mAbp1-defizienten Mäusen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Eine Vielzahl von Leuten haben mich freundlicher Weise bei der Analyse der Maus unterstützt. Daher gilt mein Dank des weiteren Prof. Dr. Harald Jockusch für die Bereitstellung von Materialien und Geräten und die Hilfe bei der Muskeldenervierung, Dr. Axel Ziesenis für die Hilfe in allen „Maus-Fragen“, Dr. Jörg W. Bartsch und Dr. Peter Heilmann für zahlreiche Tipps und Hilfen sowie die Bereitstellung von Materialien und Geräten zur Analyse des Verhaltens und der Gewebeschnitte, Dr. Hermann Eibel für zahlreiche Tipps zu FACS-Analysen und Untersuchungen der Maus, Dr. Marco Prinz für die weiterführende Betrachtung von eventuellen Neurodegenerationen mAbp1-defizienter Mäuse, Dr. Denise Hilfiker-Kleiner für die Hilfe bei der Charakterisierung des Herzphänotyps und Dr. Uwe Kölsch für die pathologischen Ratschläge bei der Analyse der Organe.

Vielen Dank auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sowohl in Bielefeld, als auch in Göttingen und vor allem meiner kleinen mAbp1-Arbeitsgruppe Amina, Anna, Cora, Kerstin, Alex und Sven, die die Jahre der Doktorarbeit zu einer Zeit gemacht haben, an die ich mich gerne zurück erinnere.

### **Ein ganz herzliches Dankeschön gilt im Besonderen:**

Marion Knufinke

für die außergewöhnliche Pflege der Tiere und der hervorragenden Zusammenarbeit, ohne die die gesamte Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Du hast einen ungeahnt großen Anteil an dieser Arbeit.

Kerstin Hinrichsen und Bianca Werner

für die Hilfe während des Blockpraktikums und Kerstin besonders für die vielen lustigen Momente im Laboralltag.

Michael Engelke und Kai Dittmann

für das gemeinsame Austüfteln der  $Ca^{2+}$ -Messungen am LSR und vor allem bei Kai für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Maren und Sebastian, Gabi und Michael, und Cora

die während der Arbeit zu neuen Freunden geworden sind.

Dirk

meiner freundlichen englischen Onlinebibliothek, meinem Statistikexperten, und langjährigen Freund und Gefährten im Chaos des Lebens und der Wissenschaft. Ich danke dir sehr!

Sabrina, Bernd und Pauline; Bianca, Ingo, Eliza und Aaron

die sich immer wieder die gleichen Geschichten über die Arbeit anhören mussten und immer ein offenes Ohr hatten.

Mein allergrößter Dank aber gilt meinen Eltern Gudrun und Burckhard für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Liebe, sowie Björn für seinen grenzenlosen Optimismus, seine liebevolle Geduld und den unglaublich starken Halt, den er mir gibt.

Euch dreien möchte ich diese Arbeit widmen!

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2002 bis Dezember 2004 an der Universität Bielefeld in der Abteilung Biochemie und Molekulare Immunologie unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Wienands und von Januar 2005 bis Januar 2006 an der Georg-August-Universität Göttingen in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Wienands durchgeführt. Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 549 und FOR 521) unterstützt.

**Teile dieser Dissertation sind in der folgenden Veröffentlichung publiziert worden:**

Connert S.\*, Wienand S.\*, Thiel C.\*, Krikunova M., Glyvuk N., Tsytsyra Y., Hilfiker-Kleiner D., Bartsch J. W., Klingauf J., Wienands J. (2006) SH3P7/mAbp1 deficiency leads to tissue and behavioral abnormalities and impaired vesicle transport. *EMBO J* **25**, 1611-1622 (\* these authors contributed equally to this work).

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. Summary.....	2
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
2.1. Das Adapterprotein mAbp1: Domänenstruktur, Expression und Interaktionspartner... 3	3
2.2. Zelldynamische Prozesse: mAbp1 und das Aktin-Zytoskelett..... 6	6
2.2.1. Die Funktion von mAbp1 in der dynamischen Organisation des Aktin-Zytoskeletts..... 6	6
2.2.2. Die Funktion von mAbp1 in endozytotischen und Transport-Prozessen der Zelle... 8	8
2.3. Das Adapterprotein Hip1R und die funktionelle Bedeutung in der Clathrin-vermittelten Endozytose..... 11	11
2.4. Intrazelluläre Signalweiterleitung in B- und T-Lymphozyten nach Stimulation des Antigenrezeptors..... 14	14
2.4.1. Intrazelluläre Signalübertragung in Lymphozyten und die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts in diesem Prozess..... 14	14
2.4.2. Die Bedeutung von mAbp1 als Adapterprotein in der Signalweiterleitung in Lymphozyten..... 16	16
2.5. Neuritenwachstum und Signalübertragung zwischen Nervenzellen..... 17	17
2.5.1. Die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts beim Wachstum von Neuriten..... 17	17
2.5.2. Struktur der neurologischen Synapse und der Zyklus synaptischer Vesikel unter Berücksichtigung der funktionellen Bedeutung von mAbp1..... 18	18
2.6. Die BALB/c mAbp1-defiziente Mauslinie..... 20	20
<b>3. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....</b>	<b>21</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
4.1. Material..... 22	22
4.1.1. Materialien, Chemikalien, Agenzien..... 22	22
4.1.2. Allgemein verwendete Puffer..... 22	22
4.1.3. Antikörper..... 22	22
4.1.4. Sekundärantikörper..... 24	24
4.1.5. Oligonukleotide..... 25	25
4.1.6. Mauslinien..... 25	25
4.1.7. Verwendete Zelllinie..... 26	26
4.2. Methoden..... 26	26
4.2.1. Arbeiten an Versuchstieren..... 26	26
4.2.1.1. Haltungsbedingungen und Züchtung von Labormäusen..... 26	26
4.2.1.2. Sektion der Mäuse..... 26	26
4.2.1.3. Anatomische Untersuchungen..... 26	26

---

4.2.1.4. Blutentnahme und Erstellung eines Blutbildes.....	27
4.2.1.5. Rückkreuzung.....	27
4.2.2. Verhaltensexperimente.....	27
4.2.2.1. Allgemeine Untersuchungen zum Gesundheitszustand.....	27
4.2.2.2. Baumelverhalten ( <i>clasp</i> ing).....	28
4.2.2.3. Laufrad-Analyse ( <i>Rotarod</i> ).....	28
4.2.2.4. Fußabdruck-Analyse.....	28
4.2.2.5. Kraftmessung.....	28
4.2.2.6. Schwimmverhalten.....	29
4.2.2.7. Balancierfähigkeit.....	29
4.2.3. Zellkultivierung.....	29
4.2.3.1. Kultivierung von Suspensionszellen.....	29
4.2.3.2. Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	29
4.2.3.3. Zellzählung.....	30
4.2.4. Molekularbiologische Methoden.....	30
4.2.4.1. DNA-Schnellpräparation aus Maus-Schwanzspitzen.....	30
4.2.4.2. RNA-Isolierung aus Geweben.....	30
4.2.4.3. Reverse Transkription.....	31
4.2.4.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	31
4.2.4.5. <i>Real-time</i> quantitative Polymerase Kettenreaktion.....	32
4.2.4.6. Agarose-Gelelektrophorese.....	33
4.2.5. Proteinbiochemische Methoden.....	33
4.2.5.1. Stimulation über den B-Zell-Antigenrezeptor.....	33
4.2.5.2. Stimulation mit Pervanadat/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	34
4.2.5.3. Lyse eukaryotischer Zellen.....	34
4.2.5.4. Lysate aus Gehirn für Immunaufreinigungen.....	35
4.2.5.5. Lysate aus Milz für Immunaufreinigungen.....	35
4.2.5.6. Gewebelysate für Proteinanalysen.....	36
4.2.5.7. Immunaufreinigung.....	36
4.2.5.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
4.2.5.9. <i>Western-Blot</i> -Analyse von Proteinen.....	38
4.2.6. Durchflusszytometrie.....	39
4.2.6.1. Vorbereitung der Gewebe für durchflusszytometrische Analysen.....	39
4.2.6.2. Erythrozyten-Lyse.....	40
4.2.6.3. Durchflusszytometrische Analysen.....	40
4.2.6.4. Analyse der Ca <sup>2+</sup> -Mobilisation.....	41
4.2.7. Kultivierung von primären Cerebellum-Neuronen.....	42
4.2.7.1. Präparation und Kultivierung.....	42
4.2.7.2. Poly-D-Lysinbeschichtung.....	43
4.2.7.3. Morphometrische Messung.....	43
4.2.8. Histologische Untersuchungen.....	43
4.2.8.1. Vorbereitung des Gewebes für Gefrierschnitte.....	43
4.2.8.2. Anfertigung von Gefrierschnitten.....	44

4.2.8.3. Immunhistochemische Färbung.....	44
4.2.8.4. Fixierung und Einbettung des Gewebes für Paraffinschnitte.....	44
4.2.8.5. Anfertigung von Paraffinschnitten.....	45
4.2.8.6. Entparaffinierung/Rehydrierung von Paraffinschnitten.....	45
4.2.8.7. NISSL-Färbung.....	45
4.2.8.8. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.....	46
4.2.9. Dokumentation und Auswertung.....	46
4.2.10. Statistische Analysen.....	46
<b>5. ERGEBNISSE.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1. Charakterisierung der mAbp1-defizienten Maus.....</b>	<b>47</b>
5.1.1. Charakterisierung des Maus-Phänotyps verursacht durch mAbp1-Defizienz.....	47
5.1.2. Pathologische Anomalien in Herz, Lunge und Milz von mAbp1-defizienten Mäusen.....	51
<b>5.2. Die Bedeutung von mAbp1 für die Integrität lymphatischer Organe und die Entwicklung und Funktionalität von Lymphozyten.....</b>	<b>57</b>
5.2.1. Auswirkung der mAbp1-Defizienz auf die Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten.....	57
5.2.2. Funktionelle Bedeutung von mAbp1 in Signalweiterleitungsprozessen nach B-Zell-Stimulation am Beispiel der Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung.....	67
<b>5.3. Analyse der muskulären und neurologischen Integrität zur Identifizierung der Ursache motorischer Defizite mAbp1-defizienter Mäuse.....</b>	<b>72</b>
5.3.1. Erstellung eines Verhaltensprofils mAbp1-defizienter Mäuse.....	72
5.3.2. Analyse der muskulären Integrität von mAbp1-defizienten Mäusen.....	76
5.3.3. Sporadische Neurodegeneration im Rückenmark von mAbp1-defizienten Mäusen mit stark ausgeprägten mAbp1-Defizienz Symptomen.....	78
5.3.4. Einfluss der mAbp1-Defizienz auf die Differenzierung von Neuronen und das Wachstum von neuronalen Zellfortsätzen.....	80
5.3.5. Expressionsanalysen von mAbp1-assoziierten oder funktionell verwandten Proteinen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm.....	84
<b>5.4. Interaktion von mAbp1 mit Proteinen der endozytotischen Maschinerie in verschiedenen Zelltypen.....</b>	<b>86</b>
5.4.1. Interaktion von mAbp1 mit Hip1R, Clathrin HC und Dynamin in B-Zelllysaten sowie in Milz- und Gehirn-Gewebelysaten.....	86
5.4.2. Stimulationsabhängigkeit der Interaktion von mAbp1 mit Hip1R, Clathrin HC und Dynamin in B-Zellen.....	90
<b>5.5. Initiale Charakterisierung mAbp1-defizienter C57BL/6 Mäuse .....</b>	<b>92</b>
<b>6. DISKUSSION.....</b>	<b>95</b>
<b>6.1. Essentielle Bedeutung von mAbp1 für die Integrität verschiedener Organe.....</b>	<b>95</b>
6.1.1. Kann die Bedeutung von mAbp1 für die Integrität des Herzens auf die F-Aktin- Bindungseigenschaft zurückgeführt werden?.....	95

6.1.2. Splenomegalie in mAbp1-defizienten Mäusen ist nicht auf die Zunahme einer B- oder T-Zell-Population zurückzuführen.....	97
<b>6.2. Bedeutung von mAbp1 für die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in B-Lymphozyten.....</b>	<b>98</b>
6.2.1. Der Ca <sup>2+</sup> -Einstrom über die Plasmamembran wird durch mAbp1 beeinflusst.....	98
6.2.2. Wie reguliert mAbp1 den Ca <sup>2+</sup> -Einstrom über die Plasmamembran?.....	99
6.2.3. MZ- und folliculäre B-Zellen der Milz zeigen einen unterschiedlichen Einfluss von mAbp1 auf die Regulation des extrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Einstroms.....	102
<b>6.3. Deuten motorische und koordinative Defizite mAbp1-defizienter Mäuse auf eine Bedeutung von mAbp1 für höhere Hirnfunktionen hin?.....</b>	<b>103</b>
6.3.1. mAbp1-defiziente Mäuse zeigen eingeschränkte motorische Fähigkeiten.....	103
6.3.2. Sind Defizite im Neuritenwachstum auf eine veränderte Aktin-Dynamik in mAbp1-defizienten Neuronen zurückzuführen?.....	104
6.3.3. mAbp1 gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die sowohl beim Wachstum von Neuriten als auch im Zyklus synaptischer Vesikel von Bedeutung sind.....	106
6.3.4. Defizite in endozytotischen Vorgängen als mögliche Ursache des gestörten Neuritenwachstums mAbp1-defizienter Neurone.....	108
<b>6.4. Das Adapterprotein mAbp1: Eine funktionelle Verknüpfung zwischen der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und verschiedenen zellulären Mechanismen.....</b>	<b>109</b>
<b>6.5. Die Interaktion von mAbp1 und Hip1R kann sowohl in neuronalen als auch in lymphatischen Geweben von funktioneller Bedeutung sein.....</b>	<b>111</b>
<b>6.6. mAbp1-Defizienz-Symptome unterliegen einem Gen-Dosis-Effekt und zeigen geschlechtsspezifische Unterschiede.....</b>	<b>113</b>
<b>6.7. Mögliche kompensatorische Effekte in der mAbp1-defizienten Maus.....</b>	<b>114</b>
6.7.1. Funktionell verwandte Proteine von mAbp1 sind mögliche Kandidaten zur Kompensation der Defizienz von mAbp1 in nicht betroffenen Organen.....	114
6.7.2. Deutet die redundante Funktion von Abp1p und Sla2p in Hefe auf kompensatorische Effekte durch Hip1R in mAbp1-defizienten Mäusen hin?.....	115
6.7.3. Können mAbp1 und Cortactin redundante Funktionen übernehmen?.....	117
<b>6.8. Die mAbp1-defiziente Mauslinie als Modellsystem für humane Erkrankungen.....</b>	<b>118</b>
<b>6.9. Ausblick.....</b>	<b>120</b>
 <b>7. LITERATUR.....</b>	 <b>122</b>
 <b>8. ANHANG.....</b>	 <b>140</b>
<b>8.1. Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>140</b>
8.1.1. Abbildungsverzeichnis.....	140
8.1.2. Tabellenverzeichnis.....	142

---

## Abkürzungen

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
°C	Grad Celcius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AChR $\alpha$	Acetylcholin Rezeptor $\alpha$
AM	Acetoxymethylester
ANTH	<i>AP180 N-terminal homology</i>
AP	Adapterprotein
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	<i>ADP-ribosylation factor</i>
Ark	<i>actin-regulating kinase</i>
Arp	<i>actin related protein</i>
as	<i>antisense</i>
b	Base/n
BCR	B-Zell-Antigenrezeptor
BIOT	biotinyliert
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CALM	<i>clathrin assembly lymphoid myeloid leukaemia protein</i>
Caspase	<i>Cysteine-dependent aspartate-directed proteases</i>
CAZ	Cytomatrix an der aktiven Zone
CCL	<i>cleared cellular lysate</i>
Cdc	<i>cell devision cycle</i>
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
DAG	Diacylglycerol
DIV	<i>days in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure

---

ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl-ether)-N,N'-tetraessigsäure
ENTH	<i>epsin N-terminal homology</i>
Epsin	<i>Eps-interacting protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
F(ab)	antigenbindendes Fragment ( <i>fragment antigen binding</i> )
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	fötales Kälberserum
Fgd	<i>faciogenital dysplasia protein</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Fyb	<i>Fyn-T binding protein</i>
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
Grb2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
h	Stunde
HC	<i>heavy chain</i>
HD	<i>Huntington's disease</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
Hip55	<i>HPK1-interacting protein of 55 kDa</i>
Hip1R	<i>Huntingtin interacting protein 1 related</i>
HPK1	<i>hematopoietic progenitor kinase 1</i>
HRPO	Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-Trisphosphat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
kDa	Kilodalton
L	Liter

---

LC	<i>light chain</i>
M	molar
mA	Milliampere
mAbp1	<i>mammalian actin binding protein 1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mc	monoclonal
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mL	Milliliter
MLP	muskuläres LIM Protein
Nck	<i>non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein</i>
NPF	<i>nucleation promoting factor</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pc	polyclonal
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	Phosphatidyl-Inositol 3,4,5-Trisphosphat
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidyl-Inositol 4,5-Bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PRAM	<i>PML-RAR<math>\alpha</math> target gene encoding an adaptor molecule-1</i>
PRD	Prolin-reiche Domäne
Prk1	<i>p58-regulating kinase 1</i>
ProSAP	<i>proline-rich synapse-associated protein</i>
PSD	<i>post synaptic density</i>
PTK	Proteintyrosinkinase
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt im <b>Roswell Park Memorial Institute</b>
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription

---

Rvs	<i>reduced viability upon starvation</i>
s	<i>sense</i>
s	Sekunde
SAC	<i>suppressor of actin</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shank	<i>SH3 and multiple ankyrin repeat domains</i>
SH	<i>Src homology</i>
SHIP	<i>SH2-containing inositol 5-phosphatase</i>
SH3P7	<i>SH3-domain containing protein 7</i>
SLA	<i>synthetic lethal with ABP1</i>
SLP	<i>SH2 domain containing leukocyte protein</i>
SOC	<i>store-operated channels</i>
T	Thymin
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCR	T-Zell-Antigenrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPC	<i>transient receptor potential canonical</i>
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaureat
U	Unit
UNLB	<i>unlabeled</i>
V	Volt
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
VASP	<i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
w/v	Verhältnis Gewicht/Volumen
YopH	<i>Yersinia outer protein H</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Zusammenfassung

Das intrazelluläre Adapterprotein *mammalian actin-binding protein 1* (mAbp1/SH3P7/Hip-55) wird in vielen Geweben der Maus exprimiert und wurde als Substrat von Proteintyrosinkinasen in stimulierten B-Zellen identifiziert. mAbp1 interagiert sowohl mit F-Aktin als auch mit einer Vielzahl von teilweise Gewebe-spezifisch exprimierten Proteinen mit Prolin-reichen Sequenzen. Diese Eigenschaften deuten auf eine Funktion von mAbp1 in vielen zellulären Prozessen in unterschiedlichen Zelltypen hin. Dabei kann häufig die F-Aktin-Bindungseigenschaft von mAbp1 zum Tragen kommen, die eine Verknüpfung von F-Aktin mit Komponenten zellulärer Maschinerien ermöglichen kann. Frühere Studien an verschiedenen Zelllinien gaben Hinweise auf eine Bedeutung von mAbp1 in der endozytotischen Maschinerie.

Im Rahmen dieser Arbeit stand eine mAbp1-defiziente Mauslinie zur Verfügung, die erstmals Analysen zur mAbp1-Funktion *in vivo* ermöglichte. Heterozygote und mAbp1-defiziente Mäuse entwickelten im Alter von vier bis zwölf Monaten abhängig vom Geschlecht einen schlechten Allgemeinzustand, Tremor und partielle Lähmungen der Hinterbeine sowie starke motorische und koordinative Defizite. Die Analyse der Organe mAbp1-defizienter Mäuse zeigte eine Abhängigkeit von mAbp1 für die Integrität von Herz, Lunge und Milz. Aufgrund der hohen Expression von mAbp1 in lymphatischen und neuronalen Geweben lag ein besonderer Fokus auf der Analyse der Zellen dieser Gewebe. Analysen der Lymphozyten-Populationen in Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und Milz zeigten keine Unterschiede in der Entwicklung und Differenzierung von B- und T-Zellen zwischen mAbp1-defizienten und wildtypischen Mäusen. Funktionelle Analysen zeigten jedoch einen verstärkten extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Einstrom in folliculären und T1-B-Zellen der Milz mAbp1-defizienter Mäuse nach Stimulation. In funktionellen Studien an primären Cerebellum-Kulturen zur Entwicklung von Neuronen konnte ein verstärktes Neuritenwachstum bei mAbp1-defizienten Neuronen detektiert werden. Des Weiteren wurde Hip1R als Interaktionspartner von mAbp1 in neuronalen und lymphatischen Geweben *in vivo* durch Co-Immunaufreinigung bestätigt.

Zusammenfassend unterstützen diese Studien die Bedeutung von mAbp1 in Zellen verschiedener Gewebe in dynamischen Prozessen und Prozessen der Signalweiterleitung. Des Weiteren kann die mAbp1-defiziente Mauslinie in zukünftigen Studien als Modellsystem für humane kardiale und neuronale Erkrankungen dienen, um Hinweise auf funktionelle Ursachen dieser Erkrankungen zu erhalten.

## 1.1. Summary

Actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7/Hip-55) is a mammalian intracellular adaptor protein that is widely expressed in murine tissues, and has been identified as substrate of protein tyrosine kinases in stimulated B-cells. mAbp1 binds to F-actin, and proline-rich domains within proteins that may display tissue-specific expression. Binding of mAbp1 to F-actin mediated its connection with components of different cellular machineries. Therefore, it has been proposed that mAbp1 plays an important role in many cellular processes in different cell types. Previous studies also suggest that mAbp1 is involved in the endocytic processes of various cell lines.

The objective of my project was characterization of the *in vivo* function of mAbp1 using the available mAbp1-deficient mouse line. Both heterozygous and mAbp1-deficient mice at four to twelve months of age develop symptoms characteristic of poor general health, tremors, partial paralysis of the hind limbs, and strongly reduced fine motor coordination that is gender dependent. Analysis of mAbp1-deficient mouse organs revealed that mAbp1 is critical for proper heart, lung and spleen functions. Considering the high levels of mAbp1 expression in lymphatic and neuronal tissues, analysis of cells from these tissues was of particular interest. Analysis of lymphocyte-populations in bone marrow, thymus, lymph node, and spleen did not reveal any remarkable differences in B- and T-cell development and differentiation between wildtype and mAbp1-deficient mice. However, functional deficits were detected by increased extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -influx in splenic follicular and T1-B-cells of mAbp1-deficient mice post stimulation. Furthermore, primary cultures of cerebellar neurons revealed enhanced neurite outgrowth from mAbp1-deficient neurons. Additionally, the predicted binding of mAbp1 to Hip1R was confirmed *in vivo* by co-immunoprecipitation experiments.

Collectively these studies support the functional relevance of mAbp1 in dynamic processes and signal transduction in different cell types. mAbp1-deficient mice may therefore serve as model system for human cardiac and neuronal diseases in future studies to investigate their functional relevance.

## 2. Einleitung

Adapterproteine umfassen eine Gruppe von Proteinen, die eine Vielzahl von Interaktionsdomänen für Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Interaktionen enthalten, aber keine enzymatische Aktivität besitzen. Die Funktion dieser Proteine liegt in der Organisation von makromolekularen Komplexen, der strukturell und zeitlich abgestimmten Rekrutierung verschiedener Komponenten dieser funktionellen Komplexe und der Modulation enzymatischer Aktivität von Interaktionspartnern zur positiven und negativen Regulation von Signaltransduktionsprozessen. Adapterproteine sind essentiell für die regulierte Antwort der Zelle auf extrazelluläre Stimuli (zur Übersicht: Koretzky und Myung, 2001; Leo et al., 2002; Janssen und Zhang, 2003). Eine häufig vorliegende Funktion dieser Moleküle liegt in der Verknüpfung des Mechanismus verschiedener zellulärer Prozesse, wie endozytotische Vorgänge, mit der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts (zur Übersicht: Qualmann et al., 2000; Schafer, 2002).

Die Interaktion des Adapterproteins *mammalian actin binding protein 1* (mAbp1) mit einer Vielzahl von Bindepartnern und mit F-Aktin deutet darauf hin, dass mAbp1 eine Bedeutung in verschiedenen zellulären Vorgängen in unterschiedlichen Zelltypen, insbesondere in Lymphozyten und Neuronen, haben kann (Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000).

Studien an Zelllinien weisen auf eine mögliche Bedeutung von mAbp1 in der Signaltransduktion und in zellulären Vorgängen hin, die eine regulierbare Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts erfordern (Ensenat et al., 1999; Larbolette et al., 1999; Fenster et al., 2003; Han et al., 2003; Qualmann et al., 2004).

Detaillierte Analysen an mAbp1-defizienten Zellen und auf der Ebene des gesamten Organismus konnten bisher nicht durchgeführt werden, um diese Studien zur Funktionalität von mAbp1 zu bestätigen.

### 2.1. Das Adapterprotein mAbp1: Domänenstruktur, Expression und Interaktionspartner

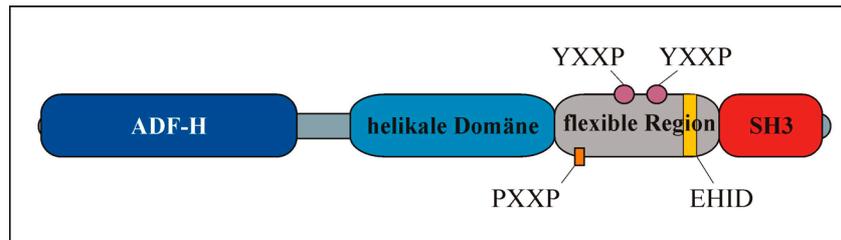
Die *mabp1*-cDNA konnte in einem cDNA *expression library screening* zum Nachweis von *Src homology 3* (SH3)-Domänen enthaltenden Proteinen isoliert werden und wird daher alternativ *SH3-domain containing protein 7* (SH3P7) genannt (Sparks et al., 1996). Des Weiteren konnte mAbp1 in einem Assay zur Isolierung Phosphotyrosin enthaltender Proteine aus Pervanadat-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulierten B-Zellen aufgereinigt werden (Larbolette et al.,

1999). Das humane Ortholog von mAbp1 zeigt eine Sequenzhomologie von 85% zur Sequenz des murinen mAbp1 und wird aufgrund der Interaktion mit der *hematopoietic progenitor kinase 1* (HPK1) auch als *HPK1-interacting protein of 55 kDa* (Hip-55) bezeichnet (Ensenat et al., 1999).

Protein-Expressionsstudien und mRNA-Analysen zeigen eine weit verbreitete Expression von mAbp1 in verschiedenen Geweben (Ensenat et al., 1999; Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000). Vor allem während der frühen embryonalen Entwicklung konnten hohe mRNA-Level detektiert werden (Kessels et al., 2000).

mAbp1 umfasst 433 Aminosäuren und konnte in der SDS-PAGE als 55 kDa-Protein identifiziert werden (Larbolette et al., 1999). Erste Hinweise auf das Vorkommen von Isoformen aufgrund alternativer Spleissmechanismen lieferten Sequenzanalysen an mAbp1 aus Maus und Ratte. Im murinen mAbp1 liegt eine Isoform vor, in der Serin 235 nicht vorkommt (Kessels et al., 2000). Korrespondierend zu diesem Ergebnis konnten vier Isoformen von mAbp1 im Gehirn der Ratte identifiziert werden, die durch alternative Spleissmechanismen entstehen (Yamazaki et al., 2001).

Die Domänenstruktur von mAbp1 zeigt N-terminal eine *actin-depolymerizing factor homology* (ADF-H)-Domäne, die aufgrund ihrer Homologien zwischen SH3P7, Coactosin, Abp1p und Drebrin auch als SCAD-Domäne bezeichnet wird (Larbolette et al., 1999; Quintero-Monzon et al., 2005; zur Übersicht: Lappalainen et al., 1998). C-terminal schließt sich eine helikale Domäne mit alternierenden positiven und negativen Ladungen an, gefolgt von einer flexiblen hydrophilen Region, die eine Konsensussequenz zur potentiellen Bindung von SH3-Domänen (PXXP) und zwei Tyrosin-Phosphorylierungsmotive (YXXP) beinhaltet. Die Tyrosine dieser Phosphorylierungsmotive an den Positionen 337 und 347 können durch Syk und Src Familien Kinasen phosphoryliert werden (Lock et al., 1998; Larbolette et al., 1999; Han et al., 2003). Am C-Terminus befindet sich eine SH3-Domäne zur Interaktion mit Prolin-reichen Domänen (PRD) (Abb. 2.1; Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000). Die N-terminalen Regionen von mAbp1 und Drebrin zeigen große Ähnlichkeiten, eine C-terminale SH3-Domäne kommt in Drebrin jedoch nicht vor (Kessels et al., 2000). Die SH3-Domäne von mAbp1 zeigt in ihrer Sequenz starke Ähnlichkeiten zur SH3-Domäne von Cortactin (Wu und Parsons, 1993; Kessels et al., 2000).



**Abbildung 2.1: Domänen und Sequenzmotive zur Protein-Protein-Interaktion des Adapterproteins mAbp1.** Dargestellt ist die ADF-H-Domäne (*actin-depolymerizing factor homology*, blau), die helikale Domäne (hellblau), die flexible Region (grau) mit zwei Tyrosin Phosphorylierungsmotiven (YXXP, violett), einem SH3-Domänen Bindemotiv (PXXP, orange) sowie einem EHID Caspase 3-Spaltungsmotiv (gelb) und die C-terminale SH3-Domäne (rot; Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000).

Aufgrund der Domänenstruktur ist mAbp1 in der Lage, mit einer Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichen zellulären Funktionen zu interagieren. Die N-terminal lokalisierte ADF-H-Domäne und die stark geladene helikale Domäne können unabhängig voneinander an F-Aktin binden (Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000; zur Übersicht: Lappalainen et al., 1998). Die Linker-Region zwischen diesen Aktin-bindenden Domänen vermittelt die Interaktion von mAbp1 mit F-Aktin an der Golgi Membran (Xu und Stamnes, 2006).

Als Interaktionspartner von mAbp1, deren PRD von der mAbp1[SH3]-Domäne gebunden werden können, wurden u.a. Dynamamin, Synapsin 1, Synaptojanin 1 (Kessels et al., 2001), SH2-containing inositol 5-phosphatase (SHIP; Larbolette, 2000) und *faciogenital dysplasia protein 1* (Fgd1), ein Cdc42 aktivierender *guanine nucleotide exchange* Faktor (GEF) (Hou et al., 2003), identifiziert. In Maus Makrophagen konnte eine Interaktion von mAbp1 mit dem in T-Zellen und myeloiden Zellen exprimierten Adapterprotein *Fyn binding protein* (Fyb) gezeigt werden (da Silva et al., 1997; Yuan et al., 2005). Aufgrund von *in vitro*-Interaktionsstudien und durch Co-Aufreinigungsexperimente mit Flag-mAbp1-Konstrukten konnte ebenfalls eine Interaktion von mAbp1 mit dem Huntingtin *interacting protein 1-related* (Hip1R) und der Clathrin schweren Kette (HC, *heavy chain*) detektiert werden (Larbolette, 2000; Connert, 2003). Des weiteren konnte für humanes Hip-55 die Bindung der SH3-Domäne an die *hematopoietic progenitor kinase 1* (HPK1), sowie ein EHID-Spaltungsmotiv zur Apoptose abhängigen Abspaltung der SH3-Domäne durch die *Cysteine-dependent aspartate-directed protease 3* (Caspase 3) gezeigt werden (Ensenat et al., 1999; Chen et al., 2001).

In Hefe kommt das zu mAbp1 orthologe Protein Abp1p vor, das eine vergleichbare Domänenstruktur zeigt (Drubin et al., 1988; Drubin et al., 1990; Lila und Drubin, 1997; Kessels et al., 2000; zur Übersicht: Olazabal und Machesky, 2001). C-terminal hinter der ADF-H-Domäne liegen jedoch Arp2/3-bindende azide Domänen, die in mAbp1 von Säugern nicht vorkommen (Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000; Goode et al., 2001).

Neben F-Aktin und dem Arp2/3-Komplex konnten auch für Abp1p eine Reihe weiterer Interaktionspartner identifiziert werden, wie die Serin/Threonin-Kinasen *p58-regulating kinase 1* (Prk1p) und *actin-regulating kinase 1* (Ark1p), das Synaptojanin-ähnliche Protein Sjl2 und das Amphiphysin Orthologe Rvs (*reduced viability upon starvation*) 167p (Freeman et al., 1996; Lila und Drubin, 1997; Colwill et al., 1999; Fazi et al., 2002; Stefan et al., 2005).

Die Einteilung ADF-H-Domänen-enthaltener Proteine erfolgt durch Sequenzanalysen und durch Vergleiche ihrer Funktionalität in Bezug auf die Aktin-Bindungseigenschaften und die Aktin-Dynamik in ADF/Cofilin, Twinfilin und mAbp1/Abp1p/Drebrin. ADF/Cofilin binden an Aktin-Filamente und Monomere und können als Promotoren für die Depolymerisation von Aktin-Filamenten fungieren und die Filament-Dynamik verstärken (Carlier et al., 1997; zur Übersicht: Theriot, 1997; Bamburg, 1999). Twinfilin reduzieren durch Bindung an Aktin-Monomere die Nukleotidaustauschrate (Goode et al., 1998). mAbp1/Abp1p und die Neuron-spezifischen Drebrin zeichnen sich im Gegensatz zu den Proteinen der anderen Gruppen durch ausschließliche Bindung an F-Aktin aus und haben keinen Einfluss auf den Nukleotidaustausch und die Depolymerisation von F-Aktin (Ishikawa et al., 1994; Kessels et al., 2000; Goode et al., 2001; zur Übersicht: Lappalainen et al., 1998).

## **2.2. Zelldynamische Prozesse: mAbp1 und das Aktin-Zytoskelett**

### **2.2.1. Die Funktion von mAbp1 in der dynamischen Organisation des Aktin-Zytoskeletts**

Zelluläre Prozesse, die eine Dynamik der Zellmembran erfordern, wie Wachstums- und endozytotische Vorgänge sowie Bewegungen der Zelle, setzen eine dynamische Regulation des Aktin-Zytoskeletts voraus. Die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts wird durch das Zusammenspiel der Prozesse Nukleation, Polymerisation, Depolymerisation und Verknüpfung von Aktin-Filamenten reguliert.

Ein wichtiger Regulator der Aktin-Dynamik ist der *actin-related protein (Arp) 2/3* Protein-Komplex, der durch regulatorische Interaktion mit verschiedenen Proteinen in unterschiedlichen Aktin-dynamischen Prozessen eine Rolle spielt (zur Übersicht: Machesky und Gould, 1999). *Nucleation promoting factors* (NPFs), die sich zum einen in Proteine der WASP/SCAR/WAVE Familie und zum anderen in Abp1p aus Hefe und Cortactin aus Säugern unterteilen lassen, vermitteln durch Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex die

Nukleation der Aktin-Assemblierung. Der Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch Proteine dieser beiden Gruppen von NPFs liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde. Die stimulatorische Wirkung der Proteine der WASP/SCAR/WAVE Familie beruht auf der Fähigkeit, den Arp2/3-Komplex zu stabilisieren und monomeres Aktin zu binden und zu rekrutieren (Machesky und Insall, 1998; Rohatgi et al., 1999; Yasar et al., 1999; zur Übersicht: Higgs und Pollard, 2001). Abp1p bindet dagegen nur an F-Aktin und kann die Arp2/3-vermittelte Aktin-Nukleation durch Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes an filamentöses Aktin aktivieren (Goode et al., 2001). Bei einer Überexpression von Abp1p in Hefe treten schwere Defekte in der Organisation von Aktin und der Zellmorphologie auf. Diese Studien unterstützen weiterhin die Bedeutung von Abp1p für die Integrität von Aktin-Strukturen in Hefe (Drubin et al., 1988; Quintero-Monzon et al., 2005). Cortactin interagiert ebenfalls mit F-Aktin und kann *in vitro* ein *debranching* des entstandenen Filament-Netzwerkes verhindern (Urano et al., 2001; Weaver et al., 2001). Für mAbp1 in Säugetieren konnte bislang keine direkte stimulatorische Wirkung auf den Arp2/3-Komplex beschrieben werden. Diese Beobachtung kann auf das Fehlen einer aziden Arp2/3-bindenden Domäne in mAbp1 zurückgeführt werden. Diese Domäne kommt sowohl in Cortactin als auch in Abp1p vor (Kessels et al., 2000; Goode et al., 2001; zur Übersicht: Olazabal und Machesky, 2001). Die Rekrutierung von mAbp1 und Co-Lokalisation mit F-Aktin in zellulären Bereichen mit einer hohen Aktin-Dynamik weisen auf einen indirekten Einfluss von mAbp1 auf den Arp2/3-Komplex hin (Kessels et al., 2000). In Bereichen hoher Membrandynamik liegt mAbp1 ebenfalls co-lokalisiert mit Fgd1 vor (Hou et al., 2003). mAbp1 und auch Cortactin rekrutieren Fgd1 durch direkte Interaktion an das kortikale Aktin-Zytoskelett. Fgd1 kann die Rho GTPase Cdc42 aktivieren und über N-WASP stimulatorisch auf den Arp2/3-Komplex wirken (Rohatgi et al., 1999).

In Fibroblasten wird mAbp1 nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren in F-Aktin-reiche Lamellipodien (Kessels et al., 2000; Mise-Omata et al., 2003) und an Dynamin-reiche Regionen der Plasmamembran rekrutiert (Kessels et al., 2001). Die Rekrutierung von mAbp1 an F-Aktin ist in diesen Bereichen abhängig von einer dynamischen Umwandlung des F-Aktins.

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Studien, dass mAbp1 besonders in den zellulären Bereichen von entscheidender funktioneller Bedeutung ist, die sich durch eine starke und effektive Dynamik des Aktin-Zytoskeletts auszeichnen. Die hohe Expression von mAbp1 in verschiedenen Zelllinien und in Stadien der frühen embryonalen Entwicklung

unterstützt des weiteren die funktionelle Bedeutung von mAbp1 in Zellen mit einer hohen Dynamik (Ensenat et al., 1999; Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000).

### **2.2.2. Die Funktion von mAbp1 in endozytotischen und Transport-Prozessen der Zelle**

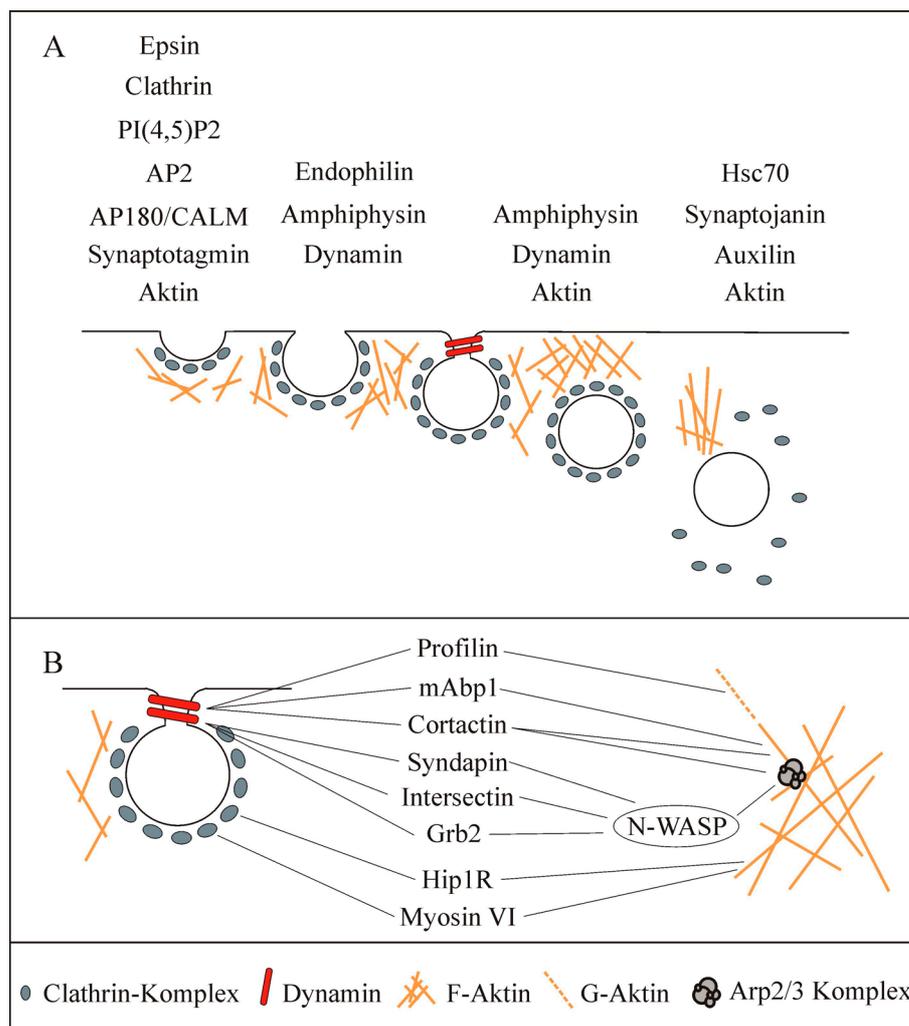
Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist ein wichtiger Prozess der Zelle sowohl zur Internalisierung von Proteinen und Lipiden als auch zur Regulation von Signalwegen der Zelle und zum synaptischen Vesikel-Recycling.

Die endozytotische Internalisierung erfordert die zeitlich regulierten Vorgänge der Assemblierung der Clathrin-Hülle an der Plasmamembran, der Einstülpung der Membran zur Formierung von Clathrin-umhüllten *pits*, der Abschnürung und des Transports der Clathrin-umhüllten Vesikel von der Plasmamembran ins Zytosol sowie der Auflösung der Clathrin-Strukturen (Abb. 2.2 A; zur Übersicht: Jarousse und Kelly, 2001). Diese Vorgänge erfordern das regulierte Zusammenwirken einer Vielzahl von Proteinen sowie Phosphoinositiden, die in Abbildung 2.2 für die aufeinanderfolgenden Schritte der Endozytose dargestellt sind (Haucke und De Camilli, 1999; zur Übersicht: Brodsky et al., 2001; Lemmon et al., 2001; Mousavi et al., 2004; Haucke, 2005).

Durch verschiedene biochemische und mikroskopische Untersuchungen konnte eine essentielle Bedeutung von dynamischen F-Aktin-Strukturen in vielen Stadien der Clathrin-vermittelten endozytotischen Internalisierung gezeigt werden (Lamaze et al., 1997; Bennett et al., 2001; Merrifield et al., 2002; Merrifield et al., 2005; Yazar et al., 2005; zur Übersicht: Qualmann et al., 2000; Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003). Diese Studien führten u.a. zu der Annahme, dass Aktin-bindende Proteine wie mAbp1 und/oder Proteine, die die Aktin-Dynamik beeinflussen, eine Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose spielen (zur Übersicht: Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003). In Studien mit HEK Zellen, die eine durch RNA-Interferenz herunterregulierte mAbp1-Expression aufweisen, deutet eine signifikante Inhibition der Rezeptor-vermittelten Endozytose in Transferrin-Rezeptor-Endozytoseassays und eine gestörte intrazelluläre Verteilung von frühen endosomalen Kompartimenten auf eine Bedeutung des F-Aktin-bindenden Adapterproteins mAbp1 in endozytotischen Transportprozessen hin (Mise-Omata et al., 2003).

Die Assemblierung neuer Clathrin-umhüllter Strukturen, sowie die Abschnürung und Internalisierung Clathrin-umhüllter Vesikel sind Vorgänge, die von der Aktin-Assemblierung und Disassemblierung abhängen. Die Membraneinstülpung Clathrin-umhüllter Strukturen kann jedoch im Gegensatz zu späten Stadien der Clathrin-vermittelten

Endozytose unabhängig von der Aktin-Dynamik stattfinden (Abb. 2.2 A; Merrifield et al., 2002; Yarar et al., 2005). Auch in Hefe spielt die Aktin-Dynamik in endozytotischen Vorgängen, die in Bereichen kortikaler Aktin *patches* stattfinden, eine wichtige Rolle. Mutationen in Aktin und in verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen führen zu Defekten in der Aktin-Organisation und zu einer Inhibition endozytotischer Vorgänge (Kübler und Riezman, 1993; Kaksonen et al., 2003; zur Übersicht: Geli und Riezman, 1998; Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003; Ayscough, 2004).



[nach: Seedorf et al., 1994; Carlier et al., 2000; Jarousse und Kelly, 2001; Schafer, 2002; Kocholchuk und Banting; 2003; Yarar et al., 2005]

**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einzelner Schritte und funktionell wichtiger Proteine der Clathrin-vermittelten Endozytose.** (A) Die Clathrin-vermittelte Endozytose erfordert das aufeinanderfolgende Zusammenspiel unterschiedlicher Proteine und der Aktin-Dynamik. (B) Eine Vielzahl von Proteinen kann durch Protein-Protein-Interaktionen eine Verknüpfung zwischen Komponenten der endozytotischen Maschinerie und dem Aktin-Zytoskelett sowie der Dynamik von Aktin-Strukturen herstellen (Profilin: Witke et al., 1998; Cortactin: Uruno et al., 2001; Cao et al., 2003; Zhu et al., 2005; Syndapin: Qualmann und Kelly, 2000; Intersectin: Hussain et al., 2001; Yamabhai et al., 1998; Grb2: Carlier et al., 2000; Kempiak et al., 2005; Myosin VI: Buss et al., 2002).

Die Abschnürungsreaktion der Clathrin-umhüllten Vesikel wird durch die Rekrutierung der GTPase Dynamin und die damit einhergehende Assemblierung von Aktin vermittelt (Abb. 2.2 A, B; Merrifield et al., 2002; zur Übersicht: Hinshaw, 2000). Dynamin kann ringförmige helikale Polymere am Hals von Membraneinstülpungen bilden, aus denen Prolin-reiche Domänen zur vielfältigen Interaktion mit SH3-Domänen enthaltenen Proteinen herausragen (zur Übersicht: Urrutia et al., 1997; Orth und McNiven, 2003). Eine Interaktion von mAbp1 mit Dynamin konnte *in vivo* gezeigt werden (Kessels et al., 2001). Des Weiteren weist die Co-Lokalisation von mAbp1 und Dynamin in neuronalen und nicht neuronalen Zellen und die gleichzeitig mögliche Interaktion von mAbp1 mit F-Aktin auf eine verknüpfende Funktion von mAbp1 zwischen endozytotischen Vorgängen und dem Aktin-Zytoskelett hin (Kessels et al., 2001). Durch Überexpression der Dynamin-bindenden SH3-Domäne von mAbp1 wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Interaktion von mAbp1 mit Dynamin und der Rezeptor-vermittelten Endozytose bestätigt (Kessels et al., 2001).

Zur Weiterleitung der endozytotischen Signale an das Zytoskelett konnten Proteine identifiziert werden, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Die erste Gruppe kann eine verknüpfende Funktion zwischen Dynamin und der Aktin-Zytoskelett-Dynamik übernehmen, wie z.B. mAbp1 (Kessels et al., 2001; Mise-Omata et al., 2003), wohingegen die zweite Gruppe eine Verknüpfung zwischen der Clathrin-Hülle und dem Aktin-Zytoskelett herstellen kann, wie z.B. Hip1R (Engqvist-Goldstein et al., 2001; Legendre-Guillemain et al., 2005; Abb. 2.2 B).

In zahlreichen früheren Studien wurde postuliert, dass mAbp1 als Adapterprotein an der Formierung eines Komplexes beteiligt ist, der durch Umordnung von Aktin-Strukturen eine Kraftentwicklung induzieren kann, die die Abschnürung der Vesikel vom Zellcortex und den Vesikeltransport in der Zelle vermittelt (Abb. 2.2 B; Kessels et al., 2001; Merrifield et al., 2002; Mise-Omata et al., 2003; Zhu et al., 2005; zur Übersicht: Mousavi et al., 2004). In Hefe konnte ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen der endozytotischen Internalisierung und der durch Abp1p regulierbaren Arp2/3-vermittelten F-Aktin-Assemblierung gezeigt werden (Goode et al., 2001; zur Übersicht: Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003). Abp1p ist in einer späten Phase der Internalisierung bei der ins Zellinnere gerichteten Bewegung der *patches* wichtig, in der die maximale Aktin-Rekrutierung in diese Bereiche erfolgt (Kaksonen et al., 2003).

mAbp1 ist sowohl an der Plasmamembran als auch in der Nähe des Zellkerns in Bereichen des Golgi-Apparates lokalisiert (Kessels et al., 2000; Fucini et al., 2002; Xu und Stamnes, 2006). Die durch ARF (*ADP-ribosylation factor*)-Aktivierung induzierte Rekrutierung von

mAbp1 und Aktin an die Golgi Membran weist auf eine funktionelle Bedeutung von mAbp1 in Abhängigkeit der Aktin-Dynamik nicht nur in der Abschnürung endozytotischer Vesikel sondern auch im vesikulären Proteintransport am Golgi-Apparat hin (Fucini et al., 2002). Die Lokalisation von Dynamin, Cortactin und dem Arp2/3-Komplex am Golgi-Apparat zeigt, dass ähnliche funktionelle Mechanismen in Golgi-Transport- und endozytotischen Prozessen von Bedeutung sind (McNiven et al., 2000; zur Übersicht: Hinshaw et al., 2000; Luna et al., 2002; Cao et al., 2005; Kessels und Qualmann, 2005).

Zusammenfassend weisen die beschriebenen Studien auf eine funktionelle Bedeutung des Adapterproteins mAbp1 in Säugern und Abp1p in Hefe in endozytotischen und intrazellulären Transport-Prozessen hin, die für eine Vielzahl zellulärer Mechanismen erforderlich sind.

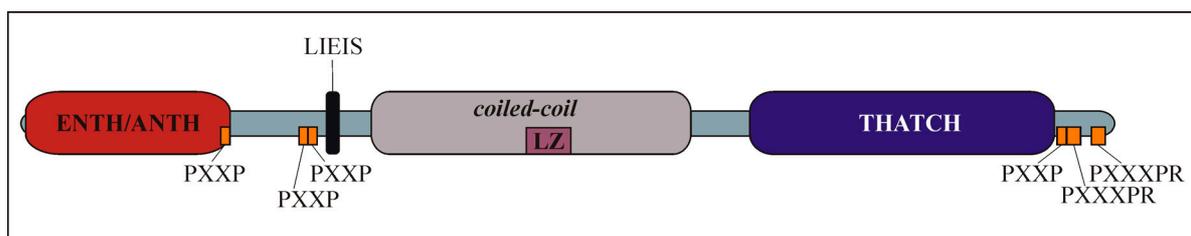
### **2.3. Das Adapterprotein Hip1R und die funktionelle Bedeutung in der Clathrin-vermittelten Endozytose**

Die Deletion von *ABPI* in Kombination mit *loss-of-function* Mutationen in anderen Genen weist auf eine Abhängigkeit der Funktion von Abp1p vom *suppressor of actin* (*SAC6*), dem Hefe Ortholog von Fimbrin, dem Protein *synthetic lethal with ABPI* (*SLA*) 1, einem endozytotischen Adapterprotein, und *SLA2*, dem Hefe Ortholog des *Huntingtin interacting protein 1* (Hip1) und des *Huntingtin interacting protein 1-related* (Hip1R) in Säugern, hin. Diese Proteine zeigen redundante Funktionen in Prozessen der Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Holtzman et al., 1993).

Das in vielen murinen Geweben exprimierte Protein Hip1R spielt eine Rolle in endozytotischen Prozessen und ist aufgrund einer ähnlichen Aminosäuresequenz (56% Homologie) verwandt mit Hip1 (Holtzman et al., 1993; Seki et al., 1998; Engqvist-Goldstein et al., 1999). Hip1 interagiert mit Huntingtin und ist involviert in die Pathologie der fatalen neurodegenerativen Erkrankung Chorea Huntington (zur Übersicht: Davies und Ramsden, 2001). Hip1 und Hip1R zeigen teilweise überlappende Funktionen, da die doppelte Defizienz von Hip1 und Hip1R zu einer Verstärkung des Phänotyps Hip1-defizienter Mäuse führt (Hyun et al., 2004).

Proteine der Sla2/Hip1-Familie zeigen eine stark konservierte Struktur mit zahlreichen Interaktionsdomänen. Am N-Terminus von Hip1R befindet sich eine *epsin N-terminal homology* (ENTH)-Domäne (Abb. 2.3), die mit Membranphospholipiden interagiert (Engqvist-Goldstein et al., 1999; Engqvist-Goldstein et al., 2001; Hyun et al., 2004). Die

ENTH-Domäne in Hip1 und Hip1R wird aufgrund einer größeren Homologie zu der N-terminalen Domäne in AP180 auch als ANTH (*AP180 N-terminal homology*)-Domäne bezeichnet (Hyun et al., 2004, b). Zentral gelegen kommt eine putative *coiled-coil* Region mit einem kurzen Leucinzipper vor (Abb. 2.3). Diese Region vermittelt zum einen Homo- und Heterodimerisierungen und zum anderen eine Interaktion von Hip1R und Hip1 mit Clathrin leichten Ketten (LC, *light chain*). Diese Interaktion ermöglicht die positive Regulation der Clathrin-Assemblierung *in vitro* durch Hip1R und Hip1 (Engqvist-Goldstein et al., 2001; Chen et al., 2005; Legendre-Guillemain et al., 2005). Werden Hip1R oder Clathrin LC überexprimiert, so führt dies zu einer diffusen subzellulären Verteilung des jeweils anderen Interaktionspartners (Engqvist-Goldstein et al., 2001). C-terminal liegt ein helikales Talin-ähnliches Modul (I/LWEQ) vor, das die F-Aktin-Bindung vermittelt (Abb. 2.3; McCann und Craig, 1997; Engqvist-Goldstein et al., 2001; Legendre-Guillemain et al., 2002). Dieses Modul wird auch als Talin-HIP1/R/Sla2p *actin-tethering C-terminal homology* (THATCH)-Domäne bezeichnet (Brett et al., 2006). Hip1R enthält im Bereich des N-Terminus drei PXXP-Sequenzen und hinter der THATCH-Domäne am C-Terminus eine PXXP- und zwei PXXXPR-Konsensussequenzen mit potentiellen SH3-Bindungseigenschaften (Abb. 2.3; Connert, 2003; Kowanetz et al., 2004). In Hip1R liegt zwischen der ENTH/ANTH- und der *coiled-coil* Domäne ein LIEIS-Sequenzmotiv vor, dass im Vergleich zur Clathrin Box-Konsensussequenz (LMDMD) von Hip1 (Metzler et al., 2001) eine stark verringerte Bindungspräferenz für Clathrin HC aufweist (Abb. 2.3; Legendre-Guillemain et al., 2002).



**Abbildung 2.3: Domänen und Sequenzmotive von Hip1R zur Interaktion mit Proteinen und Lipiden.** Dargestellt sind die ENTH/ANTH-Domäne (*epsin/AP180 N-terminal homology domain*, rot), die LIEIS-Sequenz (schwarz), die *coiled-coil* Domäne (grau) mit einem Leucinzipper (violett) und die THATCH-Domäne (Talin-HIP1/R/Sla2p *actin-tethering C-terminal homology*, dunkelblau) von Hip1R sowie vier potentielle SH3-Interaktionsregionen mit der Sequenz PXXP und zwei mit der Sequenz PXXXPR (orange; Engqvist-Goldstein et al., 1999; Engqvist-Goldstein et al., 2001; Metzler et al., 2001; Brett et al., 2006).

Hip1R ist eine stabile Komponente von Clathrin-umhüllten Vesikeln und *pits*, co-lokalisiert mit Clathrin, AP-2 und endozytiertem Transferrin und zeigt eine ähnliche räumliche und zeitliche Rekrutierung wie Clathrin am Zellcortex und in der perinuklearen Region (Engqvist-Goldstein et al., 1999; Engqvist-Goldstein et al., 2001). Hip1R liegt als parallel ausgerichtetes Dimer vor. An einem Ende des langgestreckten Dimers bilden die ENTH/ANTH-Domänen und am anderen Ende die Talin-ähnlichen Domänen jeweils zwei Köpfe. Auf diese Weise kann Hip1R F-Aktin und Clathrin Moleküle binden und so höhere Ordnungsstrukturen vermitteln. Geordnete Komplexe können dann über Hip1R mit der Membran interagieren (Engqvist-Goldstein et al., 2001). Clathrin umhüllte *pits* können auf diese Weise mit F-Aktin am Zellcortex verknüpft werden (Bennett et al., 2001; zur Übersicht: Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003). Eine Reduktion der Hip1R-Expression durch RNA-Interferenz in HeLa Zellen führt zu einer stabilen Assoziation von Clathrin-umhüllten Strukturen mit Dynamin, Aktin, dem Arp2/3-Komplex und dessen Aktivator Cortactin anstelle einer Zerstörung der Assoziation zwischen Komponenten der Endozytose und des Zytoskeletts. Diese Beobachtung geht einher mit einer defekten Transferrin-Internalisierung in diesen Zellen (Engqvist-Goldstein et al., 2004). Fibroblasten aus Hip1R-defizienten Mäusen zeigen dagegen keine Defekte bei konstitutiven und stimulatorischen Clathrin-vermittelten Transportprozessen. Diese Analysen weisen darauf hin, dass Hip1 oder andere Komponenten der Clathrin-vermittelten Endozytose die Hip1R-Defizienz in Mäusen kompensieren können (Hyun et al., 2004).

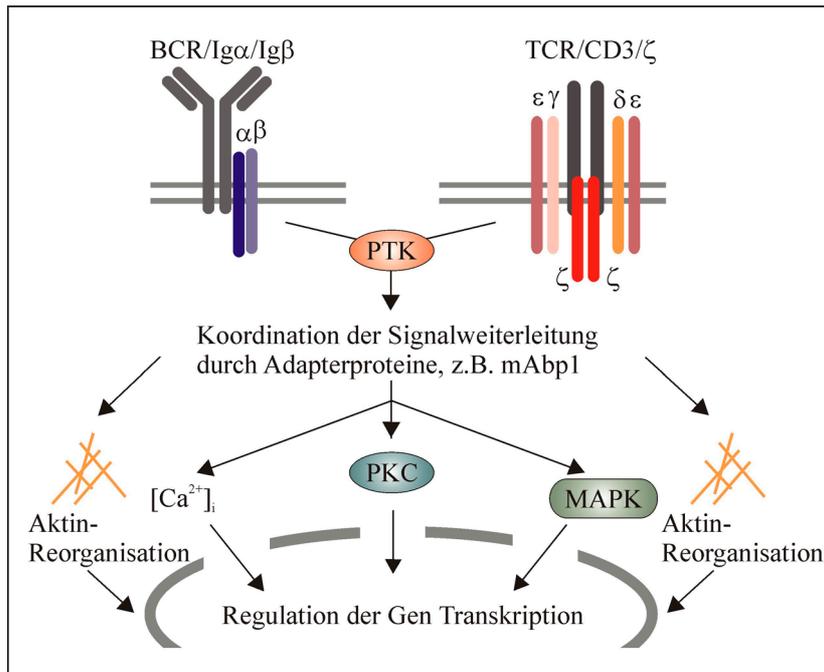
Zusammenfassend deuten die beschriebenen Studien darauf hin, dass Hip1R für die funktionelle Interaktion zwischen F-Aktin und Proteinen der endozytotischen Maschinerie essentiell ist. Die stabile Assoziation dieser Strukturen und das Auftreten anomaler Zytoskelett-Formationen und Zellmorphologien deuten des weiteren auf eine Funktion von Hip1R als negativer Regulator der F-Aktin-Assemblierung hin (Engqvist-Goldstein et al., 2004; zur Übersicht: Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003).

## **2.4. Intrazelluläre Signalweiterleitung in B- und T-Lymphozyten nach Stimulation des Antigenrezeptors**

### **2.4.1. Intrazelluläre Signalübertragung in Lymphozyten und die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts in diesem Prozess**

Die Aktivierung der B- und T-Zelle nach Stimulation des B-Zell-Antigenrezeptors durch Antigenbindung und des T-Zell-Antigenrezeptor-Komplexes durch Bindung an den MHC-Peptid-Komplex erfolgt durch die regulierte Phosphorylierung und Aktivierung einer Vielzahl von intrazellulären Signalmolekülen. Zu diesen gehören Proteintyrosinkinasen und Adapterproteine wie z.B. mAbp1, die die kontrollierte Rekrutierung in funktionelle Signalkomplexe vermitteln. Die Signalkaskade führt über die Aktivierung der Proteinkinase C, der Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, der Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade und der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts u.a. zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B, NFAT und AP-1 und deren Translokation in den Nukleus (Abb. 2.4). Diese Transkriptionsfaktoren vermitteln eine spezifisch veränderte Gentranskription, die schließlich zur Proliferation, Differenzierung oder Apoptose der B- und T-Zellen sowie zur Cytokin- und Cytotoxin-Ausschüttung in T-Zellen führen kann (zur Übersicht: Penninger und Crabtree, 1999). Die Stimulation der Antigenrezeptoren von B- und T-Zellen führt zur Aktin-Zytoskelett abhängigen Ansammlung von Antigenrezeptoren und Signalmolekülen in als *lipid rafts* bezeichneten Sphingolipid- und Cholesterol-reichen Mikrodomänen der Plasmamembran, die für eine vollständige Funktion und regulierbare Antwort der Lymphozyten nach Stimulation erforderlich ist (zur Übersicht: Pierce, 2002; Meiri, 2005). Trotz Beteiligung von teilweise unterschiedlichen Proteinen weisen diese Vorgänge viele Gemeinsamkeiten in B- und T-Zellen auf (zur Übersicht: Reth und Wienands, 1997; Kurosaki, 1999; Niiro und Clark, 2002).

Die strukturelle und funktionelle Regulation der Signaltransduktion nach Antigenrezeptor-Stimulation erfordert die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts (Holsinger et al., 1998; Hao und August, 2005; zur Übersicht: Sechi et al., 2002; Sechi und Wehland, 2004). In B-Zellen konnte eine essentielle Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts auf die Amplitude und Dauer des Signals nach BCR-Antigenstimulation beschrieben werden. Diese Regulation wird erreicht durch die kontrollierte Aktin-Depolymerisation, die die Bildung und Erhaltung von *lipid rafts* begünstigt (Hao und August, 2005).



**Abbildung 2.4: Intra-zelluläre Signalweiterleitung nach BCR- oder TCR-Stimulation.** Nach Stimulation des BCR oder TCR erfolgt die Signalweiterleitung u.a. über die Aktivierung von Proteintyrosinkinasen (PTK) und die Koordination durch Adapterproteine. Die Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der MAP Kinase (MAPK) Kaskade sowie die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts führen zu einer veränderten Gentranskription der Zelle.

[nach: Leo et al., 2002; Sechi et al., 2002; Abraham und Weiss, 2004]

In T-Zellen ist die dynamische Organisation des Aktin-Zytoskeletts sowohl in die Polarisation der T-Zelle in Richtung der *antigen-presenting cell* (APC) und die Formierung einer Kontaktstelle zwischen dem TCR und dem MHC auf der APC als auch in der regulatorischen und strukturellen Signalweiterleitung zur Aktivierung involviert (Gomez et al., 2005; zur Übersicht: Dustin und Cooper, 2000; Fuller et al., 2003; Sechi und Wehland, 2004). Viele Signalmoleküle und Komponenten von Lymphozyten-Antigenrezeptorkomplexen assoziieren mit Komponenten des Zytoskeletts und sind für die Induktion der Aktin-Polymerisation erforderlich (Rozdzial et al., 1995; Cox et al., 1996; zur Übersicht: Penninger und Crabtree, 1999; Miletic et al., 2003).

Die Clathrin-vermittelte Endozytose spielt sowohl bei der Internalisierung des T-Zell-Antigenrezeptors als auch des B-Zell-Antigenrezeptors nach Stimulation eine Rolle (zur Übersicht: Brodsky et al., 2001). Die Endozytose des BCR-Antigen-Komplexes ist ein wichtiger Mechanismus zur Prozessierung und Präsentation des Antigens auf der Zelloberfläche. Die Expression des TCR auf der Zelloberfläche unterliegt einem ständigen dynamischen Prozess in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes, der durch Regulation von Synthese, Endozytose, Recycling und Degradation beeinflusst wird (Liu et al., 2000; zur Übersicht: Alcover und Alarcon, 2000; Geisler, 2004).

#### 2.4.2. Die Bedeutung von mAbp1 als Adapterprotein in der Signalweiterleitung in Lymphozyten

Eine funktionelle Bedeutung von mAbp1 in der Signaltransduktion in B- und T-Zellen konnte durch Phosphorylierungsstudien und dem Nachweis von Interaktionspartnern, die für Signaltransduktionsprozesse wichtig sind, gezeigt werden (Larbolette et al., 1999; Han et al., 2003; Le Bras et al., 2004; Han et al., 2005).

mAbp1 wird nach BCR Stimulation durch Src und Syk Familien Kinasen phosphoryliert (Larbolette et al., 1999). Die gleichzeitige Interaktion mit F-Aktin und PRD-enthaltenden Proteinen weist auf eine mögliche Funktion von mAbp1 als Adapterprotein zur Verknüpfung der stimulationsabhängigen Aktivierung von Proteintyrosinkinasen und der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zur Signalweiterleitung hin (Larbolette et al., 1999).

Die Interaktion von humanem mAbp1 mit HPK1, einem Mitglied der MAPK Kinase Kinase Kinase Familie, und mit der Syk Familien-Kinase ZAP-70 nach TCR-Stimulation deuten des weiteren darauf hin, dass die regulierbare Weiterleitung von extrazellulären Signalen ins Innere der Zelle über das Adapterprotein mAbp1 erfolgen kann (Ensenat et al., 1999; Han et al., 2003). Die Interaktion mit HPK1 erhöht deren Kinase-Aktivität und führt so zu einer positiven Regulation der *c-Jun N-terminal kinase 1* (JNK1) Signalkaskade. Damit übereinstimmend konnte in T-Zellen, deren Level an mAbp1 durch RNA-Interferenz reduziert wurde, eine verminderte HPK1-Aktivierung und damit einhergehend eine abgeschwächte JNK-Aktivierung nach TCR-Stimulation beobachtet werden (Han et al., 2003). Die Aktivierung der MAP-Kinase ERK bleibt in diesen Zellen jedoch unbeeinflusst. Die SH3-Domäne von mAbp1 interagiert des weiteren mit PRAM-1 und zeigt abhängig von ihrer Abspaltung durch Caspase 3 eine Bedeutung in der PRAM-1-vermittelten JNK Aktivierung (Chen et al., 2001; Denis et al., 2005).

Neben der Adapterfunktion von mAbp1 bei der Signalweiterleitung in T-Zellen konnte eine Funktion bei Aktin-dynamischen Prozessen der T-Zelle nach Stimulation gezeigt werden. mAbp1 liegt in der T-Zelle nach Stimulation in *lipid rafts* als Komponente der immunologischen Synapse co-lokalisiert mit WASP vor (Han et al., 2003; Le Bras et al., 2004). Des weiteren kann mAbp1 mit dem in T-Zellen, Mastzellen und Monozyten exprimierten Protein Fyb interagieren (Yuan et al., 2005). Da Fyb nach TCR Stimulation einen Komplex mit WASP, VASP, Arp2/3, Nck und SLP-76 bildet, kann die Interaktion von mAbp1 mit Fyb eine funktionelle und/oder regulatorische Funktion bei der Verknüpfung von Signaltransduktion und Aktin-Dynamik haben (Veale et al., 1999; Krause et al., 2000; Yuan et al., 2005). Überexpressionsstudien zeigten eine Funktion von mAbp1

als negativer Regulator bei der Herunterregulierung des TCR/CD3-Komplexes nach Stimulation (Le Bras et al., 2004).

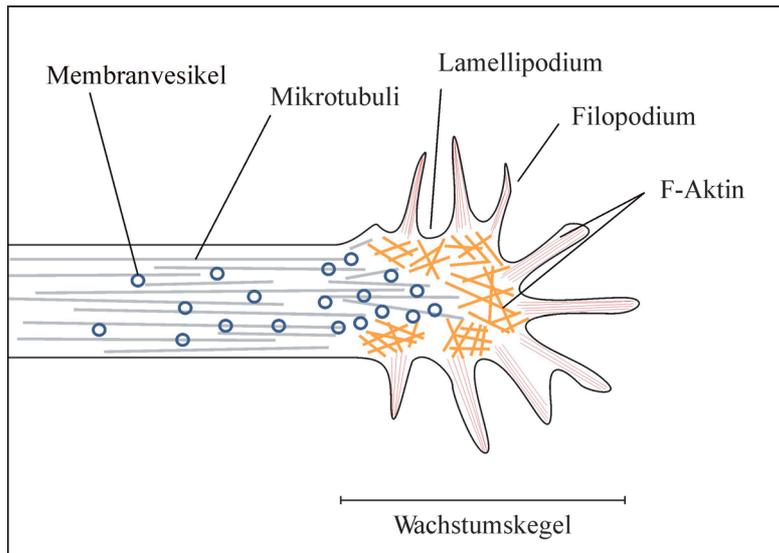
Das Adapterprotein mAbp1 kann sowohl bei der Signaltransduktion als auch bei endozytotischen und zellulären Transportprozessen in Lymphozyten von funktioneller Bedeutung sein. Durch Interaktion mit einer Vielzahl von Bindepartnern können diese zellulären Mechanismen mit der dynamischen Organisation des Zytoskeletts in Lymphozyten verknüpft werden.

## **2.5. Neuritenwachstum und Signalübertragung zwischen Nervenzellen**

### **2.5.1. Die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts beim Wachstum von Neuriten**

Die Co-Lokalisation von Aktin-assoziierten Proteinen wie Cortactin, ADF/Cofilin und mAbp1 mit Aktin in Wachstumskegeln von Neuronen deutet auf eine Bedeutung der Aktin-Dynamik und auf eine Beteiligung dieser Proteine bei der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts beim Wachstum von Neuriten hin (Du et al., 1998; Kessels et al., 2000; zur Übersicht: Dent und Gertler, 2003).

Neurone sind hochorganisierte Einheiten des Nervensystems, die an den Dendriten empfangene Informationen durch die Zelle über das Axon weiterleiten. Das Wachstum von Neuriten erfordert wie andere zelldynamische Prozesse, unter anderem die Formation von Lamellipodien und Filopodien, die Insertion von Membrankomponenten und die regulierte Aktin-vermittelte Ausdehnung (Abb. 2.5; zur Übersicht: Dent und Gertler, 2003; Orth und McNiven, 2003). Am distalen Ende von Neuriten befinden sich hochorganisierte und dynamische Strukturen, sogenannte Wachstumskegel, die die Bildung von Neuriten vorantreiben. An diesen Stellen erfolgt durch ein reguliertes Zusammenspiel und die Reorganisation des Aktin- und des Mikrotubuli-Zytoskeletts die Inkorporation von im Zellkörper neu synthetisierten Membrankomponenten und das zielgerichtete Wachstum von Neuriten (Abb. 2.5; Lockerbie et al., 1991; Tanaka und Sabry, 1995; Zakharenko und Popov, 1998; zur Übersicht: Dent und Gertler, 2003).



[nach: Dent und Gertler, 2003; Gungabissoon und Bamberg, 2003]

**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der verschiedenen Elemente des Zytoskeletts in neuronalen Wachstumskegeln.** F-Aktin-Bündel bilden lang ausgestreckte Filopodia, wohingegen ein Netzwerk aus F-Aktin die Formierung von Lamellipodien vermittelt. Das Zentrum des Wachstumskegels enthält Mikrotubuli, die den Transport von Membranvesikeln in die periphere Region ermöglichen.

Die Dynamik von Fibroblasten und das Wachstum von Neuriten scheinen viele gemeinsame charakteristische Elemente aufzuweisen (zur Übersicht: Gungabissoon und Bamberg, 2003). Die regulierte Ausstülpung und Bewegung von Wachstumskegeln bedarf eines koordinierten Zusammenspiels von Aufbau und Zerstörung von Filopodien und Lamellipodien in der zentralen Region, die durch verschiedene hochdynamische Aktin-Filamente gebildet werden (zur Übersicht: Nikolic, 2002; Dent und Gertler, 2003; Gungabissoon und Bamberg, 2003). Diese dynamischen Prozesse, die das Wachstum von Neuriten ermöglichen, können durch Aktin- und Mikrotubuli-assoziierte Proteine vermittelt werden, die in Neuronen vielfach stark exprimiert werden, wie z.B. ADF/Cofilin (zur Übersicht: Dent und Gertler, 2003).

### 2.5.2. Struktur der neurologischen Synapse und der Zyklus synaptischer Vesikel unter Berücksichtigung der funktionellen Bedeutung von mAbp1

Synapsen sind asymmetrische Zell-Zell-Kontakte zur Kommunikation zwischen Neuronen. Die Signalweiterleitung erfolgt durch schnelle, effiziente und regulierbare Transmitterfreisetzung aus synaptischen Vesikeln im Bereich der aktiven Zone der Präsynapse (Zytomatrix an der aktiven Zone, CAZ) in den synaptischen Spalt zur Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran. Die CAZ der Präsynapse liegt genau gegenüber der postsynaptischen Seite der Synapse, die ebenfalls eine komplizierte Zytomatrix umfasst, die als *post synaptic density* (PSD) bezeichnet wird. In der Präsynapse werden der *recycling* und der *reserve pool* synaptischer Vesikel in Abhängigkeit ihrer Lokalisation in der Präsynapse und Verfügbarkeit zur Transmitter-

Ausschüttung unterschieden. Diese Vesikel enthalten das transmembrane Strukturprotein Synaptophysin 1 (Jahn et al., 1985; McMahon et al., 1996; zur Übersicht: Dresbach et al., 2001). Die von der aktiven Zone entfernt lokalisierten Vesikel des *reserve pools* sind mit Synapsin assoziiert und können stimulationsabhängig über Synapsin mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft werden (Hirokawa et al., 1989; Takei et al., 1995). Nach Ausschüttung synaptischer Vesikel durch Exozytose müssen Vesikelmembran und Proteine wiedergewonnen werden. Dieser Recycling-Prozess kann u.a. sowohl durch kompensatorische Clathrin-vermittelte Endozytose als auch durch Einstülpung großer Membranbereiche erfolgen (Heuser und Reese, 1973; Takei et al., 1996; Teng und Wilkinson, 2000). Ein alternativer oder parallel existierender Weg des Endozytose/Exozytose-Gleichgewichts ist die Clathrin-unabhängige *kiss and run*-Methode (zur Übersicht: Fesce et al., 1994; Gundelfinger et al., 2003; Royle und Lagnado, 2003).

Ein Aktionspotential bewirkt die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und löst so die Exozytose von Neurotransmittern aus. Synaptotagmin ist ein wichtiger  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor für die Exozytose in Synapsen. Auch die Endozytose synaptischer Vesikel ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Prozess, der durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Komplex aus der Phosphatase Calcineurin und Dynamin 1 als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor vermittelt wird (Marks und McMahon, 1998; Lai et al., 1999; zur Übersicht: Chapman, 2002; Gundelfinger et al., 2003; Jarousse und Kelly, 2001).

Zur Aufrechterhaltung der dynamischen Zusammensetzung der postsynaptischen Membran und zur Aufrechterhaltung des Pools an Neurotransmitter-Rezeptoren müssen Recyclingwege an der Postsynapse stattfinden, die internalisierte Rezeptoren aus endosomalen Recyclingpools wieder an die Plasmamembran bringen (zur Übersicht: Melikian, 2004).

mAbp1 ist sowohl in der Prä- als auch in der Postsynapse lokalisiert und interagiert mit Proteinen der Synapse (Tab. 2.1; Fenster et al., 2003; Qualmann et al., 2004). Sowohl die Interaktionen mit strukturell und funktionell wichtigen Proteinen der Synapse als auch die Co-Lokalisation mit Dynamin an Aktin-reichen Stellen während der Synaptogenese in primären Neuronen (Kessels et al., 2001; zur Übersicht: Hinshaw, 2000) deutet auf eine Bedeutung von mAbp1 bei der Rekrutierung und Verknüpfung des Zytoskeletts mit der synaptischen Aktivität sowohl in der Prä- als auch in der Postsynapse hin.

**Tabelle 2.1: Interaktionspartner von mAbp1 in neuronalen Synapsen.**

Interaktionspartner	synaptische Lokalisation	Interaktionsmodus	vermutete Funktionsbereiche	Referenzen
Dynamin	Synapse	mAbp1[SH3]: Dynamin [PRD]*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• funktionelle und/oder strukturelle Verknüpfung des Aktin-Zytoskeletts</li> </ul>	Kessels et al., 2001; Connert et al., 2006; zur Übersicht: Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003
Piccolo	Präsynapse	mAbp1[SH3]: Piccolo [Q-Domäne]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• strukturelle Verknüpfung des <i>reserve pools</i> synaptischer Vesikel mit der CAZ über das Aktin-Zytoskelett</li> <li>• dynamische Regulation des Aktin-Zytoskeletts bei der Endozytose synaptischer Vesikel</li> </ul>	Cases-Langhoff et al., 1996; Fenster et al., 2003; zur Übersicht: Dresbach et al., 2001; Gundelfinger et al., 2003
ProSAP1/ Shank2; ProSAP2/ Shank3	Postsynapse	mAbp1[SH3]: ProSAP/Shank [PRD]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulation der postsynaptischen Dynamik durch Interaktion mit F-Aktin und diesen Gerüstproteinen</li> </ul>	Boeckers et al., 1999; Qualmann et al., 2004; zur Übersicht: Sheng und Sala, 2001

\* vermuteter Interaktionsmodus

## 2.6. Die BALB/c mAbp1-defiziente Mauslinie

In Studien zur Lokalisation und Funktionalität des F-Aktin-bindenden Adapterproteins mAbp1 in verschiedenen Zelllinien zeigte sich vielfach ein Einfluss von mAbp1 auf Signalweiterleitungsprozesse (Ensenat et al., 1999; Larbolette et al. 1999; Han et al., 2003) und auf zelluläre Mechanismen, die sich durch eine hohe Dynamik der Zelle und einer damit verbundenen Reorganisation von F-Aktin auszeichnen, wie Wachstumsprozesse (Kessels et al., 2000) und endozytotische Vorgänge (Kessels et al., 2001; Mise-Omata et al., 2003). Die funktionelle Bedeutung kann in verschiedenen Zelltypen durch regulierbare Sets von SH3-Domänen-gebundenen Interaktionspartnern vermittelt werden, die häufig gewebespezifisch exprimiert werden (Kessels et al., 2001; Fenster et al., 2003; Hou et al., 2003; Qualmann et al., 2004). Zur weiterführenden Charakterisierung der Funktionalität von mAbp1 *in vivo*, welche an die Ergebnisse der beschriebenen Studien in Zelllinien anknüpft, steht im Rahmen dieser Arbeit eine BALB/c mAbp1-defiziente Mauslinie zur Verfügung, die Analysen zur Funktionalität von mAbp1 am gesamten Organismus und unter Defizienz von mAbp1 ermöglicht. Diese Mauslinie wurde durch Deletion der Exons 2 und 3 mittels homologer Rekombination in BALB/c embryonalen Stammzellen generiert (Connert, 2003).

### 3. Zielsetzung dieser Arbeit

Zur Charakterisierung der Funktion des Adapterproteins mAbp1 *in vivo* wurde die in unserer Abteilung generierte mAbp1-defiziente Mauslinie auf Organ- und Verhaltensdefekte hin untersucht.

Aufgrund der hohen Expression von mAbp1 in lymphatischen und neuronalen Geweben sollten insbesondere immunologische Funktionen und motorische und koordinative Fähigkeiten untersucht werden.

Zur Analyse lymphatischer Gewebe sollte im Rahmen meiner Arbeit die Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten mittels durchflusscytometrischer Analysen der verschiedenen B- und T-Zell-Populationen in Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und Milz untersucht werden. Analysen zur Funktionalität von B-Zellen der Milz sollten anhand von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisationsstudien durchgeführt werden. Durch Verwendung des Durchflusscytometers LSR II (BD Biosciences, Heidelberg) war die simultane Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation getrennt nach folliculären, T1- und T2/MZ- B-Zellen möglich.

Zur Charakterisierung möglicher neuronaler Defizite sollte ein Verhaltensprofil durch Analyse der Schwimmbewegung und Fußabdruck-Geometrie während der Laufbewegung sowie durch die sensiblen Verhaltenstests der Laufrad-Analyse (*Rotarod*) und der Balancierfähigkeit erstellt werden. Die Funktionalität von Neuronen sollte durch die Analyse des Neuritenwachstums von primären Cerebellum-Neuronen aus mAbp1-defizienten und wildtypischen Mäusen erfolgen.

Zur weiteren Charakterisierung der strukturellen und molekularen Eigenschaften von mAbp1 in verschiedenen Geweben sollte die *in vivo*-Interaktion von mAbp1 mit anderen Proteinen untersucht werden. Aufgrund von Vorarbeiten lag der besondere Fokus auf der *in vivo*-Analyse der Interaktion von mAbp1 mit Hip1R in neuronalen Zellen und B-Zellen. Des Weiteren sollte die Stimulationsabhängigkeit dieser Interaktion in B-Zellen analysiert werden, da mAbp1 als Substrat von Proteintyrosinkinasen identifiziert werden konnte (Larbolette et al., 1999).

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Materialien, Chemikalien, Agenzien

Chemikalien und Agenzien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Dreieich) und Merck (Darmstadt), Zellkultur-Zubehör und Plastikwaren von den Firmen Greiner Labortechnik GmbH (Solingen), Eppendorf (Hamburg), Nunc (Wiesbaden), Braun (Melsungen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Die verwendeten Medien und Medienzusätze wurden von der Firma Gibco/Invitrogen (Karlsruhe) erworben. Speziell verwendete Materialien sind an entsprechender Stelle angegeben.

#### 4.1.2. Allgemein verwendete Puffer

**PBS:** 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**PBS-T:** PBS mit 0,1% Tween 20

**TBS:** 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl

**TBS-T:** TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20

Spezielle Puffer werden bei der dazugehörigen Methode beschrieben.

#### 4.1.3. Antikörper

**Tabelle 4.1: Verwendete Antikörper.**

Antikörper	Markierung	Hersteller	Verwendung
Kaninchen-anti-mAbp1 (pc)	UNLB	(anti-Hip-55, Mise-Omata et al., 2003)	<i>Western Blot</i> , Immunaufreinigung
Maus-anti-Hip1R (mc)	UNLB	BD Biosciences (Heidelberg)	<i>Western Blot</i> , Immunaufreinigung
Maus-anti-GFAP (mc)	Cy3	Sigma Aldrich (München)	Immunhistochemie
Ziege-anti-IgM (pc)	FITC	Southern Biotechnology (BIOZOL, Eching)	Zellmarkierungen
Ratte-anti-IgD (mc)	BIOT	Southern Biotechnology (BIOZOL, Eching)	Zellmarkierungen

Antikörper	Markierung	Hersteller	Verwendung
Ratte-anti-CD21 (mc)	FITC	BD Biosciences (Heidelberg)	Zellmarkierungen
Ratte-anti-CD23 (FcεRII) (mc)	BIOT	BD Pharmingen (Heidelberg)	Zellmarkierungen
Ratte-anti-CD24 (mc)	PE	BD Biosciences (Heidelberg)	Zellmarkierungen
Ratte-anti-CD45R/B220 (mc)	Pe-Cy7	BD Biosciences (Heidelberg)	Zellmarkierungen
Ratte-anti-CD45R/B220 (mc)	PE	BD Biosciences (Heidelberg)	Zellmarkierungen
F(ab') <sub>2</sub> Fragment anti- IgG+IgM (H+L)	UNLB	Jackson ImmunoResearch (dianova, Hamburg)	Zellstimulation
Ziege-anti-IgG	UNLB	Southern Biotechnology (BIOZOL, Eching)	Zellstimulation
Ratte-anti-CD43 (mc)	BIOT	BD Biosciences (Heidelberg)	Zellmarkierungen
Ratte-anti- <i>early B lineage</i> (mc)	FITC	BD Biosciences (Heidelberg)	Zellmarkierungen
Ratte-anti-CD4 (mc)	BIOT	BD Biosciences (Heidelberg)	Zellmarkierungen
Maus-anti-CD8 (mc)	PE	BD Biosciences (Heidelberg)	Zellmarkierungen
Hamster-anti-TCRβ <i>chain</i> (mc)	FITC	BD Biosciences (Heidelberg)	Zellmarkierungen
Kaninchen-anti- Synaptophysin 1 (pc)	UNLB	a)	Immunaufreinigung, <i>Western Blot</i>
Maus-anti-SLP-76 (mc)	UNLB	Sigma Aldrich (München)	Immunaufreinigung
Maus-anti-Adaptin α	UNLB	BD Biosciences (Heidelberg)	<i>Western Blot</i>

<b>Antikörper</b>	<b>Markierung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
Kaninchen-anti-Amphiphysin (pc)	UNLB	a)	<i>Western Blot</i>
Maus-anti-Phosphotyrosin, Klon 4G10	UNLB	Upstate (Dundee, UK), a)	<i>Western Blot</i>
Maus-anti-Synapsin Ia/Ib (mc)	UNLB	(Giovedi et al., 2004), a)	<i>Western Blot</i>
Kaninchen-anti-Synaptojanin 1 (pc)	UNLB	Synaptic Systems (Göttingen)	<i>Western Blot</i>
Maus-anti-Synaptotagmin 1 (mc)	UNLB	a)	<i>Western Blot</i>
Kaninchen-anti-Cortactin (KE-20) (pc)	UNLB	Sigma Aldrich (München)	<i>Western Blot</i>
Maus-anti-Dynamin (mc)	UNLB	BD Biosciences (Heidelberg)	<i>Western Blot</i>
Kaninchen-anti-Aktin (pc)	UNLB	Sigma Aldrich (München)	<i>Western Blot</i>
Maus-anti-Clathrin HC (mc)	UNLB	BD Biosciences (Heidelberg)	<i>Western Blot</i>
Maus-anti-GAPDH (mc)	UNLB	Chemicon (Hofheim am Taunus)	<i>Western Blot</i>

a) Der Kaninchen-anti-Synaptophysin (pc)-, der Kaninchen-anti-Amphiphysin (pc)- und der Maus-anti-Synaptotagmin 1 (mc)-Antikörper wurden freundlicher Weise von Reinhard Jahn (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.4. Sekundärantikörper

**Tabelle 4.2: Verwendete Sekundärantikörper.**

<b>Antikörper</b>	<b>Markierung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
Ziege-anti-Kaninchen IgG (pc)	HRPO	Perbio/Pierce (Bonn)	<i>Western Blot</i>
Ziege-anti-Maus IgG (pc)	HRPO	Perbio/Pierce (Bonn)	<i>Western Blot</i>

Zur Markierung von biotinylierten Antikörpern wurde Streptavidin gekoppelt mit PE-Cy5 oder Per-CP (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet.

#### 4.1.5. Oligonukleotide

**Tabelle 4.3: Verwendete Oligonukleotide.**

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Verwendung
KOgeno	GAAGAGCCTGGCATGACCTGTGC	Genotypisierung der Mäuse
KOneo	GGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGA	Genotypisierung der Mäuse
WTgeno	CTGCTGTCTACCCTCAGGCTATG	Genotypisierung der Mäuse
WTexon2	GCCAGCCACACGGATGTCATTGC	Genotypisierung der Mäuse
mbeta-Actin-s	AGCCATGTACGTAGCCATCC	Aktin-Expressionsanalysen (Kontrolle)
mbeta-Actin-as	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	Aktin-Expressionsanalysen (Kontrolle)
mAchR $\alpha$ -LC1-s	TCCCTTCGATGAGCAGAACT	AChR $\alpha$ -Expressionsanalysen
mAchR $\alpha$ -LC1-as	GGGCAGCAGGAGTAGAACAC	AChR $\alpha$ -Expressionsanalysen

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

#### 4.1.6. Mauslinien

**BALB/c:** Bei BALB/c Mäusen handelt es sich um einen Inzuchtstamm mit Albinismus. Die Mäuse haben eine weiße Fellfarbe durch unpigmentierte Haare und rote Augen.

**BALB/c *mabp1*<sup>-/-</sup>:** BALB/c *mabp1*<sup>-/-</sup> bezeichnet eine mAbp1-defiziente Mauslinie mit dem genetischen Hintergrund des BALB/c Inzuchtstamms (Sabine Connert, Dissertation, 2003). Die weitere Züchtung der *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäuse erfolgte unter Einhaltung der Zuchtkriterien eines Inzuchtstammes.

**C57BL/6:** Bei C57BL/6 Mäusen handelt es sich um einen Inzuchtstamm mit pigmentierten Haaren. Die Mäuse zeigen eine schwarze Fellfarbe.

Wildtypische Tiere, die in die laboreigene Zucht mit aufgenommen wurden, wurden von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen) bezogen.

#### **4.1.7. Verwendete Zelllinie**

**K46:** Bei der Zelllinie K46 handelt es sich um eine reife B-Zelllinie aus einem B-Zell-Lymphom, das aus BALB/c Mäusen erhalten wurde (Kim et al., 1979). Diese Zelllinie unterscheidet sich von der ursprünglich beschriebenen durch einen B-Zell-Rezeptor Klassenwechsel ( $\mu/\kappa$  zu  $\gamma 2a/\kappa$ ).

## **4.2. Methoden**

### **4.2.1. Arbeiten an Versuchstieren**

#### **4.2.1.1. Haltungsbedingungen und Züchtung von Labormäusen**

Die Mäuse wurden in einer offenen Haltung alleine oder in Gruppen bis zu drei Tieren in Makrolonkäfigen des Typs 1 (TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) gehalten. Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden möglichst konstant bei etwa  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  bzw.  $55\% \pm 15\%$  gehalten. Die Beleuchtungsdauer betrug über das gesamte Jahr 12 Stunden. Die Mäuse erhielten permanenten Zugang zu Nagetierfutter (Sniff R/M, Soest) und Leitungswasser. Die Züchtung erfolgte bei allen verwendeten Stämmen ausschließlich durch Verpaarung von Geschwistertieren (Inzucht).

#### **4.2.1.2. Sektion der Mäuse**

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Genickbruch. Für Analysen des Rückenmarks wurden Mäuse durch konstanten  $\text{CO}_2$ -Einstrom in einen geschlossenen Käfig getötet, um das Rückenmark nicht zu beschädigen. Die Entnahme der Organe erfolgte direkt im Anschluss an die Tötung.

#### **4.2.1.3. Anatomische Untersuchungen**

Es wurden sämtliche Organe der Maus im geöffneten Körper und nach der Entnahme auf offensichtliche Veränderungen wie Größe, Farbe, Form und Tumore untersucht. Routinemäßig erfolgte die Gewichtsbestimmung der Milz und des Herzens ohne Blut.

#### 4.2.1.4. Blutentnahme und Erstellung eines Blutbildes

Die Blutentnahme erfolgte aus der Augenvene der Maus nach Betäubung mit 15 µL pro g Körpergewicht Ketaset 5/Rompun (5 g/L Ketaset-5 (Selectavet, Weyam-Holzolling), 1 g/L Rompun (Bayer AG, Leverkusen)). Das Blut wurde mit Hilfe einer heparinisierten Kapillare entnommen und mit EDTA versetzt. Anschließend wurde das Tier getötet und auf Organanomalien überprüft. Das EDTA-Blut wurde zur Erstellung eines kleinen und eines Differential-Blutbildes in ein Tiermedizinisches Labor (Vet Med Labor, Ludwigsburg) geschickt. (Die Blutentnahme erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Dr. Axel Ziesenis).

#### 4.2.1.5. Rückkreuzung

Bei der Rückkreuzung wird mit einem reinen Inzucht-Mausstamm begonnen, der eine bestimmte Mutation trägt (Trägerstamm BALB/c *mabp1*<sup>-/-</sup>). Diese Mutation kann durch kontinuierliche Rückkreuzung mit einem anderen Inzucht-Mausstamm (Empfängerstamm C57BL/6 *mabp1*<sup>+/+</sup>) nach etwa 15 Generationen (N14) auf diesen anderen Mausstamm mit unterschiedlichem, aber reinen genetischen Hintergrund übertragen werden. Die erste Kreuzung zwischen einem homozygoten Tier des Trägerstammes mit einem Wildtypier des Empfängerstammes wird als F1-Generation bezeichnet. Diese Generation ist genetisch homogen. Alle weiteren Generationen werden fortlaufend mit N1 bis Nx benannt und bedürfen einer Genotypisierung, da sie nicht mehr homogen sind. Um eventuelle geschlechtsspezifische Unterschiede zu berücksichtigen, wurden zwei Rückkreuzungslinien generiert, von der eine von einer weiblichen BALB/c *mabp1*<sup>-/-</sup> und die andere von einer männlichen BALB/c *mabp1*<sup>-/-</sup> Maus ausgeht.

### 4.2.2. Verhaltensexperimente

#### 4.2.2.1. Allgemeine Untersuchungen zum Gesundheitszustand

Zur Überprüfung des physischen Allgemeinzustandes von wildtypischen, *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen wurden diese täglich vormittags einer allgemeinen Beobachtung unter besonderer Berücksichtigung von Allgemeinbefinden, Aussehen des Fells, Körperhaltung, Laufverhalten und allgemeinem Verhalten im Käfig unterzogen. Die Bestimmung des Körpergewichts erfolgte einmal wöchentlich im Rahmen dieser Untersuchung.

#### **4.2.2.2. Baumelverhalten (*clasp*ing)**

Bei der wöchentlichen Überprüfung des Baumelverhaltens wurde die Maus für maximal 60 s an ihrem Schwanz hochgehoben und die Bewegung und Position der Beine beobachtet.

#### **4.2.2.3. Laufrad-Analyse (*Rotarod*)**

Die flexible Bewegungskoordination der Vorder- und Hinterbeine sowie die Fähigkeit, Balance zu halten, wurden mittels eines Laufrades (TSE Scientific Systems, Bad Homburg) untersucht (*Rotarod*-Test; Dunham und Miya, 1957). Die Mäuse wurden bei einer konstanten Umdrehung von 14 und 26 Umdrehungen pro Minute (rpm) auf das Rad, eine Gummi-beschichtete Walze mit einem ungefähren Durchmesser von 2,5 cm, gesetzt. Die Drehrichtung des Rades ist so gewählt, dass die Mäuse vorwärts laufen müssen. Die Zeit bis zum Herunterfallen vom Laufrad wurde bestimmt. Die maximale Beobachtungszeit beträgt 300 s. Vor der Versuchsdurchführung wurden zwei Trainingsläufe durchgeführt, um artifizielle Effekte durch Lernprozesse zu minimieren. Jede Maus durchläuft anschließend fünf Testeinheiten im Abstand von zwei Tagen zur gleichen Tageszeit.

#### **4.2.2.4. Fußabdruck-Analyse**

Um Unregelmäßigkeiten im Gang der Mäuse festzustellen, wurden die Pfoten mit ungiftiger Farbe angemalt (Vorderpfoten in rot, Hinterpfoten in grün) und ein Laufabdruck auf weißem Papier erzeugt. Die Mäuse liefen einen Gang (50 cm x 10 cm x 10 cm) mit einer geschlossenen Box als Laufanreiz am Ende entlang. Fünf Parameter wurden anhand des Pfotenabdrucks analysiert: Schrittlänge, Abstand der Hinterpfoten, Abstand der Vorderpfoten, Überlappung von Vor- und Hinterpfoten und die Links-Rechts-Alteration (Auerbach et al., 2001).

#### **4.2.2.5. Kraftmessung**

Die Maus wurde während der Kraftmessung am Schwanz festgehalten und musste sich mit ihren Vorderpfoten an einem horizontal befestigten Metallstab festhalten. Die Bestimmung der maximalen Größe der Muskelkraft erfolgte durch ein konstantes, langsames Ziehen der Maus an ihrem Schwanz in einem Winkel von 45°C. Der Metallstab war an einem Dynamometer fixiert und die maximale Kraft der Vorderpfoten wurde zu dem Zeitpunkt bestimmt, an dem die Maus den Metallstab loslässt.

#### **4.2.2.6. Schwimmverhalten**

Das Schwimmverhalten der Mäuse wurde in einem Wasserbassin (240 cm x 140 cm) beobachtet. Das Bassin wurde mit 25°C warmem Wasser 12 cm tief gefüllt. Die Fähigkeit der Mäuse, koordiniert zu schwimmen, wurde für anschließende weitere Analysen für 60 s gefilmt.

#### **4.2.2.7. Balancierfähigkeit**

Motorkoordination und Balance der Mäuse wurden anhand der Fähigkeit, über einen 50 cm langen Holzstab mit einem Durchmesser von 1 cm laufen zu können, abgeschätzt. Der Holzstab wurde etwa 30 cm über einem Tisch angebracht. Als Laufanreiz diente eine geschlossene Box am Ende des Stabes. Als Maß der Balancierfähigkeit diente die Anzahl der Fehlritte von Vorder- und Hinterbeinen pro Lauf. Um die Mäuse an den Versuchsaufbau zu gewöhnen, mussten sie zwei Trainingseinheiten durchlaufen, bevor sie im tatsächlichen Versuch eingesetzt wurden. Pro Maus wurden drei Versuchsdurchläufe in wöchentlichem Abstand durchgeführt.

### **4.2.3. Zellkultivierung**

#### **4.2.3.1. Kultivierung von Suspensionszellen**

Die Kultivierung von K46 Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in gesättigter Luftfeuchtigkeit (95%). Das Kulturmedium bestand aus RPMI-Medium 1640, 5% (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptavidin und 2mM L-Glutamat. Zur Kultivierung wurden Kulturgefäße für Suspensionszellen eingesetzt.

#### **4.2.3.2. Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen**

Vor dem Einfrieren wurde die gewünschte Zellzahl einmal mit auf 4°C vorgekühltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 mL/1·10<sup>7</sup> Zellen frisch angesetztem Einfriermedium resuspendiert, je 1 mL der Zellsuspension in Cryo-Röhrchen überführt und sofort auf Eis gestellt. Die Zellen wurden bei -80°C eingefroren und bei -140°C gelagert. Zum Auftauen und wieder Inkulturnahme der Zellen wurden diese schnell bei 37°C aufgetaut und sofort zu 10 mL auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium mit 10% FCS gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 4 min zentrifugiert und das Zellpellet zur anschließenden Kultivierung in Kulturmedium mit 10% FCS aufgenommen (4.2.3.1.). Nach zwei Tagen konnte die weitere Kultivierung in Kulturmedium mit 5% FCS erfolgen.

**Einfriermedium:** RPMI-Medium 1640, 20% (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptavidin, 2mM L-Glutamat, 10% DMSO

#### 4.2.3.3. Zellzählung

Die Zählung von Zellen aus der Zellkultur und aus Geweben erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Tote Zellen konnten durch Trypanblau-Färbung sichtbar gemacht werden.

#### 4.2.4. Molekularbiologische Methoden

##### 4.2.4.1. DNA-Schnellpräparation aus Maus-Schwanzspitzen

Einer Maus wurden 2 bis 3 mm der Schwanzspitze abgeschnitten. Zur Extraktion der DNA wurde die Schwanzspitze in 300 µL Schwanzspitzenpuffer und 10 µL einer 10 mg/mL Stammlösung Proteinase K (Promega, Mannheim) über Nacht unter Schütteln bei 55°C inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte anschließend durch Inkubation bei 95°C für 10 min. Nach kurzer Zentrifugation wurde 1 µL des Überstandes als *template* für die PCR-Diagnostik (4.2.4.4.) eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Aufgrund der schnellen Präparation ohne weitere Aufreinigungsschritte eignete sich die so gewonnene DNA-Probe nur zur Amplifikation kleiner Produkte bis etwa 1000 bp.

**Schwanzspitzenpuffer:** 1 mM Tris-HCl, 5 mM KCl, 0,45% (v/v) NP 40, 0,45% (v/v) Tween 20, Lagerung bei 4°C

##### 4.2.4.2. RNA-Isolierung aus Geweben

Zur Extraktion von Total-RNA wurde frisch präpariertes oder mit flüssigem N<sub>2</sub> schockgefrorenes und bei -80°C gelagertes Gewebe eingesetzt. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte in 1 mL/100 mg Gewebe Denaturierungslösung im Ultra-Turrax. Wichtig war die ständige Kühlung des Gewebe-Homogenats. Pro 100 mg Gewebe wurden anschließend 1 mL Phenol, 200 µL Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) und 100 µL 2 M Natriumacetat, pH 4,1 hinzugegeben und mit dem Gewebe-Homogenat gut durchmischt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 10000 g und 4°C wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und mit dem gleichen Volumen -20°C kaltem Isopropanol versetzt. Zur Fällung der RNA wurde die Probe bei -20°C über Nacht inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 10000 g und 4°C gewonnen und das RNA-Pellet anschließend in 300 µL Denaturierungslösung resuspendiert. Zur erneuten Fällung wurden 300 µL -20°C

kaltes Isopropanol hinzugegeben und die Lösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht oder bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für 60 min inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 15 min bei 10000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  wurde das RNA-Pellet zweimal mit 300  $\mu\text{L}$  70% Ethanol gewaschen, vollständig getrocknet und in 50 bis 100  $\mu\text{L}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert (Chomczynski und Sacchi, 1987). An die RNA-Isolierung schloss sich eine DNase Behandlung an, um die Kontamination der RNA-Lösung durch DNA möglichst gering zu halten. Dazu wurde das *RNase-Free DNase Set* (Qiagen, Hilden) eingesetzt und nach Herstellerangaben verfahren.

**Denaturierungslösung:** 4 M Guanidinium-Isothiocyanat, 25 mM Natriumcitrat,  
pH 7,0, 0,5% (w/v) Sarcosyl

#### 4.2.4.3. Reverse Transkription

Durch retrovirale reverse Transkription (RT) kann mRNA in komplementäre DNA (cDNA) übersetzt werden. Zur Generierung der cDNA wurde das *RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Als Primer wurden oligo-dT-Primer eingesetzt, die die reverse Transkription von polyadenylierter RNA vermitteln. cDNA Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.2.4.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) können DNA-Sequenzen *in vitro* amplifiziert werden. Die flankierenden Abschnitte des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts müssen bekannt sein, um Oligonukleotide synthetisieren zu können, die an die entsprechenden Sequenzen anlagern können. Die angelagerten Oligonukleotide dienen dann als Startmoleküle für die Polymerase, die vom 3'OH-Ende des Oligonukleotids aus entlang der Matrize den komplementären DNA-Strang synthetisiert. Als DNA-Polymerase wurde die Polymerase I aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) mit einer Effizienz von 60 Basen pro Sekunde bei einem Temperaturoptimum von  $72^{\circ}\text{C}$  verwendet. Die Hitzebeständigkeit der Taq-Polymerase macht ein Erhitzen des Reaktionsansatzes auf  $94^{\circ}\text{C}$  zur Denaturierung der DNA möglich. Bei der Auswahl der Oligonukleotide wurde darauf geachtet, dass die Länge 18 bis 24 Nukleotide nicht überstieg, keine internen Sekundärstrukturen enthalten waren, der GC-Gehalt 40 bis 60 % betrug und ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen G/C und A/T reichen Regionen vorlag. Die verwendete Anlagerungstemperatur (Schmelztemperatur  $T_m$ ) für die jeweiligen Oligonukleotide wurde mit der Näherungsformel  $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{Anzahl Basen A} + \text{Anzahl$

Basen T) + 4°C x (Anzahl Basen G + Anzahl Basen C) bestimmt. Lieferte die PCR-Reaktion bei dieser Temperatur nicht die gewünschte Amplifikation des DNA-Abschnitts, wurde zur Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur eine Gradienten-PCR durchgeführt. Ein 20 µL PCR-Ansatz setzte sich zusammen aus 10 µL 2x *Taq PCR Master Mix* (Qiagen, Hilden), 0,4 µL *sense* Oligonukleotid (50 pmol/µL), 0,4 µL *antisense* Oligonukleotid (50 pmol/µL), 8,2 µL H<sub>2</sub>O und 1 µL DNA-*template*. Die eingesetzte Menge an DNA-*template* konnte je nach Konzentration der eingesetzten DNA variieren und muss gegebenenfalls optimiert werden. Die PCR wurde im *Mastercycler epgradient* (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die PCR-Reaktionsansätze wurden bis zur Analyse in der Agarose-Gelelektrophorese bei -20°C gelagert.

**Tabelle 4.4: Allgemein verwendetes PCR-Programm.**

Temperatur [°C]	Dauer	Wiederholung	Schritt
94°C	4 min	1x	initiale Denaturierung
94°C	45 s	25-35x	Denaturierung
50-65°C (abhängig von der Oligonukleotidsequenz)	45 s		Anlagerung der Oligonukleotide
72°C	abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts (60b/s)		Polymerisation
72°C	10 min	1x	Polymerisation
15°C	≥ 15 min	1x	Abkühlen der Probe

#### 4.2.4.5. *Real-time quantitative Polymerase Kettenreaktion*

Mittels der *Real-time* quantitativen Polymerase Kettenreaktion (*Real-time-PCR*) kann eine quantitative Analyse von mRNA-Expressionsunterschieden in verschiedenen Geweben erfolgen. Ein Fluoreszenzfarbstoff bindet an die neu synthetisierte doppelsträngige DNA. Durch permanente Detektion der Fluoreszenz-Emission im *LightCycler 2.0* (Roche, Grenzach-Wyhlen) kann die PCR-Reaktion in Realzeit verfolgt werden. Der *QuantiTec SYBR Green PCR Master Mix Kit* (Qiagen, Hilden) enthält den Farbstoff SYBR Green I, der

bei 494 nm angeregt wird und ein Emissionsmaximum bei 521 nm hat. Parallel wurde unter gleichen Bedingungen die Expression von Aktin quantitativ untersucht, um einen Standard zu erhalten. Relative mRNA-Level wurden dann durch Normierung auf Aktin erhalten. Die Produktgrößen betragen optimalerweise 100 bis 200 bp. Der Reaktionsansatz wurde wie unter 4.2.4.4. beschrieben zusammengesetzt. Anstelle des *2x Taq PCR Master Mix Kits* (Qiagen, Hilden) wurde jedoch der *2x QuantiTec SYBR Green PCR Master Mix Kit* (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die Entwicklung des Programms erfolgte nach den gleichen Kriterien wie unter 4.2.4.4. beschrieben. Die Zahl der Wiederholungen wurde jedoch von 25 bis 35x auf 50 bis 60x angehoben.

#### 4.2.4.6. Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe zur anschließenden Analyse voneinander getrennt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1%igen Agarosegel in TAE-Puffer mit 6 µg/mL Ethidiumbromid. Für DNA-Fragmente unter 200 bp wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Vor der Auftragung der DNA-Proben wurden diese mit 6x DNA-Auftragungspuffer versetzt. Der Gellauf erfolgte optimalerweise bei 5 V/cm Elektrodenabstand. Als Standard diente der Größenmarker *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid in die DNA ermöglichte die Analyse der DNA unter UV-Bestrahlung.

<b>6x DNA-Auftragungspuffer:</b>	10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 15% (w/v) Ficoll
<b>TAE-Puffer (50x):</b>	2 M Tris/CH <sub>3</sub> COOH, pH 7,8, 1 M CH <sub>3</sub> COOH, 1 M Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH 8,0

### 4.2.5. Proteinbiochemische Methoden

#### 4.2.5.1. Stimulation über den B-Zell-Antigenrezeptor

Die Stimulation von B-Zellen kann über die Kreuzvernetzung der B-Zell-Rezeptoren durch einen anti-Ig-Antikörper erfolgen. Die Zellen in Kultur wurden gezählt und die benötigte Zellzahl aus der Kultur entnommen. Die Zellen wurden zweimal mit 10 mL RPMI-Medium ohne Zusätze gewaschen, bevor sie bei 37°C für 30 min in RPMI-Medium ohne Zusätze inkubiert wurden. Dieser Inkubationsschritt dient der Reduktion von Phosphorylierungen zellulärer Proteine ohne Stimulation durch im FCS enthaltene Faktoren. Erfolgte

anschließend eine Protein-Analyse im *Western Blot* (4.2.5.9.) wurde eine Zelldichte von 1 bis  $2 \cdot 10^7$ /mL eingestellt. Eine anschließende Immunaufreinigung von Proteinen über spezifische Antikörper (4.2.5.7.) erforderte eine Zelldichte von  $3 \cdot 10^7$ /mL. Die Stimulation erfolgte in RPMI-Medium ohne Zusätze durch Zugabe von 10  $\mu$ g/mL anti-Maus-Ig-Antikörper. Direkt nach der Zugabe wurde die Zellsuspension vorsichtig durch Invertieren des Probengefäßes gemischt und für die gewünschte Stimulationszeit bei 37°C inkubiert. 30 s vor Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert und genau zum zuvor definierten Zeitpunkt lysiert (4.2.5.3.).

#### 4.2.5.2. Stimulation mit Pervanadat/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Die Stimulation der Zellen mit Pervanadat erfolgt durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung. Durch Pervanadat wird die Aktivität von Protein-Tyrosin-Phosphatasen inhibiert und so eine Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Substrate von Protein-Tyrosin-Kinasen ermöglicht. Ortho-Vanadat ist bereits ein Inhibitor von Protein-Tyrosin-Phosphatasen, die inhibitorische Funktion kann jedoch durch Umwandlung in Pervanadat noch deutlich erhöht werden. 100  $\mu$ L 50 mM Na-Orthovanadat und 30  $\mu$ L 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden zur Herstellung von Pervanadat/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt und bei RT für 5 min inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 520  $\mu$ L H<sub>2</sub>O wurde die Lösung verdünnt. Zur Stimulation wurden 10  $\mu$ L dieser Verdünnung pro 1 mL Zellsuspension eingesetzt (Endkonzentration 77  $\mu$ M). Alle weiteren Schritte wurden wie bei der Stimulation über den B-Zell-Antigenrezeptor beschrieben durchgeführt (4.2.5.1.).

#### 4.2.5.3. Lyse eukaryotischer Zellen

Abhängig davon, ob die Zellen vor der Lyse stimuliert wurden (4.2.5.1. und 4.2.5.2.) oder nicht, wurde der Zell-Lysispuffer oder der Zell-Lysispuffer/Stimulation verwendet. Eine Untersuchung der stimulationsabhängigen Phosphorylierung der Proteine im Zelllysate kann nur nach Lyse der Zellen mit Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und Na<sub>4</sub>MoO<sub>4</sub> enthaltenem Lysispuffer erfolgen. Durch Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und Na<sub>4</sub>MoO<sub>4</sub> werden Phosphatasen gehemmt und der Phosphorylierungszustand der Proteine bleibt erhalten. Die gewünschte Zellzahl wurde abgenommen, die Zellen pelletiert und zweimal mit RPMI-Medium ohne Zusätze gewaschen.  $1 \cdot 10^7$  bis  $3 \cdot 10^7$  Zellen wurden in 1 mL frisch angesetztem Lysispuffer lysiert und 10 min auf Eis inkubiert. Zwischendurch wurde das Probengefäß invertiert. Anschließend wurde 15 min bei 4°C mit 20000 g zentrifugiert. Das geklärte Zelllysate wurde

abgenommen, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder direkt zur Immunaufreinigung von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (4.2.5.7.) eingesetzt.

**Zell-Lysispuffer:** 20 mM HEPES, pH 7,4, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 1% (v/v) NP40, Proteinase-Inhibitor-Cocktail

**Zell-Lysispuffer/**

**Stimulation:** Zell-Lysispuffer mit 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0,01 mM  $\text{Na}_4\text{MoO}_4$

#### 4.2.5.4. Lysate aus Gehirn für Immunaufreinigungen

Zur Herstellung von Gewebelysaten aus Gehirn für die Immunaufreinigung von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurden von jedem Genotyp zwei Gehirne zusammen in 500  $\mu\text{L}$  Homogenisierungspuffer im Potter homogenisiert. Um diesen Schritt zu erleichtern, können die Gehirne zuvor mit einem Skalpell zerkleinert werden. Zum besseren Herausspülen des Homogenats wurde dieses im Potter mit weiteren 500  $\mu\text{L}$  Homogenisierungspuffer versetzt. Nach 50 minütiger Zentrifugation bei 6000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  wurde der Überstand abgenommen, in ein Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und mit Homogenisierungspuffer auf etwa 4 mL aufgefüllt. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 182000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  für 60 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 600  $\mu\text{L}$  Gewebe-Lysispuffer resuspendiert und mit dem Potter zerkleinert. Nach erneuter Zentrifugation bei 20000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min wurde als Überstand das Lysat erhalten. Alle Arbeitsschritte wurden im  $4^{\circ}\text{C}$  Kühlraum durchgeführt, um eine permanente Kühlung auch während der Homogenisierungsschritte zu gewährleisten (Engquist-Goldstein et al., 2001).

**Homogenisierungspuffer:** 10 mM HEPES, pH 7,4, 1 mM EDTA, Proteinase-Inhibitor-Cocktail

**Gewebe-Lysispuffer:** 20 mM HEPES, pH 7,4, 1 mM EDTA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl, 1% NP40, Proteinase-Inhibitor-Cocktail

#### 4.2.5.5. Lysate aus Milz für Immunaufreinigungen

Die Vorbereitung der Milz zur Herstellung von Lysaten für die Immunaufreinigung von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (4.2.5.7.) erfolgte auf die gleiche Weise wie für durchflusszytometrische Untersuchungen (4.2.6.) inklusive einer Erythrozyten-Lyse (4.2.6.2.). Anschließend wurden die Zellen in 1 bis 2 mL Gewebe-Lysispuffer (4.2.5.4.) im

Potter homogenisiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 20000 g und 4°C für 15 min konnte der Überstand für Immunaufreinigungen eingesetzt werden.

#### 4.2.5.6. Gewebelysate für Proteinanalysen

Zur Herstellung von geklärten Zellysaten für die Analyse im *Western Blot* (4.2.5.9.) wurden 40 mg frisch präpariertes oder bei -80°C gelagertes Gewebe in 50 µL Homogenisierungspuffer im Mörser homogenisiert und mit 600 µL Gewebe-Lysispuffer (4.2.5.4.) aus dem Mörser in ein Probengefäß gespült. Das gut durchmischte Homogenat wurde mindestens 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 20000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß überführt und mit gleichem Volumen 2x SDS-PAGE Probenpuffer (4.2.5.8.) bei 95°C für 5 min aufgeköcht. Bis zur Analyse im *Western Blot* wurde das Lysat bei -20°C gelagert. Wurden abweichende Gewebemengen eingesetzt, so wurde das entsprechende Volumen an verwendetem Puffer angepasst.

#### 4.2.5.7. Immunaufreinigung

Proteine können durch spezifische Antikörper aus komplexen Proteingemischen wie Lysaten aus Zellen oder Geweben aufgereinigt werden (IP, Immunpräzipitation). Dazu wird der Antikörper dem Lysat (4.2.5.3., 4.2.5.4. oder 4.2.5.5.) zugesetzt und der Komplex aus Protein und Antikörper anschließend durch Immobilisierung des Antikörpers an eine feste Matrix aus dem Lysat isoliert. Als Matrix diente Protein A/G-Plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), da Protein A aus *Staphylococcus aureus* und Protein G aus *Streptococcus spp.* an den F<sub>C</sub>-Teil von IgG-Antikörpern vieler Spezies binden. Um eine unspezifische Bindung des aufzureinigenden Proteins an die Protein A/G-Plus Agarose auszuschließen, wurde das Lysat vor der Immunaufreinigung mit der Matrix inkubiert. Proteine, die unspezifisch binden, wurden aus dem Lysat entfernt. Das Lysat wurde mit 1 bis 3 µL des spezifischen Antikörpers versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C unter Invertieren des Reaktionsgefäßes. Anschließend wurden 20 µL der Protein A/G-Plus Agarose zugegeben und der Reaktionsansatz für 3 h unter Invertieren bei 4°C inkubiert. Die Agarose wurde zuvor durch zweimaliges Waschen mit 500 µL Lysispuffer equilibriert. Nach der Inkubation wurde die Agarose durch Zentrifugation bei 900 g für 5 min vom restlichen Lysat getrennt. Nach dreimaligem Waschen der Agarose mit 500 µL Lysispuffer (4.2.5.3. oder 4.2.5.4.) wurde diese für 5 min mit 30-60 µL 2x SDS-PAGE Probenpuffer aufgeköcht. Die spezifisch aufgereinigten Proteine wurden so von der Matrix getrennt und

können über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.2.5.8.) und *Western-Blot*-Analyse (4.2.5.9.) detektiert werden.

#### 4.2.5.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen kann mittels der SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgen. Die Proteine werden in einem elektrischen Feld durch eine Polyacrylamid-Gelmatrix getrennt. Durch die Behandlung der Proteinproben mit dem anionischen Detergenz SDS bilden sich SDS-Proteinkomplexe, die ein konstantes Ladungs-Masseverhältnis aufweisen. Die Auftrennung im porösen SDS-Polyacrylamidgel erfolgt daher nur aufgrund verschiedener relativer Molekülmassen der Proteine. Die inerte Gelmatrix entsteht durch Co-Polymerisation von Acrylamidmonomeren mit N,N'-Methylenbisacrylsäureamid. Die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) ist von entscheidender Bedeutung für die Co-Polymerisation, da APS als Initiator und TEMED als Katalysator dieser Reaktion wirken. Das Gel besteht aus zwei Teilen, einem 5%-igen Sammel- und einem 10%-igen Trenngel. Das Proteingemisch durchläuft zuerst das Sammelgel zur Aufkonzentrierung der Proben und wird anschließend im Trenngel aufgrund unterschiedlicher relativer Molekülmassen aufgespalten. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 4.5 aufgeführt. Nach vollständiger Polymerisation beider Gele konnten die Proteinproben auf das Sammelgel gegeben werden. Die Proteinproben wurden zuvor mit 2x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt, gut durchmischt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25 mA im Sammelgel und 35 mA im Trenngel in SDS-PAGE-Laufpuffer (Gelelektrophoresesystem von BioRad, München) durchgeführt. Als Größenstandard wurde der *Prestained Protein Marker, Broad Range* (NEB, Frankfurt) eingesetzt.

**Tabelle 4.5: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.**

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b>
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	5 mL	-
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	-	7,5 mL
30% Acrylamid,	3,2 mL	10,8 mL
0,8% Bisacrylamid		
10% SDS, 25 mM EDTA	200 µL	300 µL
H <sub>2</sub> O	11,7 mL	13,5 mL
TEMED	20 µL	30 µL
10% APS	200 µL	300 µL

**2x SDS-PAGE-Probenpuffer:** 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 2 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 10% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

**SDS-PAGE-Laufpuffer:** 250 mM Tris, 2,5 M Glycin, 1% (w/v) SDS

#### 4.2.5.9. *Western-Blot-Analyse von Proteinen*

Zur Analyse der in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinproben mittels Detektion durch spezifische Antikörper müssen die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Die übertragenen Proteine können anschließend mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden und über die Bindung eines mit HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpers durch Enzym-katalysierte Lichtemission sichtbar gemacht werden. Auf die Anode einer *Semidry-Blotting*-Apparatur (BioRad, München) wurden nacheinander ein *Whatman*-Papier, die Nitrocellulose-Membran, das SDS-Polyacrylamid-Gel und ein weiteres *Whatman*-Papier gelegt. Alle Bestandteile mussten zuvor kurz mit *Blotting*-Puffer angefeuchtet werden. Die vertikale Elektrophorese erfolgte bei 240 mA für 45 min. Wichtig ist luftblasenfreies Arbeiten, um eine vollständige Übertragung zu ermöglichen. Vor der Inkubation mit dem spezifischen Antikörper wurden die Stellen der Membran, die kein Protein gebunden haben, mit 5% Milchpulver in TBS-T für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Anschließend wurde die Membran zweimal 6 min mit TBS-T gewaschen und über Nacht mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-T mit 1% BSA und 0,01% NaN<sub>3</sub> eingesetzt, wenn vom Hersteller keine abweichenden Angaben gemacht wurden.

Nach dreimaligem Waschen für 6 min mit TBS-T erfolgte der zweite Antikörper-Inkubationsschritt mit HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern für 45 min bei 4°C. Sekundärantikörper wurden in einer 1:10000 Verdünnung in TBS-T eingesetzt. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal 6 min mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte durch HRPO-katalysierte Oxidation von Luminol mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Lichtemission. 4 mL Lösung A, 1,2 µL 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 400 µL Lösung B wurden gemischt und für 1 min auf die Membran gegeben. Bei schwachen Signalen wurde das *ECL Plus Western Blotting Detection Reagent* (Amersham Biosciences, Freiburg) zur Detektion eingesetzt. Proteine können durch das Detektionssystem der Firma INTAS (Göttingen) nachgewiesen und mit der Software Chemi Lux 2005 (INTAS, Göttingen) analysiert werden.

<b>Blotting-Puffer:</b>	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) NaN <sub>3</sub> , 20% (v/v) CH <sub>3</sub> OH
<b>Lösung A:</b>	0,25 g/L 5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion (Luminol) in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,6
<b>Lösung B:</b>	1,1 g/L para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO

#### 4.2.6. Durchflusszytometrie

##### 4.2.6.1. Vorbereitung der Gewebe für durchflusszytometrische Analysen

Direkt nach der Tötung der Maus wurden Milz, Lymphknoten und Thymus entnommen und einer anatomischen Untersuchung unterzogen (4.2.1.3.) bevor sie in eine Schale mit 10 mL DMEM transferiert wurden. Mit dem Stempel einer 10 mL Spritze wurden die Organe durch ein Gewebesieb gedrückt und zerkleinert. Um Zellen weiter zu vereinzeln, wurden diese zwei- bis dreimal durch eine Kanüle (21G x 2'', Braun, Melsungen) gezogen. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 300 g für 5 min. Das Zellpellet wurde mit 10 mL DMEM gewaschen und nur die Zellen der Milz einer Erythrozyten-Lyse (4.2.6.2.) unterzogen. Die Zellen wurden gezählt und die erforderliche Menge für den entsprechenden Versuch abgenommen.

Zur Gewinnung von Knochenmarkzellen wurden die Oberschenkelknochen entnommen, von Muskel befreit und in eine Schale mit 10 mL DMEM gelegt. Beide Seiten des Knochens wurden so mit einem Skalpell aufgeschnitten, dass das Knochenmark frei zugänglich ist. Das Knochenmark wurde anschließend mit einer Kanüle aus dem Knochen

herausgespült. Die Zellen wurden zur Vereinzelnung ebenfalls noch zwei- bis dreimal durch die Kanüle gezogen und dann nach der Zählung für weitere Experimente eingesetzt.

#### 4.2.6.2. Erythrozyten-Lyse

Zur Herstellung des Lysispuffers wurden vor jedem Experiment Lösung A und Lösung B im Verhältnis 9:1 gemischt. Die Zellen wurden pelletiert und schnell und vorsichtig in 1 mL Erythrozyten-Lysispuffer pro  $1 \cdot 10^8$  Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden 1 bis 2 min auf Eis inkubiert bevor sie vorsichtig mit 1 mL FCS unterschichtet wurden. Nach Zentrifugation bei 300 g für 3 min muss das Zellpellet eine leicht rötliche Färbung zeigen. Ist das Pellet weiß, so war die Lysezeit zu lang und muss erneut angepasst werden. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal mit 10 mL DMEM gewaschen.

**Erythrozyten-Lysispuffer:**    **Lösung A:** 0,16 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (sterilfiltriert),  
  **Lösung B:** 0,17 M Tris-HCl, pH 7,65 (sterilfiltriert)

#### 4.2.6.3. Durchflusszytometrische Analysen

Die Zellen aus Gewebe wurden gezählt (4.2.3.3.) und  $1 \cdot 10^6$  Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse abgenommen. Wurde parallel eine Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durchgeführt, so wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen benötigt. Die Zellen wurden in 50  $\mu\text{L}$  PBS aufgenommen und zur spezifischen Markierung der Zellen wurde, wenn nicht anders vom Hersteller empfohlen, 1  $\mu\text{L}$  des Fluorochrom-markierten Antikörpers zugegeben. Die Zellen wurden in lichtundurchlässigen Reaktionsgefäßen 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bei 300 g und  $4^\circ\text{C}$  für 4 min zentrifugiert. Es kann eine gleichzeitige Markierung mit mehreren Fluorochrom-markierten Antikörpern durchgeführt werden. Ist ein Antikörper mit Biotin gekoppelt, so schloss sich an den ersten Antikörper-Inkubationsschritt unter gleichen Versuchsbedingungen ein zweiter Inkubationsschritt mit 1  $\mu\text{L}$  Fluorochrom gekoppeltem Streptavidin an. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 200  $\mu\text{L}$  PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert oder für anschließende  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen (4.2.6.4.) in 700  $\mu\text{L}$  RPMI-Medium mit 5% FCS resuspendiert.

#### 4.2.6.4. Analyse der $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung

Mit dem Durchflusszytometer LSR II (BD Biosciences, Heidelberg) ist es möglich, neben einer Messung zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung Markierungen verschiedener Oberflächenproteine zur Unterscheidung verschiedener Zell-Populationen bzw. -Entwicklungsstadien durchzuführen. Nach der Markierung der Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern erfolgte die Beladung der Zellen mit einem Acetoxymethylester von Indo-1 (Indo-1-AM). Ungeladenes Indo-1-AM (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) kann die Plasmamembran passieren. Durch Abspaltung der lipophilen Gruppen durch nicht spezifische cytoplasmatische Esterasen innerhalb der Zelle, entsteht eine geladene und dadurch weniger Membran-gängige Form des Moleküls. Vor der Komplexierung von  $\text{Ca}^{2+}$  zeigt Indo-1 eine Fluoreszenz bei 485 nm, die sich nach der Komplexierung zu einer Wellenlänge von 405 nm verschiebt. Veränderungen in dem Quotienten der Signale bei 485 nm und 405 nm spiegeln die Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wieder und können mit Hilfe der Software FACS DIVA (BD Biosciences, Heidelberg) über die Zeit aufgenommen werden.  $5 \cdot 10^6$  Zellen wurden in 700  $\mu\text{L}$  RPMI-Medium mit 5% FCS in lichtundurchlässigen Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die Beladung erfolgte durch Zugabe von 0,015% Pluronic und 1  $\mu\text{M}$  Indo-1-AM. Die Zellen wurden bei 30°C für 25 min unter leichtem Schütteln (300 rpm) im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 700  $\mu\text{L}$  RPMI-Medium mit 10% FCS dazugegeben und die Zellen bei 37°C für 10 min unter leichtem Schütteln (300 rpm) im Heizblock inkubiert. RPMI-Medium mit 10% FCS wurde vor der Zugabe auf 37°C vorgewärmt. An die Beladung schlossen sich zwei Waschschrte mit Krebs-Ringer-Lösung mit  $\text{Ca}^{2+}$  an. Nach dem letzten Waschschrte blieben die Zellen bis zur Analyse in Krebs-Ringer-Lösung mit  $\text{Ca}^{2+}$ . Direkt vor der Messung wurden die Zellen in 600  $\mu\text{L}$  Krebs-Ringer-Lösung mit EGTA aufgenommen. Die Zentrifugationsschrte der Zellen zwischen den Waschschrten und vor der Messung erfolgten bei 300 g und 4°C für 4 min. Die Messung am LSR II wurde bei der geringsten Durchflussgeschwindigkeit durchgeführt. Nach Aufnahme des Basallevels für 25 s erfolgte die Stimulation der Zellen mit 20,8  $\mu\text{g}$   $\text{F(ab')}_2$  Fragment anti-IgG+IgM (H+L). Der Level von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  wurde nach 5 min 25 s auf 1 mM angehoben. Durch Auftragung des Quotienten aus den Signalen der zwei Emissionswellenlängen gegen die Zeit kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern bzw. der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellularraum analysiert werden. Für die Analyse stand die Software Flow Jo 6.1.1 zur Verfügung.

<b>Krebs-Ringer-Lösung:</b>	10 mM HEPES, pH 7,0, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM Glucose
<b>Krebs-Ringer-Lösung mit Ca<sup>2+</sup>:</b>	Krebs-Ringer-Lösung mit 1 mM CaCl <sub>2</sub>
<b>Krebs-Ringer-Lösung mit EGTA:</b>	Krebs-Ringer-Lösung mit 0,5 mM EGTA

#### 4.2.7. Kultivierung von primären Cerebellum-Neuronen

##### 4.2.7.1. Präparation und Kultivierung

Primäre Kulturen von Cerebellum-Neuronen wurden aus Cerebelli von sechs Tage alten Mäusen gewonnen. Die Cerebelli wurden nach der Entnahme durch Entfernung von Blutgefäßen und eventuellem Fremdgewebe gereinigt. In einer Petrischale mit gekühltem HBSS wurden die Cerebelli jeweils mit einem Skalpell in drei Stücke geteilt und anschließend mit 5 mL gekühltem HBSS gewaschen. Nach Zentrifugation für 2 min bei 100 g wurde das HBSS entfernt und 1 mL Trypsin/DNase-Lösung pro drei Cerebelli zugegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt für 15 min bei RT. Anschließend wurde dreimal mit 5 mL gekühltem HBSS gewaschen. Die Dissoziation der Zellen erfolgte in 1 mL DNaseI-Lösung pro drei Cerebelli durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durch Pasteurpipetten mit einer durch Hitze verengten Öffnung. Es wurden nacheinander drei verschiedene Pasteurpipetten benutzt, die eine unterschiedliche Öffnungsgröße haben. Als erstes wurde die Pipette mit der größten Öffnung und als letztes die mit der kleinsten Öffnung eingesetzt. Wichtig ist, dass die Pasteurpipette beim Abflammen zur Öffnungsverkleinerung an der Spitze abgerundet wurde, um eine Beschädigung der Zellen zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen mit 5 mL gekühltem HBSS versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Durch vorsichtiges Dekantieren konnten die vereinzelt Zellen von eventuell noch vorhandenen Aggregaten getrennt werden. Die vereinzelt Zellen wurden durch Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 15 min gewonnen. Das Zellpellet wurde in 5 mL X-1 Medium resuspendiert, die Zellen gezählt und  $1 \cdot 10^5$  Zellen in X-1 Medium auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern (Durchmesser 1,5 cm) in 6-well-Petrischalen ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### HBSS

**(HANK's balanced salt solution):** 8 g/L NaCl, 0,4 g/L KCl, 1 g/L Glucose, 0,06 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,062 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2, autoklavieren

---

<b>Trypsin/DNaseI-Lösung:</b>	10 g/L Trypsin, 55 U/mL DNaseI in HBSS, pH 7,8, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C
<b>DNaseI-Lösung:</b>	55 U/mL DNaseI, 2,5 g/L Glucose in 1x basal Eagle's Medium (BME), sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C
<b>X-1 Medium:</b>	1x basal Eagle's Medium (BME), 2,2 µg/mL NaHCO <sub>3</sub> , 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptavidin, 0,1% (w/v) BSA, 10 µg/mL Insulin, 4 nM L-Thyroxin, 100 µg/mL Transferrin (holo, aus bovinem Plasma), 30 nM Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> , 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamat, 10% (v/v) FCS, Proteinase-Inhibitor Cocktail

#### **4.2.7.2. Poly-D-Lysinbeschichtung**

Vor der Beschichtung mit Poly-D-Lysin (Sigma, Dreieich) wurden runde Deckgläser (Durchmesser 1,5 cm) gründlich mit Ethanol gereinigt. Poly-D-Lysin wurde in einer Konzentration von 10 µg/mL auf die Deckgläser gegeben. Nach Inkubation bei 37°C für 1 h wurde die Poly-D-Lysin-Lösung entfernt. Die Deckgläser wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht getrocknet und sterilisiert.

#### **4.2.7.3. Morphometrische Messung**

Zum Zeitpunkt Tag 2, 3, 4, 5 und 6 wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf Differenzierung und Länge der Zellfortsätze analysiert. Die gesamte Fläche des Deckglases, auf der die primären Neurone ausgesät wurden, wurde fotografisch erfasst. Anhand der ausgedruckten Bilder wurden die morphometrischen Messungen durchgeführt.

### **4.2.8. Histologische Untersuchungen**

#### **4.2.8.1. Vorbereitung des Gewebes für Gefrierschnitte**

Zur Herstellung von Gefrierschnitten muss das Gewebe in Gefrierblöcken fixiert werden. Das frisch entnommene Gewebe wurde auf eine mit einem Filterpapier bezogene Korkplatte mit einem Durchmesser von etwa 1,5 cm gelegt und mit Einbettmedium (Reichert-Jung, Nussloch) fixiert. Eine dünne Schicht des Einbettmediums muss das gesamte Organ bedecken, um Gefrierschäden zu vermeiden. Kann das Gewebe nicht alleine

auf der Korkplatte in die gewünschte Position gebracht werden, so ist es möglich, das Gewebe zur Stabilisation an ein kleines Stück gekochtes Eiweiß zu lehnen. Zum schnellen Einfrieren wurden die Gewebeblöcke zuerst 1 min in flüssiges Propan gelegt und anschließend für 15 min in flüssigem Stickstoff gelassen. Gewebeblöcke können bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

#### **4.2.8.2. Anfertigung von Gefrierschnitten**

Das Schneiden der Gefrierblöcke erfolgte unter Verwendung des Gefriermikrotoms Kryostat 2800 Frigocut E (Reichert-Jung, Nussloch). Die Schnittdicke betrug zwischen 10 und 15  $\mu\text{m}$ . Direkt nach dem Schneiden wurden die Schnitte auf Objektträger übertragen (Menzel, Braunschweig) und bis zur Fixierung kalt gelagert.

#### **4.2.8.3. Immunhistochemische Färbung**

Bei der immunhistochemischen Färbung von Gefrierschnitten werden Antikörper zur spezifischen Detektion eines bestimmten Proteins im Schnitt eingesetzt. Der Antikörper kann dafür direkt an ein Fluorochrom gebunden sein oder wird in einem zweiten Inkubationsschritt von einem Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörper erkannt. Der Schnitt wurde kurz angetaut und dann 20 min in 3,7% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurde der Schnitt dreimal 5 min in PBS gewaschen und 1 h mit 1% BSA abgesättigt. Um Austrocknung zu vermeiden, erfolgte die Inkubation in einer feuchten Kammer bei RT. Der Schnitt wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend der Primärantikörper in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung dazugegeben. Der Schnitt wurde über Nacht in einer feuchten Kammer bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Handelt es sich um einen Fluorochrom gekoppelten Antikörper, erfolgte die Inkubation im Dunkeln. Der Schnitt wurde dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Muss ein Sekundärantikörper verwendet werden, so schloss sich eine Inkubation für 45 min bei RT mit dem entsprechenden Fluorochrom gekoppelten Antikörper an. Vor dem Eindecken in Elvanol musste der Schnitt mindestens einmal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen werden, um Salzkristallbildung zu vermeiden. Der Schnitt wurde mit Elvanol eingedeckt.

#### **4.2.8.4. Fixierung und Einbettung des Gewebes für Paraffinschnitte**

Gewebe bis zu 1,0 g wurden direkt nach der Sektion mindestens 12 h in 3,7% Paraformaldehyd in Paraformaldehyd-Puffer bei  $4^{\circ}\text{C}$  unter Schwenken fixiert. Bei größeren Gewebestücken empfiehlt sich eine Inkubationszeit in 3,7% Paraformaldehyd von

24 h bis zu einer Woche. Zur Entfernung des Paraformaldehyds wurde das Gewebe 30 bis 60 min unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen. Die Entwässerung erfolgte mit einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe. Die fixierten Gewebe wurden aufeinanderfolgend 2 h in 50% Isopropanol, mindestens 3 h in 75% Isopropanol, mindestens 6 h in 90% Isopropanol und zum Schluß noch zweimal mindestens 4 h in 100% Isopropanol entwässert. Anschließend wurde das Gewebe für mindestens 12 h in ein Gemisch (1:1) aus 100% Isopropanol und flüssigem Paraffin (Paraplast X-TRA, Oxford Labware, St. Louis, USA) gelegt. Für eine bessere Durchmischung wurden beide Flüssigkeiten vorher auf 60°C gebracht. Das Gewebe wurde zweimal für 4h in flüssigem Paraffin gewaschen und anschließend in vorgewärmte Formen mit flüssigem Paraffin gegeben, in der gewünschten Lage fixiert und bei RT ausgehärtet. Die Lagerung der Organ-Paraffinblöcke erfolgte bei RT.

**Paraformaldehyd-Puffer:** 6,5 g/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 4 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4

#### **4.2.8.5. Anfertigung von Paraffinschnitten**

Die Paraffinschnitte wurden direkt aus dem Paraffinblock mit einer Schnittdicke von 5-10  $\mu\text{m}$  am Mikrotom 2500 Supercut (Reichert-Jung, Nussloch) hergestellt. Die Schnitte wurden vorsichtig mit einem Pinsel auf ein mit einem Tropfen Wasser versehenen Objektträger (Superfrost, Menzel, Braunschweig) übertragen. Anschließend wurden die Objektträger mit Schnitten auf eine 37°C warme Heizplatte gelegt, um durch die Verdunstung des Wassers eine Streckung der Schnitte zu erreichen.

#### **4.2.8.6. Entparaffinierung/Rehydrierung von Paraffinschnitten**

Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte für etwa 30 min bei 60°C erwärmt. Das flüssige Paraffin konnte durch zweimaliges Waschen mit Xylol entfernt werden. Zur Rehydrierung mussten die Schnitte eine absteigende Ethanolreihe durchlaufen (100%, 90%, 80%, 70%). Die Inkubation erfolgte jeweils für etwa 5 min.

#### **4.2.8.7. NISSL-Färbung**

Die NISSL-Färbung ist eine standardisierte Methode um Neurone anzufärben. Durch Anfärben der Nissl-Schollen wird der Zellkörper markiert. Die Gewebeschnitte wurden in eine auf 60°C vorgewärmte 0,1%-ige Kresylviolett-Färbelösung gestellt. Die Inkubation erfolgte bei 60°C für 15 min. Anschließend wurden die Schnitte kurz mit  $\text{H}_2\text{O}$  gespült und

in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe für jeweils 5 min entwässert (70%, 80%, 90%, 100%). Der Ethanol-Reihe schloss sich eine Inkubation für 5 min in Xylol an, bevor mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt wurde.

#### **4.2.8.8. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin**

Mit der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung werden Zellkerne dunkelblau bis violett und das Zytoplasma rosa angefärbt. Durch die Behandlung mit Hämatoxylin wird der Schnitt gleichzeitig fixiert. Die entparaffinisierten und rehydrierten Schnitte wurden 5 bis 15 min in einer frisch filtrierten 1:1 Mischung aus Harris und Meyer's Hämatoxylinlösung (Sigma, Dreieich) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte etwa 10 min vorsichtig unter fließendem Leitungswasser gespült, um durch Oxidation des gebundenen Hämalauns eine endgültige Farbstoffentwicklung zu erreichen. Die Eosin-Färbung erfolgte für 5 min in einer 0,1% Eosin-Lösung in 50% Ethanol. Die anschließende Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe (70%, 80%, 90%, 100% für je 5 min) und anschließender vollständiger Entwässerung für 5 min in Xylol. Die Schnitte wurden mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

#### **4.2.9. Dokumentation und Auswertung**

Zur mikroskopischen Analyse der Schnitte stand ein Axiophot Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Jena) zur Verfügung. Fotografische Dokumentationen sowohl der Mäuse als auch der Organe, Organschnitte und Zellen in Kultur erfolgten mit Hilfe der Digitalkamera Coolpix 990 (Nikon, Düsseldorf), die wahlweise an das Mikroskop angeschlossen werden konnte. Die Dokumentation der Membranen in der *Western Blotting* Analyse (4.2.5.9.) erfolgte mittels des Detektionssystems von INTAS (Göttingen). Agarosegele wurden nach der Gel-Elektrophorese mit dem *Gel Imager* (INTAS, Göttingen) fotografiert.

Für Auswertungen standen die *Software*-Programme Adobe Photoshop Version 7.0, Excel Version XP, Sigma Plot 9.01, Gel Pro-Analyser Version 4.5, Cellquest Pro und Flow Jo 6.1.1 zur Verfügung.

#### **4.2.10. Statistische Analysen**

Die Angabe der Messwerte erfolgt, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung. Zusätzlich wurde ein *students t-test* unter Verwendung der *Software* Sigma Plot 9.01 durchgeführt. Ein signifikanter p-Wert wurde als  $p < 0,05$ , ein hochsignifikanter p-Wert als  $p < 0,01$  definiert.

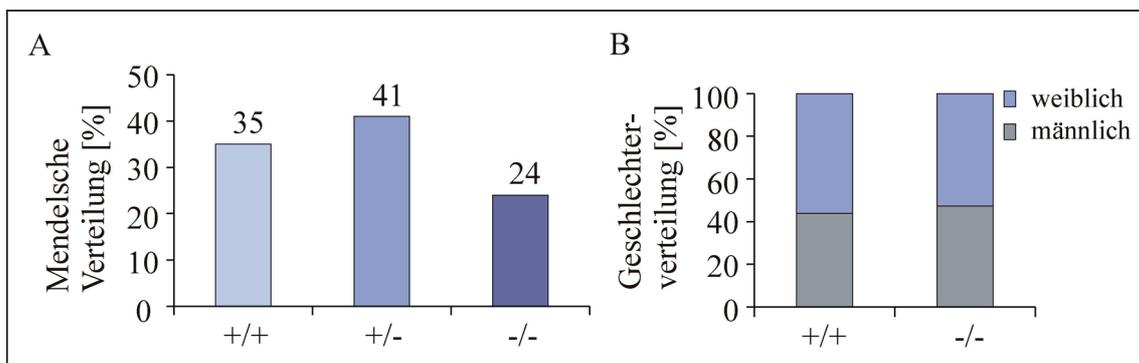
## 5. Ergebnisse

### 5.1. Charakterisierung der mAbp1-defizienten Maus

#### 5.1.1. Charakterisierung des Maus-Phänotyps verursacht durch mAbp1-Defizienz

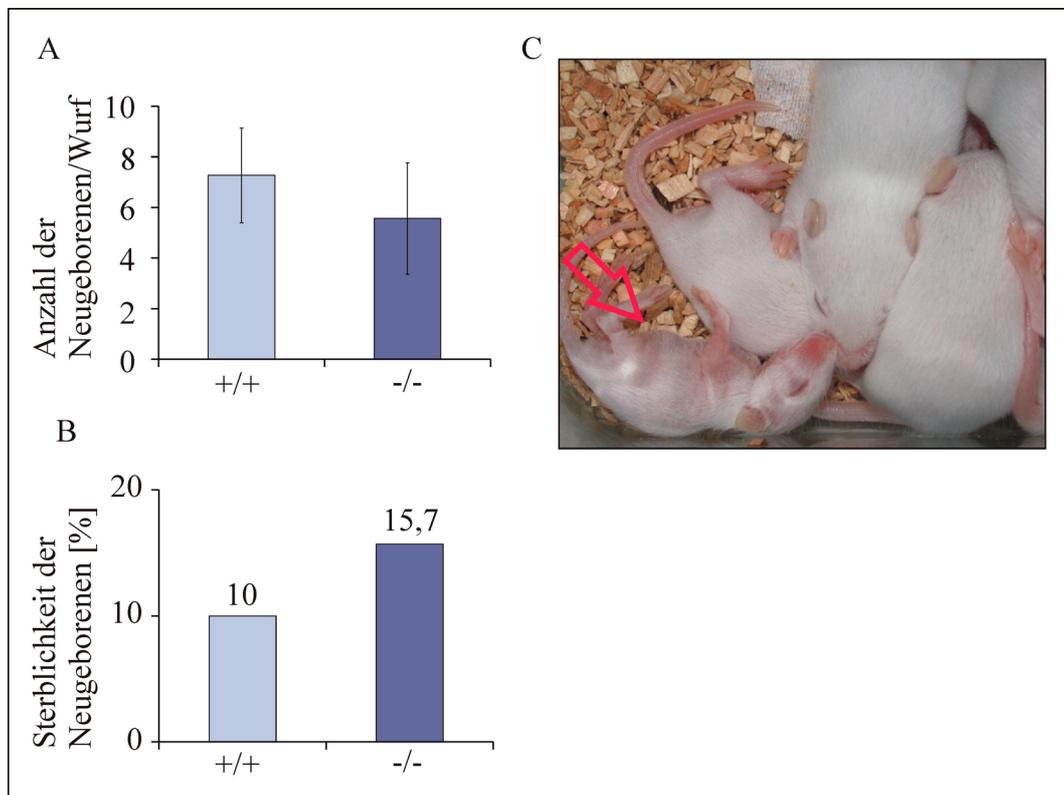
Zur funktionellen Charakterisierung des Adapterproteins mAbp1 stand eine BALB/c mAbp1-defiziente Mauslinie zur Verfügung (Connert, 2003). Vergleichende Analysen zwischen mAbp1-defizienten Mäusen und BALB/c wildtypischen Mäusen gaben Aufschlüsse über die Auswirkung der Defizienz des in den verschiedenen Geweben exprimierten Proteins.

mAbp1-defiziente Mäuse sind lebens- und fortpflanzungsfähig und zeigen in den ersten Lebensmonaten keine offensichtlichen Anomalien oder Verhaltensauffälligkeiten. Die Verpaarung von *mabp1*<sup>+/-</sup> Mäusen führte zu Nachkommen mit den Genotypen *mabp1*<sup>+/+</sup>, *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> in einem Verhältnis von 35%, zu 41%, zu 24%, das weitestgehend der Mendelschen Vererbungsstatistik folgt (Abb. 5.1 A). Sowohl bei *mabp1*<sup>-/-</sup> als auch bei wildtypischen Verpaarungen lag ein etwa gleiches Verhältnis von Weibchen zu Männchen vor (56% Weibchen zu 44% Männchen bei wildtypischen und 53% Weibchen zu 47% Männchen bei *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen) (Abb. 5.1 B). Die Verteilung von männlichen und weiblichen Nachkommen wird durch mAbp1-Defizienz nicht beeinträchtigt.

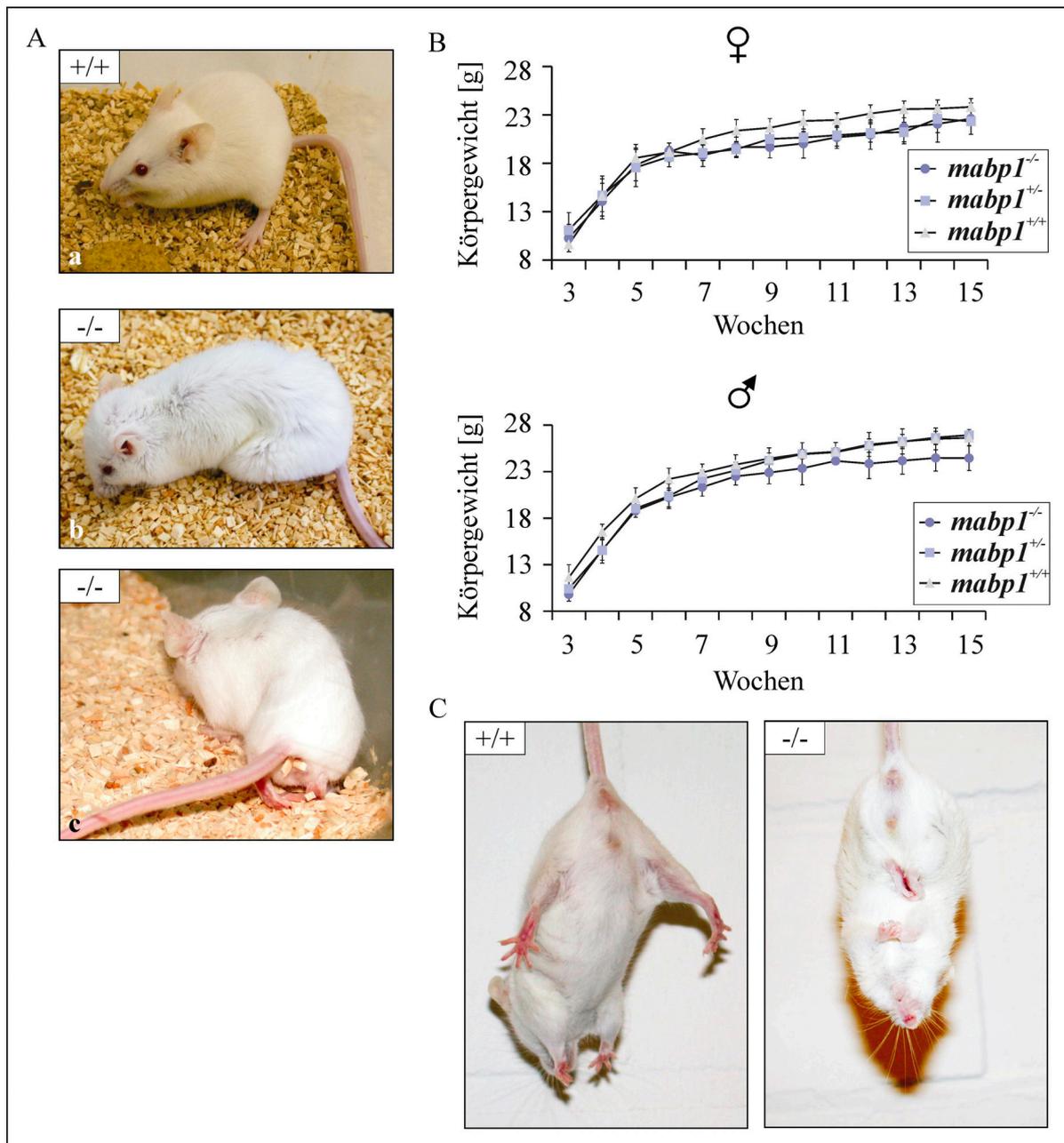


**Abbildung 5.1: Charakterisierung des Zuchtverhaltens heterozygoter und mAbp1-defizienter Mäuse.** (A) Die prozentuale Verteilung von wildtypischen (+/+, hellblau), heterozygoten (+/-, blau) und homozygoten (-/-, dunkelblau) Mäusen aus *mabp1*<sup>+/-</sup>-Verpaarungen folgte der Mendelschen Vererbungsstatistik. (B) Die Geschlechterverteilung zwischen männlichen (grau) und weiblichen (blau) Nachkommen aus *mabp1*<sup>+/+</sup>- und *mabp1*<sup>-/-</sup>-Verpaarungen wurde durch mAbp1-Defizienz nicht beeinträchtigt (Anzahl *mabp1*<sup>+/-</sup>-Verpaarungen n=32 (A), Anzahl Nachkommen: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=480, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=890 (B)).

Bei der Betrachtung der Wurfgröße trat kein Unterschied in der Anzahl der Nachkommen bei wildtypischen und *mabp1*<sup>-/-</sup>-Verpaarungen auf (Abb. 5.2 A). Nachkommen von *mabp1*<sup>-/-</sup>-Verpaarungen zeigten innerhalb der ersten vier Lebenswochen eine erhöhte Sterblichkeit von 15,7%. Im Gegensatz dazu hatten Nachkommen von *mabp1*<sup>+/+</sup>-Verpaarungen eine Sterblichkeitsrate von 10% (Abb. 5.2 B). Die erhöhte Sterblichkeitsrate kann teilweise auf das Auftreten von extrem kleinen Neugeborenen in Würfen von *mabp1*<sup>-/-</sup>-Verpaarungen zurückgeführt werden, deren Körpergewicht im Vergleich zu dem der Geschwistertiere etwa um ein Drittel reduziert war (Abb. 5.2 C). Diese blieben in ihrer Entwicklung deutlich hinter ihren Geschwistern zurück und starben in den ersten vier Lebenswochen, auch wenn sie durch das Muttertier optimal versorgt wurden.



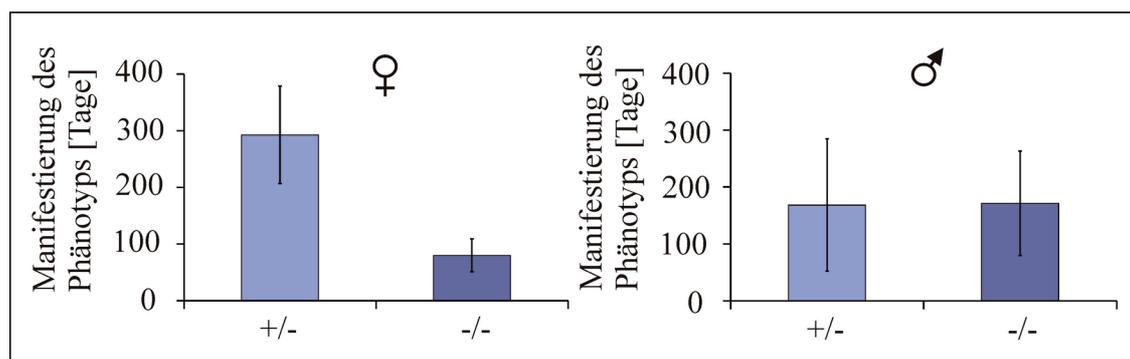
**Abbildung 5.2: Nachkommen aus *mabp1*<sup>-/-</sup>-Verpaarungen zeigten eine erhöhte Sterblichkeit.** (A) Die Anzahl der Neugeborenen pro Wurf für *mabp1*<sup>+/+</sup> (hellblau)- und *mabp1*<sup>-/-</sup>-Verpaarungen (dunkelblau) wird als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (Anzahl *mabp1*<sup>+/+</sup>-Verpaarungen n=68, Anzahl *mabp1*<sup>-/-</sup>-Verpaarungen n=163). (B) Die Sterblichkeit von neugeborenen Mäusen innerhalb der ersten vier Lebenswochen von wildtypischen (hellblau) und *mabp1*<sup>-/-</sup> (dunkelblau)-Verpaarungen wurde verglichen (*mabp1*<sup>+/+</sup> n=480, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=890). (C) Dargestellt sind Jungtiere aus einem 11 Tage alten Wurf einer *mabp1*<sup>-/-</sup>-Verpaarung mit einem auffällig kleinen Jungtier (roter Pfeil) im Vergleich zu Geschwistertieren.



**Abbildung 5.3: Die allgemeine Charakterisierung *mAbp1*-defizienter Mäuse zeigte verschiedene Symptome.** (A) Der Phänotyp *mAbp1*-defizienter Mäuse zeichnet sich im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren (a) durch einen schlechten Allgemeinzustand, eingefallene Flanken und gesträubtes Fell (b), sowie partielle Lähmung der Hinterbeine verbunden mit einem unsicheren Gang (c) aus. (B) Bei der Bestimmung des Körpergewichts von *mabp1*<sup>-/-</sup>, *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>+/+</sup> Weibchen und Männchen zeigten sich abhängig von Geschlecht und Genotyp in verschiedenen Lebensabschnitten Unterschiede (n=8 pro Genotyp und Geschlecht). (C) *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäuse drückten ihre Vorder- und Hinterbeine beim Baumeln am Schwanz an den Körper (rechtes Bild), wohingegen wildtypische Mäuse ihre Beine von sich streckten (linkes Bild).

Überlebten *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäuse die ersten vier Lebenswochen, so entwickelten sie sich in den ersten drei Lebensmonaten wie wildtypische Geschwistertiere und schienen gesund zu sein. Abhängig von Geschlecht und Genotyp traten jedoch zwischen dem vierten und zehnten Lebensmonat Symptome auf, die einen schlechten Allgemeinzustand

(Abb. 5.3 A), charakterisiert durch Akinese (verminderte Beweglichkeit), Ataxie (unsicherer Gang), Tremor und eingefallene Flanken (Abb. 5.3 A, b), sowie partielle Lähmungen der Hinterbeine (Abb. 5.3 A, c) und Krampfanfälle oder klonische Bewegungsmuster einschließen. Des weiteren hatten Mäuse mit diesen Symptomen gesträubtes Fell, das durch eingeschränkte Putztätigkeit aufgrund der Akinese hervorgerufen werden kann (Oosthyse et al., 2001). Weibliche *mabp1<sup>+/-</sup>* und *mabp1<sup>-/-</sup>* Mäuse zeigten zwischen der siebten und 13. Lebenswoche ein signifikant ( $p < 0,05$ ; *student's t-test*) vermindertes Körpergewicht im Vergleich zu weiblichen wildtypischen Kontrolltieren. Das Körpergewicht von *mabp1<sup>-/-</sup>* Männchen war ab der elften Lebenswoche signifikant ( $p < 0,05$ ; *student's t-test*) reduziert, wohingegen das Gewicht der *mabp1<sup>+/-</sup>* Tiere zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung zeigte (Abb. 5.3 B). Das Auftreten der zuvor beschriebenen Symptome korrelierte jedoch unabhängig von Geschlecht und Alter mit einem enormen Gewichtsverlust. Nach dem Auftreten der ersten Symptome verschlechterte sich der Allgemeinzustand der Tiere bis zu ihrem Tod kontinuierlich. Wurden *mabp1<sup>+/-</sup>* und *mabp1<sup>-/-</sup>* Mäuse an ihrem Schwanz hochgehalten, drückten sie ihre Hinterbeine gegen den Körper und hingen bewegungslos an ihrem Schwanz. Bei fortschreitendem schlechten Allgemeinzustand wurden auch die Vorderbeine fest an den Körper gedrückt (*claspings*-Verhalten). Im Gegensatz dazu streckten wildtypische Mäuse die Beine vom Körper ab und zappelten mit den Hinterbeinen (Abb. 5.3 C).



**Abbildung 5.4: Die Manifestierung des durch mAbp1-Defizienz verursachten Phänotyps ist abhängig vom Geschlecht und Genotyp.** Weibliche (links) und männliche (rechts) *mabp1<sup>+/+</sup>*, *mabp1<sup>+/-</sup>* und *mabp1<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden über ein Jahr auf allgemeine Symptome untersucht. In *mabp1<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren konnten diese Symptome zu keinem Zeitpunkt identifiziert werden (*mabp1<sup>+/-</sup>* blau, *mabp1<sup>-/-</sup>* dunkelblau). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung (weiblich: *mabp1<sup>+/+</sup>* n=12, *mabp1<sup>+/-</sup>* n=16, *mabp1<sup>-/-</sup>* n=29; männlich: *mabp1<sup>+/+</sup>* n=10, *mabp1<sup>+/-</sup>* n=21, *mabp1<sup>-/-</sup>* n=24).

Das Auftreten von mindestens zwei der zuvor beschriebenen Symptome des Phänotyps der Defizienz von mAbp1 wurde als Zeitpunkt der Manifestierung des Phänotyps definiert. So

konnte eine Entwicklung des Phänotyps nach  $293 \pm 86$  Tagen, bzw.  $80 \pm 29$  Tagen nach der Geburt für  $mabp1^{+/-}$  und  $mabp1^{-/-}$  Weibchen und nach  $168 \pm 116$  Tagen, bzw.  $171 \pm 92$  Tagen für  $mabp1^{+/-}$  und  $mabp1^{-/-}$  Männchen beobachtet werden (Abb. 5.4). Der Phänotyp der mAbp1-Defizienz entwickelte sich bei Weibchen mit einer Penetranz von 19% bei  $mabp1^{+/-}$  und 54% bei  $mabp1^{-/-}$  Mäusen und bei Männchen mit einer Penetranz von 44% bei  $mabp1^{+/-}$  und 64% bei  $mabp1^{-/-}$  Mäusen. Bei wildtypischen Tieren konnten diese Symptome zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Tab. 5.1).

**Tabelle 5.1: Penetranz des Phänotyps der mAbp1-Defizienz.**

Geschlecht	Genotyp	Ausprägung des Phänotyps [%]
weiblich	+/+	0
	+/-	19
	-/-	54
männlich	+/+	0
	+/-	44
	-/-	64

Beobachtung der Mäuse über einen Zeitraum von einem Jahr; weiblich:  $mabp1^{+/+}$  n=42,  $mabp1^{+/-}$  n=29,  $mabp1^{-/-}$  n=90; männlich:  $mabp1^{+/+}$  n=45,  $mabp1^{+/-}$  n=30,  $mabp1^{-/-}$  n=75.

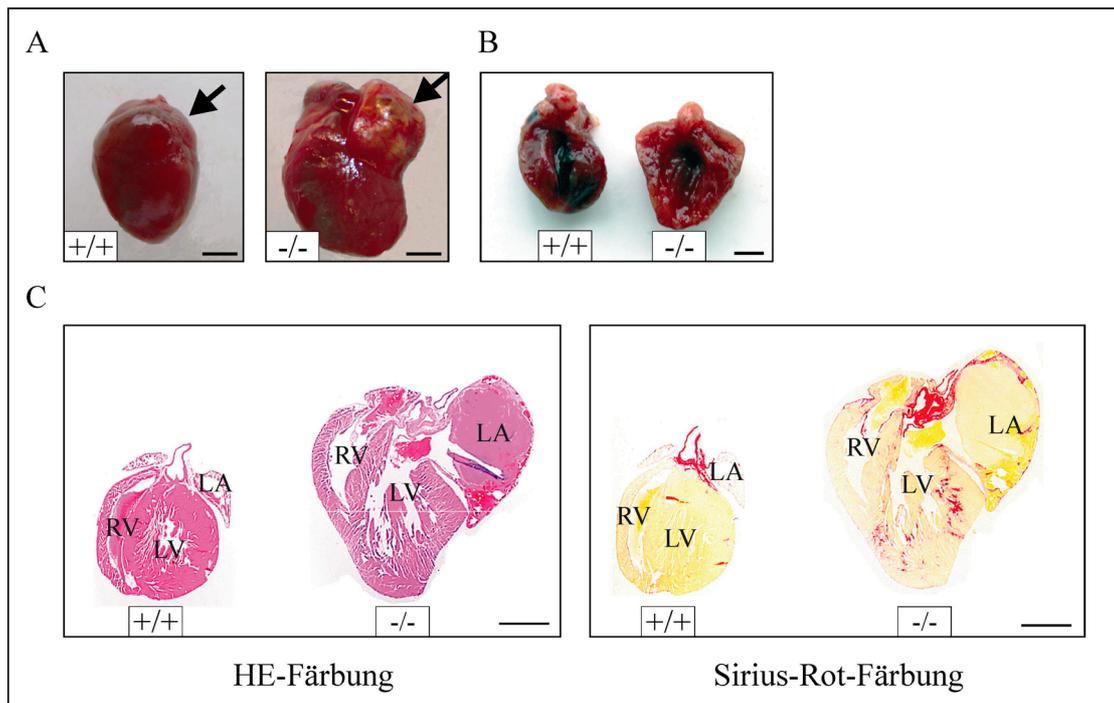
Diese Beobachtungen deuteten auf eine Abhängigkeit der Penetranz und der Manifestierung des Phänotyps vom Geschlecht hin. Des Weiteren konnte ein geschlechtsspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägter Gen-Dosis-Effekt beobachtet werden. Heterozygote Männchen waren deutlich früher betroffen als heterozygote Weibchen. Außerdem manifestierte sich der Phänotyp in heterozygoten und mAbp1-defizienten Männchen etwa im gleichen Alter, wohingegen mAbp1-defiziente Weibchen deutlich eher erkrankten als heterozygote Weibchen. Die Fortpflanzungsfähigkeit von  $mabp1^{+/-}$  und  $mabp1^{-/-}$  Tieren nach der Manifestierung des Phänotyps war aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes stark eingeschränkt. Verpaarungsversuche von Mäusen mit bereits offensichtlichen Symptomen des Phänotyps führten häufig zum Tod der Tiere aufgrund erhöhten Stresses. Diese Tiere waren anfällig gegenüber Stressfaktoren wie Verpaarungen und Verhaltensexperimenten.

### 5.1.2. Pathologische Anomalien in Herz, Lunge und Milz von mAbp1-defizienten Mäusen

Um den Einfluss der Defizienz von mAbp1 auf die Integrität von verschiedenen Geweben zu analysieren, wurden Organe von  $mabp1^{+/+}$ ,  $mabp1^{+/-}$  und  $mabp1^{-/-}$  auf pathologische

Anomalien untersucht. Die Analyse der Organe erfolgte durch optische Betrachtung des gesamten Organs bei der Sektion, sowie durch histologische Untersuchungen an Organschnitten. Des Weiteren wurde das Blutbild von wildtypischen sowie von heterozygoten und *mAbp1*-defizienten Mäusen auf Auffälligkeiten untersucht. Bei der Analyse der Organe von *mAbp1*-defizienten Mäusen im Alter von vier bis zehn Monaten, d.h. dem Lebenszeitraum, in dem sich der Phänotyp der *mAbp1*-Defizienz manifestiert, konnten pathologische Auffälligkeiten bei Herz, Lunge und Milz beobachtet werden. Niere, Leber, Darm, Lymphknoten, Thymus, Testis und Uterus waren makroskopisch und in ersten Untersuchungen in Organschnitten unauffällig. Die Untersuchung der Organe erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Uwe Kölsch (Institut für Immunologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg).

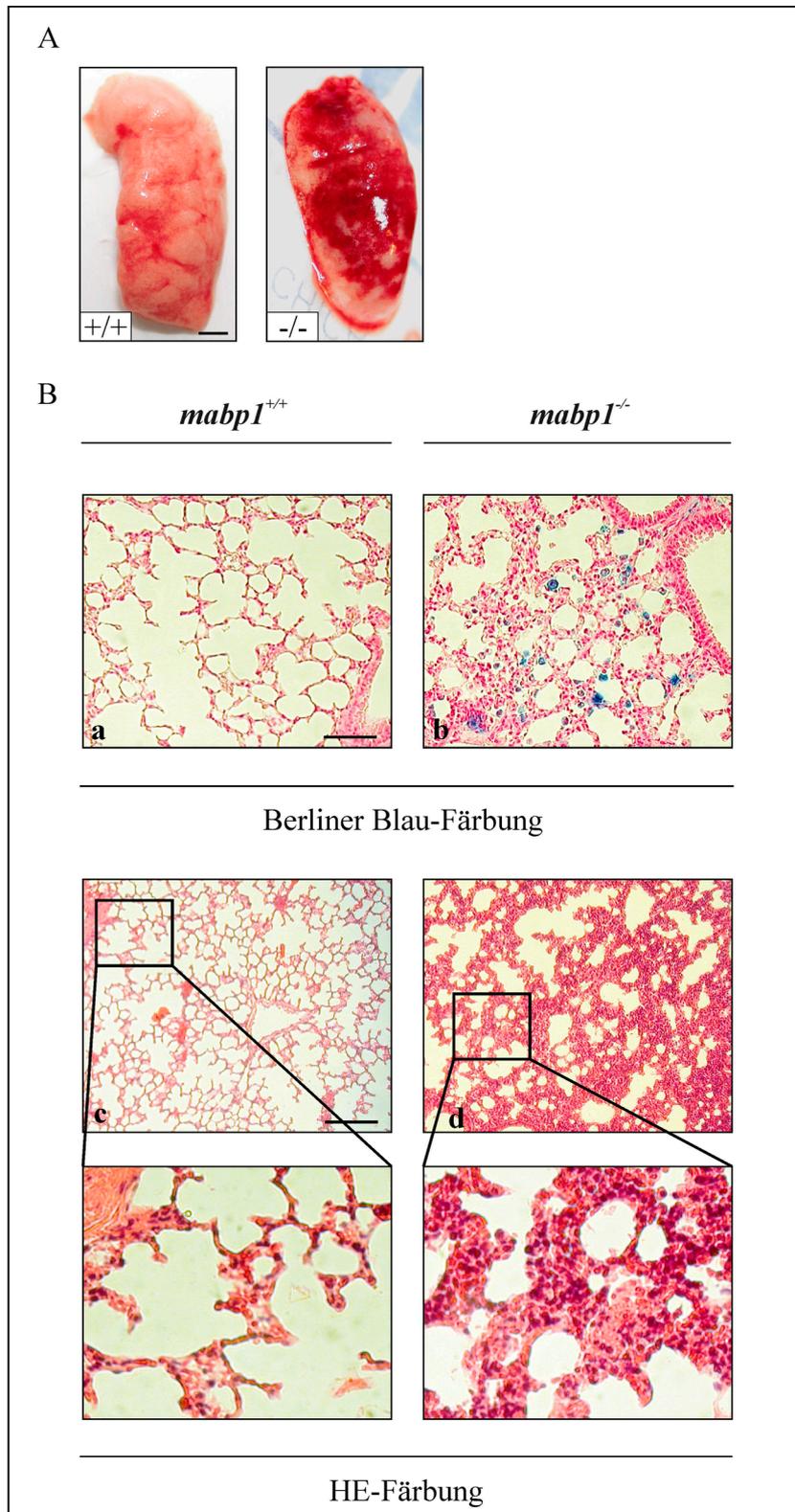
Die Charakterisierung der pathologischen Veränderungen des Herzens erfolgte durch Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und Sirius-Rot-Färbung an Längsschnitten des Herzens. In der HE-Färbung werden Nuklei dunkelblau bis violett und das Zytoplasma rosa angefärbt. Durch Sirius-Rot-Färbungen kann rot angefärbtes fibrotisches Gewebe von Herzmuskelzellen, deren Zytoplasma gelb gefärbt wird, abgegrenzt werden. Eine starke pathologische Veränderung des Herzens, die sich durch eine Dilatation aller Herzkammern einhergehend mit einer Verdünnung der Herzwände auszeichnet, wurde bei der Betrachtung des Herzens und in HE-gefärbten Schnitten sichtbar (Abb. 5.5 A-C). Durch Defizienz von *mAbp1* stark betroffen ist das linke Atrium, das eine extreme Vergrößerung und Thromben aufwies (Abb. 5.5 A und C, HE-Färbung). Durch Sirius-Rot-Färbung von Querschnitten des Herzens konnte in allen Kammern eine Zunahme des Bindegewebes (Fibrosen) identifiziert werden, die auf defekte Strukturen hindeutet (Abb. 5.5 C, Sirius-Rot-Färbung). Die Untersuchung der Anomalien des Herzens erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Denise Hilfiker-Kleiner (Kardiologie und Angiologie, Medizinische Hochschule Hannover). Die Anomalien des Herzens zeigten sich in 33% der *mabp1*<sup>+/-</sup> und 49% der *mabp1*<sup>-/-</sup> Weibchen, sowie in 48% der *mabp1*<sup>+/-</sup> und 45% der *mabp1*<sup>-/-</sup> Männchen, wohingegen ein solcher Defekt in wildtypischen Herzen in keinem Fall beobachtet werden konnte (weiblich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=42, *mabp1*<sup>+/-</sup> n=29, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=90; männlich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=45, *mabp1*<sup>+/-</sup> n=30, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=75).



**Abbildung 5.5: mAbp1-Defizienz führt zu pathologischen Veränderungen des Herzens.** (A) Das Herz einer *mabp1*<sup>-/-</sup> Maus ist vergrößert und hat ein stark vergrößertes linkes Atrium. Maßstab 0,25 cm. (B) Im Querschnitt durch das gesamte Herz wurden in *mabp1*<sup>-/-</sup> Herzen dünne Herzwände sichtbar. Maßstab 0,25 cm. (C) Hematoxylin/Eosin (HE)-gefärbte Herz-Paraffinquerschnitte von *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen wiesen eine Dilatation der Herzkammern und einen Thrombus im linken Atrium auf (linkes Bild). Sirius-Rot-Färbung vergleichbarer Querschnitte zeigten eine starke Fibrose in den Kammern von *mabp1*<sup>-/-</sup> Herzen (rote Färbung, rechtes Bild). Auf der linken Seite jeder Abbildung ist zum Vergleich das Herz, bzw. sind analoge Schnitte des Herzens einer wildtypischen Maus dargestellt. Maßstab 0,35 cm, RV= rechtes Ventrikel, LV=linkes Ventrikel, LA=linkes Atrium. (Die Untersuchung der Herzanomalien erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Denise Hilfiker-Kleiner, Kardiologie und Angiologie, Medizinische Hochschule Hannover).

Herzinsuffizienzen können durch Blutstauungen in den Lungen und einem damit verbundenen Austritt von Blutplasma als seröse Flüssigkeit aus den Kapillaren in die Alveolen ein Lungenödem auslösen. Um das parallele Auftreten von pathologischen Anomalien der Lunge und den beschriebenen pathologischen Veränderungen des Herzens zu bestätigen und genauer zu charakterisieren, wurden Lungenschnitte einer Analyse mittels HE- und Berliner Blau-Färbung unterzogen. Die Berliner Blau-Färbung dient dem Nachweis von Fe<sup>3+</sup> in Zellen und Geweben zur Untersuchung von Blutabbauprodukten. Hämosiderin-haltige Alveolarmakrophagen in der Lunge können durch die Fe<sup>3+</sup>-abhängige blaue Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Der eisenhaltige Proteinkomplex Hämosiderin ist ein Abbauprodukt von Erythrozyten und Hämoglobin und daher ein charakteristisches Merkmal für Blutungen und pulmonale Blutstauungen in der Lunge. Assoziiert mit Defekten im Herzen zeigten Lungen von *mAbp1*-defizienten Mäusen makroskopisch viele dunkelrote Verfärbungen (Abb. 5.6 A) und austretenden Schaum bei Lungenanschnitten, bestehend aus Ödemflüssigkeit und Luft. Einhergehend mit diesen Beobachtungen konnten

in Berliner Blau-gefärbten Schnitten Hämosiderin-speichernde Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden (Abb. 5.6 B, a und b).

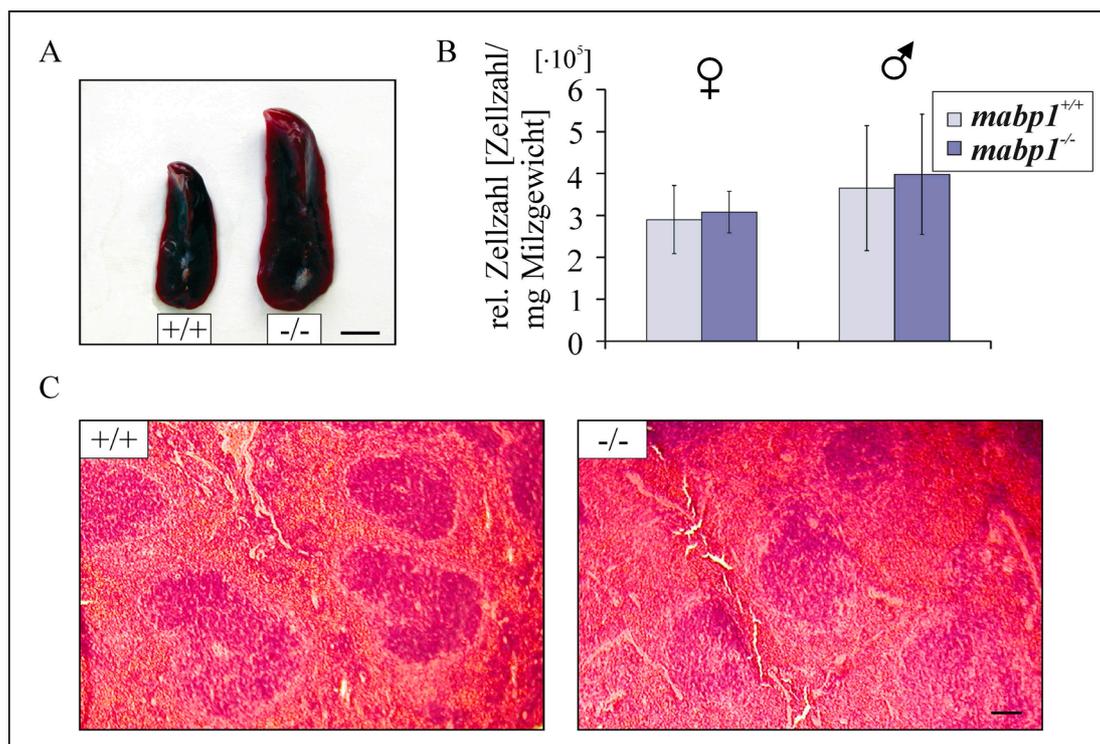


(Abbildung 5.6: Abbildungslegende siehe nächste Seite)

**Abbildung 5.6: Pathologische Veränderungen in der Lunge von *mAbp1*-defizienten Mäusen.** (A) Dargestellt ist die Lunge einer *mabp1*<sup>-/-</sup> Maus (rechts) mit Strukturveränderungen und dunkelroten Verfärbungen im Vergleich zur Lunge einer wildtypischen Maus (links). Maßstab 0,25 cm. (B) (a, b) Hämosiderin-haltige Alveolarmakrophagen (blau) wurden in Berliner Blau-gefärbten Schnitten von *mabp1*<sup>-/-</sup> Lungen (b), nicht jedoch von wildtypischen Lungen (a) nachgewiesen. Maßstab 50  $\mu$ m. (c, d) Im Vergleich zu wildtypischen Lungen (c) zeigten *mabp1*<sup>-/-</sup> Lungen (d) in Hematoxylin/Eosin (HE)-gefärbten Lungenschnitten verdickte Alveolarsepten. Die Bereiche der Schnitte im Kasten (c, d) sind in den unteren Bildern vierfach vergrößert dargestellt. Maßstab 100  $\mu$ m. (Die Untersuchung der Lungengewebeschnitte erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Uwe Kölsch, Institut für Immunologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg).

Histologische Untersuchungen zeigten weiterhin eine starke Verbreiterung der Alveolarsepten und Reduktion der Alveolen, was aufgrund der Verminderung der inneren Atmungsoberfläche zu einem verschlechterten Gasaustausch führt (Abb. 5.6 B, c und d).

Bei der Betrachtung der Milz und der Analyse des Milzgewichts wurde sowohl bei *mabp1*<sup>+/-</sup> als auch bei *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen zwischen dem dritten und zwölften Lebensmonat eine Splenomegalie beobachtet (Abb. 5.7 A).



**Abbildung 5.7: *mAbp1*-defiziente Mäuse entwickelten Splenomegalie bei normaler Milzstruktur.** (A) Dargestellt ist die Milz einer wildtypischen Maus (links) und die vergrößerte Milz einer *mabp1*<sup>-/-</sup> Maus (rechts). (B) Die getrennt nach Geschlechtern analysierte Zellularität der Milz von wildtypischen Mäusen und der vergrößerten Milz von *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen wies keinen signifikanten Unterschied auf ( $p < 0,05$ ; *student's t-test*). Die Bestimmung der relativen Zellzahl (Zellzahl/mg Milzgewicht) erfolgte nach Erythrozytenlyse. (C) Hematoxylin/Eosin (HE)-gefärbte Paraffinschnitte der Milz einer *mabp1*<sup>-/-</sup> (rechte Seite) und einer wildtypischen Maus (linke Seite) zeigten eine identische normale Struktur. Maßstab 250  $\mu$ m. (Die Untersuchung der Milzgewebeschnitte erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Uwe Kölsch, Institut für Immunologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg).

Milzen aus männlichen homozygoten *mAbp1*-defizienten und heterozygoten Mäusen haben ein etwa doppelt so großes relatives Milzgewicht (Milzgewicht auf das Körpergewicht bezogen) im Vergleich zu männlichen wildtypischen Mäusen. Der gleiche Effekt war bei weiblichen homozygoten *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen zu beobachten, wohingegen weibliche heterozygote Tiere nur ein um etwa das 1,3-fache größeres relatives Milzgewicht zeigten (Tab. 5.2).

**Tabelle 5.2: Relatives Milzgewicht weiblicher und männlicher wildtypischer, *mabp*<sup>+/-</sup> und *mabp*<sup>-/-</sup> Mäuse.**

Geschlecht	Genotyp	relatives Milzgewicht [10 <sup>-3</sup> ·g/g]	Signifikanz (p<0,05)
weiblich	+/+	4,39 ± 0,32	<b>0,023</b> <b>0,011</b>
	+/-	5,52 ± 1,02	
	-/-	9,06 ± 3,49	
männlich	+/+	3,47 ± 0,24	0,082 <b>0,016</b>
	+/-	6,41 ± 2,66	
	-/-	6,89 ± 2,92	

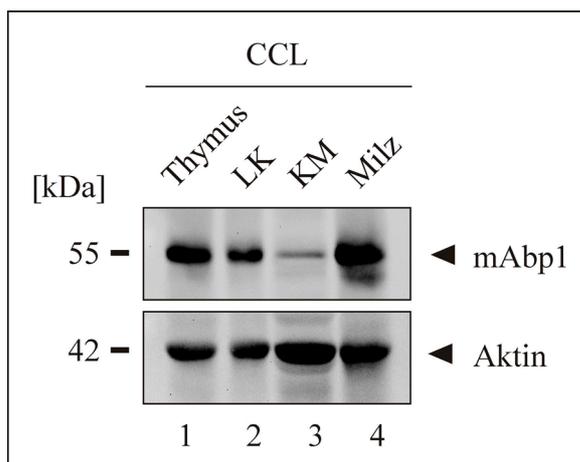
Relatives Milzgewicht: tatsächliches Milzgewicht [10<sup>-3</sup>·g] normiert auf das Körpergewicht [g]; Mäuse im Alter von 4 bis 12 Monaten wurden untersucht; dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen; eine signifikante Abweichung vom Wildtyp ist fett markiert (p<0,05; *student's t-test*); n=15 pro Genotyp und Geschlecht.

Um die Ursache der Splenomegalie zu ermitteln, wurde die relative Zahl der Milzzellen bestimmt und Milzschnitte durch HE-Färbung lichtmikroskopisch auf strukturelle Anomalien untersucht. Nach Lyse der Erythrozyten war die Zellzahl pro mg Milzgewicht in vergrößerten Milzen von *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen und in Milzen von wildtypischen Mäusen identisch (Abb. 5.7 B). HE-Färbungen von Milzschnitten von *mabp1*<sup>-/-</sup> und wildtypischen Kontrollmäusen gaben ebenfalls keinen Hinweis auf eine veränderte Milzstruktur aufgrund der Defizienz von *mAbp1*. Die klar abgegrenzte Struktur und Anordnung von weißer und roter Pulpa konnte sowohl in *mAbp1*-defizienten als auch in wildtypischen Milzschnitten beobachtet werden (Abb. 5.7 C). Die pathologischen Veränderungen in Milz, Herz und Lunge von *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen weisen auf eine essentielle Bedeutung von *mAbp1* für die Integrität dieser Organe hin. Die untersuchte Morphologie der Milz gibt keinen Hinweis auf die Ursache der sich in *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen entwickelnden Splenomegalie.

## 5.2. Die Bedeutung von mAbp1 für die Integrität lymphatischer Organe und die Entwicklung und Funktionalität von Lymphozyten

### 5.2.1. Auswirkung der mAbp1-Defizienz auf die Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten

Die Isolierung von mAbp1 aus stimulierten B-Lymphozyten und die Identifizierung von mAbp1 als Substrat von Proteintyrosinkinasen in früheren Arbeiten deuteten erstmals auf eine Funktion von mAbp1 in der Signalweiterleitung in Lymphozyten hin (Larbolette et al., 1999). In verschiedenen Studien konnte eine hohe Expression von mAbp1 in Thymus und Milz detektiert werden (Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000; Connert, 2003). Die in meiner Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen bestätigen die hohe mAbp1-Expression in Thymus und Milz und zeigen des weiteren eine Expression in Lymphknoten und Knochenmark (Abb. 5.8). Die Expression im Knochenmark ist jedoch im Vergleich zur Expression in anderen lymphatischen Organen gering.



**Abbildung 5.8: Expression von mAbp1 in lymphatischen Organen der Maus.** Die Expression von mAbp1 im Thymus (Spur 1), Lymphknoten (LK, Spur 2), Knochenmark (KM, Spur 3) und der Milz (Spur 4) von wildtypischen Mäusen wurde im Immunblot von Organlysaten (CCL, *cleared cellular lysate*) mit anti-mAbp1-Antikörpern (oben) analysiert. Als Ladungskontrolle wurde die Expression von Aktin herangezogen (unten). Relative Molekülmassen sind an der linken Seite in kDa angegeben.

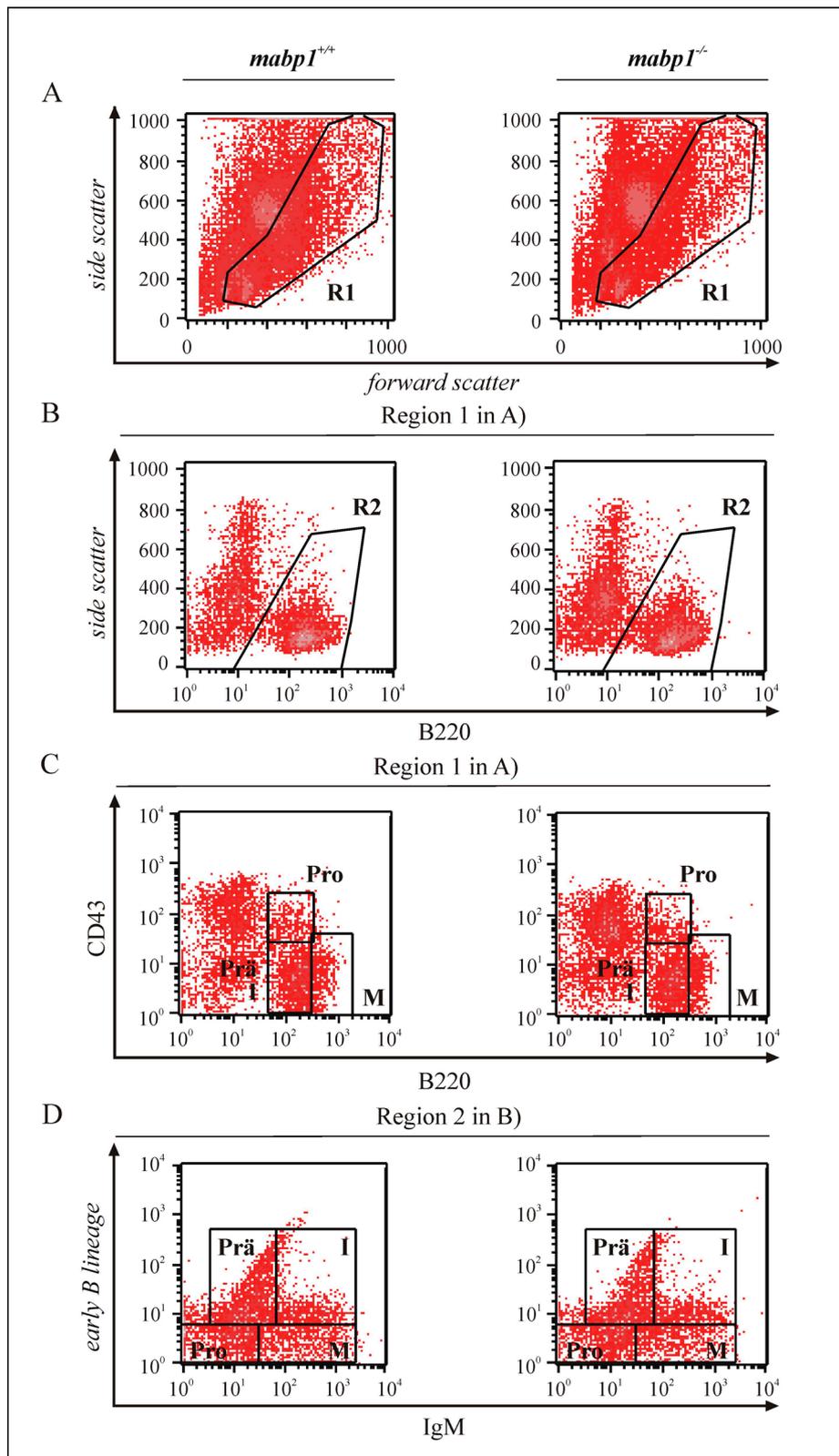
Die Analyse der mAbp1-defizienten Maus ermöglicht *in vivo*-Studien am gesamten Organismus und somit eine umfassende Analyse der Funktionalität von mAbp1 in lymphatischen Organen und in zellulären Mechanismen des Immunsystems. Die beobachtete Splenomegalie weist auf eine mögliche Bedeutung von mAbp1 in lymphatischen Geweben hin (siehe Abb. 5.7; Tab. 5.2).

Splenomegalien können durch Erkrankungen, die mit dem Immunsystem in Beziehung stehen, wie Leukosen, Lymphome und Leukämien, verursacht werden. Eine Vergrößerung der Milz kann jedoch auch anderen Erkrankungen zugrunde liegen. So führen hämatologische Erkrankungen und Infektionskrankheiten sowie rheumatische Erkrankungen und Herzinsuffizienzen ebenfalls zu Splenomegalien.

Um zu überprüfen, ob *mAbp1*-defiziente Mäuse Entzündungsreaktionen aufweisen, wurde das Blutbild wildtypischer und *mAbp1*-defizienter Mäuse miteinander verglichen. Die Untersuchung des kleinen und differentiellen Blutbildes in einem Tiermedizinischen Labor (Vet Med Labor, Ludwigsburg) zeigte keine Unterschiede zwischen wildtypischen und homozygoten *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen, die auf eine Entzündungsreaktion oder tumorartige Erkrankungen hindeuten (Daten nicht gezeigt). Für die Untersuchung des Blutbildes wurden Tiere verwendet, die aufgrund von anatomischen Untersuchungen keine Anomalien des Herzens und der Lunge aufwiesen, um ein eventuell verändertes Blutbild aufgrund dieses Phänotyps auszuschließen.

Des Weiteren wurde im Rahmen meiner Arbeit untersucht, ob die Vergrößerung der Milz auf die Zunahme einer oder mehrerer B- oder T-Zell-Populationen zurückzuführen ist. In ersten Studien zur Analyse der Splenomegalie durch Sabine Connert konnte keine erhöhte Anzahl von B-, T-Zellen oder Makrophagen, aber eine Reduktion der T1-B-Zell-Population in vergrößerten Milzen von *mabp1*<sup>-/-</sup> Männchen beobachtet werden (Connert, 2003). Durch eine Erhöhung der Probenzahl sollte die Reduktion der T1-B-Zell-Population verifiziert, sowie eventuell vorliegende weitere Unterschiede in anderen Subpopulationen ermittelt werden. Um ein umfassendes Bild über mögliche Defekte in der Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten aufgrund der Defizienz von *mAbp1* zu erhalten, wurden im Rahmen meiner Studien verschiedene B- und T-Zell-Subpopulationen und Entwicklungsstadien sowohl in der Milz als auch im Knochenmark, Thymus und Lymphknoten durchflusszytometrisch untersucht.

B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark von der Pro-B-Zelle über die Prä-B-Zelle zur unreifen B-Zelle (zur Übersicht: Rolink und Melchers, 1996). Unreife B-Zellen kommen nur im Knochenmark vor. Transitionale B-Zellen des Typs 1 (T1-B-Zellen), die das Knochenmark verlassen, können dagegen auch im Blut und in der Milz detektiert werden. Transitionale B-Zellen des Typs 2 (T2-B-Zellen) und Marginal Zonen (MZ)-B-Zellen sind nur in der Milz lokalisiert, wohingegen reife B-Zellen im Knochenmark, im Blut, in der Milz und in den Lymphknoten vorkommen (Loder et al., 1999; zur Übersicht: Carsetti, 2000; Niiro und Clark, 2002). Die unreife CD4-, CD8- T-Vorläuferzelle entwickelt sich in verschiedenen Bereichen des Thymus einhergehend mit der Expression von CD4 und CD8 und der Umordnung der TCR  $\alpha$  und  $\beta$  Gene. T-Zellen differenzieren in CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> und CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die den Thymus verlassen und in sekundäre lymphatische Organe gelangen (Mondino et al., 1996; zur Übersicht: Germain, 2002; Siebenlist et al., 2005).



(Abbildung 5.9: Abbildungslegende siehe nächste Seite)

**Abbildung 5.9: Die Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark wird durch *mAbp1*-Defizienz nicht beeinträchtigt.** Knochenmarkszellen einer wildtypischen und einer *mabp1*<sup>-/-</sup> Maus wurden mit anti-B220-PE und anti-CD43-PerCP sowie anti-B220-PE, anti-*early B lineage*-PerCP und anti-IgM-FITC zur durchflusszytometrischen Untersuchung markiert. Es wurden 30000 *events* aufgenommen. (A) Im *dot plot* wurde die Lymphozyten-Population anhand der Größe und Granularität identifiziert (Region 1). (B) B-Zellen konnten anhand der B220-Expression detektiert werden (Region 2). (C) Die unterschiedlichen B-Zell-Entwicklungsstadien der Lymphozyten-Population (Region 1 in A) wurden im *dot plot* aufgrund der Expression von CD43 und des B-Zell-Markers B220 analysiert. (D) Die Analyse B220-positiver Lymphozyten (Region 2 in B) erfolgte im *dot plot* aufgrund der Expression des *early B lineage*-Markers und IgM. R, Region; Pro, Pro-B-Zellen; Prä, Prä-B-Zellen; I, unreife (*immature*) B-Zellen; M, reife (*mature*) B-Zellen (Darstellung eines repräsentativen Experiments; weiblich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=5, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=3; männlich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=4, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=8).

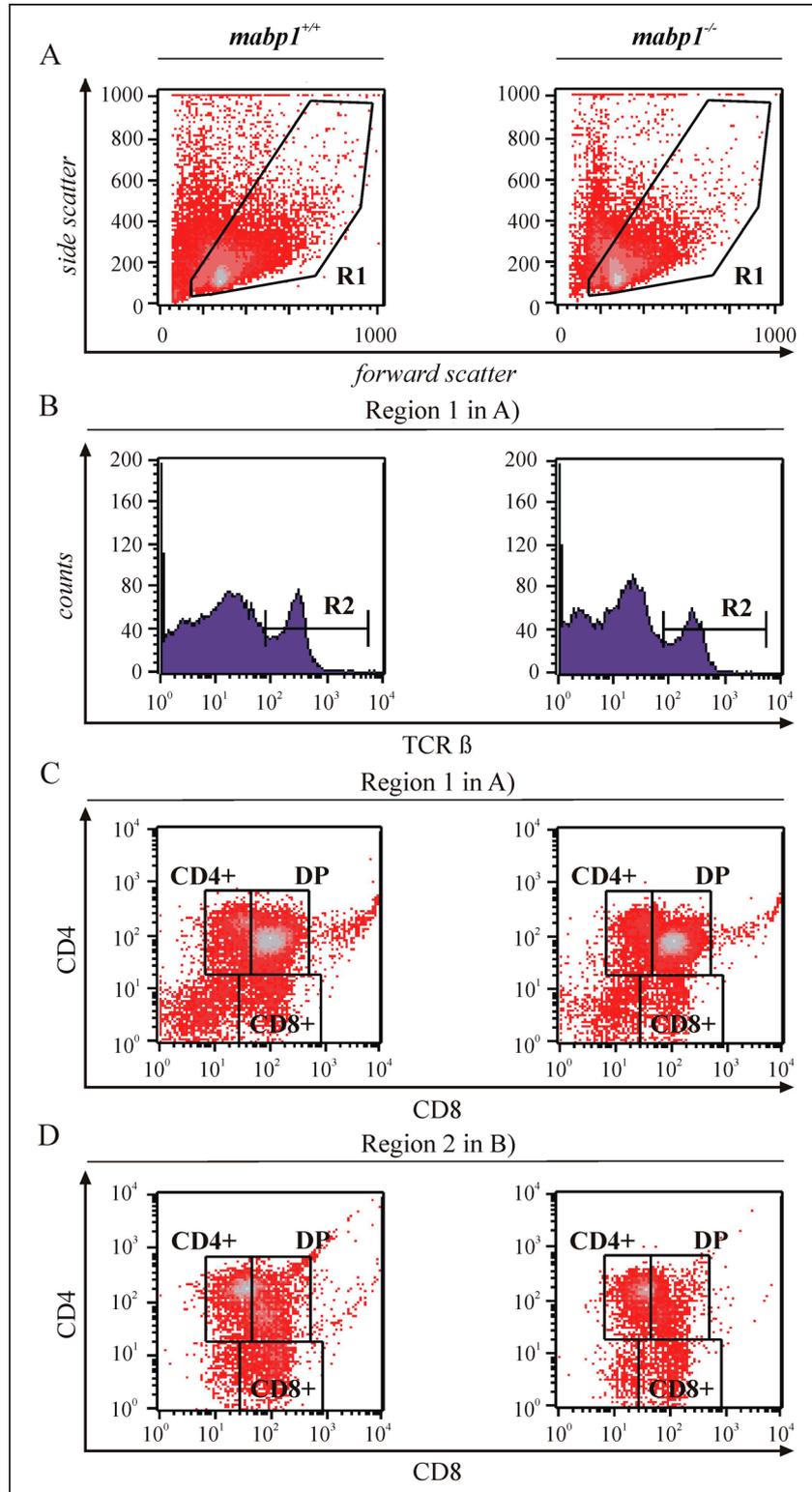
**Tabelle 5.3: Relative Anteile der B-Zell-Populationen im Knochenmark einer *mAbp1*-defizienten und einer wildtypischen Maus.**

	Population/Region	relativer Anteil [%]	
		<i>mabp1</i> <sup>+/+</sup>	<i>mabp1</i> <sup>-/-</sup>
A)	<b>Lymphozyten (R1)</b>	21,45	29,1
B)	<b>B220+ (R2)</b>	52,7	47,3
C)	<b>Pro</b>	7,1	5,7
	<b>Prä, I</b>	34,9	30,6
	<b>M</b>	8,0	8,3
D)	<b>Prä</b>	42,3	40,1
	<b>I</b>	16,1	17,9
	<b>Pro</b>	17,0	19,2
	<b>M</b>	15,8	15,6

Relative Anteile der B-Zell-Populationen wurden durch Auswertung des in Abbildung 5.9 dargestellten Experiments erhalten; R, Region; Pro, Pro-B-Zellen; Prä, Prä-B-Zellen; I, unreife (*immature*) B-Zellen; M, reife (*mature*) B-Zellen.

Aus der Gesamtpopulation der Knochenmarkszellen wird die Lymphozyten-Population anhand der spezifischen Größe und Granularität dieser Zellen im *dot plot* identifiziert und für weitere Analysen eingesetzt (Abb. 5.9 A). Die Analyse der unterschiedlichen Entwicklungsstadien der B-Zellen im Knochenmark erfolgte durch Anfärbung von für verschiedene Entwicklungsstadien spezifischen Molekülen auf der Zelloberfläche und anschließender durchflusszytometrischer Untersuchung. Als allgemeiner B-Zell-Marker und Marker für Vorläuferzellen wurde die B-Zell-spezifische B220-Isoform von CD45R verwendet, da die Expression schon ab dem Stadium der Pro-B-Zelle erfolgt und bis zur ausdifferenzierten Plasmazelle anhält. B220-positive Zellen wurden vor der weiteren Analyse aus der Lymphozyten-Population isoliert (Abb. 5.9 B). Die Unterscheidung der Pro-, Prä- und unreifen B-Zellen sowie reifen B-Zellen im Knochenmark erfolgte durch Anfärbung zum einen mit anti-CD43 (Leukosialin)-Antikörpern gegen das Mucin Leukosialin, einem Marker der frühen Phase der B-Zell-Entwicklung und anti-B220-Antikörpern (Abb. 5.9 C) und zum anderen durch Markierung mit anti-*early B lineage* Antikörpern gegen ein Transmembran-Protein, das in unreifen B-Zellen exprimiert wird,

und anti-IgM-Antikörpern (Abb. 5.9 D). Die Analyse der zellulären Zusammensetzung des Knochenmarks von *mAbp1*-defizienten Mäusen zeigt in der Gesamtzahl B220-positiver Zellen sowie in verschiedenen B-Zell-Entwicklungsstadien keine Abweichungen zur zellulären Zusammensetzung des Knochenmarks von wildtypischen Mäusen (Tab. 5.3).



(Abbildung 5.10: Abbildungslegende siehe nächste Seite)

**Abbildung 5.10: Die T-Zell-Entwicklung im Thymus wird durch mAbp1-Defizienz nicht beeinträchtigt.** Zellen des Thymus einer wildtypischen und einer *mabp1*<sup>-/-</sup> Maus wurden mit anti-TCR  $\beta$  chain-FITC, anti-CD4-PerCP und anti-CD8-PE markiert und durchflusszytometrisch analysiert. 30000 events wurden aufgenommen. (A) Im *dot plot* wurde die Lymphozyten-Population anhand der Größe und Granularität aus der Gesamtzahl der Thymuszellen detektiert (Region 1). (B) Die TCR  $\beta$ -positive Lymphozyten-Population wurde im Histogramm *plot* bestimmt (Region 2). (C, D) Die Expression von CD4 und CD8 wurde für die Gesamtzahl der Lymphozyten (Region 1 in A) (C) und für TCR  $\beta$ -positive Zellen (Region 2 in B) (D) im *dot plot* untersucht. R, Region; DP, doppelt positive (CD4+ CD8+) Thymozyten (Darstellung eines repräsentativen Experiments; weiblich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=5, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=3; männlich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=4, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=8).

**Tabelle 5.4: Relative Anteile der T-Zell-Populationen im Thymus einer mAbp1-defizienten und einer wildtypischen Maus.**

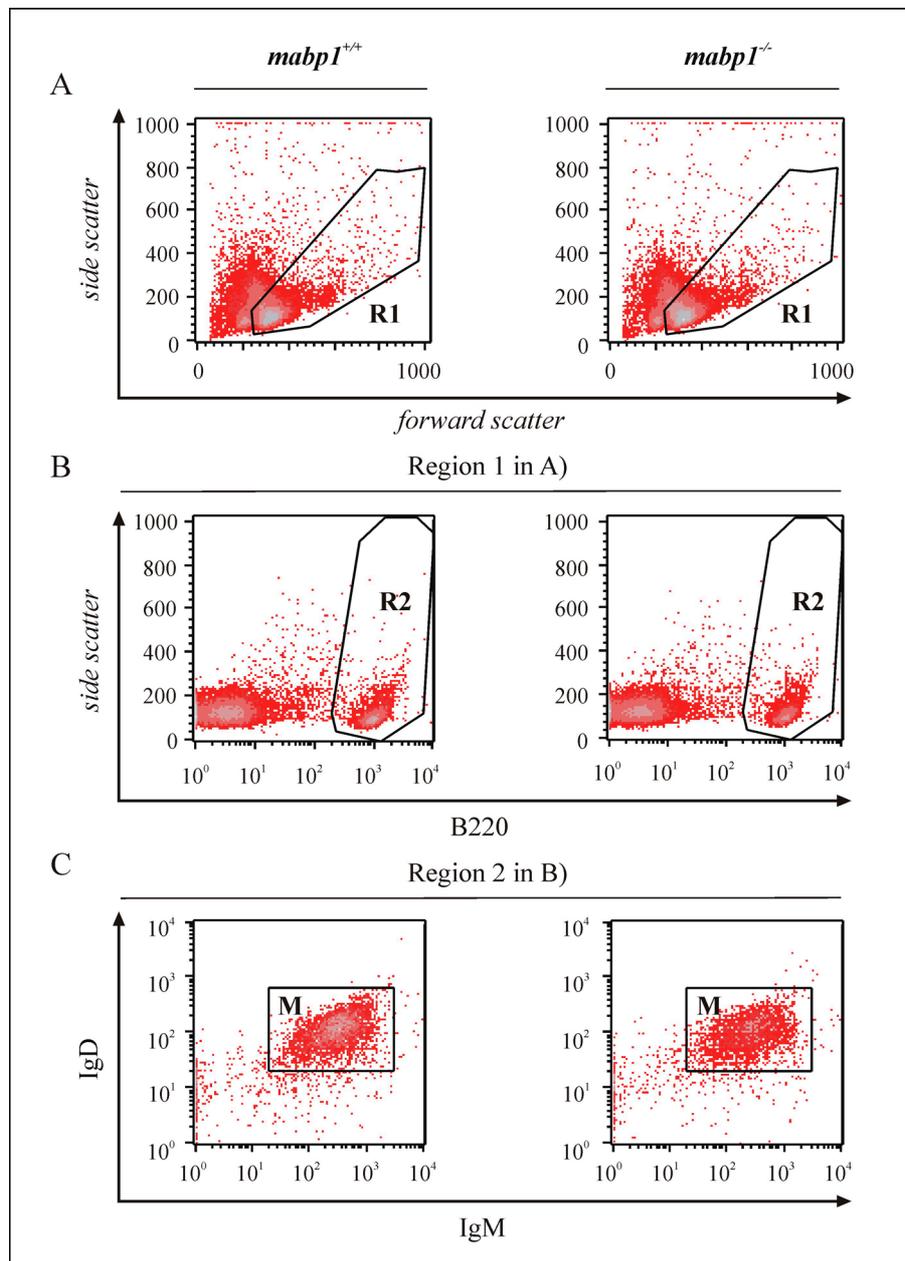
	Population/Region	relativer Anteil [%]	
		<i>mabp1</i> <sup>+/+</sup>	<i>mabp1</i> <sup>-/-</sup>
A)	<b>Lymphozyten (R1)</b>	77,0	81,2
B)	<b>TCR <math>\beta</math>+ (R2)</b>	32,6	34,6
C)	<b>CD4+</b>	19,9	12,8
	<b>CD8+</b>	6,6	4,2
	<b>DP</b>	61,5	76,8
D)	<b>CD4+</b>	38,3	47,4
	<b>CD8+</b>	17,2	16,4
	<b>DP</b>	37,5	30,7

Relative Anteile der T-Zell-Populationen wurden durch Auswertung des in Abbildung 5.10 dargestellten Experiments erhalten; R, Region; DP, doppelt positive (CD4+ CD8+) Thymozyten.

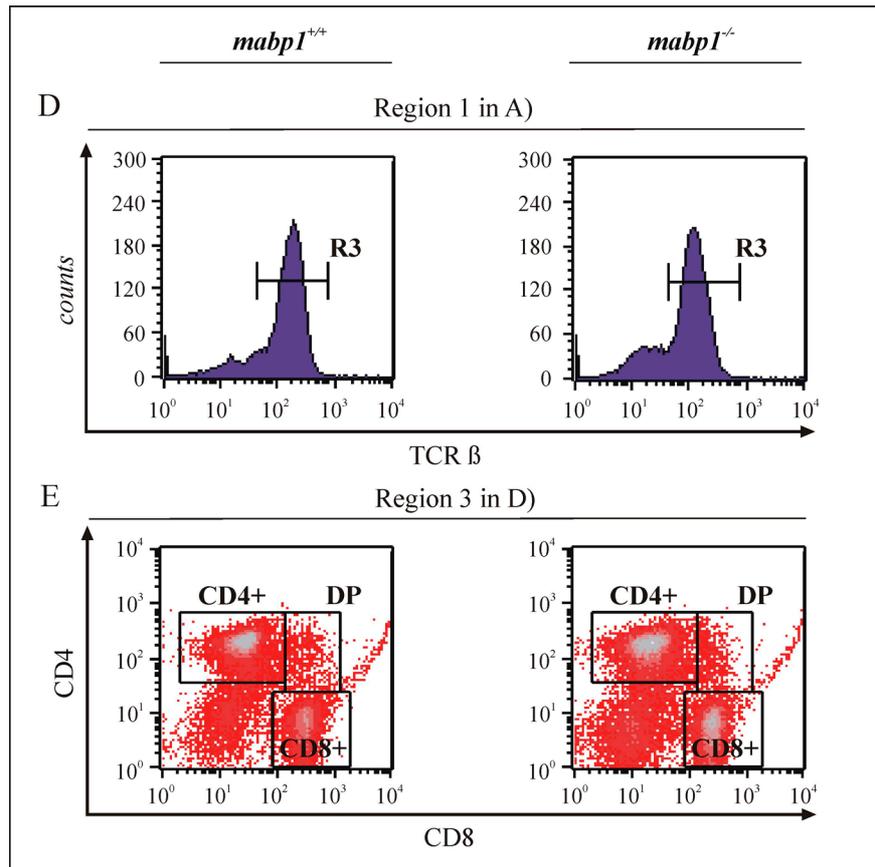
Die Analyse verschiedener T-Zell-Entwicklungsstadien im Thymus mAbp1-defizienter Mäuse erfolgte mit Hilfe der unterschiedlich exprimierten Oberflächenmarker CD4 und CD8 sowie der T-Zell-Antigenrezeptor (TCR)  $\beta$  Kette durch durchflusszytometrische Untersuchungen (Abb. 5.10). Die gesamte Lymphozyten-Population, die unter Berücksichtigung der spezifischen Größe und Granularität dieser Zellen identifiziert wurde (Abb. 5.10 A), und T-Zellen, die T-Zell-Antigenrezeptor (TCR)  $\beta$  Ketten auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abb. 5.10 B), werden einer Analyse der T-Zell-Subpopulationen aufgrund der Expression von CD4 und CD8 unterzogen (Abb. 5.10 C, D). Die Population TCR  $\beta$ -positiver Zellen sowie das Verhältnis von CD4-positiven, CD8-positiven und doppelt positiven T-Zellen ist im Thymus von mAbp1-defizienten und wildtypischen Mäusen identisch (Tab. 5.4).

Die Analyse der Population reifer B-Zellen im Lymphknoten mAbp1-defizienter und wildtypischer Mäuse erfolgte durch Markierung mit anti-IgD- und anti-IgM-Antikörpern nach Identifizierung der Lymphozyten-Population und B220-positiver Lymphozyten wie es bereits für die Analyse der B-Zellen des Knochenmarks beschrieben wurde (Abb. 5.11 A-C). Die Population der Lymphozyten, B220-positiver Zellen und reifer B-Zellen zeigte keine Veränderung aufgrund der Defizienz von mAbp1 (Tab. 5.5). Die Analyse der

zellulären Zusammensetzung der T-Zellen des Lymphknotens wurde an TCR  $\beta$ -positiven Zellen (Abb. 5.11 D) anhand der CD4- und CD8-Expression durchgeführt (Abb. 5.11 E). Das Verhältnis von CD4-positiven, CD8-positiven und doppelt positiven T-Zellen ist in *mAbp1*-defizienten und wildtypischen Mäusen identisch (Tab. 5.5).



(Abbildung 5.11: Fortsetzung der Abbildung siehe nächste Seite)



**Abbildung 5.11: mAbp1-defiziente Lymphknoten zeigten keine Veränderungen in B- und T-Zell-Subpopulationen.** Zellen der Lymphknoten einer wildtypischen und einer *mabp1*<sup>-/-</sup> Maus wurden mit anti-B220-PE, anti-IgM-FITC und anti-IgD-PerCP bzw. anti-TCR  $\beta$  chain-FITC, anti-CD4-PerCP und anti-CD8-PE markiert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte durch Aufnahme von 30000 events. (A) Die Lymphozyten-Population wurde anhand der Größe und Granularität im *dot plot* detektiert (Region 1). (B) Die Identifizierung der B-Zellen erfolgte über die Analyse der B220-Expression (Region 2). (C) Im *dot plot* wurden B-Zellen (Region 2 in B) in Abhängigkeit der Expression von IgD und IgM zur Analyse reifer B-Zellen dargestellt. (D) Die Expression der TCR  $\beta$  chain diente zur Identifizierung von T-Zellen in der Lymphozyten-Gesamtpopulation. (Region 3) (E) Im *dot plot* wurden die TCR  $\beta$ -positiven Lymphozyten (Region 3 in D) aufgrund ihrer Expression von CD4 und CD8 analysiert. R, Region; M, reife (*mature*) B-Zellen; DP, doppelt positive (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) Thymozyten (Darstellung eines repräsentativen Experiments; weiblich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=5, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=3; männlich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=4, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=8).

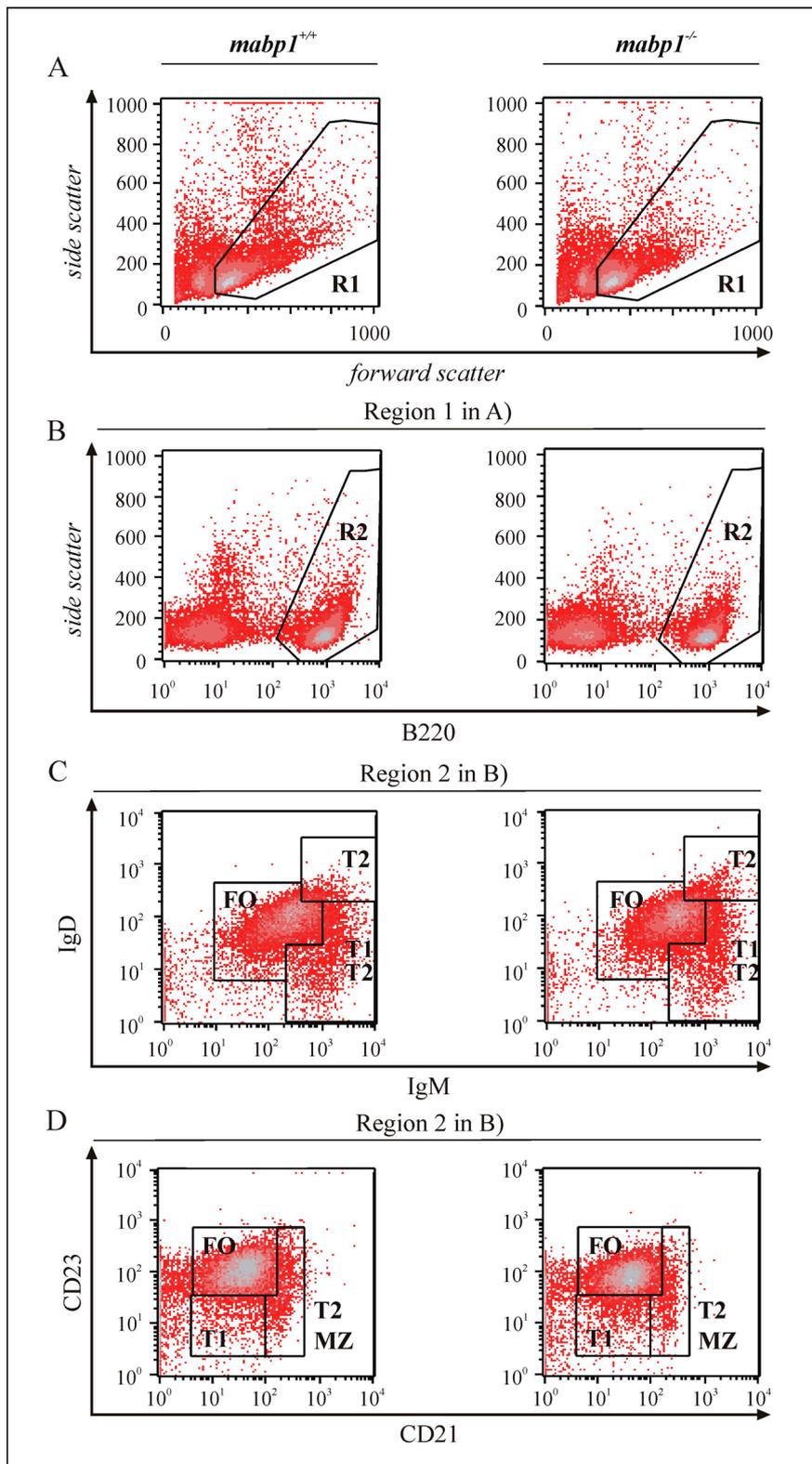
**Tabelle 5.5: Relative Anteile der Lymphozyten-Populationen im Lymphknoten einer mAbp1-defizienten und einer wildtypischen Maus.**

	Population/Region	relativer Anteil [%]	
		<i>mabp1</i> <sup>+/+</sup>	<i>mabp1</i> <sup>-/-</sup>
A)	Lymphozyten (R1)	63,3	66,2
B)	B220+ (R2)	22,1	18,2
C)	M	89,5	88,29
D)	TCR $\beta$ + (R3)	88,9	82,7
E)	CD4+	54,0	47,6
	CD8+	29,3	29,9
	DP	3,4	2,3

Relative Anteile der Lymphozyten-Populationen wurden durch Auswertung des in Abbildung 5.11 dargestellten Experiments erhalten; R, Region; M, reife (*mature*) B-Zellen; DP, doppelt positive (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) Thymozyten.

Die Identifizierung der Lymphozyten-Population aus der Gesamtzahl der Milzzellen sowie die Identifizierung der B-Zell-Gesamtpopulation erfolgte wie für die Analyse der B-Zellen des Knochenmarks beschrieben (Abb. 5.12 A, B). T1-, T2-, MZ- und reife B-Zellen aus der Milz wurden anhand der Expression der Oberflächenmarker IgM und IgD (Abb. 5.12 C) sowie CD21 (Komplementrezeptor Typ 2) und CD23 (FcεRII) durchflusszytometrisch identifiziert (Abb. 5.12 D). CD21, CD23 und IgD sind Marker der späten Differenzierung. Die Reduktion der IgM-Expression und die verstärkte Expression von IgD charakterisieren die Entwicklung von der unreifen zur reifen B-Zelle. Die zelluläre Zusammensetzung der Milz in Abhängigkeit der Defizienz von *mAbp1* wurde an Milzen von Mäusen untersucht, die eine Vergrößerung des Organs aufwiesen. In acht unabhängigen Experimenten mit Milzen von fünf weiblichen *mabp1*<sup>+/+</sup> und drei *mabp1*<sup>-/-</sup> sowie vier männlichen *mabp1*<sup>+/+</sup> und acht *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen konnte nur in einem Fall eine Reduktion der T1-B-Zellpopulation in der *mabp1*<sup>-/-</sup> Milz beobachtet werden. Dieser Unterschied kann nicht als signifikant bewertet werden und ist nicht auf Defizienz von *mAbp1* zurückzuführen. Ein signifikanter Unterschied im Verhältnis der Lymphozyten und B220-positiver Zellen konnte nicht detektiert werden. Des Weiteren ist das Verhältnis der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen aus folliculären, T1- und T2-Zellen sowie MZ-Zellen in Milzen aus *mAbp1*-defizienten und wildtypischen Mäusen identisch (Tab. 5.6).

Anhand der in meiner Arbeit durchgeführten Analysen zur Entwicklung und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten konnten keine Veränderungen der zellulären Komposition in den lymphatischen Organen Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und Milz identifiziert werden. Ein verändertes Verhältnis der zellulären Populationen der Milz kann nicht als Ursache der Splenomegalie herangezogen werden. Auf Grundlage dieser Experimente kann die Vergrößerung der Milz auf die Zunahme aller Zelltypen der Milz und des Blutvolumens zurückgeführt werden.



(Abbildung 5.12: Abbildungslegende siehe nächste Seite)

**Abbildung 5.12: Die Analyse von Splenozyten aus mAbp1-defizienten Milzen zeigte unveränderte Populationen von T1-, T2-, MZ-, und reifen B-Zellen.** Die Färbung von Splenozyten einer wildtypischen und einer *mabp1*<sup>-/-</sup> Maus erfolgte zum einen mit anti-B220-PE, anti-IgM-FITC und anti-IgD-PerCP und zum anderen mit anti-B220-PE, anti-CD21-FITC und anti-CD23-PerCP zur anschließenden durchflusszytometrischen Analyse. 30000 *events* wurden aufgenommen. (A) Die Detektion der Lymphozyten erfolgte im *dot plot* anhand der Größe und Granularität (Region 1). (B) Die B-Zell-Population der Lymphozyten der Region 1 in A) wurde aufgrund der B220-Expression identifiziert (Region 2). (C, D) B220-positive Zellen der Region 2 in B) wurden nach der Expression von IgD und IgM (C) und nach der Expression von CD23 und CD21 (D) in die unterschiedlichen Subpopulationen eingeteilt. R, Region; FO, folliculäre B-Zellen; MZ, Marginal Zonen B-Zellen; T1, transitionale B-Zellen Typ1; T2, transitionale B-Zellen Typ2 (Darstellung eines repräsentativen Experiments; weiblich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=5, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=3; männlich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=4, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=8).

**Tabelle 5.6: Relative Anteile der B-Zell-Populationen der Milz einer mAbp1-defizienten und einer wildtypischen Maus.**

	Population/Region	relativer Anteil [%]	
		<i>mabp1</i> <sup>+/+</sup>	<i>mabp1</i> <sup>-/-</sup>
A)	<b>Lymphozyten (R1)</b>	70,1	73,4
B)	<b>B220+ (R2)</b>	59,8	51,1
C)	<b>FO</b>	73,1	71,5
	<b>T1, T2</b>	15,3	16,2
	<b>T2</b>	7,0	8,5
D)	<b>FO</b>	73,4	73,5
	<b>T1</b>	7,6	6,0
	<b>MZ, T2</b>	5,5	7,4

Relative Anteile der B-Zell-Populationen wurden durch Auswertung des in Abbildung 5.12 dargestellten Experiments erhalten; R, Region; FO, folliculäre B-Zellen; MZ, Marginal Zonen B-Zellen; T1, transitionale B-Zellen Typ1; T2, transitionale B-Zellen Typ2.

### 5.2.2. Funktionelle Bedeutung von mAbp1 in Signalweiterleitungsprozessen nach B-Zell-Stimulation am Beispiel der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung

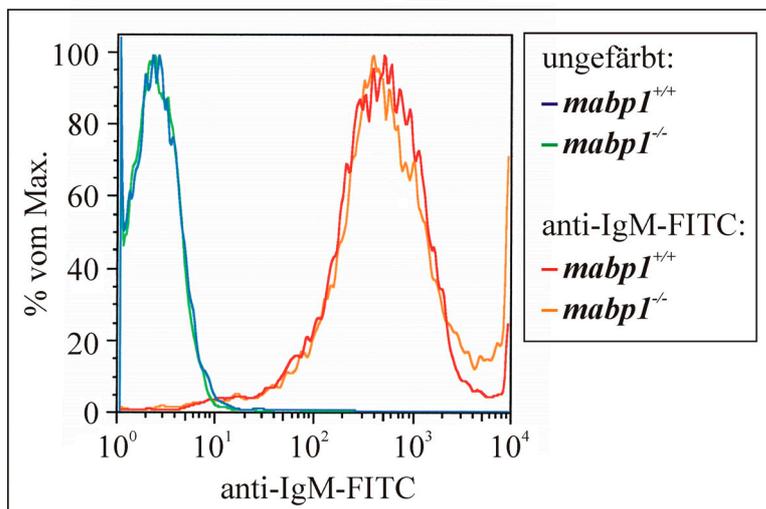
Die Entwicklung und Differenzierung von B- und T-Zellen weist in den im Rahmen meiner Arbeit durchgeführten Studien keine Unterschiede auf. Zur anschließenden Analyse der Funktionalität von mAbp1 in der Signalweiterleitung wird die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in B-Zellen nach Aktivierung als klassisches Funktionsmerkmal untersucht. Die Phosphorylierung von mAbp1 durch Proteintyrosinkinase und die Interaktion mit der 5'Phosphatase SHIP, einem negativen Regulator der B-Zell-Antigenrezeptor (BCR)-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antwort, deuten auf eine Beteiligung dieses Proteins an BCR-Signalwegen hin (Larbolette et al., 1999; Larbolette, 2000).

Der Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ist essentiell für eine Vielzahl von zellulären Vorgängen als Antwort auf stimulatorische Signale. Nach antigenabhängiger Stimulation des BCR bzw. T-Zell-Antigenrezeptors (TCR) erfolgt die Weiterleitung des Signals in das Zellinnere über die Phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), die Phosphatidylinositol-4,5-

bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) hydrolysiert. Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>), ein Produkt dieser Hydrolyse, mobilisiert die Freisetzung des Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Nach Entleerung dieser Speicher wird der extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch Ionenkanäle über die Plasmamembran induziert (zur Übersicht: Winslow et al., 2003; Gallo et al., 2006).

Die Analyse der funktionellen Bedeutung von mAbp1 auf diese zellulären Vorgänge wurde durch Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierungs-Studien an B-Zellen von *mabp1*<sup>+/+</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Milzen nach BCR-Quervernetzung mit F(ab')<sub>2</sub> Fragment anti-IgG+IgM (H+L) durchgeführt.

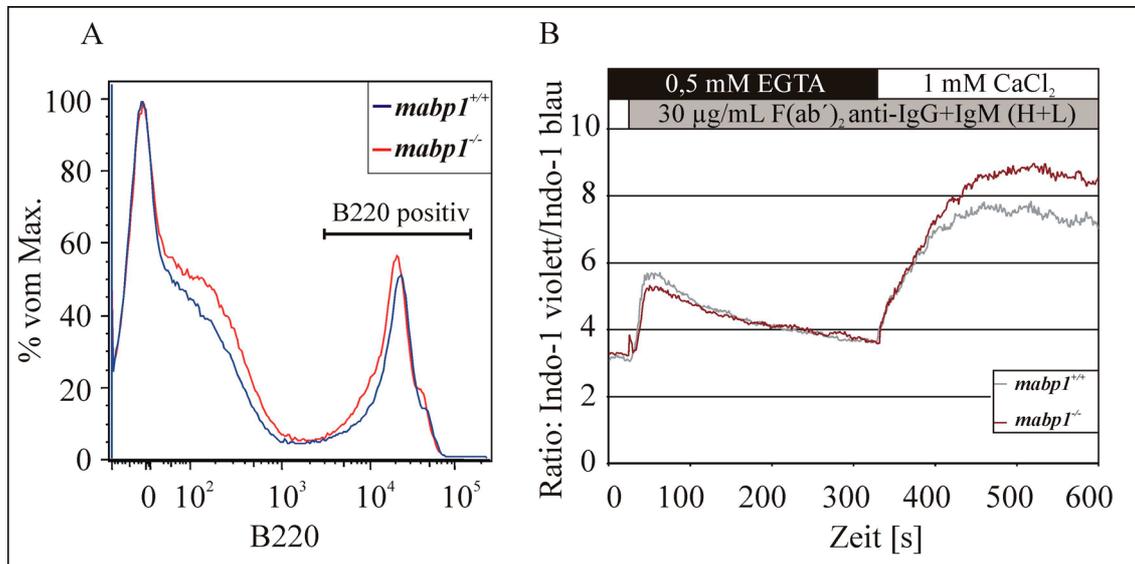
Die identische Expression von IgM an der Oberfläche wurde überprüft, um eine gleiche Stimulierbarkeit der B-Zellen aus *mabp1*<sup>-/-</sup> und *mabp1*<sup>+/+</sup> Milzen zu gewährleisten (Abb. 5.13).



**Abbildung 5.13: Die Oberflächenexpression des IgM-BCR ist in B-Zellen von mAbp1-defizienten und wildtypischen Milzen identisch.** Im Histogramm dargestellt sind ungefärbte (*mabp1*<sup>+/+</sup> blau, *mabp1*<sup>-/-</sup> grün) und mit anti-IgM-FITC angefärbte Zellen (*mabp1*<sup>+/+</sup> rot, *mabp1*<sup>-/-</sup> orange) der Milz aus *mabp1*<sup>-/-</sup> und wildtypischen Mäusen.

Das Alter der untersuchten Tiere lag zwischen fünf und zwölf Monaten und damit im Zeitraum der Manifestierung des Phänotyps (siehe Abb. 5.4). B-Zellen der Milz wurden anhand ihrer Expression von B220 mit Hilfe der Markierung dieses Oberflächenmarkers durch anti-B220-Antikörper identifiziert (Abb. 5.14 A) und die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Indo-1 (Ratio: Indo-1 violett/Indo-1 blau) im Durchflusszytometer LSR II (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert (für Details siehe Material und Methoden; Abb. 5.14 B). Bei der Betrachtung des Profils der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung zeigte sich sowohl bei B-Zellen aus mAbp1-defizienten Milzen als auch bei B-Zellen aus wildtypischen Milzen der charakteristische Verlauf der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung (Abb. 5.14 B). Dieser setzt sich zusammen aus dem Signal des Einstroms von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern des ER nach BCR-Stimulation gefolgt von dem deutlich stärkeren

Signal des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die Plasmamembran durch Ionenkanäle, das nach Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemessen wurde (Stork et al., 2004).



**Abbildung 5.14: Der Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in B-Zellen aus der Milz ist in  $mAbp1$ -defizienten Mäusen erhöht.** (A) B-Zellen einer Milz aus einer  $mabp1^{+/+}$  und einer  $mabp1^{-/-}$  Maus wurden über die Markierung mit anti-B220-PE-Cy7 aus der Gesamtzahl der Zellen identifiziert ( $mabp1^{+/+}$  blaue Linie,  $mabp1^{-/-}$  rote Linie). (B) Zellen der Milz wurden neben der Markierung mit anti-B220-PE-Cy7 mit Indo-1-AM beladen. In B220-positiven B-Zellen wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern nach Stimulation mit  $30 \mu\text{g/mL}$   $\text{F(ab')}_2$  Fragment anti-IgG+IgM (H+L) nach 25 s in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier, 0,5 mM EGTA-haltiger Lösung untersucht. Der Einstrom des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  wurde nach Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Lösung auf 1 mM nach 5 min 25 s aufgenommen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung wurde über die Ratio Indo-1 violett/Indo-1 blau gegen die Zeit [s] gemessen ( $mabp1^{+/+}$  graue Linie,  $mabp1^{-/-}$  rote Linie; weiblich:  $mabp1^{+/+}$  n=8,  $mabp1^{+/-}$  n=7,  $mabp1^{-/-}$  n=10; männlich:  $mabp1^{+/+}$  n=8,  $mabp1^{+/-}$  n=6,  $mabp1^{-/-}$  n=10).

Die in B220-positiven Zellen (Abb. 5.14 A) untersuchte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern ins Zytoplasma wird durch Defizienz von  $mAbp1$  nicht beeinträchtigt (Abb. 5.14 B, Wildtyp: graue Linie,  $mabp1^{-/-}$ : rote Linie). Teilweise auftretende Unterschiede in der Intensität des Signals (Ratio: Indo-1 violett/Indo-1 blau) waren nur schwach und nicht konsistent und deuten somit nicht auf eine veränderte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung aus dem ER hin. Der Einstrom aus dem Extrazellulärraum über die Plasmamembran war jedoch in B220-positiven B-Zellen aus  $mabp1^{-/-}$  Milzen im Vergleich zu B-Zellen aus wildtypischen Milzen erhöht (Abb. 5.14 B). Die Analysen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung wurden mit B-Zellen aus Milzen von weiblichen und männlichen wildtypischen, heterozygoten  $mabp1^{+/-}$  und homozygoten  $mabp1^{-/-}$  Mäusen durchgeführt. Das Auftreten eines verstärkten Einstroms von  $\text{Ca}^{2+}$  über die Plasmamembran zeigte eine Abhängigkeit von Genotyp und Geschlecht, da dieser Effekt häufiger in B-Zellen von homozygoten  $mabp1^{-/-}$  als von heterozygoten Mäusen und häufiger in B-Zellen von

männlichen *mabp1*<sup>-/-</sup> und *mabp1*<sup>+/-</sup> als von weiblichen *mabp1*<sup>-/-</sup> und *mabp1*<sup>+/-</sup> Mäusen auftrat (Tab. 5.7).

**Tabelle 5.7: Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung und extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in stimulierten B-Zellen aus Milzen wildtypischer, *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäuse.**

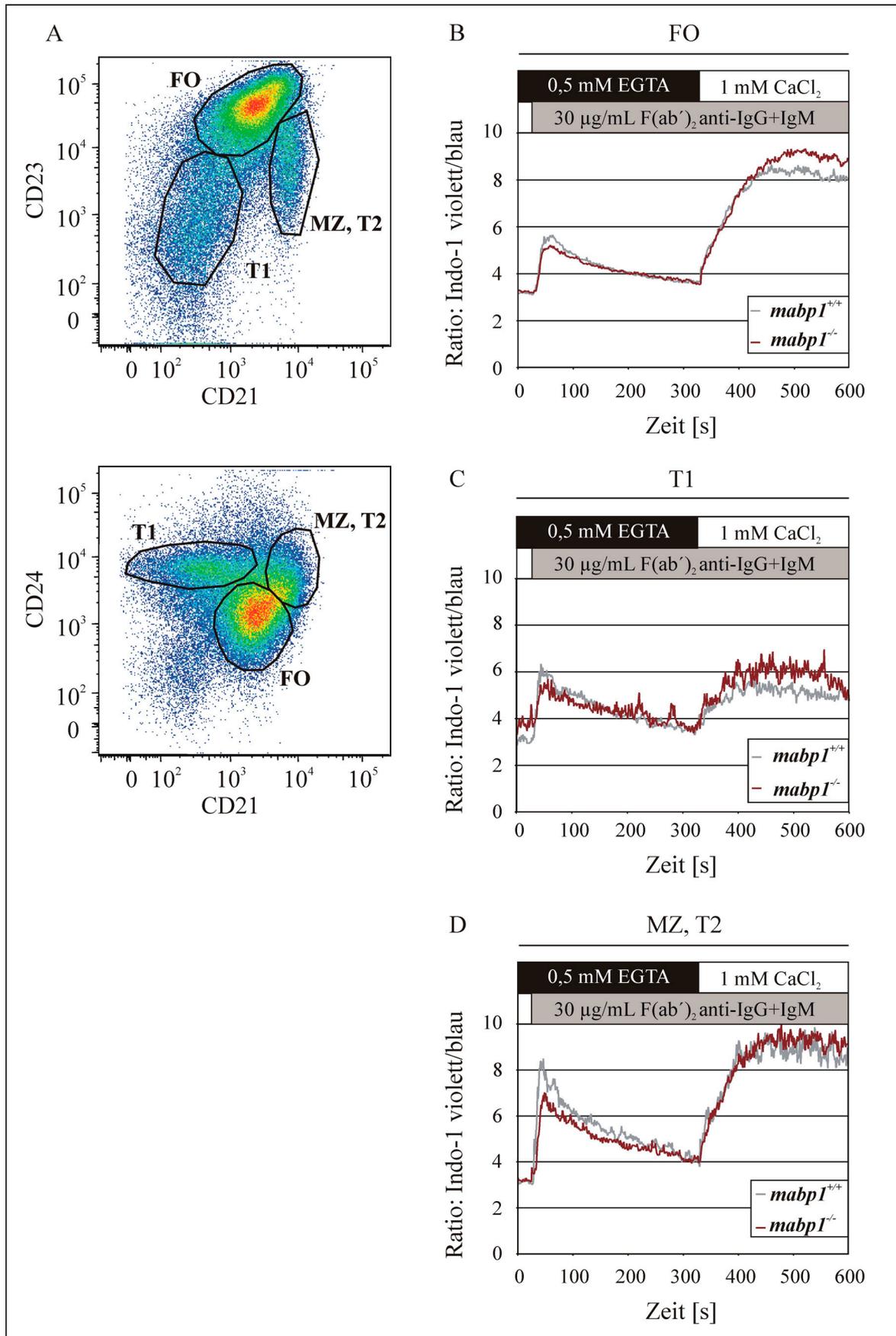
Geschlecht	Genotyp	rel. Anzahl der Tiere [%] <sup>a</sup>
weiblich	+/+	0
	+/-	14
	-/-	40
männlich	+/+	0
	+/-	67
	-/-	90

a) Relative Anzahl der Tiere, deren B-Zellen einen verstärkten extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Einstrom zeigten; weiblich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=8, *mabp1*<sup>+/-</sup> n=7, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=10; männlich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=8, *mabp1*<sup>+/-</sup> n=6, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=10.

Die bereits bei der Manifestierung des Phänotyps beobachtete Geschlechts- und Genotyp-Abhängigkeit spiegelt sich auch im Auftreten des veränderten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms aus dem Extrazellularraum wider (vgl. Abb. 5.4). Die hier vorgestellten Analysen zur Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in *mabp1*<sup>-/-</sup> B-Zellen aus der Milz zeigen eine Beteiligung des F-Aktin bindenden Proteins mAbp1 an der Regulation der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung aus dem Extrazellularraum, nicht jedoch aus Speichern des ER.

Um die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung von verschiedenen B-Zell-Subpopulationen getrennt betrachten zu können, wurden B-Zellen einer Milz neben der Beladung mit Indo-1-AM mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD21, CD23 und CD24 markiert. Follikuläre (FO), T1- und MZ-, T2-B-Zellen wurden zuerst anhand der Analyse der Expression von CD21 und CD23 (Abb. 5.15 A oben) und der anschließenden Analyse der CD21- und CD24-Expression voneinander unterschieden (Abb. 5.15 A unten). Die Analyse der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung erfolgte anschließend für jede B-Zell-Subpopulation getrennt (Abb. 5.15 B-D). Der Einstrom aus intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speichern nach BCR-Stimulation wird in keiner B-Zell-Subpopulation durch Defizienz von mAbp1 beeinflusst.

Bei der Betrachtung des Signals des extrazellulären Einstroms wurde in FO- (Abb. 5.15 B) und T1-Zellen (Abb. 5.15 C) ein erhöhter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellularraum beobachtet, der in der B220-positiven Gesamtpopulation mAbp1-defizienter B-Zellen beobachtet wurde. Dieser Effekt konnte in mAbp1-defizienten MZ- und T2- B-Zellen nicht detektiert werden (Abb. 5.15 D). Die hier vorgestellten Studien weisen auf eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung von mAbp1 bei der Regulation des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms über die Plasmamembran in verschiedenen B-Zell-Subpopulationen hin.



(Abbildung 5.15: Abbildungslegende siehe nächste Seite)

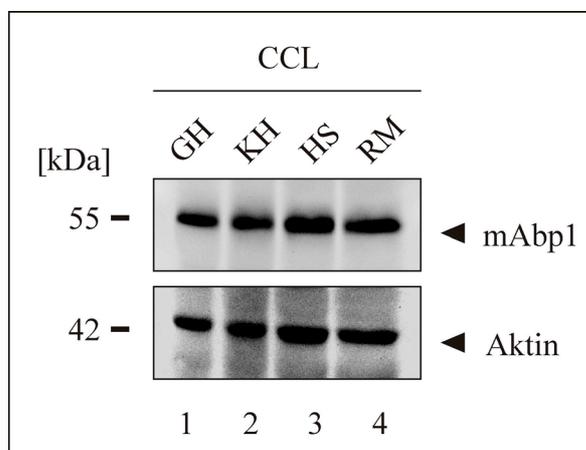
**Abbildung 5.15: Der Unterschied im extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von B-Zellen wird durch folliculäre und T1-B-Zellen verursacht.** Zellen einer Milz aus einer mAbp1-defizienten und einer wildtypischen Maus wurden gleichzeitig mit anti-B220-PE-Cy7, anti-CD21-FITC, anti-CD23-PE-Cy5 und anti-CD24-PE sowie mit Indo-1-AM markiert bzw. beladen. (A) Die Populationen von folliculären (FO), Marginal Zonen (MZ) und T2-, sowie T1-B-Zellen wurden durch aufeinander folgende Betrachtung der CD21-, CD23-Expression (A, oben) und der CD21-, CD24-Expression (A, unten) voneinander unterschieden. (B, C und D) Nach Auftrennung der Populationen der B-Zellen der Milz über die Expression von CD21, CD23 und CD24 wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung von FO- (B), T1- (C) und MZ/T2-Zellen (D) aus *mabp1*<sup>-/-</sup> (rote Linie) und wildtypischen Milzen (graue Linie) getrennt voneinander dargestellt.

Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass mAbp1 in lymphatischen Geweben stark exprimiert wird, aber keine essentielle Bedeutung bei der Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten hat. Diese Untersuchungen geben keinen Hinweis auf die Ursache der beobachteten Splenomegalie mAbp1-defizienter Mäuse. Funktionelle Analysen an B-Zellen zeigen, dass mAbp1 einen Einfluss bei der Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die Plasmamembran hat, da mAbp1-defiziente B-Lymphozyten einen verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum aufweisen.

### 5.3. Analyse der muskulären und neurologischen Integrität zur Identifizierung der Ursache motorischer Defizite mAbp1-defizienter Mäuse

#### 5.3.1. Erstellung eines Verhaltensprofils mAbp1-defizienter Mäuse

mAbp1 wird in neuronalem Gewebe ähnlich stark exprimiert wie in lymphatischen Organen. Eine hohe Expression von mAbp1 im Gehirn der Maus ist vielfach beschrieben worden (Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000; Connert, 2003). In Abbildung 5.16 ist die Immunblot-Analyse der Expression von mAbp1 getrennt nach verschiedenen Regionen des Gehirns und im Rückenmark der Maus dargestellt.



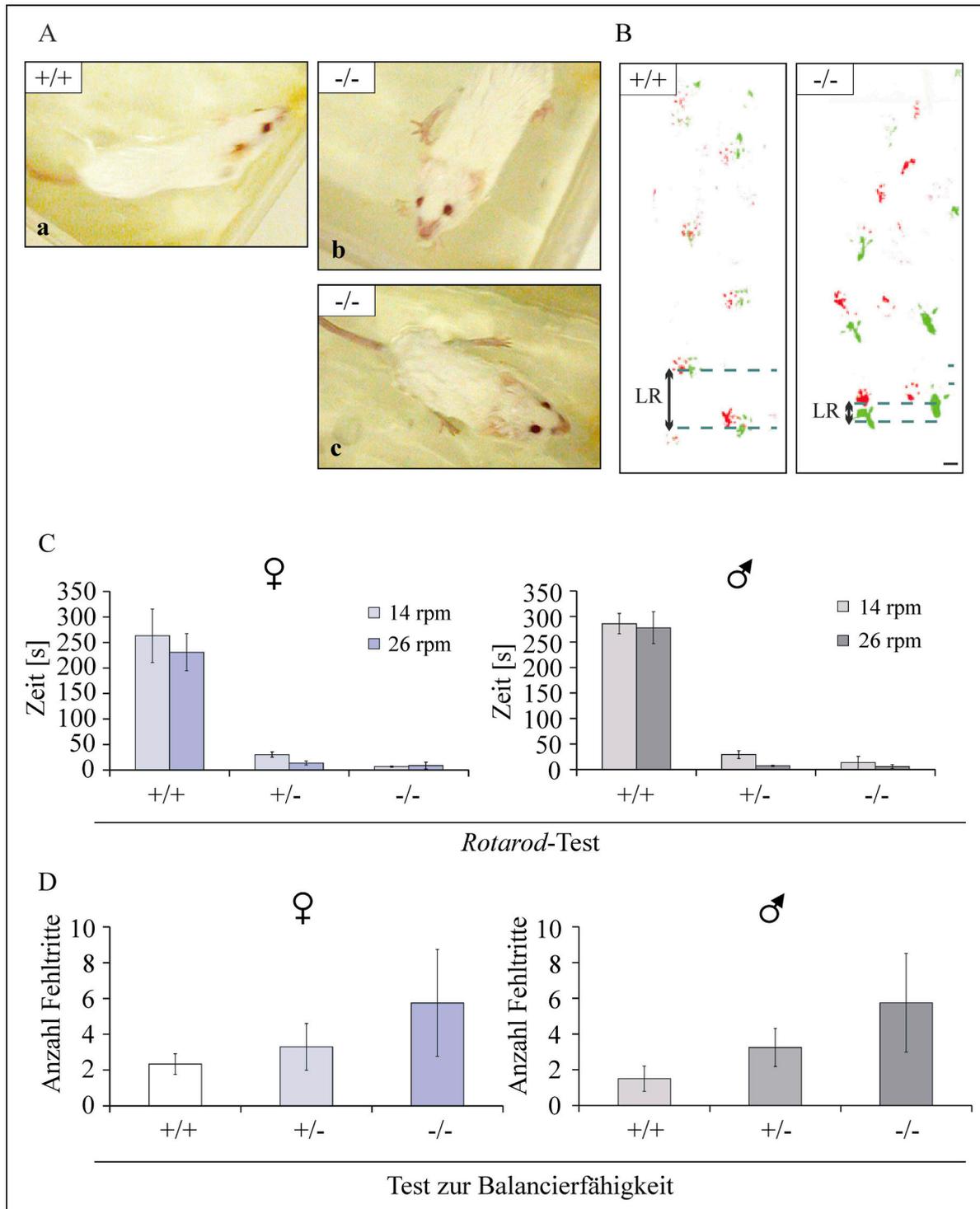
**Abbildung 5.16: Expression von mAbp1 in verschiedenen Bereichen des ZNS der Maus.** Im Immunblot von Lysaten (CCL, *cleared cellular lysate*) aus Großhirn (GH, Spur 1), Kleinhirn (KH, Spur 2), Hirnstamm (HS, Spur 3) und Rückenmark (RM, Spur 4) einer wildtypischen Maus wurde mit anti-mAbp1-Antikörpern die Expression von mAbp1 (oben) nachgewiesen. Die Expression von Aktin diente als Ladungskontrolle (unten). Relative Molekülmassen sind an der linken Seite des Immunblots in kDa aufgelistet.

mAbp1 wird in Großhirn, Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark gleichermaßen stark exprimiert. Einhergehend mit der starken Expression in neuronalen Geweben deuten verschiedene frühere Studien an Zelllinien auf eine Bedeutung von mAbp1 in endozytotischen und Aktin-dynamischen Prozessen in der Synapse von Neuronen hin (Kessels et al., 2001; Yamazaki et al., 2001; Fenster et al., 2003). Durch Analyse der mAbp1-defizienten Maus konnte im Rahmen meiner Arbeit die Bedeutung von mAbp1 für die neuronale Integrität auf der Ebene des gesamten Organismus untersucht werden.

Die Auswirkungen der Defizienz von mAbp1 im Verhalten wurden durch die Erstellung eines Verhaltensprofils mit Schwerpunkt auf spezifischen motorischen Fähigkeiten abgeschätzt. Einschränkungen in motorischen und koordinativen Fähigkeiten können als Folge von neurologischen Anomalien und Defiziten auftreten. Zu diesem Zweck wurden *mabp1<sup>+/+</sup>*, *mabp1<sup>+/-</sup>* und *mabp1<sup>-/-</sup>* Mäuse einem Test zur Analyse des Schwimmverhaltens, einer Fußabdruckanalyse, einer Laufrad-Analyse unter Verwendung des *Rotarod* und einem Test zur Balancierfähigkeit unterzogen.

Zur Analyse des Schwimmverhaltens wurden die Schwimmbewegungen von *mabp1<sup>-/-</sup>* und wildtypischen Kontrollmäusen in einem Wasserbassin (238 cm x 138 cm) beobachtet (Abb. 5.17 A). Wildtypische Mäuse zeigten eine aktive Schwimmbewegung mit am Körper anliegenden, stetig paddelnden Vorder- und Hinterbeinen (Abb. 5.17 A, a). Im Gegensatz dazu ließen sich mAbp1-defiziente Mäuse mit krampfartig abgespreizten Beinen treiben. Vor allem die Hinterbeine waren dabei starr vom Körper abgestreckt. Die Phasen des Treibenlassens wurden durch kurze Phasen der Fortbewegung unterbrochen. Die versuchten Schwimmbewegungen waren jedoch nicht zielgerichtet und erfolgten unkoordiniert (Abb. 5.17 A, b und c).

Mit Hilfe der Erstellung eines Abdruckes der Pfoten in der geraden Vorwärtsbewegung (Vorderpfoten rot, Hinterpfoten grün) ließ sich die Geometrie der Pfotenstellung während der Laufbewegung hinsichtlich der Schrittlänge, des Abstandes der Vorderpfoten und der Hinterpfoten, der Überlappung von Vorder- und Hinterpfoten und der Links-Rechts-Alternation untersuchen (Auerbach et al., 2001). Dabei zeigte sich eine mit fortschreitendem Phänotyp stärker werdende Reduktion der Links-Rechts-Alternation in *mabp1<sup>-/-</sup>* Mäusen im Vergleich zu *mabp1<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren (Abb. 5.17 B). Die reduzierte Beweglichkeit und stark eingeschränkte Koordinationsfähigkeit spiegelte sich dann in einer schwerfälligen Laufbewegung der betroffenen *mabp1<sup>-/-</sup>* Mäuse wider, die nicht mehr in der Lage waren, ihre Vorder- und Hinterbeine koordiniert voreinander zu setzen. Alle anderen Parameter waren unverändert.



**Abbildung 5.17:  $mabp1^{+/-}$  und  $mabp1^{-/-}$  Mäuse wiesen in Verhaltenstests motorkoordinative Defizite auf.** (A)  $mabp1^{-/-}$  Mäuse (b, c) zeigten im Vergleich zu wildtypischen Mäusen (a) anomale unkoordinierte Schwimmbewegungen. Die Fotos wurden einer 20 s langen Filmsequenz zur Dokumentation der Schwimmbewegungen entnommen ( $mabp1^{+/+}$  n=5,  $mabp1^{-/-}$  n=10). (B) Der fortlaufende Abdruck der Pfoten in der geraden Vorwärtsbewegung der Maus (Vorderpfoten rot, Hinterpfoten grün) wies in der Geometrie der Stellung der Pfoten zueinander Unterschiede in der Links-Rechts-Alteration (LR) zwischen wildtypischen (links) und  $mabp1^{-/-}$  Mäusen (rechts) auf ( $mabp1^{+/+}$  n=9,  $mabp1^{-/-}$  n=13). (C) In der Rotarod-Analyse wurde die Zeit bis zum Fall vom Rad [s] bei einer Drehgeschwindigkeit des Rades von 14 rpm (weiblich hellblau, männlich hellgrau) und 26 rpm (weiblich blau, männlich grau) für weibliche (links) und männliche (rechts)  $mabp1^{+/+}$ ,  $mabp1^{+/-}$  und  $mabp1^{-/-}$  Mäuse bestimmt. Die Mäuse wurden diesem Test maximal 300 s unterzogen.

(Fortsetzung siehe nächste Seite)

**Abbildung 5.17 (Fortsetzung):** Die Darstellung der durchschnittlichen Zeit bis zum Fall aus fünf Testdurchläufen mit Standardabweichungen zeigt hochsignifikante Unterschiede zwischen *mabp1<sup>+/+</sup>*, *mabp1<sup>+/-</sup>* und *mabp1<sup>-/-</sup>* Mäusen (Signifikanzniveau von  $p < 0,01$  (*student's t-test*), weiblich: *mabp1<sup>+/+</sup>* n=3, *mabp1<sup>+/-</sup>* n=3, *mabp1<sup>-/-</sup>* n=3; männlich: *mabp1<sup>+/+</sup>* n=4, *mabp1<sup>+/-</sup>* n=4, *mabp1<sup>-/-</sup>* n=3). (D) Im Test der Balancierfähigkeit wurde das zielgerichtete Aufsetzen der Pfoten beim Passieren einer hölzernen Stange beobachtet und die Anzahl der Fehlritte bestimmt. Die durchschnittliche Anzahl der Fehlritte aus drei Testdurchläufen von weiblichen (links) *mabp1<sup>+/+</sup>* (weiß), *mabp1<sup>+/-</sup>* (hellblau) und *mabp1<sup>-/-</sup>* (dunkelblau) Mäusen und männlichen (rechts) *mabp1<sup>+/+</sup>* (hellgrau), *mabp1<sup>+/-</sup>* (grau) und *mabp1<sup>-/-</sup>* (dunkelgrau) Mäusen mit Standardabweichungen ist dargestellt. Die erhöhte Anzahl der Fehlritte in *mabp1<sup>-/-</sup>* Mäusen ist signifikant (Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (*student's t-test*), weiblich: *mabp1<sup>+/+</sup>* n=4, *mabp1<sup>+/-</sup>* n=6, *mabp1<sup>-/-</sup>* n=4; männlich: *mabp1<sup>+/+</sup>* n=4, *mabp1<sup>+/-</sup>* n=4, *mabp1<sup>-/-</sup>* n=5).

Bei der Laufrad-Analyse und dem Test der Balancierfähigkeit handelt es sich um Tests mit einer hohen Sensitivität, deren Ergebnisse auf eine Beeinträchtigung des Nervensystems hindeuten können, bevor äußere Symptome offensichtlich werden. Aus diesem Grund wurden für diese Tests nur Tiere eingesetzt, die noch keine äußeren Symptome der *mAbp1*-Defizienz zeigten. Mäuse, die diese Tests durchliefen, mussten vorher Trainingseinheiten absolvieren, um sich an den Bewegungsablauf zu gewöhnen. Damit sollte vermieden werden, dass Unterschiede im Testergebnis aufgrund unterschiedlichen Lernverhaltens abhängig vom Genotyp zustande kommen. Die Laufrad-Analyse wurde mit jeder Maus fünfmal bei einer Drehgeschwindigkeit des Rades von 14 rpm und 26 rpm durchgeführt (Dunham and Miya, 1957). Die Zeit bis zum Fall vom Rad [s] wurde bestimmt, wobei die maximale Testdauer mit 300 s festgesetzt wurde. *mabp1<sup>-/-</sup>* Mäuse waren sowohl bei leichteren Testbedingungen (14 rpm) als auch bei schwereren Testbedingungen (26 rpm) nicht in der Lage, sich länger als ein paar Sekunden auf dem Laufrad zu halten. *mabp1<sup>-/-</sup>* Weibchen konnten sich im Mittel nur  $7 \pm 1$  s bei 14 rpm und  $9 \pm 7$  s bei 26 rpm ausbalancieren. *mabp1<sup>-/-</sup>* Männchen zeigten eine Verweildauer von  $13 \pm 12$  s bei 14 rpm und  $5 \pm 4$  s bei 26 rpm. Dagegen blieben wildtypische Weibchen und Männchen für  $263 \pm 52$  s bzw.  $286 \pm 20$  s bei 14 rpm und  $230 \pm 36$  s bzw.  $278 \pm 31$  s bei 26 rpm auf dem Laufrad. Heterozygote Weibchen und Männchen zeigten dagegen bei leichteren Testbedingungen eine gesteigerte Balancierfähigkeit und flexible Bewegungskoordination im Vergleich zu homozygoten *mabp1<sup>-/-</sup>* Tieren. Bei einer Drehgeschwindigkeit von 14 rpm betrug die Zeit bis zum Fall bei *mabp1<sup>+/-</sup>* Weibchen  $30 \pm 5$  s und bei *mabp1<sup>+/-</sup>* Männchen  $29 \pm 8$  s, wohingegen bei 26 rpm mit  $14 \pm 4$  s bei Weibchen und  $7 \pm 1$  s bei Männchen eine zu homozygoten *mabp1<sup>-/-</sup>* Tieren entsprechende Zeit bis zum Fall vom Rad beobachtet wurde (Abb. 5.17 C).

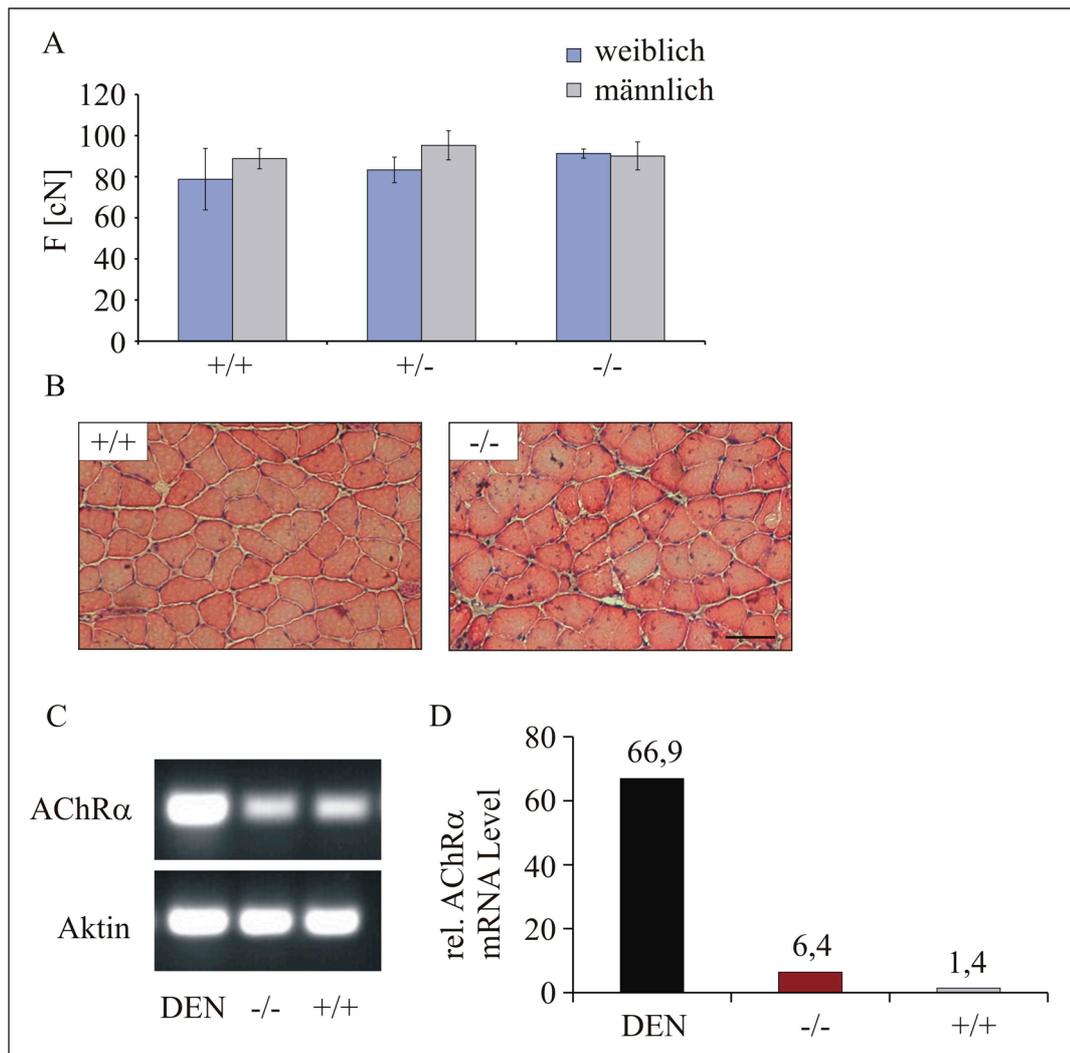
Im Test der Balancierfähigkeit liefen Mäuse über eine 50 cm lange, hölzerne Stange bis zu einer als Laufanreiz dienenden Plattform. Dieser Test erfordert ebenfalls ein hohes Maß an

motorischen Fähigkeiten. Die Anzahl der Fehlritte beim Passieren der Stange wurde in drei Durchläufen ermittelt. Beim Balancieren über die Stange traten bei wildtypischen Mäusen keine Schwierigkeiten auf. Sie wiesen durchschnittlich zwei Fehlritte pro Testdurchlauf auf. Weibliche und männliche *mabp1*<sup>-/-</sup> Tiere zeigten dagegen mit durchschnittlich sechs, bzw. fünf Fehlritten pro Testdurchlauf eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ , *student's t-test*) der Anzahl der verursachten Fehlritte (Abb. 5.17 D). *mAbp1*-defiziente Mäuse versuchten durch Drücken des Bauches an die Stange das Herunterfallen zu vermeiden und konnten im Gegensatz zu wildtypischen Mäusen ihren Schwanz nicht zur Balancekontrolle einsetzen. Heterozygote weibliche und männliche Mäuse zeigten dagegen mit vier, bzw. drei Fehlritten pro Testdurchlauf eine nicht signifikante, nur geringe Verschlechterung der Balancierfähigkeit. Wie bei der Manifestierung des Phänotyps (siehe Abb. 5.4) konnte hier bei dem Ergebnis des Balanciertests ein leichter Gen-Dosis-Effekt beobachtet werden, wohingegen ein geschlechtsspezifischer Unterschied zwischen Weibchen und Männchen nicht auftrat. Die abschließende Betrachtung der Verhaltenstests zeigt eine Relevanz von *mAbp1* für uneingeschränkte motorische und koordinative Fähigkeiten und Bewegungen und deutet auf eine Bedeutung dieses Proteins für die neuronale Integrität hin.

### 5.3.2. Analyse der muskulären Integrität von *mAbp1*-defizienten Mäusen

Um zu überprüfen, ob die Einschränkung motorischer und koordinativer Fähigkeiten *mAbp1*-defizienter Mäuse eine Folge muskulärer Defizite und eventueller Muskelatrophien ist, wurden muskuläre Strukturen von *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen histologisch untersucht und Kraftmessungen an wildtypischen und *mAbp1*-defizienten Mäusen durchgeführt. Mäuse mit nahezu identischem Körpergewicht und gleichem Alter wurden getrennt nach Geschlecht einer Kraftmessung unterzogen. Die relative maximale Muskelkraft der Vorderbeine wird durch Ziehen der Maus am Schwanz bis zu dem Zeitpunkt, in dem die Maus den an einem Dynamometer befestigten Metallstab loslässt, bestimmt. Sowohl weibliche als auch männliche *mabp1*<sup>+/+</sup>, *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten keine Unterschiede in der durch die Vorderbeine ausgeübten Kraft (Abb. 5.18 A).

Hematoxylin/Eosin (HE)-gefärbte Schnitte vom *Musculus (M.) gastrocnemius* sowohl von *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen mit charakteristischen Symptomen der *mAbp1*-Defizienz als auch von wildtypischen Kontrollmäusen zeigten eine uniforme integere Struktur ohne Anzeichen von Muskelatrophien, die z.B. durch Motoneurodegenerationen ausgelöst werden können (Oosthuyse, 2001; Abb. 5.18 B).



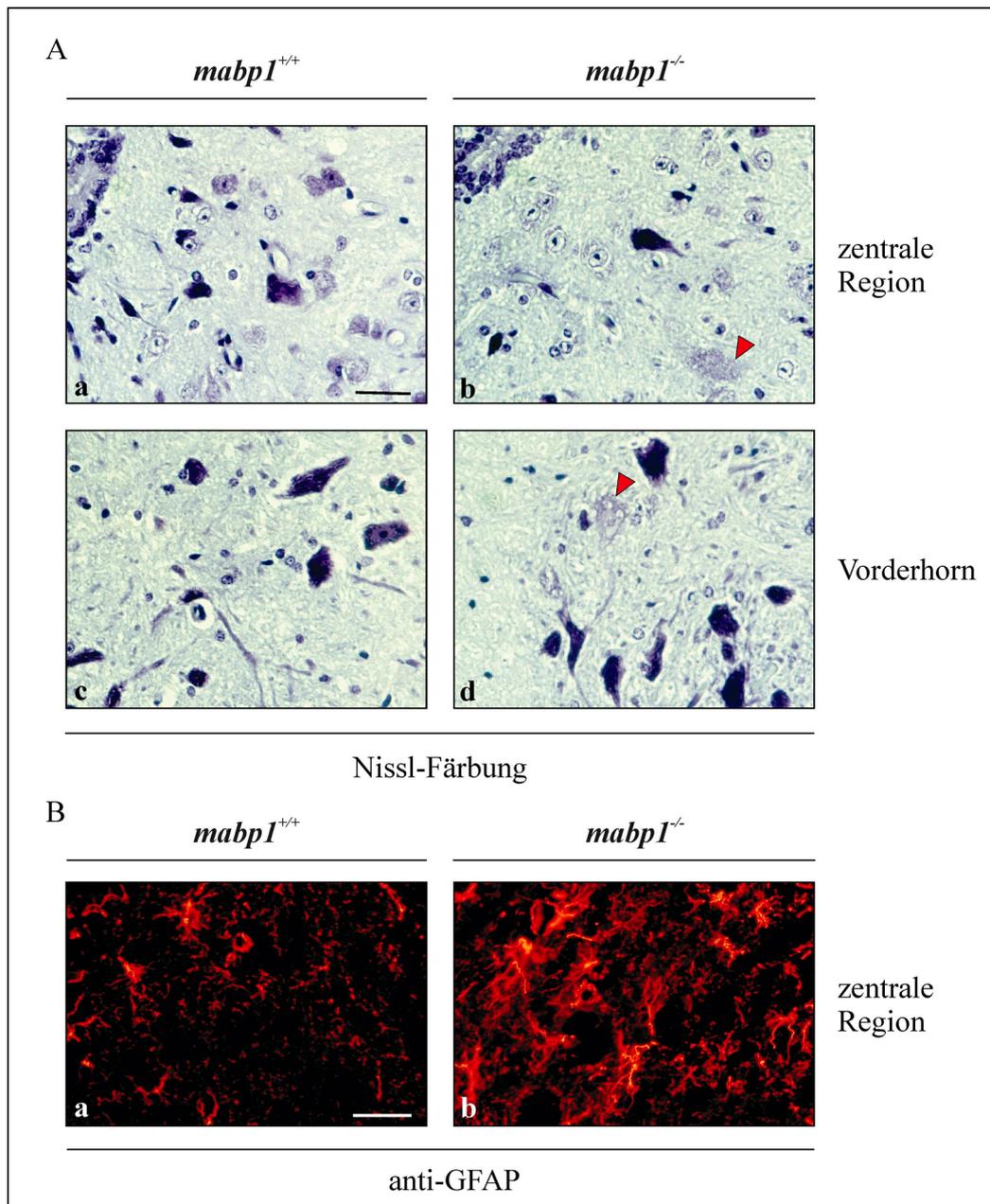
**Abbildung 5.18: Die muskuläre Innervation und Struktur von Skelettmuskeln *mAbp1*-defizienter Mäuse ist unverändert.** (A) Die Kraftmessung an Vorderbeinen von weiblichen (blau) und männlichen (grau) *mabp1*<sup>+/+</sup>, *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ; *student's t-test*). Dargestellt ist der Mittelwert der ausgeübten Kraft mit Standardabweichungen (weiblich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=5, *mabp1*<sup>+/-</sup> n=7, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=4; männlich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=5, *mabp1*<sup>+/-</sup> n=4, *mabp1*<sup>-/-</sup> n=7). (B) Die Struktur des *M. gastrocnemius* aus *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte in Hematoxylin/Eosin (HE)-gefärbten Gefrierschnitten im Vergleich zu Muskeln aus wildtypischen Mäusen keine Auffälligkeiten. Maßstab 100  $\mu$ m. (C) Muskeln aus *mabp1*<sup>+/+</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten in PCR-Analysen niedrige AChR $\alpha$ -mRNA Level, wohingegen ein hoher AChR $\alpha$ -mRNA Level im experimentell denervierten wildtypischen Muskel (DEN) vorliegt. Die Bestimmung des mRNA-Levels von Aktin diente als Kontrolle. (D) Die mittels *Real-time*-PCR ermittelten AChR $\alpha$ -mRNA Level werden normiert auf mRNA-Level von Aktin für einen denervierten (DEN) Muskel aus wildtypischen Mäusen und für einen Muskel aus einer *mabp1*<sup>-/-</sup> und einer wildtypischen Maus dargestellt. (Die Denervierung der Muskeln erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Harald Jockusch, Abteilung für Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie, Universität Bielefeld).

Eine weitere Methode zur Untersuchung der muskulären Integrität ist die Untersuchung der Expression der Acetylcholinrezeptor Untereinheit  $\alpha$  (AChR $\alpha$ ). Eine verstärkte Expression deutet auf eine defekte Muskelinnervation hin (Evans et al., 1987; Witzemann et al., 1991). Durch Polymerase Kettenreaktion (Abb. 5.18 C) und durch *Real-time* quantitative Polymerase Kettenreaktion (Abb. 5.18 D) konnte eine gleichermaßen geringe Expression der

AChR $\alpha$  im *M. vastus* von *mabp1*<sup>-/-</sup> und wildtypischen Mäusen gezeigt werden, wohingegen die Expression im experimentell denervierten wildtypischen Muskel eine etwa 70fache Erhöhung aufwies. Die Denervation des Muskels erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Harald Jockusch (Abteilung Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie, Universität Bielefeld). Sowohl histologische Studien als auch AChR $\alpha$ -Expressionsuntersuchungen ließen den Schluss zu, dass die Defizienz des in Muskeln nur schwach exprimierten Proteins mAbp1 (Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000) keinen Einfluss auf die muskuläre Integrität hat. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die eingeschränkten motorischen Fähigkeiten durch neurologische Defekte und nicht durch Beeinträchtigungen der muskulären Struktur oder Funktion verursacht werden und unterstützen die Bedeutung von mAbp1 für die neuronale Integrität.

### **5.3.3. Sporadische Neurodegeneration im Rückenmark von mAbp1-defizienten Mäusen mit stark ausgeprägten mAbp1-Defizienz Symptomen**

Da die beobachteten motorischen Defizite und die schlechte Koordinationsfähigkeit nicht durch anomale Muskelstrukturen und/oder muskuläre Degeneration erklärt werden können, wurden Gewebeschnitte von verschiedenen Bereichen des zentralen Nervensystems (ZNS) auf mikroskopisch sichtbare neuronale Anomalien hin untersucht. Die Morphologie der Neurone wurde durch Kresylviolett-Färbung (Nissl-Färbung) analysiert. In der Nissl-Färbung ermöglicht die Anfärbung des Zellkörpers durch Markierung der Nissl-Schollen die Untersuchung von Neuronen. In Bereichen der Großhirnrinde, des *Corpus striatum*, sowie im Kleinhirn von wildtypischen und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen traten keine Unterschiede in der Morphologie der Neurone auf (Daten nicht gezeigt). Eine sporadische Degeneration konnte jedoch im Bereich um den Zentralkanal und im Vorderhorn des Rückenmarks von *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Rückenmarksquerschnitten von *mabp1*<sup>+/+</sup> Mäusen detektiert werden. Neben Neuronen mit einer normalen Morphologie kamen degenerierende Neurone mit teilweise vakuolisierter Struktur vor (Abb. 5.19 A, b und d; rote Pfeile). Eine signifikante Reduktion von Neuronen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Da die Degeneration von Neuronen mit einer reaktiven Gliose einhergeht, wird das verstärkte Auftreten von Astrozyten untersucht. In immunhistochemischen Analysen der Rückenmarksquerschnitte können Astrozyten durch Antikörper gegen GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) detektiert werden.



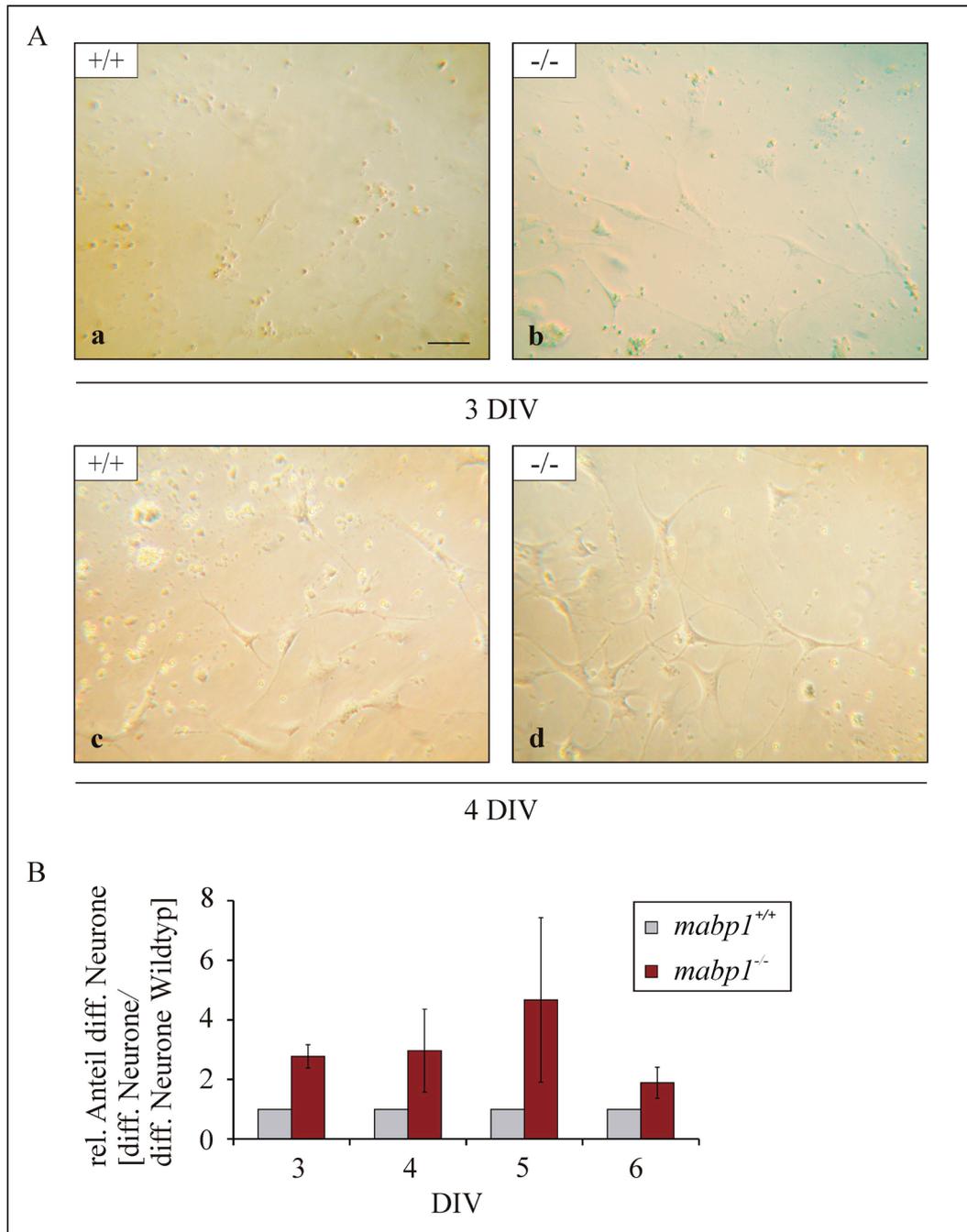
**Abbildung 5.19: Im Rückenmark von *mAbp1*-defizienten Mäusen traten sporadisch Degenerationen von Neuronen auf.** (A) In Kresylviolett-gefärbten (Nissl-Färbung) Paraffinquerschnitten des Rückenmarks von *mabp1<sup>-/-</sup>* Mäusen (b, d) konnten im Vergleich zu korrespondierenden Rückenmarksquerschnitten von *mabp1<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren (a, c) degenierte Neurone im zentralen Bereich des Rückenmarks in der Nähe des Zentralkanals (b, roter Pfeil) und im Vorderhorn des Rückenmarks (d, roter Pfeil) detektiert werden. Maßstab in a (gültig für a-d) 35  $\mu\text{m}$ . (B) In zu A (a, b) korrespondierenden Gefrierschnitten des zentralen Bereichs des Rückenmarks von *mabp1<sup>-/-</sup>* Mäusen wurden mit anti-GFAP-Cy3-Antikörpern vermehrt stark verzweigte hypertrophe Astrozyten beobachtet (b). Zum Vergleich ist ein analoger Rückenmarksquerschnitt einer wildtypischen Maus dargestellt (a). Maßstab in a (gültig für a, b) 35  $\mu\text{m}$ .

Astrozyten in wildtypischen Rückenmarksquerschnitten kamen in geringerer Anzahl, deutlich kleiner und mit weniger Verzweigungen vor als in Querschnitten aus *mabp1<sup>-/-</sup>* Rückenmark, die eine Vielzahl hypertropher Astrozyten aufwiesen (Abb. 5.19 B, a und b).

Reaktive Astrozytose trat jedoch wie die beobachteten Neurodegenerationen nur sporadisch auf. In zwölf untersuchten *mAbp1*-defizienten Mäusen mit motorischen Einschränkungen konnten diese Effekte nur in zwei Mäusen mit besonders starken Symptomen der *mAbp1*-Defizienz einhergehend mit einem nahezu vollständigen Bewegungsverlust beobachtet werden. Die starke Ausprägung der neuronalen Defizite in diesen Mäusen kann durch die beobachteten geringen Degenerationen alleine nicht erklärt werden. Die Manifestierung des neuronalen Phänotyps konnte deshalb und aufgrund der Tatsache, dass motorische Defizite immer vor sporadisch beobachteten Neurodegenerationen auftraten, nicht auf Degenerationen im Rückenmark zurückgeführt werden.

#### **5.3.4. Einfluss der *mAbp1*-Defizienz auf die Differenzierung von Neuronen und das Wachstum von neuronalen Zellfortsätzen**

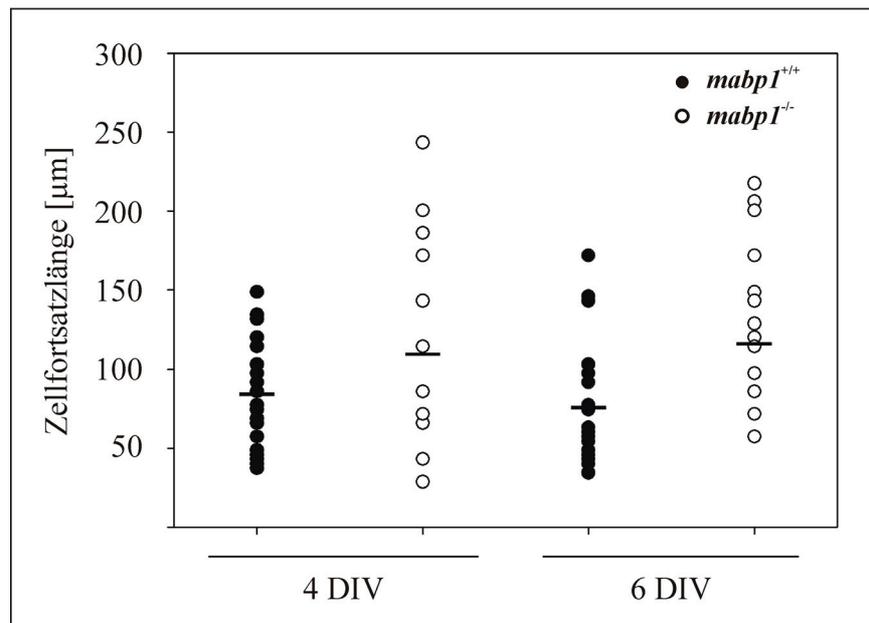
Die Lokalisation von *mAbp1* konnte in Bereichen mit hoher Membrandynamik, wie sie etwa bei der Ausbildung von Lamellipodien und bei dynamischen Prozessen während endozytotischer Vorgänge erforderlich ist, vielfach beschrieben werden (Kessels et al., 2000; Kessels et al., 2001; zur Übersicht: Orth and McNiven, 2003). Da das neuronale Zellwachstum ebenfalls eine hohe Membrandynamik erfordert, wurde die Auswirkung der *mAbp1*-Defizienz auf die neuronale Differenzierung und das Wachstum von Zellfortsätzen in primären Cerebellum (Kleinhirn)-Kulturen untersucht (Abb. 5.20). Der relative Anteil an differenzierten Neuronen in primären Kulturen von Cerebellum-Neuronen von *mAbp1*-defizienten und wildtypischen Mäusen wurde nach 3 bis 6 Kultivierungstagen (DIV; *days in vitro*) ermittelt (rel. Anteil diff. Neurone Wildtyp=1). Von 3 DIV bis 5 DIV war der relative Anteil von differenzierten Neuronen in *mAbp1*-defizienten Kulturen im Vergleich zu wildtypischen Cerebellum-Kulturen stark erhöht, erreichte nach 5 DIV ein Maximum und glich sich nach 6 DIV dem Anteil in wildtypischen Kulturen an (Abb. 5.20 A, B). Die Anzahl der Zellfortsätze pro Neuron lag nach 2 DIV, 4 DIV und 6 DIV sowohl für *mabp1*<sup>-/-</sup> als auch für wildtypische Neurone bei etwa  $2,5 \pm 0,8$  (Anzahl der analysierten Neurone; 2 DIV: *mabp1*<sup>-/-</sup> n=11, *mabp1*<sup>+/+</sup> n=6; 4 DIV: *mabp1*<sup>-/-</sup> n=132, *mabp1*<sup>+/+</sup> n=46; 6 DIV: *mabp1*<sup>-/-</sup> n=61, *mabp1*<sup>+/+</sup> n=75).



**Abbildung 5.20: Die Differenzierung von primären Cerebellum-Neuronen wird durch mAbp1-Defizienz beeinflusst.** Die Gewinnung und Kultivierung von mAbp1-defizienten und wildtypischen Cerebellum-Neuronen erfolgte zur gleichen Zeit und unter gleichen Bedingungen. Je  $1 \cdot 10^5$  Zellen eines Cerebellum-Extrakts wurden auf  $180 \text{ mm}^2$  Kulturoberfläche ausgesät.

(A) Vergleichende fotografische Dokumentation der Differenzierung von wildtypischen (a, c) und mAbp1-defizienten (b, d) primären Cerebellum-Neuronen drei und vier Tage nach Beginn der Kultivierung (*days in vitro*, DIV). Maßstab in a (gültig für a-d)  $50 \mu\text{m}$ . (B) Die Darstellung des relativen Anteils an differenzierten Neuronen von *mabp1*<sup>-/-</sup> (rot) zu wildtypischen (grau) Cerebellum-Neuronen zeigte eine früher beginnende Differenzierung von *mabp1*<sup>-/-</sup> Neuronen. Es sind die Mittelwerte der relativen Anteile differenzierter Neurone, d.h. der Anzahl differenzierter Neurone bezogen auf die Anzahl differenzierter Neurone der korrespondierenden wildtypischen Kultur, mit Standardabweichungen dargestellt (rel. Anteil diff. Neurone Wildtyp=1; Anzahl Präparationen n=3; Anzahl ausgezählter Deckgläser pro Präparation *mabp1*<sup>-/-</sup> n=5, *mabp1*<sup>+/+</sup> n=3).

Die durch morphometrische Messung bestimmte Länge der Zellfortsätze von primären *mabp1*<sup>+/+</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Cerebellum-Neuronen wurde vier und sechs Tage nach Beginn der Kultivierung ermittelt und in einem vertikalen Punktplot dargestellt (Abb. 5.21). Der vertikale Punktplot wurde gewählt, um extreme Messpunkte darzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass in primären *mabp1*<sup>-/-</sup> Cerebellum-Kulturen Neurone mit deutlich längeren Zellfortsätzen vorkommen als in wildtypischen Cerebellum-Kulturen. Dies spiegelt sich auch in den als Balken dargestellten Mittelwerten wider.



**Abbildung 5.21: mAbp1-defiziente Neurone der primären Cerebellum-Kultur bilden längere Zellfortsätze aus.** Im vertikalen Punktplot werden Zellfortsatzlängen nach 4 DIV (*days in vitro*) und 6 DIV von wildtypischen (schwarze Kreise) und *mabp1*<sup>-/-</sup> Neuronen (weiße Kreise) vergleichend dargestellt. Die Mittelwerte aller Messwerte sind als Balken angegeben (Anzahl morphometrisch vermessener Neuronenzellfortsätze, 4 DIV: *mabp1*<sup>-/-</sup> n=24, *mabp1*<sup>+/+</sup> n=24, 6 DIV: *mabp1*<sup>-/-</sup> n=22, *mabp1*<sup>+/+</sup> n=22).

Um längere und kürzere Zellfortsätze getrennt voneinander betrachten zu können, wurde der Mittelwert der Länge der Zellfortsätze über 100 µm und unter 100 µm bestimmt. Die Einteilung der Zellfortsätze erfolgte per Definition aufgrund der Überlegung, dass Axone ein besonders starkes Wachstum in den ersten Tagen nach Beginn der Kultivierung zeigen und somit Zellfortsätze während des Kultivierungszeitraums über 100 µm eher axonalen Ursprungs, kleinere Zellfortsätze unter 100 µm dagegen eher dendritischen Ursprungs sind (Dotti et al., 1988; zur Übersicht: Craig und Banker, 1994). Die Länge der Zellfortsätze über 100 µm war in primären *mabp1*<sup>-/-</sup> Cerebellum-Kulturen mit  $166,0 \pm 41,7$  µm nach 4 DIV signifikant erhöht ( $p < 0,05$ , *student's t-test*). Die Länge der wildtypischen Zellfortsätze erreichte im Mittel nur einen Wert von  $123,4 \pm 16,1$  µm. Die Länge der Zellfortsätze von

primären *mabp1*<sup>-/-</sup> Neuronen unter 100 µm zeigte nach 4 DIV mit einer Länge von 70,1 ± 19,0 µm im Vergleich zu Zellfortsätzen von primären wildtypischen Neuronen mit 67,7 ± 20,2 µm dagegen keinen Unterschied. Nach 6 DIV hatte sich die Länge der Zellfortsätze von *mabp1*<sup>-/-</sup> und wildtypischen Neuronen weitestgehend angeglichen (Tab. 5.8).

**Tabelle 5.8: Wachstum neuronaler Zellfortsätze in mAbp1-defizienten und wildtypischen Cerebellum-Kulturen nach 4 und 6 DIV.**

DIV	Genotyp	Länge der Zellfortsätze [µm]			
		< 100 µm	Signifikanz (p<0,05)	> 100 µm	Signifikanz (p<0,05)
4	+/+	67,7 ± 20,2		123,4 ± 16,1	
	-/-	70,1 ± 19,0	0,73	<b>166,0 ± 41,7</b>	<b>0,03</b>
6	+/+	61,0 ± 17,4		141,0 ± 28,4	
	-/-	71,3 ± 14,5	0,15	154,3 ± 36,3	0,52

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen; eine signifikante Abweichung ist fett markiert (p<0,05; *student's t-test*); Anzahl morphometrisch vermessener Neuronenzellfortsätze, 4 DIV: *mabp1*<sup>-/-</sup> n=14 (< 100 µm), n=10 (>100 µm), *mabp1*<sup>+/+</sup> n=17 (< 100 µm), n=7 (>100 µm), 6 DIV: *mabp1*<sup>-/-</sup> n=10 (< 100 µm), n=12 (>100 µm), *mabp1*<sup>+/+</sup> n=18 (< 100 µm), n=4 (>100 µm).

Die Morphologie der primären Neurone aus mAbp1-defizienten Kleinhirnen war in Kultur im Vergleich zu wildtypischen Neuronen unverändert (Abb. 5.20 A). mAbp1 zeigt in neuronalen Vorgängen mit besonders hoher Membrandynamik eine regulatorische Funktion, da die Defizienz von mAbp1 vor allem bei Zellfortsätzen mit besonders starkem Wachstum zu Defekten führt.

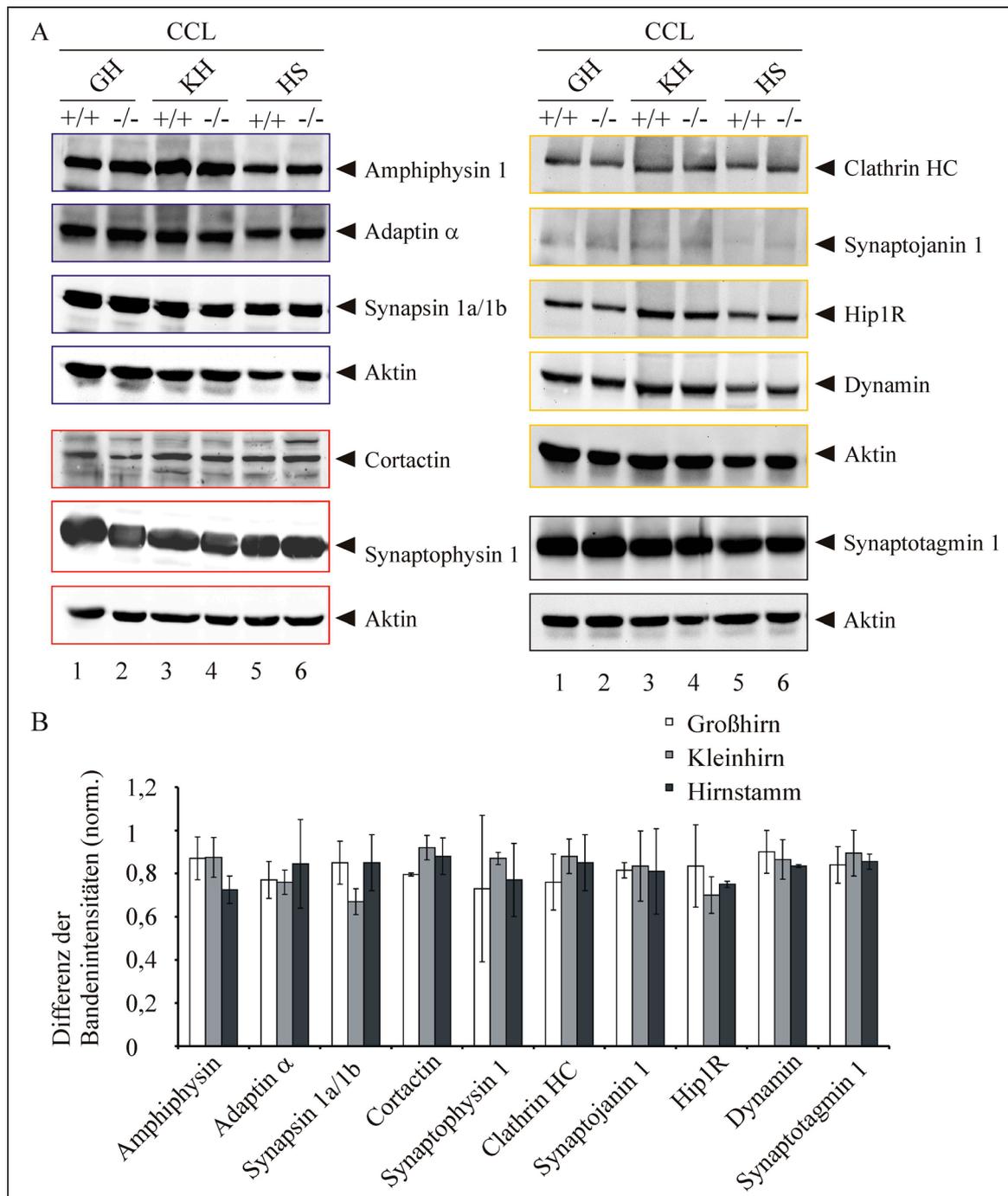
Zusammenfassend zeigen diese *in vivo*-Studien an mAbp1-defizienten Mäusen eine essentielle Bedeutung von mAbp1 für die neuronale Integrität. mAbp1 spielt eine Rolle bei höheren Hirnfunktionen, da die Ausübung von Bewegungen, die ein hohes Maß an motorischen und koordinativen Fähigkeiten erfordern, durch Defizienz von mAbp1 beeinträchtigt wird. Es konnte gezeigt werden, dass diese motorischen Defizite jedoch keine Folge von Neurodegenerationen im ZNS sind. In primären Cerebellum-Neuronen von mAbp1-defizienten Mäusen können Defizite auf zellulärer Ebene beobachtet werden, da mAbp1-defiziente Neurone Defekte im kontrollierten Wachstum von Neuriten zeigen.

### 5.3.5. Expressionsanalysen von mAbp1-assoziierten oder funktionell verwandten Proteinen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm

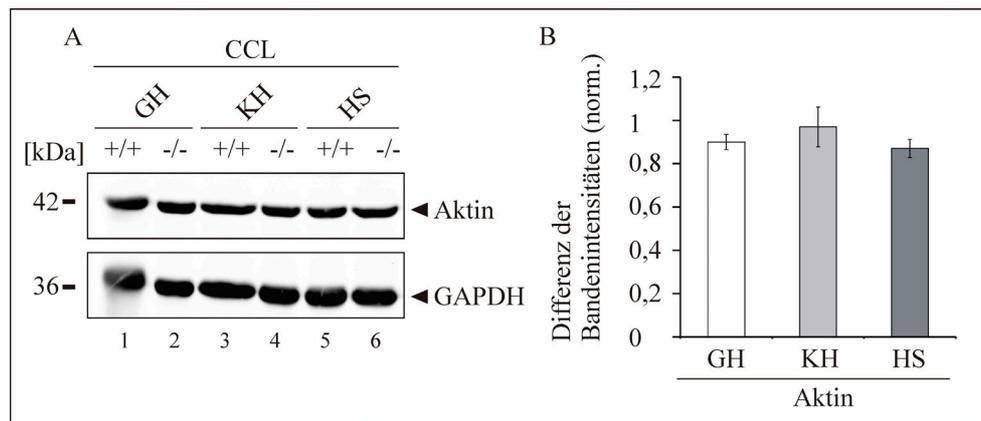
mAbp1 ist vielfach als Protein beschrieben worden, das die Assoziation des Aktin-Zytoskeletts mit Komponenten der endozytotischen Maschinerie vermitteln und so eine Rolle in der Clathrin-vermittelten Endozytose einnehmen kann (Kessels et al., 2000; Kessels et al., 2001; Mise-Omata et al., 2003). Außerdem wird eine funktionelle Verknüpfung des dynamischen Aktin-Zytoskeletts mit zellulären Mechanismen der Synapse in Neuronen durch mAbp1 diskutiert (Yamazaki et al., 2001; Kessels et al., 2001; Fenster et al., 2003; Qualmann et al., 2004). Die Expression von mAbp1-assoziierten oder aufgrund der Beteiligung in diesen Prozessen funktionell verwandten Proteinen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm von mAbp1-defizienten und wildtypischen Mäusen wurde analysiert. Die Proteinlysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von Amphiphysin 1, Adaptin  $\alpha$ , einer Komponenten des AP2-Komplexes, Synapsin 1a und 1b, Cortactin, einem mit mAbp1 strukturell und funktionell verwandten Protein, Synaptophysin 1, Clathrin HC, Synaptojanin 1, Hip1R, Dynamin und Synaptotagmin 1 im Immunblot durch Normierung auf die Expression von Aktin untersucht (Abb. 5.22 A). Nach Quantifizierung der Bandenintensitäten mit der Software *Gel-Pro Analyzer* konnten keine konsistenten Veränderungen der Expressionen dieser Proteine in verschiedenen Gehirnregionen mAbp1-defizienter Mäuse detektiert werden (Abb. 5.22 B).

Aktin wurde aus experimentellen Gründen als interner Standard für Expressionsvergleiche verschiedener Proteine zwischen wildtypischen und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen herangezogen. Da mAbp1 direkt mit F-Aktin interagiert, wird überprüft, ob die Expression von Aktin in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm durch Defizienz von mAbp1 beeinflusst wird (Abb. 5.23 A, B). Die Expressionsanalyse wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Normierung erfolgte anhand der Expression des ubiquitär exprimierten *house keeping* Gens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Abb. 5.23 B). Die Expression von Aktin in den verschiedenen Hirnregionen von wildtypischen und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen wies keine Unterschiede auf, so dass sie als interner Standard zur Normierung der Expression weiterer Proteine herangezogen werden kann.

Die durchgeführte Studie zeigte, dass der beobachtete neuronale Phänotyp der mAbp1-Defizienz nicht auf einen Sekundäreffekt aufgrund veränderter Expression eines in diesen Studien untersuchten Proteins, das mit mAbp1 assoziiert oder funktionell verwandt ist, zurückgeführt werden kann.



**Abbildung 5.22: Die Expression verschiedener mAbp1-assoziierter oder funktionell verwandter Proteine wird durch mAbp1-Defizienz nicht beeinflusst.** (A) Proteine aus Lysaten (CCL, *cleared cellular lysate*) von Großhirn (GH), Kleinhirn (KH) und Hirnstamm (HS) aus wildtypischen und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Expressionslevel von Amphiphysin 1, Adaptin  $\alpha$ , Synapsin 1a/1b, Cortactin, Synaptophysin 1, Clathrin HC, Synaptojanin 1, Hip1R, Dynamin und Synaptotagmin 1 mit spezifischen Antikörpern im Immunblot analysiert. Als Ladungskontrolle wurde die Expression von Aktin herangezogen. Die jeweilige Darstellung der Aktin-Expression bezieht sich immer auf die darüberliegenden farblich gleich umrandeten Immunblots. Relative Molekülmassen sind in kDa an der linken Seite des jeweiligen Immunblots angegeben. (B) Unterschiede in den Bandenintensitäten der analysierten Proteine in verschiedenen Gehirnregionen aus *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen normiert auf die Bandenintensitäten der Proteine aus wildtypischen Gehirnregionen werden dargestellt. Die Bandenintensitäten im Immunblot wurden mittels der Software *Gel Pro-Analyzer* quantifiziert und auf Aktin normiert. Die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen der Mittelwerte für die Differenz der normierten Bandenintensitäten aus zwei unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 5.23: Die Expression von Aktin ist in mAbp1-defizienten Gehirnen unverändert.** (A) Im Immunoblot von Lysaten (CCL, *cleared cellular lysate*) aus Großhirn (GH), Kleinhirn (KH) und Hirnstamm (HS) wurde die Expression von Aktin von *mabp1*<sup>-/-</sup> und wildtypischen Mäusen verglichen. Als Ladungskontrolle diente die Expression des *house keeping* Proteins GAPDH. Relative Molekülmassen der Markerproteine sind in kDa an der linken Seite des jeweiligen Immunblots angegeben. (B) Die Bandenintensitäten im Immunoblot wurden mittels der Software *Gel Pro-Analyzer* quantifiziert und die Aktin-Expression auf GAPDH normiert. Mittelwerte der Differenz der normierten Bandenintensitäten aus zwei unabhängigen Experimenten sind mit Standardabweichungen dargestellt.

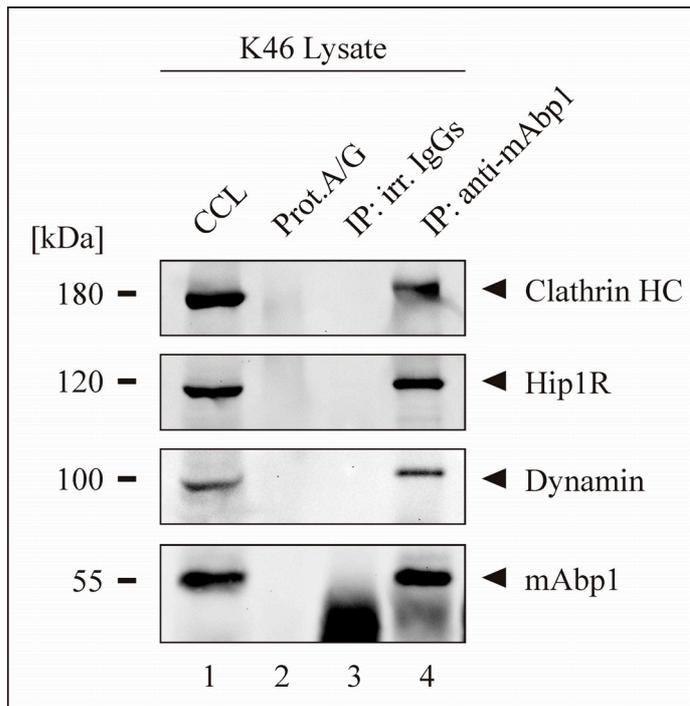
#### 5.4. Interaktion von mAbp1 mit Proteinen der endozytotischen Maschinerie in verschiedenen Zelltypen

##### 5.4.1. Interaktion von mAbp1 mit Hip1R, Clathrin HC und Dynamin in B-Zelllysaten sowie in Milz- und Gehirn-Gewebelysaten

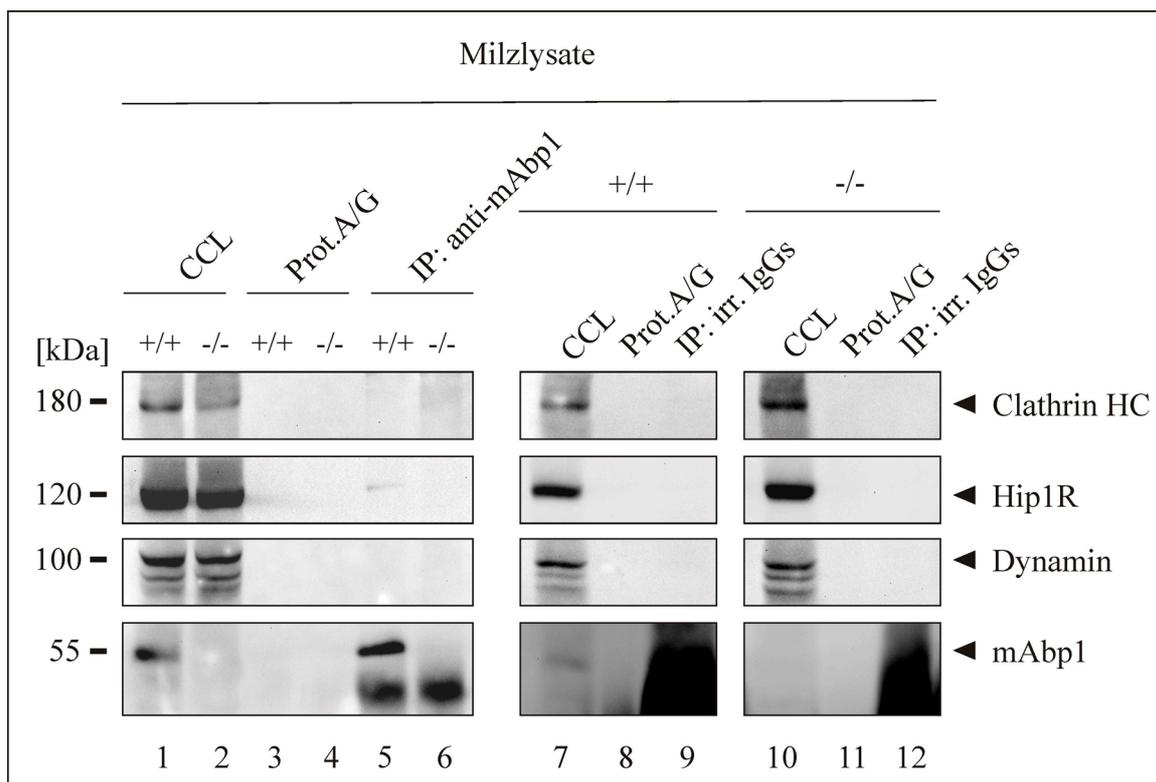
Die Defizienz des in vielen Geweben exprimierten Adapterproteins mAbp1 wirkt sich mit unterschiedlich starker Relevanz auf die Integrität verschiedener Organe und Funktionalität verschiedener zellulärer Mechanismen aus. Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass mAbp1-Defizienz unter anderem Splenomegalie verursacht und in Vorgängen des neurologischen Wachstums und der Signalweiterleitung nach BCR-Stimulation involviert ist (siehe Abb. 5.7, 5.14, 5.20). mAbp1 enthält Sequenzmotive und Domänen zur Assoziation mit einer Vielzahl von Interaktionspartnern, wie F-Aktin und Proteinen mit Prolin-reichen Sequenzen (Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000). Eine mögliche Ursache für die verschiedenartige funktionelle Bedeutung von mAbp1 in unterschiedlichen Geweben können unterschiedlich ausgeprägte Interaktionen mit potentiellen Bindepartnern von mAbp1 sein, die für jedes Gewebe ein charakteristisches Muster aufweisen können. Sabine Connert und Oliver Larbolette konnten in *in vitro*-Analysen eine Interaktion von mAbp1 mit Hip1R und Clathrin schweren Ketten (HC, *heavy chain*) nachweisen (Connert, 2003; Larbolette, 2000). Des Weiteren wurden Hip1R und Clathrin HC aus Zelllysaten der

murinen B-Zelllinie K46, die mAbp1-flag exprimiert, über einen anti-flag-Antikörper aufgereinigt (Connert, 2003). Die Interaktion von mAbp1 mit Dynamin konnte von Kessels et al. durch Aufreinigungsstudien mit spezifischen Antikörpern aus Gehirnextrakten und mAbp1-flag exprimierenden HEK-Zellen und von Sabine Connert in *in vitro*-Studien gezeigt werden (Kessels et al., 2001; Connert, 2003). Die Interaktion von mAbp1 mit Clathrin HC, Hip1R und Dynamin, die eine Bedeutung in der endozytotischen Maschinerie haben, unterstützt Studien, die ebenfalls eine funktionelle Bedeutung von mAbp1 in der Clathrin-vermittelten Endozytose nachweisen konnten (Kessels et al., 2001; Mise-Omata et al., 2003; Connert, Wienand, Thiel et al., 2006). Im Rahmen meiner Arbeit wurde die Interaktion von mAbp1 mit Clathrin HC, Hip1R und Dynamin weiterführend *in vivo* durch Immunaufreinigung (IP, Immunpräzipitation) untersucht. Die zur Verfügung stehende mAbp1-defiziente Mauslinie ermöglichte eine umfassende Analyse dieser Interaktionen, da Organlysate der mAbp1-defizienten Maus als Negativkontrolle herangezogen werden können. Da eine essentielle funktionelle Bedeutung von mAbp1 in B-Zellen und Neuronen gezeigt werden konnte, wird die *in vivo*-Analyse der Interaktion von mAbp1 mit Hip1R, Dynamin und Clathrin HC zum einen mit Lysaten aus K46-B-Zellen und Milz-Lysaten von wildtypischen und mAbp1-defizienten Mäusen und zum anderen mit Lysaten aus dem Gehirn von wildtypischen und mAbp1-defizienten Mäusen durchgeführt und verglichen. Die *in vivo*-Untersuchung der Interaktion von mAbp1 mit Clathrin HC, Hip1R und Dynamin erfolgte durch Immunaufreinigung dieser Proteine unter Verwendung von anti-mAbp1-Antikörpern und Protein A/G-Agarose, anschließender Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE und Analyse im Immunblot mit spezifischen Antikörpern. anti-mAbp1-Antikörper wurden freundlicher Weise von Marcel Deckert (Laboratoire d'Immunologie, Nizza, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Aus Zelllysaten von K46-B-Zellen konnten sowohl Hip1R und Clathrin HC als auch Dynamin durch anti-mAbp1-Antikörper co-immun aufgereinigt werden. Die aufgereinigte Menge Dynamin ist jedoch geringer als die detektierbare Menge von Hip1R und Clathrin HC (Abb. 5.24, Spur 4). Als Negativkontrolle wurden anstelle von anti-mAbp1-Antikörpern und Protein A/G-Agarose zum einen nur Protein A/G-Agarose ohne Antikörper (Abb. 5.24, Spur 2) und zum anderen irrelevante IgGs und Protein A/G-Agarose (Abb. 5.24, Spur 3) verwendet. In beiden Kontrollexperimenten konnten Clathrin HC, Hip1R, Dynamin und mAbp1 nicht detektiert werden (Abb. 5.24, Spuren 2, 3).



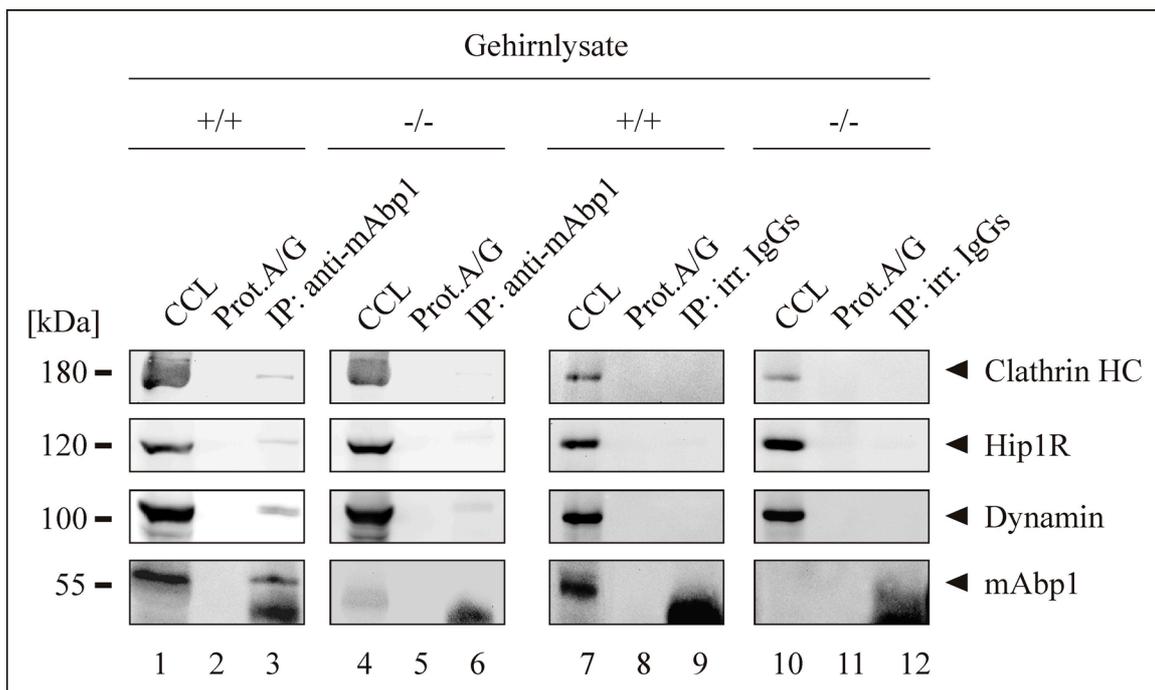
**Abbildung 5.24: Co-Immunaufreinigung von Clathrin HC, Hip1R und Dynamin mit mAbp1 aus K46-Zelllysaten.** Clathrin HC, Hip1R und Dynamin konnten mit anti-mAbp1-Antikörpern aus K46-Zelllysaten (CCL, *cleared cellular lysate*) (Spur 1) von  $2 \cdot 10^7$  Zellen aufgereinigt und im Immunblot durch spezifische Antikörper (anti-Clathrin HC, anti-Hip1R, anti-Dynamin, anti-mAbp1) detektiert werden (Spur 4). Eine Aufreinigung dieser Proteine erfolgte nicht mit äquivalenten Mengen irrelevanter IgGs (anti-Synaptophysin, Spur 3) oder ohne Zugabe von Antikörpern (Spur 2). Relative Molekülmassen sind in kDa an der linken Seite des jeweiligen Immunblots aufgelistet. Vergleichbare Ergebnisse konnten in drei unabhängigen Experimenten erzielt werden (IP, Immunpräzipitation).



**Abbildung 5.25: Co-Immunaufreinigung von Hip1R und mAbp1 aus Milzlysaten wildtypischer Mäuse.** Die Aufreinigung von Hip1R (Spur 5) mit anti-mAbp1-Antikörpern aus Lysaten von Zellen einer wildtypischen Milz konnte im Immunblot nachgewiesen werden. Eine Aufreinigung von Dynamin und Clathrin HC (Spur 5) war jedoch nicht möglich. Ohne Antikörper (Spur 8) und mit äquivalenten Mengen irrelevanter IgGs (anti-Synaptophysin, Spur 9) wurden Clathrin HC, Hip1R und Dynamin nicht aufgereinigt. Identische Analysen wurden als Negativkontrolle mit Lysaten von mAbp1-defizienten Milzen durchgeführt (Spuren 2, 4, 6 und 10-12). Relative Molekülmassen in kDa sind links aufgelistet. Das Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt (IP, Immunpräzipitation).

In Milzlysaten konnte durch Co-Immunaufreinigung mit anti-mAbp1-Antikörpern ebenfalls eine Interaktion von mAbp1 und Hip1R, nicht jedoch eine Interaktion von mAbp1 mit Clathrin HC und Dynamin *in vivo* nachgewiesen werden (Abb. 5.25, Spur 5). Als Negativkontrolle wurden die oben beschriebenen Versuchsanordnungen verwendet (Abb. 5.25, Spuren 3, 8, 9). Zusätzlich dienten Milzlysate aus mAbp1-defizienten Mäusen als Kontrolle zur Verifizierung der Spezifität der nachgewiesenen Interaktion von mAbp1 mit Hip1R (Abb. 5.25, Spur 6). In allen durchgeführten Kontrollexperimenten konnte keine unspezifische Aufreinigung von Clathrin HC, Hip1R, Dynamin und mAbp1 detektiert werden (Abb. 5.25, Spuren 3, 4, 7-12).

Des Weiteren wurden die Interaktionen von mAbp1 mit diesen potentiellen Interaktionspartnern in neuronalem Gewebe untersucht. In Gehirnllysaten konnte eine Interaktion von mAbp1 sowohl mit Hip1R als auch mit Dynamin und Clathrin HC nach Co-Immunaufreinigung mit anti-mAbp1-Antikörpern im Immunblot detektiert werden. Die nachweisbare Menge aufgereinigten Dynamins ist höher als die nachweisbare Menge von Clathrin HC und Hip1R (Abb. 5.26, Spur 3).



**Abbildung 5.26: Co-Immunaufreinigung von Clathrin HC, Hip1R und Dynamin mit mAbp1 aus Gehirnllysaten wildtypischer Mäuse.** Aus Gehirnllysaten (CCL, *cleared cellular lysate*) einer wildtypischen Maus wurden Clathrin HC, Hip1R und Dynamin mit anti-mAbp1 Antikörpern co-aufgereinigt (Spur 3), wohingegen eine Aufreinigung ohne Antikörper (Spuren 2 und 8) oder mit äquivalenten Mengen irrelevanter IgGs (anti-SLP-76, Spur 9) nicht nachgewiesen werden konnte. Die Detektion erfolgte im Immunblot mit spezifischen Antikörpern (anti-Clathrin, anti-Hip1R, anti-Dynamin, anti-mAbp1). Als Negativkontrolle wurden identische Analysen mit Organlysaten aus mAbp1-defizienten Mäusen durchgeführt (Spuren 4-6 und 10-12). Relative Molekulmassen in kDa sind an der linken Seite angegeben. In drei unabhängigen Experimenten konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (IP, Immunpräzipitation).

In Kontrollexperimenten, die wie für die Interaktionsanalyse mit Milzlysaten beschrieben durchgeführt wurden, konnte eine sehr geringe Menge der Proteine Clathrin HC, Hip1R und Dynamin nach Co-Immunaufreinigung über anti-mAbp1-Antikörper aus Gehirnllysaten von mAbp1-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Die Intensität der Clathrin HC-Bande nach unspezifischer Aufreinigung aus Gehirnllysaten von mAbp1-defizienten Mäusen beträgt jedoch nur 7% der Intensität der Clathrin HC-Bande nach Aufreinigung aus wildtypischen Gehirnllysaten. Ähnlich gering war die Intensität des unspezifischen Hintergrundsignals der nachweisbaren Menge Hip1R (19%) und Dynamin (16%) im Vergleich zur Bandenintensität nach Aufreinigung aus wildtypischen Organlysaten (Abb. 5.26, Spur 6). Die Kontrollexperimente unter Verwendung irrelevanter IgGs und Protein A/G-Agarose alleine zeigten keine detektierbaren Mengen Clathrin HC, Hip1R, Dynamin und mAbp1 im Immunblot (Abb. 5.26, Spuren 2, 5, 8, 9, 11, 12).

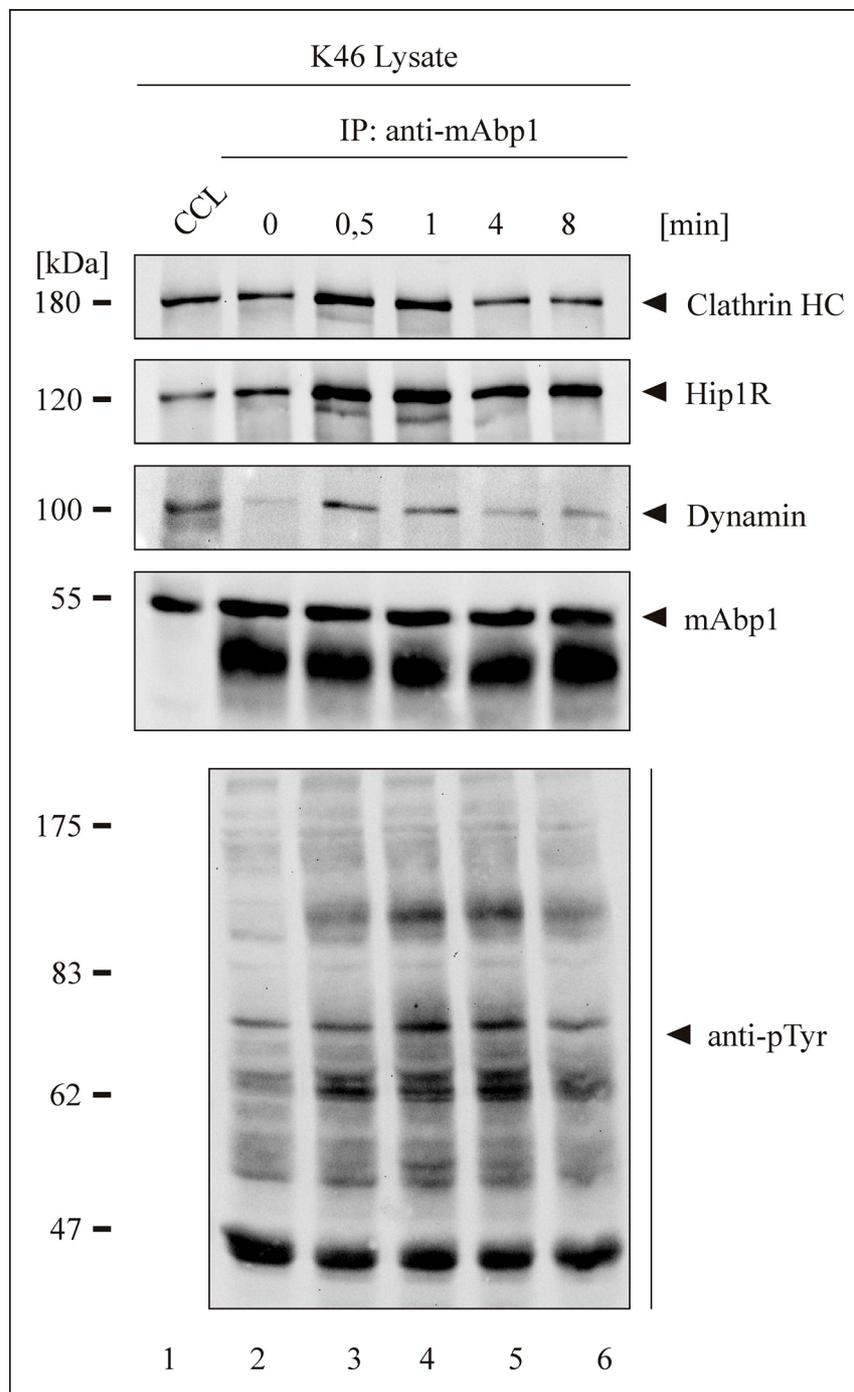
Die Interaktion von mAbp1 mit Hip1R konnte *in vivo* sowohl in neuronalem als auch in lymphatischem Gewebe sowie in B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Eine funktionelle Bedeutung der Interaktion von mAbp1 mit Hip1R kann daher in unterschiedlichen Zelltypen neuronaler und lymphatischer Gewebe vorliegen. Der Nachweis der Interaktion von mAbp1 mit Clathrin HC erfolgte mit Lysaten aus B-Zellen und mit Gehirnllysaten. Dynamin konnte mit mAbp1 im Vergleich zu Hip1R stärker aus Gehirnllysaten, aber nur in geringeren Mengen aus K46-Zelllysaten und nicht aus Milzlysaten aufgereinigt werden. Die Ergebnisse bestätigen die bereits beschriebenen Studien dieser Interaktion, in denen eine stärkere Interaktion von Dynamin und mAbp1 in Neuronen und Fibroblasten als in Lymphozyten gezeigt werden konnte und auf eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung in verschiedenen Zelltypen hindeutet (Kessels et al., 2001; Connert, 2003).

mAbp1 kann durch gleichzeitige Interaktion mit F-Aktin und verschiedenen Komponenten der endozytotischen Maschinerie eine zelltypische, funktionelle Verknüpfung des Aktin-Zytoskeletts mit der in vielen zellulären Prozessen erforderlichen endozytotischen Maschinerie herstellen.

#### **5.4.2. Stimulationsabhängigkeit der Interaktion von mAbp1 mit Hip1R, Clathrin HC und Dynamin in B-Zellen**

mAbp1 hat eine funktionelle Bedeutung in der  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung nach Aktivierung der B-Zelle durch B-Zell-Antigenrezeptor (BCR)-Stimulation und ist ein Substrat der Syk und Src Familien Kinasen (Larbolette et al., 1999). Um die Stimulationsabhängigkeit der Interaktion von mAbp1 mit Clathrin HC, Hip1R und Dynamin zu analysieren, wurden

*in vivo*-Immunaufreinigungsstudien wie oben beschrieben mit Zelllysaten von K46-B-Zellen durchgeführt, die über den BCR stimuliert oder mit Pervanadat/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden (Abb. 5.27; für Details siehe Material und Methoden).



**Abbildung 5.27: Beeinflussung der Interaktion von mAbp1 mit Clathrin HC, Hip1R und Dynamin durch BCR-Stimulation.** Je  $2 \cdot 10^7$  K46-Zellen wurden mit anti-Maus-IgG für 0, 0,5, 1, 4, und 8 min stimuliert, lysiert (CCL, *cleared cellular lysate*; Spur 1) und die stimulationsabhängige Interaktion von mAbp1 mit Clathrin HC, Hip1R und Dynamin durch Co-Immunaufreinigung mit anti-mAbp1-Antikörpern untersucht (Spuren 2-6). Clathrin HC, Hip1R, Dynamin und mAbp1 wurden mit spezifischen Antikörpern (anti-Clathrin HC, anti-Hip1R, anti-Dynamin, anti-mAbp1) detektiert. Die BCR-Stimulation wurde durch Detektion von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen mit anti-pTyr-Antikörpern im Immunblot überprüft (Spuren 2-6). Drei unabhängige Experimente führten zu identischen Ergebnissen (IP, Immunpräzipitation).

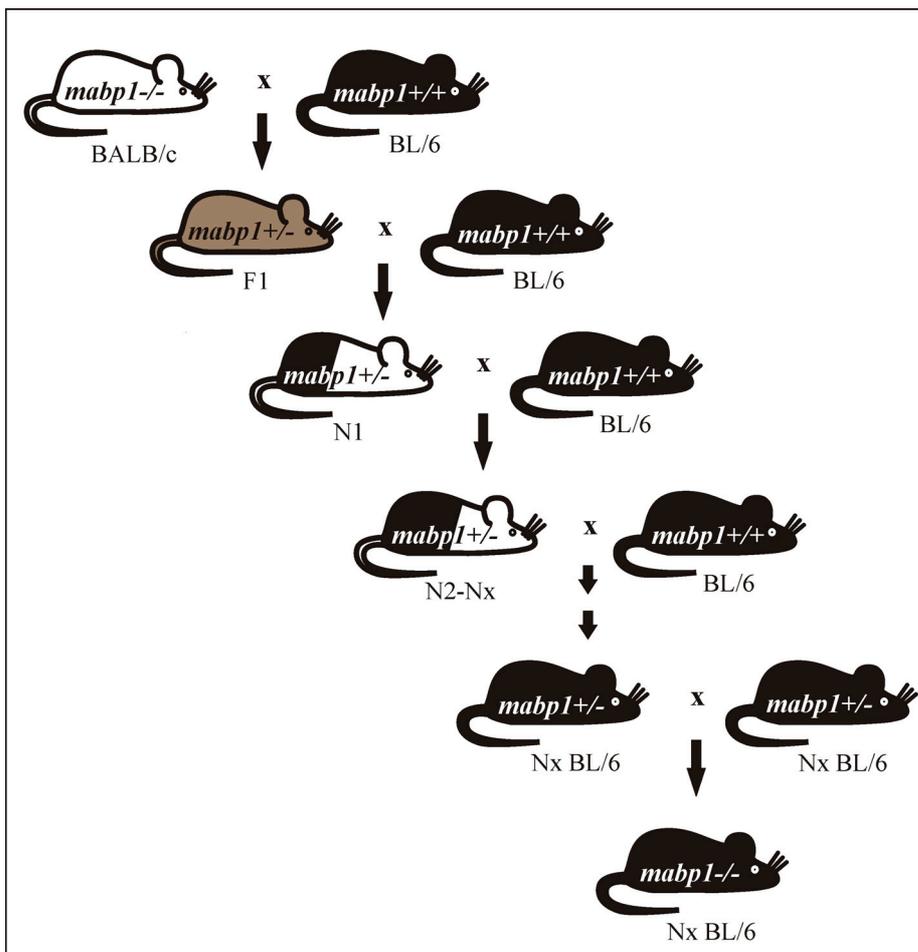
Direkt nach der BCR-Stimulation war eine deutliche Zunahme der Interaktion von mAbp1 mit Clathrin HC, Hip1R und Dynamin durch Detektion erhöhter Mengen des Interaktionspartners bei gleichbleibenden Mengen aufgereinigtem mAbp1 im Immunblot nachweisbar (Abb. 5.27, Spuren 2, 3). Nach etwa vierminütiger Stimulation nahm die Interaktion von mAbp1 mit diesen Proteinen wieder ab (Abb. 5.27, Spuren 4-6). Die Stimulation der B-Zelle mit Pervanadat/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatte dagegen keine Auswirkung auf die Interaktionen (Daten nicht gezeigt). Die Aufreinigung von Hip1R, Clathrin HC und Dynamin mit anti-mAbp1-Antikörpern aus Lysaten von aktivierten K46-B-Zellen zeigte eine BCR-Stimulationsabhängigkeit der Assoziation von mAbp1 mit diesen Interaktionspartnern. Die Aktivierung der B-Zelle durch Stimulation des BCR kann einen regulierbaren, positiven Einfluss auf die Interaktion von mAbp1 mit Clathrin HC, Hip1R und Dynamin direkt nach der Stimulation ausüben.

### **5.5. Initiale Charakterisierung mAbp1-defizienter C57BL/6 Mäuse**

Für verschiedenste Analysen an Maus-Modellen stehen eine Vielzahl von Maus-Inzuchtstämmen mit verschiedenen genetischen Hintergründen zur Verfügung. Die einzelnen Tiere eines Inzuchtstamms sind untereinander genetisch homogen (zur Übersicht: Wade und Daly, 2005). Einflüsse des genetischen Hintergrunds können in verschiedenen Experimenten und Fragestellungen beobachtet werden. So zeigen sich beispielsweise aufgrund genetischer Heterogenität Unterschiede in der Immunantwort zwischen BALB/c und C57BL/6 Mäusen (Morokata et al., 1999; Rosas et al., 2005). Aber auch in Tests zum Verhalten und Lernen haben unterschiedliche Inzuchtstämme voneinander abweichende Fähigkeiten (Crawley et al., 1997). Die Auswirkungen des genetischen Hintergrunds von verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen auf den Phänotyp einer Genmutation oder Deletion sind bereits vielfach beschrieben worden. Der genetische Hintergrund kann die Penetranz verschiedener Symptome der Defizienz oder Mutation und die Ausprägung dieser Symptome beeinflussen (Sibilia and Wagner, 1995; Threadgill et al., 1995; Ulbrich et al., 2002).

Alle bisher im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Studien wurden an BALB/c mAbp1-defizienten Mäusen durchgeführt. Um die Auswirkung des genetischen Hintergrunds auf die Symptome der mAbp1-Defizienz zu analysieren, wurde die *mabp1*-Deletion in den Mausstamm C57BL/6 eingekreuzt (Abb. 5.28). Da geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ausprägung des Phänotyps der mAbp1-Defizienz beobachtet wurden, wurde eine

maternale und eine paternale C57BL/6 *mAbp1*-defiziente Linie generiert. Die Rückkreuzung erfolgt aus diesem Grund einmal ausgehend von einem *mAbp1*-defizienten BALB/c Weibchen und einmal von einem *mAbp1*-defizienten BALB/c Männchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in der paternalen Linie bis zur Generation N10 und in der maternalen Linie bis zur Generation N11 rückgekreuzt (Abb. 5.28; für Details siehe Material und Methoden). *mabp1*<sup>+/-</sup> C57BL/6 Weibchen der maternalen Linie wurden mit *mabp1*<sup>+/-</sup> C57BL/6 Männchen der paternalen Linie verpaart und die Nachkommen mit den Genotypen *mabp1*<sup>+/+</sup>, *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> ersten Analysen unterzogen (weiblich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=7; *mabp1*<sup>+/-</sup> n=9; *mabp1*<sup>-/-</sup> n=5; männlich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=8; *mabp1*<sup>+/-</sup> n=17; *mabp1*<sup>-/-</sup> n=6). C57BL/6 *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäuse sind lebensfähig und zeigten in den ersten sechs Lebensmonaten keine auffälligen Symptome (vgl. Abb. 5.3). Die Nachkommen aus *mabp1*<sup>+/-</sup>-Verpaarungen zeigten eine typische Mendelsche Verteilung der Genotypen (*mabp1*<sup>+/+</sup> 29%; *mabp1*<sup>+/-</sup> 50%; *mabp1*<sup>-/-</sup> 21%; n=52) und ein weitestgehend ausgeglichenes Geschlechterverhältnis von 60% Männchen und 40% Weibchen.



**Abbildung 5.28:** Kreuzungsschema zur Übertragung der *mabp1*-Deletion vom Mausstamm BALB/c auf den Mausstamm C57BL/6.

Ausgehend von einem *mAbp1*-defizienten BALB/c Weibchen und einem *mAbp1*-BALB/c Männchen wurde eine maternale und eine paternale C57BL/6 *mAbp1*-defiziente Mauslinie durch Rückkreuzung erzeugt. Nachkommen der ersten Kreuzung werden als F1-Generation bezeichnet. Alle weiteren Generationen werden fortlaufend mit N1 bis Nx betitelt.

Auffällig war, dass alle drei untersuchten mAbp1-defizienten C57BL/6 Männchen kurz nach Verpaarungen das für BALB/c mAbp1-defiziente Mäuse beschriebene *clasping*-Verhalten zeigten. C57BL/6 mAbp1-defiziente Mäuse scheinen daher eine starke Anfälligkeit gegenüber Stressfaktoren wie Verpaarungen zu haben. Bei der Betrachtung des *clasping*-Verhaltens zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede, die bereits bei BALB/c *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet wurden. Weibliche *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine gleiche Ausprägung des *clasping*-Verhaltens von 33%, wohingegen bei männlichen *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen ein deutlicher Unterschied in der Ausprägung dieses Merkmals neurologischer Defizite auftrat. Männliche mAbp1-defiziente Mäuse zeigten deutlich häufiger ein *clasping*-Verhalten als heterozygote Mäuse (Tab. 5.9). Die Manifestierung eines neurologischen Phänotyps erfolgte erst nach sechs Monaten, aber mit einer deutlich stärkeren Ausprägung gegenüber BALB/c mAbp1-defizienten Mäusen. Herz-Lungen-Anomalien sowie Splenomegalie konnten in Mäusen der C57BL/6 mAbp1-defizienten Linie bis zu einem Alter von neun Monaten nicht beobachtet werden (Tab. 5.9). Für eine umfassende Analyse müssen jedoch deutlich mehr Tiere pro Genotyp und Geschlecht über einen längeren Zeitraum beobachtet und analysiert werden.

**Tabelle 5.9: Erste Analysen C57BL/6 mAbp1-defizienter Mäuse.**

Geschlecht	Genotyp	<i>clasping</i> -Verhalten <sup>a</sup> [%]	relatives Milzgewicht [10 <sup>-3</sup> ·g/g] <sup>b</sup>	Herz-Lungen- Phänotyp
weiblich	+/+	0	-	nicht beobachtet
	+/-	33	-	
	-/-	33	-	
männlich	+/+	0	3,25 ± 0,8	nicht beobachtet
	+/-	25	2,85 ± 1,2	
	-/-	100	3,8 ± 0,9	

a) Berücksichtigt wurden alle Tiere ab einem Alter von sechs Monaten;

b) das relative Milzgewicht konnte aufgrund der geringen Anzahl zur Verfügung stehender wildtypischer Mäuse nicht für Weibchen bestimmt werden;

weiblich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=1; *mabp1*<sup>+/-</sup> n=3; *mabp1*<sup>-/-</sup> n=3; männlich: *mabp1*<sup>+/+</sup> n=4; *mabp1*<sup>+/-</sup> n=4; *mabp1*<sup>-/-</sup> n=3.

Aufgrund der beschriebenen Unterschiede in BALB/c und C57BL/6 *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen ist davon auszugehen, dass modifizierende Gene existieren, die in den verschiedenen genetischen Hintergründen zu einer unterschiedlichen Ausprägung des Phänotyps aufgrund der Defizienz von mAbp1 führen. Für weitere Analysen, insbesondere des neuronalen mAbp1-Defizienz-Phänotyps, steht die C57BL/6 mAbp1-defiziente Mauslinie zur Verfügung.

## 6. Diskussion

Die Charakterisierung der Funktion des Adapterproteins mAbp1 in verschiedenen Zelltypen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch umfassende Analyse des Phänotyps mAbp1-defizienter Mäuse unter Berücksichtigung von Organanomalien und Verhaltensauffälligkeiten. Ein besonderes Interesse galt der Morphologie und Funktionalität von Lymphozyten und Neuronen, da mAbp1 in neuronalem und lymphatischem Gewebe stark exprimiert wird. mAbp1-defiziente Mäuse entwickeln nach vier bis zwölf Monaten einen offensichtlichen Phänotyp mit einem schlechten Allgemeinzustand, eingefallenen Flanken, partiellen Lähmungen der Hinterbeine und klonischen Bewegungsmustern. Die Untersuchungen der Organe nach Sektion und Analyse mittels histologischer Methoden zeigten Anomalien der Milz, des Herzens und der Lunge in mAbp1-defizienten Mäusen. In durchflusszytometrischen Untersuchungen konnten keine Unterschiede in verschiedenen Populationen von B- und T-Zellen in den lymphatischen Organen Knochenmark, Thymus, Milz und Lymphknoten zwischen mAbp1-defizienten und wildtypischen Mäusen identifiziert werden. Studien zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in B-Zellen der Milz nach BCR-Stimulation zeigten einen verstärkten extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in folliculären und T1-B-Zellen aus mAbp1-defizienten Mäusen. T2/MZ-B-Zellen zeigten diesen Effekt nicht. Durch Analysen des Lauf- und Schwimmverhaltens sowie die Durchführung der hochsensitiven Laufrad (*Rotarod*)- und Balancierfähigkeits-Tests zur Untersuchung motorischer und koordinativer Fähigkeiten konnten neuronale Defizite identifiziert werden. Anschließende Analysen des Neuritenwachstums in primären Cerebellum-Kulturen zeigten eine Verstärkung des Neuritenwachstums aufgrund der mAbp1-Defizienz. Die funktionelle Bedeutung von mAbp1 wird durch vielfältige Wechselwirkungen mit anderen Proteinen in verschiedenen Zelltypen vermittelt. Als weiterer Interaktionspartner von mAbp1 in neuronalem und lymphatischem Gewebe konnte Hip1R durch Co-Immunaufreinigungsexperimente bestätigt werden.

### 6.1. Essentielle Bedeutung von mAbp1 für die Integrität verschiedener Organe

#### 6.1.1. Kann die Bedeutung von mAbp1 für die Integrität des Herzens auf die F-Aktin-Bindungseigenschaft zurückgeführt werden?

Obwohl mAbp1 im Herz nur schwach und in der Lunge mittelstark exprimiert wird (Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000), hat die Defizienz von mAbp1 einen essentiellen Einfluss auf die Integrität dieser Organe. Die Abwesenheit von mAbp1 führt zu

Herz-Fehlfunktionen, ähnlich den charakteristischen Symptomen der dilatativen Kardiomyopathie. Die dilatative Kardiomyopathie zeichnet sich durch Dilatation und thromboembolische Effekte sowie einer verminderten Kontraktionsfähigkeit des Herzens aus. Herzen von mAbp1-defizienten Mäusen zeigen Dilatationen sowie Thromben und fibrotisches Gewebe in allen Herzkammern. Beeinträchtigungen der Herzfunktion, die zu Kardiomyopathien führen, können durch Defekte in verschiedenen zellulären Mechanismen verursacht werden, wie die Erzeugung der zur Kontraktion benötigten Kraft oder die Weiterleitung dieser Kraft an das Zytoskelett und an die extrazelluläre Matrix (zur Übersicht: Seidman und Seidman, 2001).

Es konnte eine essentielle Bedeutung des Aktin-assoziierten muskulären LIM Proteins (MLP; Arber et al., 1997), der Intermediärfilament-Proteine Desmin (Li et al., 1996; Milner et al., 1996; Goldfarb et al., 1998; Li et al., 1999; Milner et al., 1999) und Lamin A und C (Nikolova et al., 2004), der kardialen  $\beta$ -Myosin schweren Kette (Fatkin et al. 2000; Kamisago et al., 2000), des kardialen Troponin T (Kamisago et al., 2000), sowie des kardialen Aktins (Olson et al., 1998) für die Struktur und Funktion des Herzens gezeigt werden (zur Übersicht: Ehler und Perriard, 2000; Seidman und Seidman, 2001). Vor allem die essentielle Bedeutung des Aktin-assoziierten MLP sowie die Bedeutung von Aktin selber deuten darauf hin, dass auch weitere Aktin-assoziierte Proteine für die kardiale Funktionalität wichtig sein können. So überrascht es nicht, dass auch mAbp1 als Adapterprotein eventuell aufgrund seiner F-Aktin-Bindungseigenschaften für die strukturelle und funktionelle Integrität des Herzens von Bedeutung zu sein scheint (Lappalainen et al., 1998; Kessels et al., 2000). Die in Herzen von mAbp1-defizienten Mäusen beobachteten Fibrosen können zu einer reduzierten Beweglichkeit des Herzmuskels und einer Beeinträchtigung der ventrikulären Relaxation führen.

Die einzelnen Muskelzellen des Herzens (Kardiomyozyten) weisen eine zu Skelettmuskelzellen vergleichbare Organisation der kontraktilen Proteine in Sarkomere auf. Kontraktile Elemente des Sarkomers sind dünne Filamente mit dem Hauptbestandteil Aktin sowie Aktin-bindenden Proteinen und den regulatorischen Proteinen Troponin und Tropomyosin und dicke Filamente mit dem Hauptbestandteil Myosin. Die durch ATP-Hydrolyse vermittelte Konformationsänderung in einer Domäne des Myosins, welche die zyklische Interaktion mit dem dünnen Filament ermöglicht, ist ein zentraler Vorgang zur Krafterzeugung und führt zu einer relativen Verschiebung des miteinander wechselwirkenden dicken und dünnen Filaments gegeneinander. Folglich hat Aktin eine essentielle Bedeutung bei der Generierung der kontraktilen Kraft zusammen mit Myosin

und bei der Ausbreitung dieser Kraft durch Kardiomyozyten (zur Übersicht: Seidman und Seidman, 2001). Die Bedeutung von mAbp1 für die Funktionalität von Kardiomyozyten kann daher vermutlich in der Beeinflussung der Integrität der Aktin-Struktur und Dynamik sowie der damit verbundenen Verknüpfung mit anderen zellulären Komponenten begründet liegen.

Die als Dilatation bezeichnete Volumenzunahme der Herzkammern in Herzen mAbp1-defizienter Mäuse kann eine Folge der eingeschränkten Funktionalität des Herzens einhergehend mit einer verminderten Kontraktionsfähigkeit sein. Dadurch können mechanistische Defekte bis zu einem gewissen Grad zur Aufrechterhaltung der lebenswichtigen Herzfunktionen ausgeglichen werden.

Dagegen scheint mAbp1 im Skelettmuskel keine essentielle Bedeutung zu haben oder es existieren Möglichkeiten, die Defizienz von mAbp1 zu kompensieren, da keinerlei Defekte bei der Struktur und Funktionalität des Skelettmuskels gefunden werden konnten.

Da eine gestörte Lungenstruktur und eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion in vielen Krankheitsbildern eine Folge von Herzdysfunktionen sind, kann die hier auftretende Lungenanomalie vermutlich als Sekundäreffekt eingestuft werden. Ein weiteres Indiz für die Einstufung als Sekundäreffekt ist die nahezu 100%ige Korrelation von Herz- und Lungenanomalien.

#### **6.1.2. Splenomegalie in mAbp1-defizienten Mäusen ist nicht auf die Zunahme einer B- oder T-Zell-Population zurückzuführen**

Heterozygote und mAbp1-defiziente Mäuse entwickelten zwischen dem vierten und zwölften Monat eine Vergrößerung des sekundären lymphatischen Organs Milz. Eine Splenomegalie ist nicht in jedem Fall durch Fehlfunktionen des Immunsystems zu erklären. Zur Analyse der Ursache dieser Organanomalien wurden histologische Studien an Milzen von mAbp1-defizienten Mäusen durchgeführt, die jedoch keine veränderte Struktur von roter und weißer Pulpa zeigten. Des Weiteren konnten mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen keine Unterschiede in verschiedenen B- und T-Zell-Populationen in Knochenmark, Milz, Lymphknoten und Thymus im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren identifiziert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Analysen zur Entwicklung von Hip-55/mAbp1-defizienten T-Zellen von Han et al. überein (Han et al., 2005). Die Splenomegalie in mAbp1-defizienten Mäusen ist daher nicht auf die Zunahme einer der untersuchten Zellpopulationen als Ursache zurückzuführen. mAbp1 hat keine essentielle Bedeutung in der Entwicklung sowie Differenzierung von B- und T-Zellen. Die

Zahl der Milzzellen insgesamt nahm daher aufgrund der Zunahme der Größe von mAbp1-defizienten Milzen zu, die relative Zellzahl, d.h. die Anzahl der Zellen bezogen auf das Gewicht der Milz, war jedoch im Vergleich zu wildtypischen Milzen unverändert.

Bei einer Vielzahl von Erkrankungen mit unterschiedlichen Ursachen kommt es zu einer Vergrößerung der Milz. Eine mögliche Ursache von Splenomegalien sind Herzinsuffizienzen, die als Folge von Kardiomyopathien auftreten können. Die beobachteten Anomalien des Herzens, die den Symptomen der Kardiomyopathie ähneln, und die beobachtete Splenomegalie in mAbp1-defizienten Mäusen traten in einigen Fällen zusammen auf, eine Kardiomyopathie in mAbp1-defizienten Mäusen ging jedoch nicht in jedem Fall mit einer Splenomegalie einher und umgekehrt. Die Defizite in diesen Organen traten nicht gekoppelt auf. Die sich in mAbp1-defizienten Mäusen entwickelnde Splenomegalie ist daher wahrscheinlich keine Folge von Herzinsuffizienzen und bedarf einer weiteren Analyse zur Identifizierung der Ursachen dieser Organanomalie und der funktionellen Bedeutung von mAbp1 für die Integrität dieses Organs.

## **6.2. Bedeutung von mAbp1 für die $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in B-Lymphozyten**

### **6.2.1. Der $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran wird durch mAbp1 beeinflusst**

mAbp1 scheint eine Bedeutung in der Signalweiterleitung von B-Lymphozyten zu haben, da es nach Stimulation durch Proteintyrosinkinasen phosphoryliert wird (Larbolette et al., 1999). Im Rahmen meiner Arbeit wurden keine Defekte in der B-Zell-Entwicklung und Differenzierung identifiziert. Um die Integrität der Funktion von B-Zellen bei Defizienz von mAbp1 zu analysieren, wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisationsmessungen durchgeführt. Die Modulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist ein essentieller Mechanismus für die Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen in verschiedenen Zelltypen. Die Stimulation des B-Zell-Antigenrezeptors (BCR) führt über die Aktivierung von Kinasen und der regulierten Rekrutierung von Adaptermolekülen zur Signalweiterleitung, die über die Produktion von Inositol 1,4,5-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) durch Aktivierung von PLC- $\gamma$ 2 zur Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt. Die durch  $\text{IP}_3$  vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus den intrazellulären Speichern des endoplasmatischen Retikulums (ER) führt zum Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  über Plasmamembran-Kanäle, die als *store-operated channels* (SOCs) bezeichnet werden (zur Übersicht: Winslow et al., 2003; Parekh und Putney, 2005; Gallo et al., 2006).

Bei der Analyse der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in B-Zellen aus Milzen *mabp1*<sup>-/-</sup> und *mabp1*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigte sich ein erhöhter extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom im Vergleich zu B-Zellen aus Milzen wildtypischer Mäuse. Der veränderte Einstrom aus dem Extrazellularraum kann nicht auf eine Beeinträchtigung der Freisetzung aus intrazellulären Speichern zurückgeführt werden, da dieser zelluläre Vorgang durch mAbp1-Defizienz nicht beeinflusst wird. Der unterschiedliche Einfluss der mAbp1-Defizienz in diesen Prozessen deutet auf eine Bedeutung von mAbp1 in der Regulation des extrazellulären Einstroms, nicht jedoch bei der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung hin. Dieses Defizit bei der Mobilisation von  $\text{Ca}^{2+}$  führt jedoch nicht zu einer beeinträchtigten Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen, die u.a. durch den *second messenger*  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert werden. Der verstärkte extrazelluläre Einstrom wurde in homozygoten mAbp1-defizienten B-Zellen häufiger beobachtet als in heterozygoten B-Zellen. Da der Unterschied im extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom sowohl in mAbp1-defizienten als auch in heterozygoten B-Zellen variiert, müssen weitere Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede in der Ausprägung dieses Effekts in Abhängigkeit des Genotyps zu identifizieren.

Die Analyse der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung wurde sowohl mit mAbp1-defizienten B-Zellen aus Milzen mit einer unveränderten Größe im Vergleich zu Milzen aus wildtypischen Kontrolltieren durchgeführt als auch mit B-Zellen aus vergrößerten Milzen (siehe Abb. 9, Tab. 2). Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt, dass das Auftreten eines verstärkten extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms nicht in direktem Zusammenhang mit einer Vergrößerung der Milz steht.

### 6.2.2. Wie reguliert mAbp1 den $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran?

Es ist bisher nicht vollständig verstanden, wie die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  über SOCs vermittelt. Verschiedene Modelle wurden postuliert, die die Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die Plasmamembran erklären können (zur Übersicht: Winslow et al., 2003). Unter anderem wurde eine funktionelle Bedeutung von PLC- $\gamma$  beschrieben, die unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität die Rekrutierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -durchlässigen Kanalproteinen zur Plasmamembran von Lymphozyten vermitteln kann (van Rossum et al., 2005; Yu et al., 2005; zur Übersicht: Gallo et al., 2006). Des Weiteren wurde in früheren Studien ein Aktin-Zytoskelett-abhängiger Mechanismus beschrieben, in dem die Kopplung des ER mit Kanalproteinen der Plasmamembran zur Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in Hepatozyten (Wang et al., 2002) und Thrombozyten (Rosado et al., 2000)

führt. SOCs in Hepatozyten zeigen starke Ähnlichkeiten mit SOCs von Lymphozyten (Rychkov et al., 2001). Durch Interaktion mit zellulären Komponenten, die eine Rolle in den beschriebenen Prozessen zum regulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran spielen, ist auch eine funktionelle Bedeutung von mAbp1 bei der Regulation des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms denkbar.

Eine mögliche Bedeutung von mAbp1 in der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung kann durch die Interaktion mit der Lipid-Phosphatase SHIP vermittelt werden (Larbolette, 2000). Die Phosphatase SHIP ist von entscheidender Bedeutung bei der negativen Regulation des Levels von  $\text{PIP}_3$  an der Plasmamembran durch Katalyse der Dephosphorylierung von  $\text{PIP}_3$ . Viele *pleckstrin homology* (PH)-Domänen-enhaltende Proteine können über  $\text{PIP}_3$  an die Membran rekrutiert werden, u.a. Btk und PLC- $\gamma$ . SHIP ist folglich ein negativer Regulator der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort, der durch Destabilisierung der Membran-Interaktion von Btk und PLC- $\gamma$  eine verminderte Aktivierung von PLC- $\gamma$  durch Btk zur Folge hat. Daraus resultiert eine verminderte  $\text{IP}_3$ -Produktion und folglich eine abgeschwächte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort (Damen et al., 1996; Hashimoto et al., 1999; zur Übersicht: Rohrschneider et al., 2000). In Hip-55/mAbp1-defizienten T-Zellen konnte eine Reduktion der Phosphorylierung von PLC- $\gamma$ 1 gezeigt werden (Han et al., 2005). Eine mit diesem Ergebnis übereinstimmende Reduktion der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER aufgrund eines reduzierten Levels an  $\text{IP}_3$  sowie eine daraus eventuell resultierende Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms aus dem Extrazellulärraum konnte im Rahmen meiner Arbeit in B-Zellen mAbp1-defizienter Mäuse nach Stimulation nicht beobachtet werden. Stattdessen zeigten mAbp1-defiziente B-Zellen der Milz einen verstärkten extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran. Da keine Beeinträchtigung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in mAbp1-defizienten B-Zellen detektiert werden konnte, liegt kein Hinweis auf eine Bedeutung der Interaktion von mAbp1 mit SHIP in der Signalweiterleitung von der BCR-Stimulation bis zur Aktivierung von PLC- $\gamma$  vor.

Neben der essentiellen Bedeutung von PLC- $\gamma$  für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER über die Produktion von  $\text{IP}_3$  wird dieser Lipase eine direkte Funktion in der Regulation des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms zugesprochen. Der Kontrolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum durch PLC- $\gamma$  liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde, da die Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die Plasmamembran unabhängig von der Lipase-Aktivität von PLC- $\gamma$  erfolgen kann (Patterson et al., 2002; van Rossum et al., 2005; Yu et al., 2005; zur Übersicht: Gallo et al., 2006). Die Tatsache, dass

die katalytische Aktivität von PLC- $\gamma$  für diese Regulation nicht absolut notwendig ist, weist auf einen zusätzlichen direkten Einfluss von PLC- $\gamma$  auf klassische SOC oder von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung unabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle hin (zur Übersicht: Putney, 2002). PLC- $\gamma$ 1 reguliert die Lokalisation von TRPC3, einem Protein der *transient receptor potential canonical* (TRPC) Kanalprotein-Familie. TRPC sind  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kationenkanäle, die eine Bedeutung in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung haben (Clapham et al., 2001). Die Rekrutierung erfolgt über die Formation einer intermolekularen PH-Domäne zwischen TRPC3 und PLC- $\gamma$ 1 an der Plasmamembran (van Rossum et al., 2005; zur Übersicht: Gallo et al., 2006). Des Weiteren bewirkt eine *gain-of-function*-Mutation im PLC- $\gamma$ 2-kodierenden Gen einen verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran. Dabei sind jedoch sowohl die *in vitro*-Lipase-Aktivität von PLC- $\gamma$ 2 als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern nicht beeinträchtigt. Vielmehr kann dieser Effekt durch eine verlängerte Lokalisation von PLC- $\gamma$ 2 an der Membran verursacht werden (Yu et al., 2005). Unter Berücksichtigung dieser Studien ist es denkbar, dass eine mögliche funktionelle Bedeutung von mAbp1 bei der Kontrolle des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in der Regulation der Lipase-unabhängigen Eigenschaften von PLC- $\gamma$  liegt, eventuell vermittelt durch die positive Beeinflussung der SHIP-Aktivität. In mAbp1-defizienten B-Zellen wäre die Aktivität von SHIP dann reduziert, so dass höhere Level von  $\text{PIP}_3$  zur verstärkten Rekrutierung von Kanalproteinen über PLC- $\gamma$  führen können, die den durch Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern vermittelten extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom begünstigen können (van Rossum et al., 2005). Dieser regulatorische Mechanismus über mAbp1 hat jedoch keinen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern und die Funktion von SHIP in der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER (Hashimoto et al., 1999).

Aufgrund der Interaktion mit F-Aktin kann mAbp1 des Weiteren eine Rolle bei der Aktin-Zytoskelett-abhängigen Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die Plasmamembran haben. Einen möglichen Weg zur Kommunikation zwischen dem ER und der Plasmamembran zur regulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung aus dem Extrazellulärraum nach Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher beschreibt die reversible Interaktion von Regionen des ER mit spezifischen Bereichen der Plasmamembran (Patterson et al., 1999; Rosado et al., 2000; Wang et al., 2002). Eine Interaktion der TRPC, die als Komponenten der SOCs diskutiert werden (zur Übersicht: Parekh und Putney, 2005; Gallo et al., 2006), mit  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren konnte in Co-Immunpräzipitations-Studien gezeigt werden (Kiselyov et al., 1998; Kiselyov et al., 1999).

Die Interaktion zwischen dem ER und der Plasmamembran erfordert die regulierbare Reorganisation des Aktin Zytoskeletts. In Hepatozyten der Ratte werden SOCs durch die Reduktion von kortikalem F-Aktin inhibiert, wohingegen IP<sub>3</sub>-Rezeptoren unbeeinflusst bleiben (Wang et al., 2002). Da mAbp1 mit F-Aktin interagiert und eine funktionelle Bedeutung in zellulären Prozessen hat, die eine hohe Dynamik des Aktin-Zytoskeletts erfordern, wie endozytotische Vorgänge und Wachstumsprozesse (siehe 5.3.3.3.; Kessels et al., 2000; Connert, Wienand, Thiel et al., 2006), ist auch eine regulatorische Funktion von mAbp1 in der Dynamik des Aktin Zytoskeletts bei der Regulation des extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Einstroms möglich. Da die Defizienz von mAbp1 zu einer Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms führt, scheint mAbp1 als negativer Regulator in diesem dynamischen Prozess zu fungieren. Zusammenfassend deuten diese beschriebenen Daten auf eine regulatorische Bedeutung von mAbp1 auf den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über die Plasmamembran aus dem Extrazellulärraum, nicht jedoch aus intrazellulären Speichern hin. Sowohl die Interaktion von mAbp1 mit SHIP als auch die Interaktion von mAbp1 mit F-Aktin und die Beeinflussung der Aktin-Dynamik können funktionelle Bedeutungen in diesem zellulären Mechanismus haben.

### **6.2.3. MZ- und folliculäre B-Zellen der Milz zeigen einen unterschiedlichen**

#### **Einfluss von mAbp1 auf die Regulation des extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Einstroms**

Da eine gleichzeitige Markierung von Oberflächenmarkern der B-Zellen in der Milz und Beladung mit dem Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Indo1-AM möglich ist, kann die Analyse der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in verschiedenen B-Zell-Populationen getrennt voneinander erfolgen. Die gleichzeitige Färbung der Zellen führt nicht zu einer Beeinträchtigung der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung (Daten nicht gezeigt). Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierungsanalysen in folliculären, T1- und T2/MZ-B-Zellen zeigen, dass nur in folliculären und T1-B-Zellen ein verstärkter extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Einstrom detektiert werden kann. In diesem Zusammenhang wäre ein Expressionsvergleich von mAbp1 zwischen folliculären, T1-, T2- und MZ-B-Lymphozyten interessant. Reife B-Zellen der Milz, die in folliculäre und MZ-B-Zellen eingeteilt werden, scheinen teilweise unterschiedliche zelluläre Mechanismen zur Regulation des extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Einstroms zu haben (siehe 5.2.2.). In Lokalisation und Funktionalität unterscheiden sich die reifen B-Zellen der Milz, da MZ-B-Zellen für die schnelle erste Antwort auf Pathogene im Blut verantwortlich sind. MZ-B-Zellen, die an der Marginalen Zone der Milz lokalisiert sind, haben die Fähigkeit, schnell und effizient zu differenzieren, so dass sie in frühen Phasen der Immunantwort schneller reagieren können als ein Großteil der reifen folliculären B-Zellen (Oliver et al., 1999; zur Übersicht: Lopes-Carvalho und

Kearney, 2004). Da die Defizienz von mAbp1 nur eine Beeinträchtigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem Extrazellularraum in folliculären B-Zellen, nicht aber in MZ-B-Zellen zur Folge hat, kann mAbp1 eine funktionelle Komponente zur unterschiedlichen Regulation dieses zellulären Vorgangs darstellen und so eventuell Einfluss auf die unterschiedliche Reaktivität dieser Zellen nach Stimulation über den BCR nehmen.

### **6.3. Deuten motorische und koordinative Defizite mAbp1-defizienter Mäuse auf eine Bedeutung von mAbp1 für höhere Hirnfunktionen hin?**

#### **6.3.1. mAbp1-defiziente Mäuse zeigen eingeschränkte motorische Fähigkeiten**

Eine starke Expression von mAbp1 konnte im Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm sowie im Rückenmark nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.18; Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000). Außerdem wurde in Schnitten des Gehirns von Ratten eine Lokalisation von mAbp1 in der Großhirnrinde, im Kleinhirn und Hippocampus und in geringen Mengen im Hirnstamm, sowie auf zellulärem Level in Neuriten und teilweise in Zellkörpern von primären Hippocampus Neuronen detektiert (Qualmann et al., 2004). Viele Interaktionspartner von mAbp1 sind hirnspezifisch oder werden im Gehirn stark exprimiert (Kessels et al., 2001; Fenster et al., 2003; Qualmann et al., 2004). Zusammen weisen diese Beobachtungen auf eine essentielle Bedeutung dieses Proteins für die neuronale Integrität hin.

Potentielle neurologische Defizite zeigen sich bereits bei der Betrachtung des allgemeinen Phänotyps der mAbp1-Defizienz z.B. durch *clasp*ing-Verhalten und eingeschränkter Beweglichkeit der Hinterbeine. Diese Beobachtungen stimmen mit initialen Untersuchungen von Han et al. an Hip-55/mAbp1-defizienten Mäusen überein (Han et al., 2005). Störungen der neuronalen Integrität können sich des weiteren in Verhaltensanomalien widerspiegeln. Motorische und koordinative Defizite von *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen wurden daher durch Analysen der Schwimmbewegungen und der Untersuchung der Geometrie der Fußabdrücke während der Laufbewegung sowie durch Laufrad (*Rotarod*)- und Balancierfähigkeits-Tests analysiert. Bei Laufrad (*Rotarod*)- und Balancierfähigkeits-Analysen handelt es sich um besonders sensitive Testverfahren, die ein besonderes Maß an Bewegungskoordination erfordern. Bei der Durchführung dieser Tests konnten motorische Defizite mAbp1-defizienter Mäuse auch in frühen Stadien erkannt werden. mAbp1-defiziente Mäuse zeigten Defizite in motorischen Fähigkeiten auch dann, wenn noch keine allgemeinen offensichtlichen Symptome, wie Gewichtsverlust und

*clasping*-Verhalten, nachgewiesen werden konnten. Die eingeschränkte Fähigkeit, diese Tests zu absolvieren, ist daher keine Folge eines schlechten Allgemeinzustandes, der Gewichtsverlust und Schwäche der Tiere einschließt, oder einer pathologischen Veränderung des Herzens, die zu einer eingeschränkten Leistungsfähigkeit führen kann. Zur Charakterisierung möglicher neuronaler Defizite gehört neben der Analyse von motorischen und koordinativen Fähigkeiten auch die Analyse des Lernverhaltens, das ein Maß für die Fähigkeit zur Speicherung von Informationen darstellt. Zum Test der Lernfähigkeit kann der *Morris water maze* Test angewandt werden (Morris, 1989). Die Durchführung dieses Tests war jedoch nicht möglich, da *mAbp1*-defiziente Mäuse stark beeinträchtigte Schwimmbewegungen zeigten.

Neben neurologischen Defiziten können auch Beeinträchtigungen der muskulären Integrität, z.B. durch Muskelatrophie oder Denervation, eine Ursache für eine eingeschränkte Bewegungsfähigkeit sein. Sowohl durch histologische und AChR $\alpha$ -Expressions-Studien mit Muskeln *mAbp1*-defizienter Mäuse als auch durch Kraftmessungen mit wildtypischen und *mAbp1*-defizienten Mäusen konnten muskuläre Defekte als Ursache ausgeschlossen werden. Diese Analysen deuten auf eine entscheidende Rolle von *mAbp1* bei der Ausbildung höherer Hirnfunktionen hin.

Die beeinträchtigten Tiere sind lebensfähig und die nach einigen Monaten auftretende akute Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit Todesfolgen kann nicht direkt auf neuronale Anomalien mit Beeinträchtigung der motorischen Fähigkeiten zurückgeführt werden. Ein plötzlicher Tod trat auch bei Tieren auf, die zuvor keine stark ausgeprägten Beeinträchtigungen motorischer Fähigkeiten zeigten. Nach Sektion plötzlich verstorbener Tiere konnte jedoch eine besonders starke Ausprägung der beschriebenen Symptome des Herz-Lungen-Phänotyps bei diesen Tieren nachgewiesen werden, die auf schwere Defekte der Herz-Lungen-Funktion als Todesursache hindeuten.

### **6.3.2. Sind Defizite im Neuritenwachstum auf eine veränderte Aktin-Dynamik in *mAbp1*-defizienten Neuronen zurückzuführen?**

Zur Charakterisierung der neuronalen Defizite, die sich in eingeschränkten motorischen und koordinativen Fähigkeiten widerspiegeln, wurden verschiedene Regionen des zentralen Nervensystems auf Neurodegenerationen als mögliche Ursache des beobachteten Phänotyps hin untersucht. Neurodegenerationen traten nur sporadisch in Bereichen des cervikalen Rückenmarks von *mAbp1*-defizienten Mäusen mit besonders starken motorischen Beeinträchtigungen auf. Andere Regionen des Rückenmarks sowie Großhirn, Kleinhirn und

Hirnstamm wiesen keine mikroskopisch sichtbaren Veränderungen auf. Die Morphologie von mAbp1-defizienten Neuronen in primären Kulturen zeigte im Vergleich zu Neuronen wildtypischer Kontrollkulturen keinen Unterschied (siehe Abb. 5.20.; Connert, Wienand, Thiel et al., 2006). Der beobachtete Phänotyp kann daher nicht durch den Verlust von Neuronen oder anomalen Morphologien erklärt werden, die zu einer eingeschränkten Hirnfunktion führen könnten.

Um zu überprüfen, ob in mAbp1-defizienten Neuronen funktionelle Defizite trotz einer unveränderten Morphologie vorliegen, wurden Analysen zur Differenzierung von Neuronen und zum Wachstum von Neuriten in primären Cerebellum-Neuronen-Kulturen durchgeführt. Das Wachstum von Neuriten erfordert die regulierte Reorganisation von F-Aktin zur Formation von Lamellipodien und Filopodien. Des Weiteren setzt das Wachstum von Neuriten die Bewegung neu synthetisierter Membrankomponenten zum Pol der Mikrotubuli am Wachstumskegel und die Fusion mit der Membran des Wachstumskegels voraus (zur Übersicht: Tanaka und Sabry, 1995; Dent und Gertler, 2003). Da die zellulären Mechanismen des Wachstumsprozesses auf den Einfluss von Proteinen hindeuten, welche die Aktin-Dynamik regulieren und in exo- und endozytotische Prozesse involviert sind, lag die Vermutung nahe, dass mAbp1 als Adapterprotein, welches mit F-Aktin interagieren kann und Einfluss auf Aktin-dynamische Prozesse zu haben scheint (Kessels et al., 2000), eine Rolle beim Neuritenwachstum haben kann.

In primären Cerebellum-Kulturen von mAbp1-defizienten und wildtypischen Mäusen konnten Neurone unter den angewandten Kulturbedingungen Zellfortsätze ausbilden. Die Differenzierung der Neurone konnte unabhängig von mAbp1 stattfinden, begann jedoch unter mAbp1-Defizienz zu einem früheren Zeitpunkt. Außerdem zeigte das Wachstum von Neuriten mAbp1-defizienter Cerebellum-Neurone eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit. Eine Überexpression von ADF/Cofilin in Neuronen führt ebenfalls zu einem verstärkten Neuritenwachstum (Bamburg und Bray, 1987; Meberg und Bamburg, 2000). Die Dynamik von Aktin kann in Wachstumskegeln von Neuronen durch ADF/Cofilin reguliert werden (zur Übersicht: Gungabissoon und Bamburg, 2003). Sowohl ADF/Cofilin als auch mAbp1 liegen in neuronalen Wachstumskegeln co-lokalisiert mit Aktin vor (Du et al., 1998; Kessels et al., 2000; zur Übersicht: Dent und Gertler, 2003). mAbp1 enthält eine zu ADF/Cofilin verwandte ADF-H Domäne mit jedoch unterschiedlichen Bindungseigenschaften zu Aktin (Kessels et al., 2000; zur Übersicht: Lappalainen et al., 1998). Die Defizienz von mAbp1 führt ebenso wie die Überexpression von ADF/Cofilin zu einem verstärkten Neuritenwachstum von primären Neuronen. Die verschiedenen Mechanismen von mAbp1

und ADF/Cofilin in der Regulation der Dynamik von Aktin durch unterschiedliche Bindungseigenschaften für Aktin-Monomere und Filamente können sich in der entgegengesetzten Bedeutung dieser Proteine für das Neuritenwachstum widerspiegeln. In diesem Zusammenhang wäre die Betrachtung des Neuritenwachstums in Neuronen unter gleichzeitiger Defizienz von mAbp1 und Überexpression von ADF/Cofilin interessant, um zu analysieren, welche Folgen dies für das Neuritenwachstum hätte.

### **6.3.3. mAbp1 gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die sowohl beim Wachstum von Neuriten als auch im Zyklus synaptischer Vesikel von Bedeutung sind**

Eine Vielzahl von Studien konnte die Bedeutung von Proteinen, die eine Funktion in endozytotischen Prozessen haben oder Komponenten bzw. assoziierte Proteine synaptischer Vesikel sind, für neuronale Wachstumsprozesse zeigen. So konnte in Neuronen, deren Level an Amphiphysin 1 und Dynamin 1 durch Antisense Oligonukleotide reduziert wurde, ein vermindertes Neuritenwachstum beobachtet werden (Torre et al., 1994; Mundigl et al., 1998). Die Defizienzen der Proteine Synaptophysin, dem Haupt-Membranprotein synaptischer Vesikel, und Synapsin, einem peripheren synaptischen Vesikelprotein, verursachen ebenfalls Defekte im Neuritenwachstum in primären Hippokampus-Kulturen. Im Falle der Synaptophysin-Defizienz zeigte sich ein verstärktes Dendritenwachstum (Eshkind und Leube, 1995; Gorsleben, 1999) und im Falle der Synapsin-Defizienz eine gestörte Entwicklung mit beeinträchtigtem Neuritenwachstum und einer verzögerten Synapsenformation (Chin et al., 1995). Außerdem zeigen Proteine, die einen Einfluss auf das Neuritenwachstum haben, in einigen Fällen eine funktionelle Bedeutung für vesikuläre Transportprozesse.

Bei der Analyse des synaptischen Vesikeltransports primärer Hippokampus Neurone aus Amphiphysin-defizienten und Synapsin 1-defizienten Mäusen konnten neben einem reduzierten Neuritenwachstum auch Defekte in vesikulären Transportprozessen und eine Reduktion des totalen *recycling vesicle pools* identifiziert werden (Takei et al., 1995; Ryan et al., 1996; Di Paolo et al., 2002). Diese Experimente legten vergleichbare Untersuchungen in mAbp1-defizienten primären Neuronen nahe. Unsere Abteilung konnte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jürgen Klingauf (Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) eine Bedeutung von mAbp1 für den Zyklus synaptischer Vesikel zeigen. Die Untersuchung des Exo- und Endozytose-Zyklus von synaptischen Vesikeln erfolgte durch *live cell imaging* unter Verwendung des Fluoreszenz-Farbstoffs FM1-43 (Connert, Wienand, Thiel et al., 2006). In Synapsen mAbp1-defizienter primärer

hippokampaler Neurone konnten Defekte im Recycling synaptischer Vesikel gezeigt werden, welche die Reduktion des funktionellen *recycling pools* und eine Beeinträchtigung der Regeneration von funktionellen synaptischen Vesikeln, d.h. des erneuten Übergangs endozytierter Membran zu funktionellen synaptischen Vesikeln, einschließen. Diese Analysen zeigen, dass mAbp1 nicht nur eine Rolle bei der Regulation des Neuritenwachstums sondern auch beim Recycling synaptischer Vesikel spielt.

Zur Analyse der funktionellen Ursachen dieser Defizite wurden Ultrastruktur-Analysen von Synapsen mAbp1-defizienter hippocampaler Neurone durchgeführt, die eine Akkumulation von Endosomen-ähnlichen Strukturen zeigten. Dies deutet auf eine Bedeutung von mAbp1 in der Vesikel-Abschnürung von der Plasmamembran oder von endosomalen intermediären Strukturen hin (Connert, Wienand, Thiel et al., 2006). Die Interaktionen von mAbp1 mit Dynamin und F-Aktin, deren reguliertes Zusammenwirken einen essentiellen Vorgang bei der Vesikel-Abschnürung darstellen (Merrifield et al., 2002; zur Übersicht: Hinshaw, 2000), unterstützen das Ergebnis dieser Studie.

In Studien an primären Hippokampus-Kulturen Synaptojanin 1-defizienter Mäuse konnten bei anhaltender Stimulation ebenfalls Defekte im Recycling synaptischer Vesikel aufgrund einer starken Reduktion der Regenerationszeit synaptischer Vesikel beobachtet werden (Kim et al., 2002). Diese Studien führten zu der Hypothese, dass der Phosphoinositol-Metabolismus für synaptische Prozesse und vor allem für das synaptische Vesikelrecycling von Bedeutung ist, indem die 5'Phosphatase Synaptojanin 1 einen negativen Einfluss auf die Interaktion zwischen Membranen und cytosolischen funktionellen Komponenten ausübt. mAbp1 kann möglicherweise auf diesen Prozess Einfluss nehmen, da es als Interaktionspartner von Synaptojanin 1 identifiziert werden konnte (Kessels et al., 2001). In B-Zellen konnte bereits eine mögliche Bedeutung von mAbp1 für den Phosphoinositol-Metabolismus durch die Interaktion mit einer weiteren 5'Phosphatase, der Phosphatase SHIP (Larbolette, 2000), bei der Regulation des  $Ca^{2+}$ -Einstroms über die Plasmamembran diskutiert werden (siehe 6.2.2.). Diese Experimente deuten auf eine zelluläre Funktion von mAbp1 bei der Regulation des Phosphoinositol-Metabolismus durch Interaktion mit Phosphatasen hin, die sich in verschiedenen Zelltypen bei unterschiedlichen zellulären Mechanismen auswirken können.

Die Ergebnisse der mit mAbp1-defizienten Neuronen durchgeführten Analysen unterstützen die mögliche Bedeutung der Integrität endozytotischer Prozesse und der strukturellen und/oder funktionellen Integrität synaptischer Vesikel für das Wachstum von Neuriten.

Die beobachteten motorischen Defizite, die sich in einer eingeschränkten Koordination und Beweglichkeit mAbp1-defizienter Mäuse in Verhaltenstests widerspiegeln, können als Folge der neuronalen Defekte aufgrund der mAbp1-Defizienz auftreten. Zusammenfassend bestätigen diese Studien, die eine Funktion von mAbp1 sowohl für das regulierte Wachstum von Neuriten als auch für das effiziente Recycling synaptischer Vesikel zeigen (Connert, Wienand, Thiel et al., 2006), die Bedeutung dieses Adapterproteins für höhere Hirnfunktionen.

#### **6.3.4. Defizite in endozytotischen Vorgängen als mögliche Ursache des gestörten Neuritenwachstums mAbp1-defizienter Neurone**

Das beobachtete anomale Neuritenwachstum von mAbp1-defizienten Neuronen in primären Cerebellum-Kulturen kann vermutlich nicht auf anomale Aktin-Strukturen zurückgeführt werden, wie sie in früheren Studien in Amphiphysin-defizienten Neuronen mit einem verminderten Neuritenwachstum beobachtet wurden (Mundigl et al., 1998), da die Morphologie von mAbp1-defizienten Neuronen sowohl in neuronalem Gewebe als auch in primären Kulturen keine mikroskopisch sichtbaren Defekte zeigte (siehe 5.3.3.2. und 5.3.3.3.; Connert, Wienand, Thiel et al., 2006).

Da mAbp1 eine Rolle in endozytotischen Prozessen spielt, können endozytotische Defekte eine mögliche Ursache des gestörten Neuritenwachstums sein. In verschiedenen Studien, wie die Überexpression von mAbp1 und die Reduktion der mAbp1 Expressionslevel durch RNA-Interferenz, konnte eine Bedeutung von mAbp1 in der Clathrin-vermittelten Endozytose bestätigt werden (Kessels et al., 2001; Mise-Omata et al., 2003). Des Weiteren führt die Defizienz von mAbp1 in Fibroblasten und primären Hippokampus Neuronen zu einer Reduktion endozytotischer Vorgänge (Connert, Wienand, Thiel et al., 2006). Die endozytotische Maschinerie zum Recycling neuronaler synaptischer Vesikel zeigt große Ähnlichkeiten mit der Clathrin-vermittelten Endozytose in anderen Zelltypen. Viele Proteine der Clathrin-vermittelten Endozytose, wie Clathrin, AP-2, AP-180, Intersectin, Dynamin und Amphiphysin, und Aktin-assoziierte Adapterproteine, wie Hip1R (Engqvist-Goldstein et al., 1999; Okano et al., 2003), Profilin II (Honore et al., 1993), Syndapin (Qualmann et al., 1999) und mAbp1 (Kessels et al., 2000), sind in Nervenendigungen angereichert und haben teilweise hirnspezifische Isoformen (zur Übersicht: Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003; Jarousse und Kelly, 2001). Der exo- und endozytotische Zyklus synaptischer Vesikel kann nicht nur in reifen Neuronen beobachtet werden, sondern auch unabhängig von Zell-Zell-Kontakten, d.h. der Ausbildung von Synapsen, in sich

entwickelnden Neuronen (Matteoli et al., 1992). Verursacht die Defizienz von mAbp1 einen Defekt in der Abschnürung von synaptischen Vesikeln in sich entwickelnden Neuronen, so ist es denkbar, dass eine verminderte Endozytoserate bei gleichbleibender Exozytoserate zu einem verstärkten Einbau von Membranmaterial in die Plasmamembran und zu einem verstärkten Neuritenwachstum führt.

Zelluläre Prozesse in der Synapse erfordern eine besonders hohe Geschwindigkeit, um eine effiziente neuronale Signalweiterleitung zu gewährleisten. Eine enorme Effizienz endozytotischer Vorgänge kann durch ein hohes Maß an räumlicher Organisation der verschiedenen Komponenten (zur Übersicht: Roos und Kelly, 1999; Gundelfinger et al., 2003), einer hohen Expression der beteiligten Proteine in neuronalen Geweben und einer stark ausgeprägten Lokalisation dieser Proteine in synaptischen endozytotischen Bereichen erreicht werden (zur Übersicht: Jarousse und Kelly, 2001). Sowohl mAbp1 als auch Hip1R zeigen eine starke Expression in neuronalen Geweben (Engqvist-Goldstein et al., 1999; Larbolette et al., 1999). Die Interaktion von mAbp1 und Hip1R in neuronalen Geweben konnte im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* bestätigt werden. Eine mögliche strukturelle Funktion der Interaktion von mAbp1 und Hip1R kann in der Vermittlung einer höheren Ordnungsstruktur des Aktin Zytoskeletts und der verschiedenen funktionellen Komponenten der endozytotischen Maschinerie liegen (Engqvist-Goldstein et al., 2001). mAbp1 kann neben der Interaktion mit F-Aktin mit Dynamin assoziieren (Kessels et al., 2000; Kessels et al., 2001), Hip1R mit F-Aktin und Clathrin (Engqvist-Goldstein et al., 1999; Engqvist-Goldstein et al., 2001). Die hohe Expression von mAbp1 und Hip1R kann daher mit einer unterschiedlichen zellulären Anforderung der Endozytose in Synapsen im Vergleich zu endozytotischen Prozessen anderer Zelltypen korrelieren und unterstützt die Bedeutung dieser Proteine in synaptischen endozytotischen Vorgängen.

#### **6.4. Das Adapterprotein mAbp1: Eine funktionelle Verknüpfung zwischen der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und verschiedenen zellulären Mechanismen**

Die Regulation von dynamischen Aktin-Strukturen ist ein essentieller Prozess in vielen zellulären Mechanismen. Aktin-Strukturen und deren Reorganisation spielen unter anderem eine strukturelle und/oder funktionelle Rolle sowohl in membrandynamischen Vorgängen wie endozytotischen und Wachstums-Prozessen und bei der zielgerichteten Bewegung der Zelle als auch bei der Anreicherung von funktionell verwandten Komponenten in bestimmten zellulären Strukturen zur regulierten Signalweiterleitung. Die Verknüpfung von

F-Aktin mit den Komponenten verschiedener zellulärer Prozesse sowie die Regulation der Rekrutierung und Aktivierung dieser zellulären Komponenten ist dabei von entscheidender Bedeutung und für verschiedene Zelltypen charakteristisch. Durch Interaktion mit F-Aktin und Proteinen mit Prolin-reichen Regionen kann mAbp1 die Formation von Multiproteinkomplexen und deren Verknüpfung mit dem Aktin-Zytoskelett vermitteln, um die Dynamik der Aktin-Strukturen für verschiedene zelluläre Mechanismen nutzbar und regulierbar zu machen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine funktionelle Bedeutung von mAbp1 sowohl in Lymphozyten als auch in Neuronen gezeigt werden. In B-Lymphozyten hat mAbp1 einen Einfluss auf die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation durch Beeinträchtigung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die Plasmamembran. In primären Neuronen mAbp1-defizienter Mäuse konnte in meiner Arbeit ein verstärktes Wachstum von Neuriten und durch Experimente der Abteilung von Dr. Jürgen Klingauf (Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) Defizite im Recycling synaptischer Vesikel beobachtet werden (Connert, Wienand, Thiel et al., 2006). Der universelle *second messenger*  $\text{Ca}^{2+}$  hat in Neuronen eine essentielle Bedeutung beim Recycling synaptischer Vesikel. So konnte eine wichtige Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ , dessen Einstrom in Neuronen durch Depolarisation der Nervenendigung erreicht wird, u.a. für die Regulation der Dynamin-abhängigen Endozytose synaptischer Vesikel durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Phosphatase Calcineurin gezeigt werden (Marks und McMahon, 1998). Der mögliche Einfluss der mAbp1-Defizienz auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in erregbaren Zellen muss in weiteren Experimenten analysiert werden.

Die Abhängigkeit von dynamischen Aktin-Strukturen ist u.a. eine funktionelle Eigenschaft der beschriebenen zellulären Prozesse. So konnte ein Einfluss von F-Aktin für den durch Ausschüttung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher induzierten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellularraum postuliert werden (Patterson et al., 1999; Rosado et al., 2000; Wang et al., 2002), aber auch das Wachstum von Neuriten erfordert eine starke Dynamik von Aktin-Strukturen durch Polymerisation und Depolymerisation des F-Aktin (zur Übersicht: Dent und Gertler, 2003; Gungabissoon und Bamberg, 2003). Die beschriebenen Studien zeigen eine Bedeutung des F-Aktin bindenden Proteins mAbp1 in zellulären Mechanismen in Lymphozyten und Neuronen und bestätigen den Einfluss des Aktin-Zytoskeletts in diesen Prozessen.

### **6.5. Die Interaktion von mAbp1 und Hip1R kann sowohl in neuronalen als auch in lymphatischen Geweben von funktioneller Bedeutung sein**

Die Bedeutung von mAbp1 in verschiedenen Zelltypen kann durch Zell-typische Interaktionspartner vermittelt werden. Diese Anforderung an die Funktionalität von mAbp1 geht einher mit dem Vorkommen einer großen Anzahl von möglichen Interaktionspartnern von mAbp1. Hip1R konnte als Interaktionspartner *in vivo* in neuronalem Gewebe und in Zellen der Milz bestätigt werden. Zur Analyse der Bedeutung der Interaktion von mAbp1 mit Hip1R erfolgte ein Vergleich mit der Interaktion von mAbp1 mit Dynamin. Die Interaktion von mAbp1 mit Hip1R scheint in diesen Geweben von Bedeutung zu sein, da sie eine vergleichbare Intensität zeigt wie die Interaktion von mAbp1 mit Dynamin, die eine Rolle in endozytotischen Prozessen spielt (Kessels et al., 2001).

Für die Interaktion von mAbp1 mit Hip1R ist die SH3-Domäne des Adapterproteins mAbp1 essentiell (Connert, 2003). Die für diese Interaktion benötigten Sequenzmotive oder Domänen in Hip1R wurden bisher nicht identifiziert.

Falls keine direkte Interaktion zwischen mAbp1 und Hip1R vorliegt, wäre die gemeinsame Aufreinigung der in diesen Studien untersuchten Proteine über einen weiteren Interaktionspartner beider Proteine oder aufgrund einer gemeinsamen Lokalisation in einem funktionellen Komplex z.B. aus Aktin, Komponenten der Clathrin vermittelten Endozytose und verschiedenen Proteinen mit strukturellen und regulatorischen Funktionen denkbar.

Engqvist-Goldstein et al. postulierten, dass in Hip1R von Säugern im Gegensatz zu Sla2p in Hefe keine Prolin-reiche Region vorkommt, die von SH3-Domänen gebunden werden kann (Engqvist-Goldstein et al., 1999). Im N-terminalen Abschnitt von Hip1R sind jedoch drei Prolin-reiche Sequenzabschnitte mit einem PXXP-Motiv lokalisiert (Seki et al., 1998; Larbolette, 2000; Connert, 2003). Funktionelle Studien zur Bindungseigenschaft der SH3-Domäne von mAbp1 an Prolin-reiche Sequenzabschnitte von Hip1R liegen bisher nicht vor. Am C-terminalen Ende kommen im murinen und humanen Hip1R außerdem zwei PXXXPR-Motive vor (siehe Abb. 2.3.; Maus Hip1R: P<sup>1026</sup>SPAPR, P<sup>1044</sup>SIAPR). In früheren Studien konnte eine Bedeutung dieser Prolin-reichen Sequenzen von Hip1R bei der Interaktion mit dem *Cbl-interacting protein of 85 kDa* (CIN85) gezeigt werden (Kowanetz et al., 2004). CIN85 ist ein Multidomänen-Adapterprotein, das über eine SH3-Domäne Proteine bindet, die dieses funktionelle, atypische Prolin-Arginin-Motiv mit der Sequenz PXXXPR enthalten (Take et al., 2000). Diese Studien deuten darauf hin, dass dieses Sequenzmotiv eine Interaktion von Hip1R mit SH3-Domänen enthaltenden Proteinen ermöglicht und eventuell auch für eine Interaktion mit mAbp1 essentiell sein kann. Bei der

Betrachtung der Interaktionspartner von CIN85 und mAbp1 zeigen sich teilweise weitere Parallelen, da beide Adapterproteine mit SHIP interagieren sowie CIN85 mit Synaptojanin 2 und mAbp1 mit Synaptojanin 1 (Larbolette, 2000; Kessels et al., 2001; Kowanetz et al., 2004). Obwohl sowohl Synaptojanin 1 als auch Synaptojanin 2 ein PXXPR-Motiv enthalten, konnte eine Interaktion mit CIN85 nur für Synaptojanin 2 beschrieben werden (Kowanetz et al., 2004). Der Vergleich der Interaktionspartner von mAbp1 und CIN85 unterstützt die Vermutung, dass die Interaktion von mAbp1 und Hip1R möglicherweise durch die Bindung der SH3-Domäne von mAbp1 an ein Prolin-reiches PXXXPR-Motiv von Hip1R erfolgen kann. Mutationsanalysen sowohl der PXXP-Motive als auch der PXXXPR-Motive in Hip1R können weitere Aufschlüsse über die Interaktion von mAbp1 mit Hip1R geben.

Weiterhin zeigen diese Studien, dass mAbp1 und CIN85 möglicherweise in einem gemeinsamen funktionellen Komplex von Bedeutung sein können. CIN85 kann an zahlreiche Moleküle binden, die in endozytotischen Prozessen eine Rolle spielen und scheint so durch Regulation von endozytotischen und recycelnden Vorgängen den Transport des EGF-Rezeptors zu kontrollieren (Take et al., 2000; Kowanetz et al., 2004). In diesem Zusammenhang wären Experimente interessant, die Aufschluss darüber geben können, ob z.B. Hip1R gleichzeitig mit CIN85 und mAbp1 interagieren kann.

Des Weiteren konnte eine Interaktion von mAbp1 mit Clathrin *in vivo* beobachtet werden. Eine direkte Interaktion von Clathrin schweren Ketten (HC, *heavy chain*) mit mAbp1 konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden. In früheren Studien wurde postuliert, dass das mit mAbp1 interagierende Hip1R als verbrückendes Bindeglied fungieren kann, das die indirekte Interaktion von mAbp1 und Clathrin HC vermittelt (Larbolette, 2000; Connert, 2003). Das mit Hip1R verwandte Protein Hip1 hat zwischen der ENTH/ANTH- und der *coiled-coil*-Domäne ein Clathrin-Box-Motiv (LMDMD) zur Bindung an die Clathrin HC (Metzler et al., 2001). Bei Hip1R liegt an vergleichbarer Stelle die Sequenz LIEIS, die einem Clathrin-Box-Motiv in den Clathrin-bindenden Proteinen ACK1 und ACK2 ähnelt (Teo et al., 2001; Yang et al., 2001). Über Hip1- und Hip1R-GST-Fusionsproteine konnte eine starke Interaktion von Hip1 mit Clathrin HC identifiziert werden, wohingegen die Bindung von Hip1R über das LIEIS-Motiv an Clathrin HC wesentlich schwächer ist (Legendre-Guillemain et al., 2002) und die starke Co-Immunaufreinigung von Clathrin HC nicht alleine erklären kann. Ein alternativer Weg zur Assoziation von Hip1R mit Clathrin HC ist die indirekte Interaktion über Clathrin leichte Ketten (LC, *light chain*). Hip1R interagiert mit Clathrin LC und zeigt eine deutlich erhöhte Bindungspräferenz für Clathrin

LC, die an Clathrin HC gebunden sind (Engqvist-Goldstein et al., 2001; Chen et al., 2005; Legendre-Guillemain et al., 2005). Diese Theorie muss in weiteren Co-Immunaufreinigungsanalysen unter Verwendung von anti-Clathrin LC-Antikörpern verifiziert werden.

Da Clathrin LC und Clathrin HC gleichzeitig an Hip1R binden können (Chen et al., 2005), ist es denkbar, dass die Aufreinigung von Clathrin HC sowohl über direkte schwache Interaktion mit Hip1R als auch über indirekte Assoziation an Hip1R über Clathrin LC erfolgen kann (Legendre-Guillemain et al., 2002). Die Interaktion von mAbp1 und Hip1R kann daher das mit mAbp1 interagierende Protein Dynamin mit Clathrin, einer weiteren Komponente der Clathrin-vermittelten Endozytose, in räumliche Nähe bringen und eventuell funktionell verknüpfen.

#### **6.6. mAbp1-Defizienz-Symptome unterliegen einem Gen-Dosis-Effekt und zeigen geschlechtsspezifische Unterschiede**

Die Expression von mAbp1 ist in Organen heterozygoter Mäuse im Vergleich zu Organen wildtypischer Mäuse um etwa die Hälfte verringert (Connert, 2003). Die reduzierte Menge an mAbp1 reicht in verschiedenen Zelltypen aus, die zellulären Vorgänge, die die Funktion von mAbp1 benötigen, bis zu einem gewissen Grad aufrechtzuerhalten und daher die durch mAbp1-Defizienz verursachten Defizite abzuschwächen oder zu verzögern. So manifestierte sich der Phänotyp der mAbp1-Defizienz nach etwa drei bis vier Monaten in weiblichen *mabp1*<sup>-/-</sup> und erst nach etwa zehn Monaten in weiblichen *mabp1*<sup>+/-</sup> Mäusen. Die Anomalien in Milz und Herz waren in mAbp1-defizienten Mäusen ebenfalls stärker ausgeprägt als in *mabp1*<sup>+/-</sup> Mäusen. Männliche *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten keinen Unterschied in der Manifestierung des Phänotyps und in der Ausprägung der Organanomalien. Studien zur Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung deuteten ebenfalls auf einen Gen-Dosis-Effekt sowohl bei Weibchen als auch bei Männchen hin. B-Zellen aus Milzen von mAbp1-defizienten Mäusen zeigten häufiger einen verstärkten extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Einstrom als B-Zellen aus Milzen von heterozygoten Mäusen. Die Analyse motorischer Defizite deutete nur bei der Betrachtung der Ergebnisse des Balancierfähigkeits-Tests auf stärkere Defizite in mAbp1-defizienten als in heterozygoten Mäusen hin. Ein Gen-Dosis-Effekt zeigte sich daher bezüglich des Grades und des Umfangs sowohl bei Organanomalien und allgemeinen Verhaltensauffälligkeiten als auch bei funktionellen Defiziten in B-Zellen. Entsprechende Unterschiede bei der Ausprägung der Defizite des Neuritenwachstums wurden bislang nicht untersucht.

Des Weiteren zeigten sich sowohl bei der Manifestierung des allgemeinen Phänotyps der mAbp1-Defizienz als auch bei der Ausprägung von Organanomalien geschlechtsspezifische Unterschiede. Bei funktionellen Studien an B-Zellen konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden. Das Auftreten eines verstärkten extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in B-Zellen wurde häufiger bei männlichen *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> als bei weiblichen *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet. Die Analyse motorischer und koordinativer Fähigkeiten zeigte bei männlichen und weiblichen *mabp1*<sup>+/-</sup> und *mabp1*<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch gleich starke Defizite. Die beschriebenen Studien zum Neuritenwachstum wurden ohne Berücksichtigung des Geschlechts durchgeführt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Funktion von mAbp1 in verschiedenen Zelltypen von geschlechtsspezifischen Faktoren, wie etwa unterschiedlichen Hormonspiegeln, abhängig sein kann.

## **6.7. Mögliche kompensatorische Effekte in der mAbp1-defizienten Maus**

### **6.7.1. Funktionell verwandte Proteine von mAbp1 sind mögliche Kandidaten zur Kompensation der Defizienz von mAbp1 in nicht betroffenen Organen**

mAbp1 wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert wie Niere, Leber, Milz, Thymus, Lunge, Herz, Uterus, Testis und Gehirn (Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000). Mikroskopisch sichtbare Organanomalien oder Defekte in zellulären Mechanismen gewebespezifischer Zellen konnten jedoch nur für Herz, Lunge, Milz und Gehirn nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass mAbp1 keine essentielle Funktion in allen mAbp1-exprimierenden Zellen hat oder dass verschiedene Zelltypen unterschiedlich ausgeprägte Möglichkeiten der Kompensation der Funktion von mAbp1 durch andere funktionell verwandte Proteine besitzen. So können diese Proteine in manchen Geweben die Defizienz von mAbp1 kompensieren und die Integrität der Gewebe und die Funktionalität gewebespezifischer Zellen aufrechterhalten. Eine vollständige Kompensation kann jedoch nicht in neuronalen Geweben beim Neuritenwachstum und Recycling synaptischer Vesikel erfolgen, so dass sich ein Phänotyp in mAbp1-defizienten Mäusen manifestiert, der sich durch starke Beeinträchtigungen in motorischen und koordinativen Fähigkeiten auszeichnet (Connert, Wienand, Thiel et al., 2006). Des Weiteren kann die Funktion von mAbp1 in der Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die Plasmamembran in B-Zellen aus der Milz mAbp1-defizienter Mäuse nicht vollständig kompensiert werden. Obwohl mAbp1 im Herz nur schwach exprimiert wird, zeigt sich eine starke Auswirkung auf die Integrität dieses muskulären Organs bei mAbp1-Defizienz.

Eine verstärkte Expression eines Proteins in mAbp1-defizienten Mäusen kann auf kompensatorische Effekte dieses Proteins hindeuten. In den Hirnregionen Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm zeigten sich bei der Analyse der Expression von Amphiphysin, Adaptin  $\alpha$  (AP2), Synapsin 1a und 1b, Synaptophysin, Clathrin HC, Synaptojanin 1, Hip1R, Dynamin und Synaptotagmin 1 keine Unterschiede zwischen wildtypischen und mAbp1-defizienten Mäusen. Die Expressionsanalysen dieser Proteine, die mit mAbp1 assoziieren und/oder funktionell verwandt sind, geben keinen Hinweis auf kompensatorische Effekte zur Aufrechterhaltung der neuronalen Funktionalität. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass Expressionsunterschiede aufgrund der mAbp1-Defizienz von anderen, nicht analysierten oder noch nicht identifizierten Proteinen vorliegen, die auf mögliche kompensatorische Effekte hindeuten.

#### **6.7.2. Deutet die redundante Funktion von Abp1p und Sla2p in Hefe auf kompensatorische Effekte durch Hip1R in mAbp1-defizienten Mäusen hin?**

Ein Hinweis auf Kompensation der Abp1p-Funktion konnte in Hefe gezeigt werden, da *ABP1*-defiziente Hefezellen keinen offensichtlichen Defekt bei der Rezeptor-vermittelten endozytotischen Internalisierung zeigen (Kübler und Riezman, 1993). Die kombinierte Null-Mutation von *ABP1* und *SLA2* führt jedoch zur Lethalität. Diese Studien weisen auf eine redundante Funktion von Abp1p und Sla2p in Hefe hin (Holtzman et al., 1993). In Hefezellen konnte eine Bedeutung von Sla2p für die Aktin-Organisation und die endozytotische Maschinerie nachgewiesen werden (Holtzman et al., 1993; Wesp et al., 1997; Yang et al., 1999; zur Übersicht: Wendland et al., 1998).

Hip1R-defiziente Mäuse zeigen keine offensichtlichen Anomalien oder Defekte in endozytotischen Prozessen, so dass die Funktion von Hip1R entweder nicht essentiell ist oder alternative kompensatorische Wege das Fehlen von Hip1R ausgleichen können (Hyun et al., 2004). Eine mögliche Kompensation durch mAbp1 ist nicht auszuschließen, obwohl für mAbp1 und Hip1R Funktionen in unterschiedlichen Schritten der Clathrin-vermittelten Endozytose identifiziert werden konnten. Für mAbp1 wurde eine spezifische Funktion in der Vesikel-Abschnürung und dem vesikulären Transport nach der Hip1R-abhängigen Formation Clathrin-umhüllter Vesikel nachgewiesen (Engqvist-Goldstein et al., 2001; Connert, Wienand, Thiel et al., 2006).

Sowohl mAbp1 als auch Hip1R können eine funktionelle Rolle bei der Vermittlung und Verknüpfung der endozytotischen Maschinerie mit dem Aktin-Zytoskelett übernehmen. Beide Adapterproteine binden über verschiedene Domänen sowohl Proteine mit

---

endozytotischen Funktionen als auch F-Aktin. Obwohl ein unterschiedlicher funktioneller Einfluss von mAbp1 und Hip1R in der Clathrin-vermittelten Endozytose beschrieben wurde, deutet die Interaktion von mAbp1 und Hip1R auf eine gemeinsame Bedeutung in einem funktionellen Komplex hin. Die durch Dynamin vermittelte Abschnürungsreaktion von Clathrin umhüllten Vesikeln scheint von der Clathrin HC abhängig zu sein (Iversen et al., 2003). Ein funktionelles Zusammenspiel von Dynamin und Clathrin in den letzten Schritten der Membranspaltung zur Vesikel-Abschnürung wurde von Iversen et al. postuliert. Eine Reduktion der in der Zelle vorliegenden Menge Clathrin HC um 10% durch RNA-Interferenz führt zur Bildung von umhüllten *pits*, die über lange tubuläre Hälse mit der Zelloberfläche verbunden sind. Der Level an Dynamin wird in diesen Zellen um das Zehnfache hochreguliert. Obwohl die Hälse von Dynamin-Ringen umgeben sind, findet keine Abschnürungsreaktion statt (Iversen et al., 2003).

Die Interaktion von mAbp1 mit Hip1R kann eine Bedeutung in diesem von Iversen et al. beschriebenen Prozess haben, da mAbp1 mit Dynamin und Hip1R mit Clathrin interagiert (Engqvist-Goldstein et al., 2001; Kessels et al., 2001). Möglicherweise stellt diese Interaktion einen Regulationsmechanismus für das Zusammenspiel von Dynamin und Clathrin dar, der für die letztendliche Abschnürungsreaktion erforderlich ist. Diese Hypothese wird durch die Identifizierung von Beeinträchtigungen in der Vesikel-Abschnürung von der Plasmamembran oder von endosomalen intermediären Strukturen in Präsynapsen von primären Hippokampus-Kulturen bei mAbp1-Defizienz und einer verminderten Endozytose-Rate in Transferrin-*uptake-assays* mit mAbp1-defizienten Fibroblasten gestützt (Connert, Wienand, Thiel et al., 2006). Diese Interaktion kann möglicherweise eine regulatorische Bedeutung für die Funktion von Hip1R als Promotor der Clathrin-Assemblierung und die Rolle von mAbp1 in der endozytotischen Maschinerie durch Interaktion mit Dynamin haben.

Expressionsanalysen von Hip1R in Hirnregionen wildtypischer und mAbp1-defizienter Mäuse zeigten keine Unterschiede und geben daher keinen Hinweis auf mögliche kompensatorische Effekte von Hip1R bei Defizienz von mAbp1. Die Kreuzung der mAbp1- und der Hip1R-defizienten Maus (Hyun et al., 2004) könnte durch Analyse des Phänotyps doppelt defizienter Mäuse im Vergleich zum Phänotyp der mAbp1-defizienten Maus Hinweise auf die Verknüpfung der Funktionalität von Hip1R und mAbp1 liefern.

### 6.7.3. Können mAbp1 und Cortactin redundante Funktionen übernehmen?

Cortactin kommt aufgrund einer mAbp1-ähnlichen Domänenstruktur und vielen funktionellen Gemeinsamkeiten als Kandidat zur Kompensation der mAbp1-Defizienz in Frage. Die in vielen Geweben exprimierten Proteine Cortactin und mAbp1 können als einzige bisher beschriebene Proteine über unterschiedliche Domänen gleichzeitig an Dynamin und an F-Aktin binden (Wu und Parson, 1993; Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2001; zur Übersicht: Orth und McNiven, 2003). Aufgrund der ähnlichen Domänenstruktur besitzen sie teilweise identische Interaktionspartner und viele physikalische und funktionelle Gemeinsamkeiten, wie die Phosphorylierung durch Src-Kinasen (Wu et al., 1991; Larbolette et al., 1999; Kessels et al., 2000) und die Beteiligung an Prozessen, die eine hohe Aktin-Dynamik erfordern, wie Zellwachstum (siehe 5.3.3.3.; Du et al., 1998; Weed et al., 1998; Kessels et al., 2000; Weed et al., 2000) und Membrantransport-Prozesse (Kessels et al., 2001; Cao et al., 2003; Zhu et al., 2005; Connert, Wienand, Thiel et al., 2006). Zu den gemeinsamen Interaktionspartnern zählen neben Hip1R (hier vorgestellte Experimente; Engqvist-Goldstein et al., 2004) und F-Aktin (zur Übersicht: Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003; Orth und McNiven, 2003) auch Dynamin (Kessels et al., 2001; zur Übersicht: Orth und McNiven, 2003) und Fgd1, ein *guanine nucleotide exchange factor* (GEF) für die Cdc42-Aktivierung (Hou et al., 2003).

Aufgrund der zahlreichen Gemeinsamkeiten zwischen mAbp1 und Cortactin ist es denkbar, dass die Interaktion von Hip1R mit mAbp1 ähnliche funktionelle und regulatorische Bedeutungen für die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts während endozytotischer Prozesse haben kann wie die Interaktion von Hip1R mit Cortactin. Für Hip1R ist eine regulatorische Funktion bei der Verknüpfung von Proteinen der endozytotischen Maschinerie mit dem Aktin-Zytoskelett beschrieben worden. In Zellen mit reduzierten Hip1R-Leveln findet eine konstitutive Aktin-Polymerisation statt (Engqvist-Goldstein et al., 2004). Es wird postuliert, dass diese funktionelle Bedeutung von Hip1R über die Interaktion mit Cortactin vermittelt werden kann, da eine direkte Interaktion von Hip1R und Cortactin nachgewiesen wurde (Engqvist-Goldstein et al., 2004). Die Interaktion mit Hip1R kann einen negativ regulatorischen Einfluss auf die Cortactin-vermittelte Aktin-Polymerisation ausüben.

Im Gegensatz zu Cortactin konnte für mAbp1 bisher kein direkter Einfluss auf die Aktivität des Arp2/3 Komplexes gezeigt werden. mAbp1 hat keine für die Interaktion mit dem Arp2/3 Komplex essentielle azide Bindedomäne, die sowohl in Cortactin als auch in Abp1p in Hefe vorliegt (Urano et al., 2001; zur Übersicht: Olazabal und Machesky, 2001). Die Assoziation mit F-Aktin und die Lokalisation in zelluläre Bereiche mit hoher

Membrandynamik deuten darauf hin, dass auch mAbp1 über indirekte Interaktion mittels Bindepartner, die an den Arp2/3 Komplex binden und diesen aktivieren können, in die für endozytotische Prozesse wichtige Organisation des Aktin-Netzwerkes eingreifen kann (Kessels et al., 2000). Aus diesem Grund ist es denkbar, dass die für endozytotische Mechanismen erforderliche Regulation der Aktin-Polymerisation über Hip1R sowohl durch die Interaktion mit Cortactin als auch mit mAbp1 erfolgen kann. Abhängig von zellulären oder funktionellen Bereichen kann dann die regulatorische Funktion von Hip1R durch Interaktion mit verschiedenen Proteinen, die die Aktin-Dynamik beeinflussen, modifiziert werden.

Aufschlüsse über eine mögliche kompensatorische Wirkung von Cortactin auf die Funktion von mAbp1 in mAbp1-defizienten Organen kann die Analyse der Cortactin-Expression liefern. Im Gehirn zeigten sich jedoch keine veränderten Expressionslevel von Cortactin, die auf einen kompensatorischen Effekt hindeuten. Die Analyse des Phänotyps einer mAbp1/Cortactin-doppelt-defizienten Mauslinie im Vergleich zum Phänotyp der mAbp1-defizienten Maus kann weiterführend Hinweise auf mögliche kompensatorische Wirkungen und vergleichbare Funktionen liefern.

### **6.8. Die mAbp1-defiziente Mauslinie als Modellsystem für humane Erkrankungen**

Mutationen im Gen des Adapterproteins mAbp1 konnten bisher nicht mit der Pathologie humaner Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Für Interaktionspartner von mAbp1 oder funktionell verwandten Proteinen sind jedoch Mutationen beschrieben worden, die in einigen Fällen zu humanen Erkrankungen führen können, deren Pathologien auf neuronale Defizite oder Fehlentwicklungen von Geweben zurückzuführen sind.

Mutationen im Gen des FGD1, dem humanen Ortholog von murinem Fgd1, einem GEF, führen zur Faciogenitalen Dysplasie (FGDY), einer selten auftretenden Erkrankung, die sich durch faciale, skeletale und genitale Anomalien auszeichnet (Pasteris et al., 1994). Fgd1 vermittelt die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts über den Cdc42-Signalweg und wird über mAbp1 und Cortactin an das kortikale Aktin-Zytoskelett gebunden. Eine anomale Lokalisation von Fgd1 führt zu Anomalien im Aktin-Zytoskelett und einer veränderten Zellmorphologie (Hou et al., 2003). Hou et al. postulierten, dass Beeinträchtigungen in zellulären Mechanismen, die die Signalweiterleitung von Fgd1 und Cdc42 erfordern, zur Faciogenitalen Dysplasie führen. mAbp1-defiziente Mäuse zeigen jedoch keine zur

Faciogenitalen Dysplasie vergleichbaren Symptome und können nicht als Modell für diese Erkrankung herangezogen werden. Die Interaktion mit mAbp1 scheint für die Funktion des Fgd1 nicht essentiell zu sein oder kann möglicherweise durch Interaktion mit Cortactin kompensiert werden.

Aufgrund von Homologien in der Aminosäuresequenz und Domänenstruktur scheinen Hip1 und Hip1R analoge Funktionen bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts und endozytotischer Prozesse zu übernehmen (Engqvist-Goldstein et al., 2001; Metzler et al., 2001; zur Übersicht: Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003). Das *Huntingtin interacting protein 1* (Hip1) konnte als Interaktionspartner von Huntingtin identifiziert werden (Kalchman et al., 1997), wohingegen eine Interaktion von Hip1R mit Huntingtin bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Chopra et al., 2000). Die progressive, neurodegenerative Erkrankung *Huntington's disease* (HD) resultiert aus einer Cytosin-Adenin-Guanin-(CAG) Trinukleotid-Repeat-Expansion im humanen *HD* Gen, die eine Polyglutamin-Expansion des Proteins Huntingtin zur Folge hat. Charakteristische Symptome dieser Erkrankung sind pathologische, unkontrollierte Bewegungen (Veitstanz) und Gedächtnisstörungen.

Die Interaktion zwischen Huntingtin und Hip1 ist umgekehrt abhängig von der Länge der Polyglutaminsequenzen, so dass bei Verlust der Interaktion von Huntingtin und Hip1 eine beeinträchtigte Hip1-Funktion eine Ursache der HD sein kann (Kalchman et al., 1997). Aufgrund der funktionellen Bedeutung von Hip1 und Hip1R in endozytotischen Prozessen wurde in früheren Studien postuliert, dass endozytotische Defekte eine Ursache der Entwicklung charakteristischer Symptome der HD sein können (Metzler et al., 2001).

In früheren Arbeiten konnte ein Mausmodell für HD entwickelt werden, das das erste Exon des humanen *HD* Gens mit 141-157 CAG-Repeats trägt (Mangiarini et al., 1996). Dieses Mausmodell zeigt typische neuropathologische Merkmale der humanen Erkrankung, wie eingeschränkte Beweglichkeit, Tremor und Zittern, epileptische Anfälle sowie starke Defizite der Motorik und Koordination beginnend im Alter von etwa neun bis elf Wochen (Mangiarini et al., 1996; Carter et al., 1999). Einschränkungen motorischer Fähigkeiten konnten bereits vor dem Auftreten offensichtlicher Symptome durch Analysen des Schwimmverhaltens sowie der Geometrie der Pfotenstellung während der Laufbewegung und durch Laufrad-Analyse unter Verwendung des *Rotarods* und einem Test zur Balancierfähigkeit identifiziert werden. Neuronale Verluste konnten in Mäusen des HD-Mausmodells nicht identifiziert werden. Die neuronalen Defizite können dagegen auf Dysfunktionen im Striatum zurückgeführt werden (Carter et al., 1999). Obwohl

*Huntington's disease* als eine neurodegenerative Erkrankung eingestuft wird, korreliert das Auftreten typischer Symptome in HD-Patienten, die eine große Varianz aufweisen können, nicht in allen Fällen mit Verlusten striataler und kortikaler Neurone. Es wird daher diskutiert, dass das HD-Mausmodell für Studien zu frühen Stadien der HD herangezogen werden kann (Carter et al., 1999).

Unter Verwendung der für das HD-Mausmodell durchgeführten Verhaltenstests konnten in mAbp1-defizienten Mäusen ebenfalls starke Defizite in motorischen und koordinativen Fähigkeiten identifiziert werden. Des Weiteren zeigten mAbp1-defiziente Mäuse einen offensichtlichen Phänotyp nach frühestens neun Wochen, der ebenfalls durch Tremor und eine eingeschränkte Beweglichkeit durch partielle Paralyse der Hinterbeine charakterisiert werden konnte und einen progressiven Verlauf zeigte. In verschiedenen Regionen des Gehirns konnten ebenfalls keine Neurodegenerationen identifiziert werden, die die beschriebenen Symptome der mAbp1-Defizienz erklären können. In funktionellen Studien konnten sowohl Defizite im Recycling synaptischer Vesikel (Connert, Wienand, Thiel et al., 2006) als auch beim Wachstum von Neuriten nachgewiesen werden, die das Auftreten neuronaler Dysfunktionen in mAbp1-defizienten Mäusen erklären können.

Da der Vergleich dieser Mausmodelle viele Gemeinsamkeiten bei der Charakterisierung des Phänotyps aufweist, ist die Verwendung der mAbp1-defizienten Maus als Modellsystem für humane neurologische Erkrankungen nach weiterführender Analyse der molekularen und funktionellen Ursachen der neuronalen Defizite denkbar. Mausmodelle für humane Erkrankungen sind von essentieller Bedeutung zur Entwicklung von Therapien, die z. B. im Falle der *Huntington's disease* den schweren Verlauf der Erkrankung mildern oder sogar anhalten können.

## **6.9. Ausblick**

Eine funktionelle Bedeutung von mAbp1 konnte in früheren Studien und im Rahmen dieser Arbeit in unterschiedlichen Zelltypen verschiedener Gewebe identifiziert werden. Ein immer wiederkehrendes Muster der Funktionalität von mAbp1 ist die Bedeutung in zellulären Mechanismen, die eine Dynamik des Aktin-Zytoskeletts erfordern. Studien zur Nukleation, Polymerisation und Depolymerisation von Aktin sind daher in zukünftigen Arbeiten von zentraler Bedeutung.

Die unterschiedliche Funktionalität von mAbp1 kann von der Interaktion mit verschiedenen Sets von SH3-Domänen-gebundenen Proteinen abhängen und durch diese kontrolliert

werden. Bei der Charakterisierung der Funktionalität von mAbp1 ist daher auch die Untersuchung von Interaktionspartnern von entscheidender Bedeutung. So können z.B. Konzentrationsunterschiede, Stimulationsunterschiede und die subzelluläre Lokalisation von Interaktionspartnern Einfluss auf die Funktionalität von mAbp1 nehmen. Aus diesem Grund kann die vergleichende Untersuchung von Interaktionspartnern in wildtypischen und mAbp1-defizienten Mäusen im Hinblick auf die oben genannten Punkte wie Konzentration und Lokalisation Aufschluss über die Funktionalität von mAbp1 geben. Als Interaktionspartner von mAbp1 konnte Hip1R *in vivo* bestätigt werden. Die Interaktion erfolgt über die SH3-Domäne von mAbp1. Die Sequenzmotive oder Domänen in Hip1R, die für diese Interaktion erforderlich sind, konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Mutationsanalysen der Prolin-reichen Sequenzen von Hip1R können Aufschluss über die für diese Interaktion erforderlichen Sequenzmotive geben.

Obwohl mAbp1 in vielen Geweben exprimiert wird, zeigen nur Herz, Lunge, Milz und neuronale Gewebe morphologische und/oder funktionelle Defizite aufgrund der mAbp1-Defizienz. Als mögliche bei mAbp1-Defizienz kompensatorisch wirkende Proteine wurden Hip1R und Cortactin diskutiert. Die Analyse des Phänotyps von mAbp1/Hip1R und mAbp1/Cortactin-doppelt-defizienten Mäusen im Vergleich zum Phänotyp mAbp1-defizienter Mäuse kann Aufschluss über redundante Funktionen dieser Proteine und mögliche alternative Wege zur Kompensation der mAbp1-Defizienz geben.

Zur weiterführenden Charakterisierung von mAbp1 steht neben der BALB/c mAbp1-defizienten Mauslinie eine BL6-mAbp1-defiziente Mauslinie zur Verfügung. Es ist nicht auszuschließen, dass die beschriebenen Symptome der mAbp1-Defizienz durch einen anderen genetischen Hintergrund beeinflusst werden können. Die Analyse der Mausmutante mit dem genetischen Hintergrund des BL6-Inzuchtstamms kann eventuell auftretende begleitende Effekte, die auf den genetischen Hintergrund zurückgeführt werden können, minimieren.

mAbp1-defiziente Mäuse können nach weiterführender Charakterisierung des kardialen Phänotyps sowie der neuronalen Dysfunktionen, welche die beobachteten motorischen Defizite verursachen, als Modellsystem sowohl für humane kardiale als auch für neuropathologische Erkrankungen dienen.

## 7. Literatur

Abraham R. T., Weiss A. (2004) Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol* **4**, 301-308.

Alcover A., Alarcon B. (2000) Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol* **20**, 325-346.

Arber S., Hunter J. J., Ross J., Hongo M., Sansig G., Borg J., Perriard J-C., Chien K. R., Caroni P. (1997) MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* **88**, 393-403.

Auerbach W., Hurlbert M. S., Hilditch-Maguire P., Wadghiri Y. Z., Wheeler V. C., Cohen S. I., Joyner A. L., MacDonald M., Turnbull D. H. (2001) The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expression reduced levels of huntingtin. *Hum Mol Genet* **10**, 2515-2523.

Ayscough K. R. (2004) Endocytosis: actin in the driving seat. *Curr Biol* **14**, R124-R126.

Bamburg J. R. (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 185-230.

Bamburg J. R., Bray D. (1987) Distribution and cellular localization of actin depolymerising factor. *J Cell Biol* **105**, 2817-2825.

Bennett E. M., Chen C. Y., Engqvist-Goldstein A. E., Drubin D. G., Brodsky F. M. (2001) Clathrin hub expression dissociates the actin-binding protein Hip1R from coated pits and disrupts their alignment with the actin cytoskeleton. *Traffic* **2**, 851-858.

Boeckers T. M., Kreutz M. R., Winter C., Zuschratter W., Smalla K-H., Sanmarti-Vila L., Wex H., Langnaese K., Bockmann J., Garner C. C., Gundelfinger E. D. (1999) Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain highly enriched in the postsynaptic density. *J Neurosci* **19**, 6506-6518.

Brett T. J., Legendre-Guillemin V., McPherson P. S., Fremont D. H. (2006) Structural definition of the F-actin-binding THATCH domain from HIP1R. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 121-130.

Brodsky F. M., Chen C-Y., Knuehl C., Towler M. C., Wakeham D. E. (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 517-568.

Buss F., Luzio J. P., Kendrick-Jones J. (2002) Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic* **3**, 851-858.

Cao H., Orth J. D., Chen J., Weller S. G., Heuser J. E., McNiven M. A. (2003) Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol* **23**, 2162-2170.

- Cao H., Weller S., Orth J. D., Chen J., Huang B., Chen J-L., Stamnes M., McNiven M. A. (2005) Actin and Arp1-dependent recruitment of a cortactin-dynamamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nat Cell Biol* **7**, 483-492.
- Carlier M-F., Laurent V., Santolini J., Melki R., Didry D., Xia G-X., Hong N-H., Chua N-H., Pantaloni D. (1997) Actin depolymerising factor (ADF/Cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* **136**, 1307-1323.
- Carlier M-F., Nioche P., Broutin-L'Hermite I., Boujemaa R., Le Clainche C., Egile C., Garbay C., Ducruix A., Sansonetti P., Pantaloni D. (2000) GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J Biol Chem* **275**, 21946-21952.
- Carsetti R. (2000) The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from microenvironment. *J Exp Med* **191**, 5-8.
- Carter R. J., Lione L. A., Humby T., Mangiarini L., Mahal A., Bates G. P., Dunnett S. B., Morton A. J. (1999) Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human huntington's disease mutation. *J Neurosci* **15**, 3248-3257.
- Cases-Langhoff C., Voss B., Garner A. M., Appeltauer U., Takei K., Kindler S., Veh R. W., De Camilli P., Gundelfinger E. D., Garner C. C. (1996) Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur J Cell Biol* **69**, 214-223.
- Chapman E. R. (2002) Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 498-508.
- Chen C. Y., Brodsky F. M. (2005) Huntingtin-interacting protein 1 (Hip1) and Hip1-related protein (Hip1R) bind the conserved sequence of clathrin light chains and thereby influence clathrin assembly *in vitro* and actin distribution *in vivo*. *J Biol Chem* **280**, 6109-6117.
- Chen Y. R., Kori R., John B., Tan T. H. (2001) Caspase-mediated cleavage of actin-binding and SH-domain-containing proteins cortactin, HS1, and HIP-55 during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 981-989.
- Chin L-S., Li L., Ferreira A., Kosik K. S., Greengard P. (1995) Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9230-9234.
- Chopra V. S., Metzler M., Rasper D. M., Engqvist-Goldstein A. E. Y., Singaraja R., Gan L., Fichter K. M., McCutcheon K., Drubin D., Nicholson D. W., Hayden M. R. (2000) HIP12 is a non-proapoptotic member of a gene family including HIP1, an interacting protein with huntingtin. *Mamm Genome* **11**, 1006-1015.
- Clapham D. E., Runnels L. W., Strubing C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* **2**, 387-396.

- Colwill K., Field D., Moore L., Friesen J., Andrews B. (1999) *In vivo* analysis of the domains of yeast Rvs167p function is mediated through multiple protein interactions. *Genetics* **152**, 881-893.
- Connert S. (2003) Biochemical and genetic analysis of the adaptor protein SH3P7: insights from a newly generated knockout mouse. Dissertation.
- Connert S., Wienand S., Thiel C., Krikunova M., Glyvuk N., Tsytsyra Y., Hilfiker-Kleiner D., Bartsch J. W., Klingauf J., Wienands J. (2006) SH3P7/mAbp1 deficiency leads to tissue and behavioral abnormalities and impaired vesicle transport. *EMBO J* **25**, 1611-1622.
- Cox D., Chang P., Kurosaki T., Greenberg S. (1996) Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *J Biol Chem* **271**, 16597-16602.
- Craig A. M., Banker G. (1994) Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* **17**, 267-310.
- Crawley J. N., Belknap J. K., Collins A., Crabbe J. C., Frankel W., Henderson N., Hitzemann R. J., Maxson S. C., Miner L. L., Silva A. J., Wehner J. M., Wynshaw-Boris A., Paylor R. (1997) Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* **132**, 107-124.
- Damen J. E., Liu L., Rosten P., Humphries R. K., Jefferson A. B., Majerus P. W., Krystal G. (1996) The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 1689-1693.
- Da Silva A. J., Li Z., De Vera C., Canto E., Findell P., Rudd C. E. (1997) Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 7493-7498.
- Davies S., Ramsden D. B. (2001) Huntington's disease. *Mol Pathol* **54**, 409-413.
- Denis F. M., Benecke A., Di Gioia Y., Touw I. P., Cayre Y. E., Lutz P. G. (2005) PRAM-1 potentiates arsenic trioxide-induced JNK activation. *J Biol Chem* **280**, 9043-9048.
- Dent E. W., Gertler F. B. (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* **40**, 209-227.
- Di Paolo G., Sankaranarayanan S., Wenk M. R., Daniell L., Perucco E., Caldarone B. J., Flavell R., Picciotto M. R., Ryan T. A., Cremona O., De Camilli P. (2002) Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron* **33**, 789-804.
- Dotti C., Sullivan C., Banker G. A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **8**, 1454-1468.
- Dresbach T., Qualmann B., Kessels M. M., Garner C. C., Gundelfinger E. D. (2001) The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol Life Sci* **58**, 94-116.

- Drubin D. G., Miller K. G., Botstein D. (1988) Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J Cell Biol* **107**, 2551-2561.
- Drubin D. G., Mulholland J., Zhu Z. M., Botstein D. (1990) Homology of a yeast actin-binding protein to signal transduction proteins and myosin-I. *Nature* **343**, 288-290.
- Du Y., Weed S. A., Xiong W-C., Marshall T. D., Parsons J. T. (1998) Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol Cell Biol* **18**, 5838-5851.
- Dunham N. W., Miya T. S. (1957) A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rat and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim.)* **46**, 208-209.
- Dustin M. L., Cooper J. A. (2000) The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* **1**, 23-29.
- Ehler E., Perriard J-C. (2000) Cardiomyocyte cytoskeleton and myofibrillogenesis in healthy and diseased heart. *Heart Failure Rev* **5**, 259-269.
- Engqvist-Goldstein A., Drubin D. G. (2003) Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 287-332.
- Engqvist-Goldstein A. E. Y., Kessels M. M., Chopra V. S., Hayden M. R., Drubin D. G. (1999) An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles. *J Cell Biol* **147**, 1503-1518.
- Engqvist-Goldstein A. E. Y., Warren R. A., Kessels M. M., Keen J. H., Heuser J., Drubin D. G. (2001) The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly in vitro. *J Cell Biol* **154**, 1209-1223.
- Engqvist-Goldstein A. E. Y., Zhang C. X., Carreno S., Barroso C., Heuser J. E., Drubin D. G. (2004) RNAi-mediated Hip1R silencing results in stable association between the endocytic machinery and the actin assembly machinery. *Mol Biol Cell* **15**, 1666-1679.
- Ensenat D., Yao Z., Wang X. S., Kori R., Zhou G., Lee S. C., Tan T. H. (1999) A novel src homology 3 domain-containing adaptor protein, HIP-55, that interacts with hematopoietic progenitor kinase 1. *J Biol Chem* **274**, 33945-33950.
- Eshkind L. G., Leube R. E. (1995) Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell Tissue Res* **282**, 423-433.
- Evans S., Goldman D., Heinemann S., Patrick J. (1987) Muscle acetylcholine receptor biosynthesis. Regulation by transcript availability. *J Biol Chem* **262**, 4911-4916.
- Fatkin D., McConnell B. K., Mudd J. O., Semsarian C., Moskowitz I. G. P., Schoen F. J., Giewat M., Seidman C. E., Seidman J. G. (2000) An abnormal Ca<sup>2+</sup> response in mutant sarcomere protein-mediated familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* **106**, 1351-1359.

- Fazi B., Cope M. J., Douangamath A., Ferracuti S., Schirwitz K., Zucconi A., Drubin D. G., Wilmanns M., Cesareni G., Castagnoli L. (2002) Unusual binding properties of the SH3 domain of the yeast actin-binding protein Abp1: structural and functional analysis. *J Biol Chem* **277**, 5290-5298.
- Fenster S. D., Kessels M. M., Qualmann B., Chung W. J., Nash J., Gundelfinger E. D., Garner C. C. (2003) Interactions between Piccolo and the actin/dynamin-binding protein Abp1 link vesicle endocytosis to presynaptic active zones. *J Biol Chem* **278**, 20268-20277.
- Fesce R., Grohovaz F., Valtorta F., Meldolesi J. (1994) Neurotransmitter release: fusion of 'kiss-and-run'? *Trends Cell Biol* **4**, 1-4.
- Freeman N. L., Lila T., Mintzer K. A., Chen Z., Pahk A. J., Ren R., Drubin D. G., Field J. (1996) A conserved proline-rich region of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein binds SH3 domains and modulates cytoskeletal localization. *Mol Cell Biol* **16**, 548-556.
- Fucini R. V., Chen J. L., Sharma C., Kessels M. M., Stamnes M. (2002) Golgi vesicle proteins are linked to the assembly of an actin complex defined by mAbp1. *Mol Biol Cell* **13**, 621-631.
- Fuller C. L., Braciale V. L., Samelson L. E. (2003) All roads lead to actin: the intimate relationship between TCR signaling and the cytoskeleton. *Immunol Rev* **191**, 220-236.
- Gallo E. M., Canté-Barrett K., Crabtree G. R. (2006) Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nat Rev Immunol* **7**, 25-32.
- Geisler C. (2004) TCR trafficking in resting and stimulated T cells. *Crit Rev Immunol* **24**, 67-86.
- Geli M. I., Riezman H. (1998) Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J Cell Sci* **111**, 1031-1037.
- Germain R. N. (2002) T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**, 309-322.
- Giovedi S., Vaccaro P., Valtorta F., Darchen F., Greengard P., Cesareni G., Benfenati F. (2004) Synapsin is a novel Rab3 effector protein on Small synaptic vesicles. *J Biol Chem* **279**, 43760-43768.
- Goldfarb L. G., Park K-Y., Cervenakova L., Gorokhova S., Lee H-S., Vasconcelos O., Nagle J. W., Semino-Mora C., Sivakumar K., Dalakas M. C. (1998) Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* **19**, 402-403.
- Gomez T. S., Hamann M. J., McCarney S., Savoy D. N., Lubking C. M., Heldebrant M. P., Labno C. M., McKean D. J., McNiven M. A., Burkhardt J. K., Billadeau D. D. (2005) Dynamin 2 regulated T cell activation by controlling actin polymerisation at the immunological synapse. *Nat Immunol* **6**, 261-270.

- Goode B. L., Drubin D. G., Lappalainen P. (1998) Regulation of the cortical actin cytoskeleton in budding yeast by twinfilin, a ubiquitous actin monomer-sequestering protein. *J Cell Biol* **142**, 723-733.
- Goode B. L., Rodal A. A., Barnes G., Drubin D. G. (2001) Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *J Cell Biol* **153**, 627-634.
- Gorsleben (1999) Einfluß der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin auf Wachstum und Differenzierung der hippocampalen Zellkultur. Dissertation.
- Gundelfinger E. D., Kessels M. M., Qualmann B. (2003) Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 127-139.
- Gungabissoon R. A., Bamburg J. R. (2003) Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/Cofilin. *J Histochem Cytochem* **51**, 411-420.
- Han J., Kori R., Shui J-W., Chen Y-R., Yao Z., Tan T-H. (2003) The SH3 domain-containing adaptor HIP-55 mediates c-Jun N-terminal kinase activation in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* **278**, 52195-52202.
- Han J., Shui J-W., Zhang X., Zheng B., Han S., Tan T-H. (2005) HIP-55 is important for T-cell proliferation, cytokine production, and immune responses. *Mol Cell Biol* **25**, 6869-6878.
- Hashimoto A., Hirose K., Okada H., Kurosaki T., Iino M. (1999) Inhibitory modulation of B cell receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization by Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP). *J Biol Chem* **274**, 11203-11208.
- Hao S., August A. (2005) Actin depolymerization transduces the strength of B-cell receptor stimulation. *Mol Biol Cell* **16**, 2275-2284.
- Haucke V. (2005) Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans* **33**, 1285-1289.
- Haucke V., De Camilli P. (1999) AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science* **285**, 1268-1271.
- Heuser J. E., Reese T. S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **57**, 315-344.
- Higgs H. N., Pollard T. D. (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* **70**, 649-676.
- Hinshaw J. E. (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 483-519.
- Hirokawa N., Sobue K., Kanda K., Harada A., Yorifuji H. (1989) The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1. *J Cell Biol* **108**, 111-126.

- Holsinger L. J., Graef I. A., Swat W., Chi T., Bautista D. M., Davidson L., Lewis R. S., Alt F. W., Crabtree G. R. (1998) Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr Biol* **8**, 563-572.
- Holtzman D. A., Yang S., Drubin D. G. (1993) Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, SLA1 and SLA2, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **122**, 635-644.
- Honore B., Madsen P., Andersen P., Andersen A. H., Leffers H. (1993) Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett* **330**, 151-155.
- Hou P., Estrada L., Kinley A. W., Parsons J. T., Vojtek A. B., Gorski J. L. (2003) Fgd1, the Cdc42 GEF responsible for Faciogenital Dysplasia, directly interacts with cortactin and mAbp1 to modulate cell shape. *Hum Mol Genet* **12**, 1981-1993.
- Hussain N. K., Jenna S., Glogauer M., Quinn C. C., Wasiak S., Guipponi M., Antonarakis S. E., Kay B. K., Stossel T. P., Lamarche-Vane N., McPherson P. S. (2001) Endocytic protein intersectin-I regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol* **3**, 927-932.
- Hyun T. S., Li L., Oravec-Wilson K. I., Bradley S. V., Provot M. M., Munaco A. J., Mizukami I. F., Sun H., Ross T. S. (2004) *Hip1-related* mutant mice grow and develop normally but have accelerated spinal abnormalities and dwarfism in the absence of HIP1. *Mol Cell Biol* **24**, 4329-4340.
- Hyun T. S., Rao D. S., Saint-Dic D., Michael L. E., Kumar P. D., Bradley S. V., Mizukami I. F., Oravec-Wilson K. I., Ross T. S. (2004 b) HIP1 and HIP1r stabilize receptor tyrosine kinases and bind 3-phosphoinositides via Epsin N-terminal homology domains. *J Biol Chem* **279**, 14294-14306.
- Ishikawa R., Hayashi K., Shirao T., Xue Y., Takagi T., Sasaki Y., Kohama K. (1994) Drebrin, a development-associated brain protein from rat embryo, causes the dissociation of tropomyosin from actin filaments. *J Biol Chem* **47**, 29928-29933.
- Iversen T-G., Skretting G., van Deurs B., Sandvig K. (2003) Clathrin-coated pits with long, dynamin-wrapped necks upon expression of a clathrin antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 5175-5180.
- Jahn R., Schiebler W., Ouimet C., Greengard P. (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 4137-4141.
- Janssen E., Zhang W. (2003) Adaptor proteins in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **15**, 269-276.
- Jarousse N., Kelly R. B. (2001) Endocytotic mechanisms in synapses. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 461-469.
- Kaksonen M., Sun Y., Drubin D. G. (2003) A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**, 475-487.

- Kalchman M. A., Koide H. B., McCuchton K., Graham R. K., Nichol K., Nishiyama K., Kazemi-Esfarjani P., Lynn F. C., Wellington C., Metzler M., Goldberg Y. P., Kanazawa I., Gietz R. D., Hayden M. R. (1997) HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat Genet* **16**, 44-53.
- Kamisago M., Sharma S. D., DePalma S. R., Solomon S., Sharma P., McDonough B., Smoot L., Mullen M. P., Woolf P. K., Wigle E. D., Seidman J. G., Seidman C. E. (2000) Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* **343**, 1688-1696.
- Kempiak S. J., Yamaguchi H., Sarmiento C., Sidani M., Ghosh M., Eddy R. J., DesMarais V., Way M., Condeelis J., Segall J. E. (2005) A neural Wiskott-Aldrich syndrome protein-mediated pathway for localized activation of actin polymerization that is regulated by cortactin. *J Biol Chem* **280**, 5836-5842.
- Kessels M. M., Engqvist-Goldstein A. E., Drubin D. G. (2000) Association of mouse actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7), an Src kinase target, with dynamic regions of the cortical actin cytoskeleton in response to Rac1 activation. *Mol Biol Cell* **11**, 393-412.
- Kessels M. M., Engqvist-Goldstein A. E., Drubin D. G., Qualmann B. (2001) Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin. *J Cell Biol* **153**, 351-366.
- Kessels M. M., Qualmann B. (2005) Extending the court for cortactin: from the cortex to the Golgi. *Nat Cell Biol* **7**, 448-449.
- Kim K. J., Kanellopoulos-Langevin C., Merwin R. M., Sachs D. H., Asofsky R. (1979) Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J Immunol* **122**, 549-554.
- Kim W. T., Chang S., Daniell L., Cremona O., Di Paolo G., De Camilli P. (2002) Delayed reentry of recycling vesicles into the fusion-competent synaptic vesicle pool in synaptojanin 1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 17143-17148.
- Kiselyov K., Mignery G. A., Zhu M. X., Muallem S. (1999) The N-terminal domain of the IP<sub>3</sub> receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* **4**, 423-429.
- Kiselyov K., Xu X., Mozhayeva G., Kuo T., Pessah I., Mignery G., Zhu X., Birnbaumer L., Muallem S. (1998) Functional interaction between InsP<sub>3</sub> receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* **396**, 478-482.
- Kocholchuk V., Banting G. (2003) Kinases in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans* **31**, 857-860.
- Koretzky G. A., Myung P. S. (2001) Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* **1**, 95-107.

- Kowanetz K., Husnjak K., Höller D., Kowanetz M., Soubeyran P., Hirsch D., Schmidt M. H. H., Pavelic K., De Camilli P., Randazzo P. A., Dikic I. (2004) CIN85 associated with multiple effectors controlling intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Cell* **15**, 3155-3166.
- Krause M., Sechi A. S., Konradt M., Monner D., Gertler F. B., Wehland J. (2000) Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **149**, 181-194.
- Kübler E., Riezman H. (1993) Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J* **12**, 2855-2862.
- Kurosaki T. (1999) Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* **17**, 555-592.
- Lai M. M., Hong J. J., Ruggiero A. M., Burnett P. E., Slepnev V. I., De Camilli P., Snyder S. H. (1999) The calcineurin-dynamain 1 complex as a calcium sensor for synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem* **274**, 25963-25966.
- Lamaze C., Fujimoto L. M., Yin H. L., Schmid S. L. (1997) The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J Biol Chem* **272**, 20332-20335.
- Lappalainen P., Kessels M. M., Cope M. J. T. V., Drubin D. G. (1998) The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol Biol Cell* **9**, 1951-1959.
- Larbolette O. (2000) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Adaptor-Proteins SH3P7. Dissertation.
- Larbolette O., Wollscheid B., Schweikert J., Nielsen P. J., Wienands J. (1999) SH3P7 is a cytoskeleton adapter protein and is coupled to signal transduction from lymphocyte antigen receptors. *Mol Cell Biol* **19**, 1539-1546.
- Le Bras S., Foucault I., Foussat A., Brignone C., Acuto O., Deckert M. (2004) Recruitment of the actin-binding protein HIP-55 to the immunological synapse regulates T cell receptor signaling and endocytosis. *J Biol Chem* **279**, 15550-15560.
- Legendre-Guillemain V., Metzler M., Charbonneau M., Gan L., Chopra V., Philie J., Hayden M. R., McPherson P. S. (2002) HIP1 and HIP12 display differential binding to F-actin, AP2, and Clathrin. *J Biol Chem* **277**, 19897-19904.
- Legendre-Guillemain V., Metzler M., Lemaire J-F., Philie J., Gan L., Hayden M. R., McPherson P. S. (2005) Huntingtin interacting protein 1 (HIP1) regulates clathrin assembly through direct binding to the regulatory region of the clathrin light chain. *J Biol Chem* **280**, 6101-6108.
- Lemmon S. K. (2001) Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Curr Biol* **11**, R49-R52.

- Leo A., Wienands J., Baier G., Horejsi V., Schraven B. (2002) Adapters in lymphocyte signaling. *J Clin Invest* **109**, 301-309.
- Li D., Tapscoft T., Gonzalez O., Burch P. E., Quinones M. A., Zoghbi W. A., Hill R., Bachinski L. L., Mann D. L., Roberts R. (1999) Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* **100**, 461-464.
- Li Z., Colucci-Guyon E., Pincon-Raymond M., Mericskay M., Pournin S., Paulin D., Babinet C. (1996) Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin. *Dev Biol* **175**, 362-366.
- Lila T., Drubin D. G. (1997) Evidence for physical and functional interactions among two *saccharomyces cerevisiae* SH3 domain proteins, an adenylyl cyclase-associated protein and the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **8**, 367-385.
- Liu H., Rhodes M., Wiest D. L., Vignali D. A. A. (2000) On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* **13**, 665-675.
- Lock P., Abram C. L., Gibson T., Courtneidge S. A. (1998) A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify Fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate. *EMBO J* **17**, 4346-4357.
- Lockerbie R. O., Miller V. E., Pfenninger K. H. (1991) Regulated plasmalemmal expansion in nerve growth cones. *J Cell Biol* **112**, 1215-1227.
- Loder F., Mutschler B., Ray R. J., Paige C. J., Sideras P., Torres R., Lamers M. C., Carsetti R. (1999) B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* **190**, 75-89.
- Lopes-Carvalho T., Kearney J. F. (2004) Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev* **197**, 192-205.
- Luna A., Matas O. B., Martinez-Menarguez J. A., Mato E., Duran J. M., Ballesta J., Way M., Egea G. (2002) Regulation of protein transport from the golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP. *Mol Biol Cell* **13**, 866-879.
- Machesky L. M., Gould K. L. (1999) The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 117-121.
- Machesky L. M., Insall R. H. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* **8**, 1347-1356.
- Mangiarini L., Sathasivam K., Seller M., Cozens B., Harper A., Heterington C., Lawton M., Trotter Y., Lehrach H., Davies S. W., Bates G. P. (1996) Exon 1 of the *HD* Gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**, 493-506.
- Marks B., McMahon H. T. (1998) Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr Biol* **8**, 740-749.

- Matteoli M., Takei K., Perin M. S., Südhof T. C., De Camilli P. (1992) Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons. *J Cell Biol* **117**, 849-861.
- McCann R. O., Craig S. W. (1997) The I/LWEQ module: a conserved sequence that signifies F-actin binding in functionally diverse proteins from yeast to mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 5679-5684.
- McMahon H. T., Bolshakov V. Y., Janz R., Hammer R. E., Siegelbaum S. A., Südhof T. C. (1996) Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 4760-4764.
- McNiven M. A., Kim L., Krüger E. W., Orth J. D., Cao H., Wong T. W. (2000) Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol* **151**, 187-198.
- Meberg P. J., Bamberg J. R. (2000) Increase in neurite outgrowth mediated by overexpression of actin depolymerizing factor. *J Neurosci* **20**, 2459-2469.
- Meiri K. F. (2005) Lipid rafts and regulation of the cytoskeleton during T cell activation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 1663-1672.
- Melikian H. E. (2004) Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation. *Pharmacol Ther* **104**, 17-27.
- Merrifield C. J., Feldmann M. E., Wan L., Almers W. (2002) Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol* **4**, 691-698.
- Merrifield C. J., Perrais D., Zenisek D. (2005) Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell* **121**, 593-606.
- Metzler M., Legendre-Guillemain V., Gan L., Chopra V., Kwok A., McPherson P. S., Hayden M. R. (2001) HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. *J Biol Chem* **276**, 39271-39276.
- Miletic A. V., Swat M., Fujikawa K., Swat W. (2003) Cytoskeletal remodelling in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **15**, 261-268.
- Milner D. J., Taffet G. E., Wang X., Pham T., Tamura T., Hartley C., Gerdes A. M., Capetanaki Y. (1999) The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 2063-2076.
- Milner D. J., Weitzer G., Tran D., Bradley A., Capetanaki Y. (1996) Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol* **134**, 1255-1270.
- Mise-Omata S., Montagne B., Deckert M., Wienands J., Acuto O. (2003) Mammalian actin binding protein 1 is essential for endocytosis but not lamellipodia formation: functional analysis by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 704-710.

- Mondino A., Khoruts A., Jenkins M. K. (1996) The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2245-2252.
- Morokata T., Ishikawa J., Ida K., Yamada T. (1999) C57BL/6 mice are more susceptible to antigen-induced pulmonary eosinophilia than BALB/c mice, irrespective of systematic T helper 1/T helper 2 responses. *Immunology* **98**, 345-351.
- Morris R. G. (1989) Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation *in vivo* by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* **9**, 3040-3057.
- Mousavi S. A., Malerod L., Berg T., Kjekken R. (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* **377**, 1-16.
- Mundigl O., Ochoa G-C., David C., Slepnev V. I., Kabanov A., De Camilli P. (1998) Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **18**, 93-103.
- Niir H., Clark E. A. (2002) Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* **2**, 945-956.
- Nikolic M. (2002) The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 731-745.
- Nikolova V., Leimena C., McMahon A. C., Tan J. C., Chandar S., Jogia D., Kesteven S. H., Michalicek J., Otway R., Verheyen F., Rainer S., Stewart C. L., Martin D., Fenekey M. P., Fatkin D. (2004) Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest* **113**, 357-369.
- Okano A., Usuda N., Furihata K., Nakayama K., Tian Q. B., Okamoto T., Suzuki T. (2003) Huntingtin-interacting protein-1-related protein of rat (rHIP1R) is localized in the postsynaptic regions. *Brain Research* **967**, 210-225.
- Olazabal I. M., Machesky L. M. (2001) Abp1p and cortactin, new "hand-holds" for actin. *J Cell Biol* **154**, 679-682.
- Oliver A. M., Martin F., Kearney J. F. (1999) IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *Eur J Immunol* **27**, 2366-2374.
- Olson T. M., Michels V. V., Thibodeau S. N., Tai Y-S., Keating M. T. (1998) Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* **280**, 750-752.

- Oosthuysen B., Moons L., Storkebaum E., Beck H., Nuyens D., Brusselmans K., Van Dorpe J., Hellings P., Gorselink M., Heymans S., Theimeiner G., Dewerchin M., Laudénbach V., Vermylen P., Raat H., Acker T., Vleminckx V., Van Den Bosch L., Cashman N., Fufisawa H., Drost M. R., Sciort R., Bruyninckx F., Hicklin D. J., Ince C., Gressens P., Lupu F., Plate K. H., Robberecht W., Herbert J-M., Collen D., Carmeliet P. (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* **28**, 131-138.
- Orth J. D., McNiven M. A. (2003) Dynamin at the actin-membrane interface. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 31-39.
- Parekh A. B., Putney Jr. J. W. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* **85**, 757-810.
- Pasteris N. G., Cadle A., Logie L. J., Porteous M. E., Schwartz C. E., Stebensson R. E., Glover T. W., Wilroy R. S., Gorski J. L. (1994) Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. *Cell* **18**, 669-678.
- Patterson R. L., van Rossum D. B., Ford D. L., Hurt K. J., Bae S. S., Suh P-G., Kurosaki T., Snyder S. H., Gill D. L. (2002) Phospholipase C- $\gamma$  is required for agonist-induced  $Ca^{2+}$  entry. *Cell* **111**, 529-541.
- Penninger J. M., Crabtree G. R. (1999) The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell* **96**, 9-12.
- Pierce S. K. (2002) Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol* **2**, 96-105.
- Putney J. W. (2002) PLC-gamma: an old player has a new role. *Nat Cell Biol* **4**, E280-E281.
- Qualmann B., Roos J., DiGregorio P., Kelly R. B. (1999) Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol Biol Cell* **10**, 501-513.
- Qualmann B., Boeckers T. M., Jeromin M., Gundelfinger E. D., Kessels M. M. (2004) Linkage of the actin cytoskeleton to the postsynaptic density via direct interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank family. *J Neurosci* **24**, 2481-2495.
- Qualmann B., Kelly R. B. (2000) Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J Cell Biol* **148**, 1047-1061.
- Qualmann B., Kessels M. M., Kelly R. B. (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **150**, F111-F116.
- Quintero-Monzon O., Rodal A. A., Strokopytov B., Almo S. C., Goode B. L. (2005) Structural and functional dissection of the Abp1 ADFH actin-binding domain reveals versatile in vivo adapter functions. *Mol Biol Cell* **16**, 3128-3139.
- Reth M., Wienands J. (1997) Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* **15**, 453-479.

- Rohatgi R., Miki H., Lopez M., Kirchhausen T., Takenawa T., Kirschner M. W. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221-231.
- Rohrschneider L. R., Fuller J. F., Wolf I., Liu Y., Lucas D. M. (2000) Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev* **14**, 505-520.
- Rolink A., Melchers F. (1996) B-cell development in the mouse. *Immunol Lett* **54**, 157-161.
- Roos J., Kelly R. B. (1999) The endocytic machinery in nerve terminals surrounds sites of exocytosis. *Curr Biol* **9**, 1411-1414.
- Rosado J. A., Jenner S., Sages S. O. (2000) A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. *J Biol Chem* **275**, 7527-7533.
- Rosas L. E., Keiser T., Barbi J., Satoskar A. A., Septer A., Kaczmarek J., Lezama-Davila C. M., Satoskar A. R. (2005) Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *Int Immunol* **17**, 1347-1357.
- Royle S. J., Lagnado L. (2003) Endocytosis at the synaptic terminal. *J Physiol* **553**, 345-355.
- Rozdzial M. M., Malissen B., Finkel T. H. (1995) Tyrosine-phosphorylated T cell receptor  $\zeta$  chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity* **3**, 623-633.
- Ryan T. A., Li L., Chin L. S., Greengard P., Smith S. J. (1996) Synaptic vesicle recycling in synapsin I knock-out mice. *J Cell Biol* **134**, 1219-1227.
- Rychkov G., Brereton H. M., Harland M. L., Barritt G. J. (2001) Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels with a high selectivity for  $\text{Ca}^{2+}$  identified by patch-clamp recording in rat liver cells. *Hepatology* **33**, 938-947.
- Schafer D. A. (2002) Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 76-81.
- Sechi A. S., Buer J., Wehland J., Probst-Kepper M. (2002) Changes in actin dynamics at the T-cell/APC interface: implications for T-cell anergy? *Immunol Rev* **189**, 98-110.
- Sechi A. S., Wehland J. (2004) Interplay between TCR signalling and actin cytoskeleton dynamics. *Trends Immunol* **25**, 257-265.
- Seedorf K., Kostka G., Lammers R., Bashkin P., Daly R., Burgess W. H., van der Bliek A. M., Schlessinger J., Ullrich A. (1994) Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase  $\text{C}\gamma$  and GRB-2. *J Biol Chem* **269**, 16009-16014.
- Seidman J. G., Seidman C. (2001) The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* **104**, 557-567.

- Seki N., Muramatsu M., Sugano S., Suzuki Y., Nakagawara A., Ohhira M., Hayashi A., Hori T., Saito T. (1998) Cloning, expression analysis, and chromosomal localization of *HIP1R*, an isolog of huntingtin interacting protein (HIP1). *J Hum Genet* **43**, 268-271.
- Sheng M., Sala C. (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1-29.
- Sibilia M., Wagner E. F. (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* **14**, 234-348.
- Siebenlist U., Brown K., Claudio E. (2005) Control of lymphocyte development by nuclear factor- $\kappa$ -B. *Nat Rev Immunol* **5**, 435-445.
- Sparks A. B., Hoffman N. G., McConnell S. J., Fowlkes D. M., Kay B. K. (1996) Cloning of ligand targets: systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nat Biotechnol* **14**, 741-744.
- Stefan C. J., Padilla S. M., Audhya A., Emr S. D. (2005) The phosphoinositide phosphatase Sjl2 is recruited to cortical actin patches in the control of vesicle formation and fission during endocytosis. *Mol Cell Biol* **25**, 2910-2923.
- Stork B., Engelke M., Frey J., Horejsi V., Hamm-Baarke A., Schraven B., Kurosaki T., Wienands J. (2004) Grb2 and the non-T cell activation linker NTAL constitute a  $Ca^{2+}$ -regulating signal circuit in B lymphocytes. *Immunity* **21**, 681-691.
- Take H., Watanabe S., Takeda K., Yu Z.-X., Iwata N., Kajigaya S. (2000) Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochem Biophys Res Commun* **16**, 321-328.
- Takei K., Mundigl O., Daniell L., De Camilli P. (1996) The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol* **133**, 1237-1250.
- Takei Y., Harada A., Takeda S., Kobayashi K., Terada S., Noda T., Takahashi T., Hirokawa N. (1995) Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system. *J Cell Biol* **131**, 1789-1800.
- Tanaka E., Sabry J. (1995) Making the connection: Cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* **83**, 171-176.
- Teng H., Wilkinson R. S. (2000) Clathrin mediated endocytosis in snake motor terminals is directly facilitated by intracellular  $Ca^{2+}$ . *J Physiol* **565**, 743-750.
- Teo M., Tan L., Lim L., Manser E. (2001) The tyrosine kinase ACK1 associated with clathrin-coated vesicles through a binding motif shared by arrestin and other adaptors. *J Biol Chem* **276**, 18392-18398.
- Theriot J. A. (1997) Accelerating on a treadmill: ADF/Cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J Cell Biol* **136**, 1165-1168.

- Threadgill D. W., Dlugosz A. A., Hansen L. A., Tennenbaum T., Litchi U., Yee D., LeMantia C., Mourton T., Herrup K., Harris R. C. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* **14**, 230-234.
- Torre E., McNiven M. A., Urrutia R. (1994) Dynamin 1 antisense oligonucleotide treatment prevents neurite formation in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* **269**, 32411-32417.
- Ulbrich M., Schmidt V. C., Ronsiek M., Mussmann A., Bartsch J. W., Augustin M., Jockusch H., Schmitt-John T. (2002) Genetic modifiers that aggravate the neurological phenotype of the wobbler mouse. *Neuroreport* **13**, 535-539.
- Urrutia R., Henley J. R., Cook T., McNiven M. A. (1997) The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 377-384.
- Urano T., Liu J., Zhang P., Fan Y-X., Egile C., Li R., Mueller S. C., Zhan X. (2001) Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* **3**, 259-266.
- van Rossum D. B., Patterson R. L., Sharma S., Barrow R. K., Kornberg M., Gill D. L., Snyder S. H. (2005) Phospholipase C $\gamma$ 1 controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain. *Nature* **434**, 99-104.
- Veale M., Raab M., Li Z., da Silva A. J., Kraeft S-K., Weremowicz S., Morton C. C., Rudd C. E. (1999) Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production. *J Biol Chem* **274**, 28427-28435.
- Wade C. M., Daly M. J. (2005) Genetic variation in laboratory mice. *Nat Genet* **37**, 1175-1180.
- Wang Y-J., Gregory R. B., Barritt G. J. (2002) Maintenance of the filamentous actin cytoskeleton is necessary for the activation of store-operated Ca $^{2+}$  channels, but not other types of plasma-membrane Ca $^{2+}$  channels, in rat hepatocytes. *Biochem J* **363**, 117-126.
- Weaver A. M., Karginov A. V., Kinley A. W., Weed S. A., Li Y., Parsons J. T., Cooper J. A. (2001) Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol* **11**, 370-374.
- Weed S. A., Du Y., Parson J. T. (1998) Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J Cell Sci* **111**, 2433-2443.
- Weed S. A., Karginov A. V., Schafer D. A., Weaver A. M., Kinley A. W., Cooper J. A., Parsons J. T. (2000) Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **151**, 29-40.
- Wendland B., Emr S. D., Riezman H. (1998) Protein traffic in the yeast endocytic and vacuolar protein sorting pathways. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 513-522.

- Wesp A., Hicke L., Palecek J., Lombardi R., Aust T., Munn A. L., Riezman H. (1997) End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**, 2291-2306.
- Winslow M. M., Neilson J. R., Crabtree G. R. (2003) Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **15**, 299-307.
- Witke W., Podtelejnikov A. V., Di Nardo A., Sutherland J. D., Gurniak C. B., Dotti C., Mann M. (1998) In mouse brain profiling I and profiling II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J* **17**, 967-976.
- Witzemann V., Brenner H., Sakmann B. (1991) Neural factors regulate AchR subunit mRNAs at rat neuromuscular synapses. *J Cell Biol* **114**, 125-141.
- Wu H., Parsons J. T. (1993) Cortactin, an 80/85-Kilodalton pp60<sup>src</sup> substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol* **120**, 1417-1426.
- Wu H., Reynolds A. B., Kanner S. B., Vines R. R., Parsons J. T. (1991) Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60<sup>src</sup> substrate. *Mol Cell Biol* **11**, 5113-5124.
- Xu W., Stamnes M. (2006) The actin-depolymerizing factor homology and charged/helical domains of drebrin and mAbp1 direct membrane binding and localization via distinct interactions with actin. *J Biol Chem* **281**, 11826-11833.
- Yamabhai M., Hoffman N. G., Hardison N. L., McPherson P. S., Castagnoli L., Cesareni G., Kay B. K. (1998) Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *J Biol Chem* **47**, 31401-31407.
- Yamazaki H., Takahashi H., Aoki T., Shirao T. (2001) Molecular cloning and dendritic localization of rat SH3P7. *Eur J Neurosci* **14**, 998-1008.
- Yang W., Lo C. G., Dispenza T., Cerione R. A. (2001) The Cdc42 target ACK2 directly interacts with clathrin and influences clathrin assembly. *J Biol Chem* **276**, 17468-17473.
- Yang S., Cope M. J., Drubin D. G. (1999) Sla2p is associated with the yeast cortical actin cytoskeleton via redundant localization signals. *Mol Biol Cell* **10**, 2265-2283.
- Yarar D., To W., Abo A., Welch M. D. (1999) The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr Biol* **9**, 555-558.
- Yarar D., Waterman-Storer C. M., Schmid S. L. (2005) A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* **16**, 964-975.

Yu P., Constien R., Dear N., Katan M., Hanke P., Bunney T. D., Kunder S., Quintanilla-Martinez L., Huffstadt U., Schröder A., Jones N. P., Peters T., Fuchs H., Hrabe de Angelis M., Nehls M., Grosse J., Wabnitz P., Meyer T. P. H., Yasuda K., Schiemann M., Schneider-Fresenius C., Jagla W., Russ A., Popp A., Josephs M., Marquardt A., Laufs J., Schmittwolf C., Wagner H., Pfeffer K., Mudde G. C. (2005) Autoimmunity and inflammation due to a gain-of-function mutation in phospholipase C $\gamma$ 2 that specifically increases external Ca<sup>2+</sup> entry. *Immunity* **22**, 451-465.

Yuan M., Mogemark L., Fällman M. (2005) Fyn binding protein, Fyb, interacts with mammalian actin binding protein, mAbp1. *FEBS Lett* **579**, 2339-2347.

Zakharenko S., Popov S. (1998) Dynamics of axonal microtubules regulate the topology of new membrane insertion into the growing neurites. *J Cell Biol* **143**, 1077-1086.

Zhu J., Zhou K., Hao J.-J., Liu J., Smith N., Zhan X. (2005) Regulation of cortactin/dynamin interaction by actin polymerisation during the fission of clathrin-coated pits. *J Cell Sci* **118**, 807-817.

## 8. Anhang

### 8.1. Abbildungen und Tabellen

#### 8.1.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Domänen und Sequenzmotive zur Protein-Protein-Interaktion des Adapterproteins mAbp1.....	5
Abbildung 2.2:	Schematische Darstellung einzelner Schritte und funktionell wichtiger Proteine der Clathrin-vermittelten Endozytose.....	9
Abbildung 2.3:	Domänen und Sequenzmotive von Hip1R zur Interaktion mit Proteinen und Lipiden.....	12
Abbildung 2.4:	Intrazelluläre Signalweiterleitung nach BCR- oder TCR-Stimulation...	15
Abbildung 2.5:	Schematische Darstellung der verschiedenen Elemente des Zytoskeletts in neuronalen Wachstumskegeln.....	18
Abbildung 5.1:	Charakterisierung des Zuchtverhaltens heterozygoter und mAbp1-defizienter Mäuse.....	47
Abbildung 5.2:	Nachkommen aus <i>mabp1</i> <sup>-/-</sup> -Verpaarungen zeigten eine erhöhte Sterblichkeit.....	48
Abbildung 5.3:	Die allgemeine Charakterisierung mAbp1-defizienter Mäuse zeigte verschiedene Symptome.....	49
Abbildung 5.4:	Die Manifestierung des durch mAbp1-Defizienz verursachten Phänotyps ist abhängig vom Geschlecht und Genotyp.....	50
Abbildung 5.5:	mAbp1-Defizienz führt zu pathologischen Veränderungen des Herzens.....	53
Abbildung 5.6:	Pathologische Veränderungen in der Lunge von mAbp1-defizienten Mäusen.....	54
Abbildung 5.7:	mAbp1-defiziente Mäuse entwickelten Splenomegalie bei normaler Milzstruktur.....	55
Abbildung 5.8:	Expression von mAbp1 in lymphatischen Organen der Maus.....	57
Abbildung 5.9:	Die Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark wird durch mAbp1-Defizienz nicht beeinträchtigt.....	59
Abbildung 5.10:	Die T-Zell-Entwicklung im Thymus wird durch mAbp1-Defizienz nicht beeinträchtigt.....	61

Abbildung 5.11: mAbp1-defiziente Lymphknoten zeigten keine Veränderungen in B- und T-Zell-Subpopulationen .....	63, 64
Abbildung 5.12: Die Analyse von Splenozyten aus mAbp1-defizienten Milzen zeigte unveränderte Populationen von T1-, T2-, MZ-, und reifen B-Zellen.....	66
Abbildung 5.13: Die Oberflächenexpression des IgM-BCR ist in B-Zellen von mAbp1-defizienten und wildtypischen Milzen identisch.....	68
Abbildung 5.14: Der Einstrom von extrazellulärem Ca <sup>2+</sup> in B-Zellen aus der Milz ist in mAbp1-defizienten Mäusen erhöht.....	69
Abbildung 5.15: Der Unterschied im extrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Einstrom von B-Zellen wird durch folliculäre und T1-B-Zellen verursacht.....	71
Abbildung 5.16: Expression von mAbp1 wird in verschiedenen Bereichen des ZNS der Maus.....	72
Abbildung 5.17: <i>mabp1</i> <sup>+/-</sup> und <i>mabp1</i> <sup>-/-</sup> Mäuse wiesen in Verhaltenstests motorkoordinative Defizite auf.....	74
Abbildung 5.18: Die muskuläre Innervation und Struktur von Skelettmuskeln mAbp1-defizienter Mäuse ist unverändert.....	77
Abbildung 5.19: Im Rückenmark von mAbp1-defizienten Mäusen traten sporadisch Degenerationen von Neuronen auf.....	79
Abbildung 5.20: Die Differenzierung von primären Cerebellum-Neuronen wird durch mAbp1-Defizienz beeinflusst.....	81
Abbildung 5.21: mAbp1-defiziente Neurone der primären Cerebellum-Kultur bilden längere Zellfortsätze aus.....	82
Abbildung 5.22: Die Expression verschiedener mAbp1-assoziiierter oder funktionell verwandter Proteine wird durch mAbp1-Defizienz nicht beeinflusst.....	85
Abbildung 5.23: Die Expression von Aktin ist in mAbp1-defizienten Gehirnregionen unverändert.....	86
Abbildung 5.24: Co-Immunaufreinigung von Clathrin HC, Hip1R und Dynamin mit mAbp1 aus K46-Zelllysaten.....	88
Abbildung 5.25: Co-Immunaufreinigung von Hip1R und mAbp1 aus Milzlysaten wildtypischer Mäuse.....	88
Abbildung 5.26: Co-Immunaufreinigung von Clathrin HC, Hip1R und Dynamin mit mAbp1 aus Gehirnllysaten wildtypischer Mäuse.....	89
Abbildung 5.27: Beeinflussung der Interaktion von mAbp1 mit Clathrin HC, Hip1R und Dynamin durch BCR-Stimulation.....	91

Abbildung 5.28: Kreuzungsschema zur Übertragung der <i>mabp1</i> -Deletion vom Mausstamm BALB/c auf den Mausstamm C57BL/6.....	93
--	----

### 8.1.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Interaktionspartner von mAbp1 in neuronalen Synapsen.....	20
Tabelle 4.1: Verwendete Antikörper.....	22
Tabelle 4.2: Verwendete Sekundäntikörper.....	24
Tabelle 4.3: Verwendete Oligonukleotide.....	25
Tabelle 4.4: Allgemein verwendetes PCR-Programm.....	32
Tabelle 4.5: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.....	38
Tabelle 5.1: Penetranz des Phänotyps der mAbp1-Defizienz.....	51
Tabelle 5.2: Relatives Milzgewicht weiblicher und männlicher wildtypischer, <i>mabp</i> <sup>+/-</sup> und <i>mabp</i> <sup>-/-</sup> Mäuse.....	56
Tabelle 5.3: Relative Anteile der B-Zell-Populationen im Knochenmark einer mAbp1-defizienten und einer wildtypischen Maus.....	60
Tabelle 5.4: Relative Anteile der T-Zell-Populationen im Thymus einer mAbp1-defizienten und einer wildtypischen Maus.....	62
Tabelle 5.5: Relative Anteile der Lymphozyten-Populationen im Lymphknoten einer mAbp1-defizienten und einer wildtypischen Maus.....	64
Tabelle 5.6: Relative Anteile der B-Zell-Populationen der Milz einer mAbp1-defizienten und einer wildtypischen Maus.....	67
Tabelle 5.7: Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung und extrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Einstrom in stimulierten B-Zellen aus Milzen wildtypischer, <i>mabp1</i> <sup>+/-</sup> und <i>mabp1</i> <sup>-/-</sup> Mäuse.....	70
Tabelle 5.8: Wachstum neuronaler Zellfortsätze in mAbp1-defizienten und wildtypischen Cerebellum-Kulturen nach 4 und 6 DIV.....	83
Tabelle 5.9: Erste Analysen C57BL/6 mAbp1-defizienter Mäuse.....	94

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

**Vorname, Name** Simone Wienand  
**Geburtstag** 02.03.1977  
**Geburtsort** Bielefeld  
**Familienstand** geschieden

### Schulische Daten

1983-1987 Besuch der Grundschule Werther  
1987-1996 Besuch des Ev. Gymnasiums Werther  
30.05.1996 Allgemeinen Hochschulreife

### Ausbildung

1996-2001 Studium der Biochemie an der Universität Bielefeld  
2001 Diplomarbeit an der Universität Bielefeld in der Abteilung Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie unter der Leitung von Prof. Dr. Jockusch; Thema der Diplomarbeit: Immunologische Suche nach den Produkten der Gene *Pelil* und *Kiaa0903*, Kandidatengen für die *wobbler*-Mutation der Maus  
18.12.2001 Abschluss Diplom Biochemikerin  
22.03-02.04.2004 Versuchstierkundlicher Kurs mit Prüfung am Tierschutzinformationszentrum für die Biomedizinische Forschung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (TIZ-BIFO)

### Berufspraxis

02.2002-12.2004 Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Bielefeld in der Abteilung Biochemie und Molekulare Immunologie, Prof. Dr. Wienands  
seit 01.2005 Wissenschaftliche Angestellte an der Georg-August-Universität Göttingen, Bereich Humanmedizin in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie, Prof. Dr. Wienands

Bielefeld, den 08.05.2006

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter unter ausschließlicher Nutzung der aufgeführten Materialien, Methoden und Literaturquellen an der Universität Bielefeld und an der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Wienands angefertigt zu haben.

Bielefeld, den 08.05.2006

Simone Wienand

