Die Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für den Aufbau und die Funktion glutamaterger Synapsen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Friederike Wolk

aus
Salzgitter-Bad

Göttingen 2009

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Nils Brose
in der Abteilung Molekulare Neurobiologie
am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen
angefertigt.

D 7

Referent: Prof. Dr. Ralf Heinrich

Korreferent: Prof. Dr. Oliver Einsle

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 2009

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND ANGLIZISMEN 1
1. EINLEITUNG 7
1.1 Das Gehirn 7
1.2 Aufbau und Verschaltung von Neuronen 7
1.3 Grundlagen der synaptischen Transmission 8
1.3.1 Elektrische Synapsen 9
1.3.2 Chemische Synapsen 9
1.3.3 Autaptische Kulturen als einfaches Analysesystem synaptischer Transmission 10
1.4 Die durch AMPA-Rezeptoren vermittelte Transmission 10
1.5 Das Proteingerüst in der PSD 12
1.6 Die 4.1-Proteinfamilie 14
1.7 Die Proteine 4.1G und 4.1N und ihre Interaktion mit AMPA-Rezeptoren 16
1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit 17
2. MATERIAL 18
2.1 Geräte 18
2.2 Chemikalien 19
2.3 Verbrauchsmaterialien 21
2.4 Kits 21
2.5 Medien und Lösungen 22
2.5.1 Medien und Lösungen für die Kultur von *E. coli* Stämmen 22
2.5.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur 23
2.5.3 Lösungen für Elektrophysiologie 24
2.5.4 Lösungen für SDS-PAGE 25
2.5.5 Weitere Lösungen 25
2.6 Bakterienstämme 26
2.7 Vektoren 27
2.8 Lentiviren 27
2.9 Oligonukleotide 27
2.9.1 Oligonukleotide für Genotypisierungen 28
2.9.2 Oligonukleotide für RACE-PCR 28
2.9.3 Oligonukleotide für Mutagenese-PCR 29
2.10 Antikörper 29

2.10.1 Primäre monoklonale Antikörper....29
2.10.2 Primäre polyklonale Antikörper....30
2.10.3 Sekundäre Antikörper....30
2.11 Tiere....31
3. METHODEN....32
3.1 Molekularbiologische Methoden....32
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)....32
3.1.1.1 Genotypisierungs-PCR....32
3.1.1.2 Reverse Transkription....33
3.1.1.3 RLM-RACE-PCR....33
3.1.1.4 Positions-orientierte Mutagenese-PCR....34
3.1.2 Restriktionsverdau von DNS....35
3.1.3 Dephosphorylierung der 5'-Enden mit Alkalischer Phosphatase....35
3.1.4 Ligation....35
3.1.5 Elektrotransformation von Plasmid-DNS in Bakterien (Elektroporation)...36
3.1.6 Plasmid-DNS-Präparation....36
3.1.7 DNS-Präzipitation....37
3.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion....37
3.1.9 TempliPhi DNS-Matrizen-Präparation....37
3.1.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren....38
3.1.11 Agarosegelelektrophorese....38
3.1.12 DNS-Sequenzierung, modifiziert nach Sanger *et al*. (1977)....39
3.2 Proteinbiochemische Methoden....39
3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen....39
3.2.2 SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen (Fling und Gregerson, 1986)....39
3.2.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran (Towbin *et al*., 1979)....40
3.2.4 Immundetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz....40
3.2.5 Quantifizierung von Proteinen mittels ECL-Western-Blot....41
3.2.6 Immundetektion von Proteinen durch Fluoreszenz....42
3.2.7 Quantifizierung von Proteinen mittels Odyssey-Western-Blot....42
3.2.8 Entfernen der Antikörper von einer Nitrozellulosemembran....42
3.2.9 Präparation von P2-Fraktionen aus Mausgehirn....43
3.2.10 Präparation von Synaptosomen aus Mausgehirn....43

3.2.11 Präparation von PSD enthaltenen Fraktionen aus Mausgehirn 44
3.3 Immunfärbungen 45
3.3.1 Immunhistologie 45
3.3.2 Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen 46
3.3.3 Immunzytochemie 46
3.4 Zellkulturtechniken 47
3.4.1 Beschichtungen von Zellkulturgefäßen für kontinentale Kulturen 47
3.4.2 Auftauen und Kultivierung von HEK293FT-Zellen 47
3.4.3 Präparation von Astrozyten-Zellen 47
3.4.4 Präparation hippocampaler Ratten-Neuronen 48
3.4.5 Präparation hippocampaler Maus-Neuronen 49
3.4.6 Präparation cerebellärer Körnerzellen 50
3.4.7 Biotinylierung von membranständigen Proteinen in Zellkultur 50
3.4.8 Herstellung und Transfektion rekombinanter Lentiviren 51
3.5 Elektrophysiologie 52
3.5.1 *Patch-clamp*-Techniken 52
3.5.1.1 *Whole-cell patch-clamp*-Technik 53
3.5.1.2 *Perforated-patch-clamp*-Technik 54
3.5.1.3 Gepaarte *patch-clamp*-Technik 54
3.5.2 Messplatz für *patch-clamp*-Techniken und Analyse der Daten 55
4. ERGEBNISSE 57
4.1 Expressionsmuster der Proteine 4.1G und 4.1N im Zentralnervensystem der Maus 57
4.2 Strukturelle Analysen der Spleißvarianten von 4.1N 58
4.3 Expression von Protein 4.1N im *Hippocampus* 60
4.4 Synaptische Morphologie im *Hippocampus* 62
4.5 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die Lokalisation von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten im *Hippocampus* 64
4.5.1 AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in Synaptosomen 64
4.5.2 AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in hippocampalen PSDs 66
4.5.3 AMPA-Rezeptor-Untereinheiten an der Plasmamembran hippocampaler Neuronen 67

4.6 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die Phosphorylierung von GluR1 im *Hippocampus* 69
4.6.1 Anteil phosphorylierter GluR1 in hippocampalen PSDs 70
4.6.2 Anteil phosphorylierter GluR1 in hippocampalen Neuronen 71
4.7 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die synaptischen Transmission im *Hippocampus* 73
4.7.1 Messungen in hippocampalen Autapsen 73
4.7.2 Ermittlung der Zusammensetzung von AMPA-Rezeptoren in hippocampalen Autapsen mittels *perforated-patch-clamp*-Messungen 76
4.7.3 Ermittlung der Zusammensetzung von AMPA-Rezeptoren in hippocampalen Neuronen mit Hilfe gepaarter *patch-clamp*-Messungen 79
4.8 Untersuchungen auf Kompensation durch Protein 4.1B im *Hippocampus* 81
4.9 Expression von Protein 4.1N im *Cerebellum* 82
4.10 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die Lokalisation von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten im *Cerebellum* 84
4.10.1 AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in cerebellären PSDs 85
4.10.2 AMPA-Rezeptor-Untereinheiten an der Plasmamembran cerebellärer Körnerzellen 86
4.11 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die Phosphorylierung von GluR4 im *Cerebellum* 88
4.11.1 Expression der GluR4-Phosphomutanten in Neuronen 89
4.11.2 Lokalisation der GluR4- Phosphomutanten in cerebellären Körnerzellen 90
4.12 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die synaptische Transmission im *Cerebellum* 92
4.12.1 Ermittlung der Zusammensetzung von AMPA-Rezeptoren in cerebellären Körnerzellen mittels *perforated-patch-clamp*-Messungen 92
4.12.2 Ermittlung der Zusammensetzung von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in cerebellären Körnerzellen mit Hilfe gepaarter *patch-clamp*-Messungen 94
4.13 Untersuchung auf Kompensation durch Protein 4.1B im *Cerebellum* 95
5. DISKUSSION 97
5.1 Funktion der Proteine 4.1G und 4.1N bei der glutamatergen synaptischen Transmission 97

5.2 Charakterisierung der Restexpression von Protein 4.1N in den 4.1G/N-Doppelmutanten 99
5.3 Kompensation und Redundanz in 4.1G/N-Doppelmutanten 100
5.4 Einfluss der Proteine 4.1G und 4.1N auf die Ausbildung glutamaterger Synapsen im *Hippocampus* 101
5.5 Funktion der Proteine 4.1G und 4.1N bei der Lokalisation von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in glutamatergen Synapsen 102
5.6 Funktion der Proteine 4.1G und 4.1N bei der Phosphorylierung von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten 105
6. ZUSAMMENFASSUNG 109
7. LITERATURVERZEICHNIS 111
8. ANHANG 121
DANKSAGUNG 123
PUBLIKATIONEN 125
LEBENSLAUF 127

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND ANGLIZISMEN

Neben den gebräuchlichen SI-Einheiten wurden die aufgelisteten Abkürzungen verwendet:

A	Alanin
Abb.	Abbildung
AMBA	Acrylamid/Bis-Lösung
AMPA	α-Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoazol-propionat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BO	*Bulbus olfactorius* (Riechkolben)
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
CA	*Cornu ammonis* (Ammons Horn), neuroanatomisch definierte Region des Hippocampus
CaM	Calmodulin
CaMKII	*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*
Cb	*Cerebellum* (Kleinhirn)
CNIH	*cornichon homolog*
Co	*Colliculus*
Cpu	*Corpus striatum*
CTD	C-terminale Domäne
C-terminal	am COOH-Terminus eines Proteins gelegen
C-Terminus	COOH-Terminus eines Proteins
Cx	*Cortex* (Kortex, Hirnrinde)
D	Asparaginsäure
d.h.	das heißt
dest. H_2O	destilliertes Wasser

DIV	*day in vitro*
DKO	*double-knockout*, hier: 4.1G/N Doppelmutante
DMEM	*Dulbecco's modified eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxynukleosidtriphosphate
D-PBS	Dulbecco's PBS
E	Glutaminsäure
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxibis(ethylennitrilo)tetraessigsäure
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom *(current)*
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
et al.	*et alteres*
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FBS	*fetal bovine serum* (fötales Rinderserum)
FCS	*fetal calf serum* (fötales Kälberserum)
FERM	*four point one-ezrin-radixin-moesin*
g	Erdschwerebeschleunigung
GABA	γ-Aminobuttersäure
GD	*Gyrus dentatus*
GluR	Glutamat-Rezeptor
HBSS	*Hank's buffered salt solution*
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HEK	*human embryonic kidney*
Hi	*Hippocampus*
Hthal	*Hypothalamus*

IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
kb	Kilobasenpaare
KCC2	K/Cl-Cotransporter-2
kDa	Kilodalton
KO	*knockout*, Synonym für die Ausschaltung eines Gens in der Maus
Kunitz	Einheit Enzymaktivität DNaseI: 50 U entsprechen ca. 1 *Kunitz*
LB	*lysogeny broth*
LTD	*long-term depression*
LTP	*long-term potentiation*
M	Molarität
MAGUK	Membran-assoziierte Guanylat-Kinasen
mAK	monoklonaler Antikörper
mEPSC	*mini* EPSC
MeS	*Medulla spinalis* (Rückenmark)
$M_r \times 10^{-3}$	relatives Molekulargewicht in kDa
mRNS	*messenger* RNS
NBA	Neurobasal-A Medium
NMDA	n-Methyl-D-Aspartat
NT	Neurotransmitter
N-terminal	am NH_2-Terminus eines Proteins gelegen
N-Terminus	NH_2-Terminus eines Proteins
OD	optische Dichte
p.A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	*phosphate buffer,* Phosphatpuffer
PBS	*phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	*polymerase chain reaction*, Polymerase Kettenreaktion

pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+-Konzentration
PKA, PKC	Protein-Kinase A, Protein-Kinase C
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
ProSAP1	*Proline-rich synapse-associated protein-1*
PSD	*postsynaptic density,* postsynaptische Verdichtung
PSD-93/-95	*postsynaptic density - 93 kDa protein /-95 kDa protein*
Pvr	*vesicular release probability*
QX-314	Lidocain n-ethylbromid
RACE	*rapid amplification of cDNA ends*
RLM-RACE	*RNA ligase mediated* RACE
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute*
RRP	*ready releasable pool*
RT	reverse Transkription
s.	siehe
S	Serin
SABD	Spektrin-Aktin-Bindedomäne
SAP97	*synapse-associated protein of 97 kDa*
SDS	*sodium dodecylsulfate*, Natriumdodecylsulfat
shRNS	*small hairpin* RNS
STD	*short-term depression*
STP	*short-term plasticity*
T	Threonin
TARP	transmembranes, AMPA-Rezeptor regulierendes Protein
TB	*terrific broth*
TBS	*Tris buffered saline*
TC	*Truncus cerebri* (Hirnstamm)
TEA-Cl	Tetraethylammoniumchlorid

TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Thal	*Thalamus*
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
TX-100	Triton X-100
U	*unit,* (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
U/Min	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VGLUT1/2	*vesicular glutamate transporter 1/2*
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1 Das Gehirn

Unser Gehirn stellt ein präzises Netzwerk aus mehr als 100 Milliarden Nervenzellen (Neuronen) dar und ist somit das komplizierteste Organ im menschlichen Körper. Die einzelnen Neuronen sind zu komplexen Schaltkreisen verbunden, die unsere Sinneswahrnehmungen, Empfindungen, Bewegungen, Sprache und Gefühle steuern. Die Aktivitäten unseres Gehirns liefern damit die Grundlage für unser gesamtes Verhalten.

Das Gehirn kann in verschiedene spezialisierte Regionen mit spezifischen Funktionen unterteilt werden. Diese Vorstellung geht bis an das Ende des 18. Jahrhunderts zurück, als der deutsche Mediziner Franz Josef Gall einzelnen Gehirnregionen mentale Funktionen wie Hoffnung und Mitgefühl zuordnete. Trotz dieser willkürlichen und falschen Zuordnung konnte im Laufe der Zeit eine funktionelle Differenzierung des Gehirns bestätigt werden und die funktionellen Bereiche wurden immer genauer bestimmt. Während der *Hippocampus* zum Beispiel für die Speicherung von Informationen, also für das Gedächtnis wichtig ist, spielt das *Cerebellum* eine wichtige Rolle für die Koordination und Feinabstimmung von Bewegungen. Bei bestimmten Prozessen sind jedoch nicht nur einzelne Gehirnregionen aktiv, sondern verschiedene funktionelle Bereiche arbeiten zusammen. So fließen im *Hippocampus* Informationen verschiedener sensorischer Systeme zusammen und Erinnerungen werden dort erzeugt. Die Informationen werden dann an den *Cortex* weitergeleitet und dort gespeichert.

Die Aktivitäten des Gehirns gehen auf die Funktionen der Neuronen zurück, welche die grundlegenden Einheiten des Gehirns darstellen. Um die Arbeit der Neuronen in ihrer komplexen Verschaltung verstehen zu können, müssen zunächst der Aufbau und die Funktionsweise der einzelnen Neuronen betrachtet werden.

1.2 Aufbau und Verschaltung von Neuronen

Die ersten Erkenntnisse über die Zytoarchitektur und den Zusammenschluss von Neuronen gehen auf die Studien von Camillo Golgi und Ramón y Cajal Ende des 19. Jahrhunderts

zurück. Der italienische Mediziner Camillo Golgi entwickelte die Methode der bis heute angewandten Golgi-Färbung, bei der durch das Einwirken einer Silberchromat-Lösung auf Gehirngewebe einzelne Neuronen gefärbt werden und somit der Aufbau dieser Neuronen untersucht werden kann. Ein Neuron besteht aus einem Zellkörper (Soma), der im Gegensatz zu anderen Zelltypen mehrere Fortsätze ausbildet, die Neurite genannt werden. Diese lassen sich typischerweise noch einmal in mehrere, kurze Dendriten und ein langes Axon unterscheiden. Der spanische Mediziner Ramón y Cajal erforschte mit Hilfe der Golgi-Färbung das komplexe Netzwerk aus Neuronen. Nach seinen Erkenntnissen besteht dieses Netzwerk nicht, wie bis dahin vermutet, aus einem Neuronen-Kontinuum, sondern die Neuronen stellen einzelne Bausteine des Netzwerkes dar, die über Kontaktstellen miteinander kommunizieren (Neuronendoktrin).

Neuronen nehmen Veränderungen in unserer Umwelt wahr, leiten die entsprechenden Informationen an andere Neuronen weiter und lösen körperliche Reaktionen aus. Die Informationen innerhalb eines Neurons werden in Form elektrischer Signale durch Aktionspotentiale weitergeleitet, wobei das Axon das Ausgangssignal des Neurons übermittelt und die Dendriten wie Antennen wirken, die hereinkommende Signale anderer Neuronen aufnehmen, innerhalb des Neurons weiterleiten und prozessieren. Die Informationsübertragung von einem Neuron auf ein anderes Neuron erfolgt an spezialisierten Kontaktstellen, den so genannten Synapsen. Der Vorgang der Informationsübertragung an diesen Synapsen wird als synaptische Übertragung oder synaptische Transmission bezeichnet und kann durch ein elektrisches oder chemisches Signal erfolgen.

1.3 Grundlagen der synaptischen Transmission

Eine Synapse ist eine Verbindung, über die ein Neuron mit einem anderen Neuron oder auch einem anderen Zelltyp wie einer Muskelzelle oder Drüsenzelle kommuniziert, wobei die interneuronale Informationsübertragung durch ein elektrisches oder ein chemisches Signal erfolgen kann. Aufgrund ihrer Struktur und Funktion lassen sich zwei Synapsen-Gruppen unterscheiden.

1.3.1 Elektrische Synapsen

In elektrischen Synapsen erfolgt die Kommunikation über so genannte *gap junctions* und ist in beide Richtungen möglich. Die Informationsübertragung eines elektrischen Signals erfolgt dabei in Form eines Ionen-Stroms von einem Neuron zum nächsten. An der Kontaktstelle werden die Membranen der beiden Neuronen durch einen *gap-junction*-Kanal verbunden, der aus zwei Connexonen besteht. Connexone sind Kanäle, die aus jeweils sechs als Connexine bezeichneten Proteinen aufgebaut sind. Elektrische Synapsen sind im Gehirn von Säugern weit verbreitet, vor allem während der Embryogenese (Connors und Long, 2004; Sloper und Powell, 1978).

1.3.2 Chemische Synapsen

Im Zentralnervensystem erfolgt die Informationsweitergabe überwiegend an chemischen Synapsen, in denen das elektrische Signal in ein chemisches Signal übersetzt wird. Der sendende Teil einer chemischen Synapse besteht aus einem dem Axon entspringenden präsynaptischen Endknöpfchen, in dem je nach Synapsentyp bestimmte Neurotransmitter in synaptischen Vesikeln gelagert werden. Nach Depolarisation der Präsynapse durch ein ankommendes Aktionspotential werden spannungsabhängige Kalzium-Kanäle geöffnet. Der Einstrom von Kalzium-Ionen liefert das Signal zur Freisetzung der Neurotransmitter, die durch Exozytose der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran in der so genannten aktiven Zone erfolgt (Couteaux und Pécot-Dechavassine, 1970; del Castillo und Stark, 1952; Fatt und Katz, 1952; Katz und Miledi, 1967). Die Neurotransmitter diffundieren durch den synaptischen Spalt zum empfangenden Teil der Synapse, der als Postsynapse bezeichnet wird. Der synaptische Spalt ist durch eine Matrix aus Adhäsions-Proteinen gefüllt, die für eine Verbindung zwischen den prä- und postsynaptischen Membranen sorgen. An der Postsynapse befindet sich eine proteinreiche Region, in der auch die verschiedenen Rezeptor-Proteine für die Neurotransmitter lokalisiert sind. Sie wird als postsynaptische Verdichtung (oder kurz PSD für engl. *postsynaptic density*) bezeichnet. Die Neurotransmitter-Rezeptoren lassen sich in ionotrope Rezeptoren (transmitterabhängige Ionenkanäle) und metabotrope Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) unterteilen. Transmitterabhängige Ionenkanäle erfahren durch die Bindung der entsprechenden Neurotransmitter eine Konformationsänderung und werden dadurch für

bestimmte Ionen permeabel. Der darauf folgende Ionen-Einstrom führt zu einer Depolarisation in exzitatorischen (erregenden) Synapsen und somit zu einem exzitatorischen postsynaptischen Potential (kurz EPSP) oder zu einer Hyperpolarisation in inhibitorischen (hemmenden) Synapsen und somit zu einem inhibitorischen postsynaptischen Potential (kurz IPSP).

1.3.3 Autaptische Kulturen als einfaches Analysesystem synaptischer Transmission

Mit Hilfe verschiedener elektrophysiologischer Methoden kann die Transmission an chemischen Synapsen untersucht werden. Ein einfaches Modell zur Analyse dieser synaptischen Transmission sind Kulturen autaptischer Neuronen aus der jeweils zu untersuchenden Gehirnregion. Mit Hilfe dieser Kulturen kann die synaptische Transmission auf der Ebene einer einzelnen Zelle untersucht werden (Bekkers und Stevens, 1991). Das System autaptischer Kulturen besteht aus einem einzelnen Neuron, das auf einer zuvor kultivierten Astrozyten-Insel wächst. So entwickelt es sich getrennt von anderen Neuronen und bildet aufgrund dieser Isolation Synapsen auf eigene Dendriten aus, die Autapsen genannt werden. Die autaptische Transmission bietet den enormen Vorteil, dass mit einer einzigen Messelektrode das Neuron sowohl stimuliert werden kann, als auch die gleichzeitige Messung der Antwort über die Autapsen möglich ist. Autaptische Antworten werden im einfachsten Fall durch eine kurze Depolarisation hervorgerufen, die ein Aktionspotential auslöst. Das führt zur Freisetzung der Neurotransmitter aus dem präsynaptischen Endknöpfchen, die an der postsynaptischen Seite an die entsprechenden Rezeptor-Proteine binden und dort wiederum einen postsynaptischen Strom auslösen (EPSP oder IPSP). Es können aber auch andere Stimuli gegeben werden, wie z.B. die direkte Applikation von Rezeptor-Agonisten, die ebenfalls zu einem postsynaptischen Potential führen. Anhand eines autaptischen Neurons können somit an einer einzelnen Zelle die verschiedenen Eigenschaften der Transmission untersucht werden.

1.4 Die durch AMPA-Rezeptoren vermittelte Transmission

Die verschiedenen Neuronen des Gehirns setzen unterschiedliche Neurotransmitter frei, die in drei chemische Klassen unterteilt werden können: Aminosäuren, Amine und Peptide.

Das Amin Acetylcholin zum Beispiel vermittelt die schnelle synaptische Transmission an der neuromuskulären Endplatte, also von einem Neuron zu einer Muskelzelle. Die schnelle synaptische Transmission zwischen einzelnen Neuronen des Zentralnervensystems erfolgt an den meisten Synapsen durch die Aminosäuren Glutamat, γ-Aminobuttersäure (GABA) und Glycin. Während GABA und Glycin Neurotransmitter in hemmenden Synapsen sind, wird in dem Großteil der erregenden Synapsen die synaptische Transmission durch den Neurotransmitter Glutamat vermittelt.

Zu den ionotropen, glutamatabhängigen Rezeptoren gehören die AMPA-Rezeptoren (für α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazolpropionat), NMDA-Rezeptoren (für N-Methyl-D-Aspartat) und Kainat-Rezeptoren, die nach ihren Agonisten und ihren physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften benannt sind (Hollmann und Heinemann, 1994). Die schnelle exzitatorische Transmission im Gehirn wird überwiegend durch die AMPA-Rezeptoren vermittelt, die in der PSD stark angereichert sind (Dingledine *et al*., 1999). AMPA-Rezeptoren sind hetero-oligomere Proteine, die aus den Untereinheiten GluR1 bis GluR4 (oder GluRA bis GluRD) aufgebaut sind (Hollmann und Heinemann, 1994; Wisden und Seeburg, 1993), wobei jeder Rezeptor aus 4 Untereinheiten besteht (Rosenmund *et al*., 1998).

Für die Funktion des Gehirns ist neben der synaptischen Verknüpfung von Neuronen auch die synaptische Plastizität von entscheidender Bedeutung. Als Plastizität wird die Eigenschaft von Synapsen bezeichnet, entsprechend ihrer Aktivierung die Effizienz zu verändern. Eine solche Veränderung kann in der präsynaptischen Seite durch die Freisetzung von Neurotransmittern reguliert werden oder postsynaptisch durch eine Veränderung der Anzahl, Typen oder Eigenschaften von Neurotransmitter-Rezeptoren. Diese Vorgänge sind im *Hippocampus* an Lernvorgängen und der Ausbildung des Gedächtnis beteiligt (Abbott und Nelson, 2000), wobei die Regulation von AMPA-Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielt. Ein bekanntes Modell dieser aktivitätsabhängigen, synaptischen Plastizität ist die so genannte Langzeit-Potenzierung (kurz LTP für engl. *long-term potentiation*). Dabei werden durch Hochfrequenz-Stimulationen AMPA-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren aktiviert, was anschließend zu einer Veränderung der Anzahl von AMPA-Rezeptoren in der Synapse führt (Barry und Ziff, 2002; Bredt und Nicoll, 2003; Collingridge *et al*., 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass AMPA-Rezeptoren ebenfalls abhängig von ihrer Aktivierung während der Vorgänge des Lernens und der Gedächtnisbildung phosphoryliert

werden. Im *Hippocampus* spielt dabei die Phosphorylierung der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR1 eine wichtige Rolle (Whitlock *et al*., 2006). In Mausmutanten mit Defiziten in der Phosphorylierung von GluR1 an einer spezifischen Phosphorylierungs-Stelle konnten Beeinträchtigungen in der hippocampalen Plastizität sowie beim Lernen und der Speicherung von Gedächtnisinhalten nachgewiesen werden (Lee *et al*., 2003). Die Phosphorylierung der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten stellt außerdem ein entscheidendes Kriterium für den Transport in die Postsynapse sowie den Aufbau des AMPA-Rezeptors aus seinen Untereinheiten dar (Derkach *et al*., 2007).

1.5 Das Proteingerüst in der PSD

Der Transport von Neurotransmitter-Rezeptoren in die PSD hinein und auch aus der Synapse hinaus gehört zu den Hauptmechanismen der Bereitstellung einer definierten Anzahl funktioneller Rezeptoren in der Synapse, die der Übertragungsstärke des Signals entspricht. Diese Rezeptordichte an der postsynaptischen Membran wird u.a. durch die laterale Diffusion der Rezeptor-Proteine entlang der postsynaptischen Membran reguliert (Malinow und Malenka, 2002). Für den Transport und die Verankerung transmembraner Proteine wie der Rezeptor-Proteine ist ein Netzwerk aus Proteinen des Zytoskeletts, Adhäsions-Proteinen und anderen stabilisierenden Proteinen (Gerüstproteinen) notwendig, das in der PSD ein weit reichendes Proteingerüst ausbildet. Es konnte bereits eine Vielfalt an Proteinen identifiziert werden, die für die Regulation verschiedener Rezeptor-Proteine in der PSD wichtig sind (Kim und Huganir, 1999; Sheng und Kim, 1996) und zu den Mitgliedern dieses Proteingerüsts in der PSD gezählt werden. Die Rezeptor-Proteine sind also durch Interaktionen mit entsprechenden Proteinen an dieses Proteingerüst gebunden (Chen *et al*., 2008; Kennedy, 1993).

Die Hauptaufgabe des Proteingerüsts liegt in der schnellstmöglichen Übersetzung des chemischen Signals der Neurotransmitter in ein postsynaptisches Potential (EPSP oder IPSP), weshalb alle Komponenten dieses Gerüsts auch eng miteinander verknüpft sein müssen. Für eine schnelle Signalweiterleitung spielt zum einen der Transport der Rezeptor-Proteine in die PSD eine wichtige Rolle, so dass bei einer Freisetzung der Neurotransmitter die entsprechenden Rezeptor-Proteine an der postsynaptischen Membran aktiviert werden können. Zum anderen ist die Lokalisation der Rezeptor-Proteine entscheidend. Um den Weg der Neurotransmitter durch den synaptischen Spalt so kurz wie möglich zu halten,

müssen die entsprechenden Rezeptor-Proteine direkt gegenüber der Transmitter-freisetzenden Region lokalisiert sein. Durch die Verknüpfung der Rezeptor-Proteine mit dem Proteingerüst der PSD können die Integration der Rezeptoren in die PSD, die Lokalisation und auch die Zusammensetzung der Rezeptor-Proteine aus den Untereinheiten reguliert werden (Cull-Candy *et al*., 2001; Greger *et al*., 2007; Lüscher und Keller, 2004).

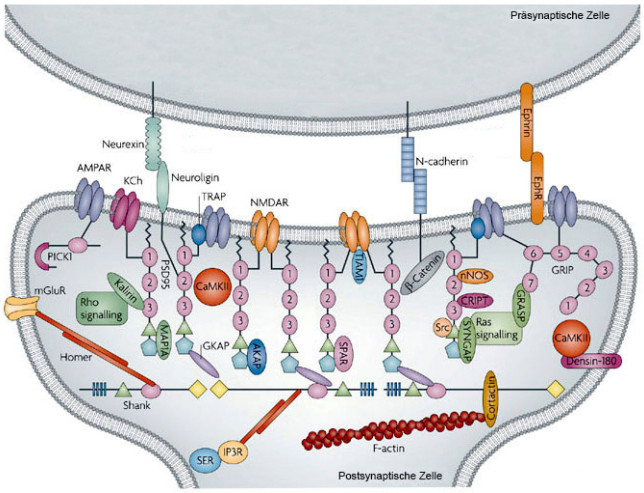

Abbildung 1: Modell des Proteingerüsts in der PSD. Die PSD beinhaltet Rezeptor-Proteine, Ionenkanäle sowie ein weitreichendes Proteingerüst. Dieses besteht aus vielen verschiedenen Gerüstproteinen, Adhäsions-Proteinen und Proteinen des Zytoskeletts, die zu einem engen Netzwerk verknüpft sind, um eine schnelle Signalweiterleitung zu gewährleisten. AKAP, *adenylate-kinase anchoring protein*; AMPAR, α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazolpropionat-Rezeptor; CaMKII, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*; CRIPT, *cysteine-rich PDZ-binding protein*; EphR, *ephrin receptor*; GKAP, *guanylate kinase-associated protein*; GRASP, *GRIP-associated protein*; GRIP, *glutamate receptor interacting protein*; IP3R, *inositol-1,4,5-trisphosphate receptor*; KCh, K^+ *channel*; MAP1A, *microtubule-associated protein 1A*; mGluR, *metabotropic glutamate receptor*; NMDAR, N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor; nNOS, *neuronal nitric oxide synthase*; PICK1, *protein interacting with PRKCA1*; SER, *smooth endoplasmic reticulum*; SPAR, *spine-associated RAPGAP*; SYNGAP, *synaptic Ras GTPase-activating protein*; TIAM1, *T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*; TRAP, *C-terminal receptor-binding region*. Abb. modifiziert nach Feng und Zhang (2009).

Die AMPA-Rezeptoren werden durch Interaktionen mit spezifischen Proteinen des Proteingerüsts und des Zytoskeletts in der PSD exzitatorischer Synapsen lokalisiert (Braithwaite *et al*., 2000; Scannevin und Huganir, 2000). Zu diesen Proteinen gehören die transmembranen AMPA-Rezeptor regulierenden Proteine (kurz TARPs), die ATPase N-Ethylmaleimide-sensitiver Faktor (kurz NSF), Mitglieder der Membran-assoziierten

Guanylat-Kinasen (kurz MAGUKs) sowie weitere Proteine, die eine PDZ-Domäne enthalten, wie das Glutamat-Rezeptor interagierende Protein (kurz GRIP) oder das Protein-Kinase C alpha-bindende Protein (kurz PICK1). Stargazin und γ-8 sind Mitglieder der TARP-Proteinfamilie, die für die Lokalisation der AMPA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran wichtig und somit für die postsynaptische Signalweiterleitung essentiell sind (Nicoll *et al*., 2006). Das zeigt sich in Stargazin-defizienten Mausmutanten, in denen AMPA-Rezeptoren in cerebellären Körnerzellen nicht mehr synaptisch lokalisiert werden (Chen *et al*., 2000), sowie in γ-8-*knockout*-Mäusen, die Defizite in der hippocampalen synaptischen Transmission und Plastizität aufweisen (Rouach *et al*., 2005). Gleiches gilt für PSD95, ein Mitglied der MAGUK-Proteinfamilie, das durch Überexpression die AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission erhöht (Beique und Andrade, 2003; Ehrlich und Malinow, 2004; Schnell *et al*., 2002). In PSD93/PSD95-*double-knockout*-Mäusen hingegen ist die schnelle exzitatorische Transmission stark beeinträchtigt (Elias *et al*., 2006). CNIH-2 und CNIH-3 sind Mitglieder der Cornichon-Proteinfamilie und interagieren ebenfalls mit AMPA-Rezeptor-Untereinheiten. In CNIH-2 und CNIH-3 überexprimierenden Zellen kann eine bis zu zehnfach erhöhte Expression von AMPA-Rezeptoren an der Plasmamembran festgestellt werden (Schwenk *et al*., 2009). Auch GRIP, NSF und PICK1 interagieren durch die Bindung an GluR2 mit AMPA-Rezeptoren (Kim *et al*., 2001; Lüthi *et al*., 1999; Setou *et al*., 2002).

Einige Mitglieder der 4.1-Proteinfamilie interagieren mit den AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 und könnten ebenfalls für den Transport und die Lokalisation von AMPA-Rezeptoren in die PSD exzitatorischer Synapsen von Bedeutung sein (Coleman *et al*., 2003; Shen *et al*., 2000).

1.6 Die 4.1-Proteinfamilie

Die Mitglieder der 4.1-Proteinfamilie sind ebenfalls Komponenten des Proteingerüsts in der PSD, die sowohl an Membranproteine als auch an Proteine des Zytoskeletts binden und dadurch den Transport und die Lokalisation funktioneller Rezeptoren regulieren könnten (Choquet und Triller, 2003). Alle Mitglieder der 4.1-Proteinfamilie sind durch eine N-terminale Membran-Bindedomäne charakterisiert, die so genannte FERM-Domäne (für engl. *four-point-one*, und die Mitglieder der 4.1-Proteinfamilie Ezrin, Radixin, Moesin),

sowie in vielen Fällen durch eine Spektrin-Aktin-Bindedomäne [kurz SABD (Hoover und Bryant, 2000)].

Der Name der Proteinfamilie leitet sich von der Position des Prototyps Protein 4.1R (für engl. *red blood cell*) auf einem SDS-Gel nach einer elektrophoretischen Trennung ab (Holzwarth *et al*., 1976). Protein 4.1R wurde ursprünglich als ein in humanen Erythozyten angereichertes Protein identifiziert, das die Form dieser Zellen stabilisiert, indem es die transmembranen Proteine Glycophorin C und p55 mit dem Zytoskelettprotein Spektrin verbindet (Marfatia *et al*., 1995). Eine im Menschen bekannte Funktionsstörung der roten Blutkörperchen ist die Erbkrankheit Hereditäre Elliptozytose, die u.a. durch Mutationen des 4.1R-Gens hervorgerufen wird und sich in deformierten Erythrozyten äußert (Gallagher *et al*., 2003). Homozygote Mäuse mit einer 4.1R-*knockout*-Mutation zeigen eine Elliptozytose-ähnliche Symptomatik sowie Störungen in Bewegung, Koordination, Gleichgewicht und Lernfähigkeit (Hoover und Bryant, 2000).

Invertebraten besitzen lediglich ein 4.1-Gen, z.B. *coracle* in *Drosophila*. Homozygote Mutationen dieses Gens führen zu einem embryonal letalen Phänotyp und heterozygote Mutationen zu Defekten im Dorsalschluss während der Embryogenese (Fehon *et al*., 1994). Neben Protein 4.1R besteht die 4.1-Proteinfamilie in Vertebraten des Weiteren aus Protein 4.1G [für engl. *general* (Parra *et al*., 1998)], Protein 4.1N [für engl. *neuronal* (Walensky *et al*., 1999; Yamakawa *et al*., 1999)] und Protein 4.1B [für engl. *brain* (Parra *et al*., 2000; Yamakawa und Ohara, 2000)]. Jedes der 4.1-Proteine weist ein typisches Expressionsprofil auf, wird in mehreren Spleißvarianten exprimiert und jeweils von einem Gen codiert (Parra *et al*., 2000; Peters *et al*., 1998). Alle vier Proteine haben eine hoch konservierte Domänen-Struktur, die neben den bereits genannten FERM- und Spektrin-Aktin-Bindedomänen auch durch eine C-terminale Domäne (CTD) charakterisiert wird, die an verschiedene transmembrane Proteine bindet. Des Weiteren besitzen die 4.1-Proteine drei einzigartige Domänen U1, U2 und U3 (für engl. *unique*), die für die funktionellen Unterschiede zwischen den 4.1-Proteinen verantwortlich sein könnten (Sun *et al*., 2002).

Die Mitglieder der 4.1-Proteinfamilie können mit Hilfe ihrer verschiedenen Domänen strukturell sehr verschiedene Interaktionspartner binden. Diese Fähigkeit ermöglicht ihnen die Teilnahme in vielen verschiedenen Prozessen in einer Vielzahl von Zelltypen und Geweben.

1.7 Die Proteine 4.1G und 4.1N und ihre Interaktion mit AMPA-Rezeptoren

Protein 4.1G ist mit einer Homologie von 70 % in der FERM-Domäne, 68 % in der SABD und 64 % in der CTD dem Protein 4.1R am ähnlichsten. Es besteht aus 1005 Aminosäuren und zeigt eine weitreichende Expression in der Maus, da es in vielen verschiedenen Geweben vorhanden ist. Im Gehirn wird Protein 4.1G sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Zellen exprimiert (Ohno *et al*., 2005)

Protein 4.1N ist ein in Neuronen angereichertes Homolog der 4.1-Proteine. Das Protein besteht aus 881 Aminosäuren und zeigt zu Protein 4.1R eine Homologie von 70 % in der FERM-Domäne, 36 % in der SABD und 46 % in der CTD. Durch die auffallend geringe Homologie von Protein 4.1N in der SABD zu anderen 4.1-Proteinen könnte Protein 4.1N mit verschiedenen neuronalen Homologen von Spektrin und Aktin interagieren. Protein 4.1N wird in fast allen zentralen und peripheren Neuronen der Maus exprimiert und ist dort sowohl im Zellkörper als auch in den Dendriten und Axonen vorhanden. In nicht-neuronalen Zellen wird Protein 4.1N am stärksten in der Niere exprimiert (Ramez *et al*., 2003; Walensky *et al*., 1999).

Die synaptische Lokalisation, Dichte und Verankerung von Neurotransmitter-Rezeptoren sind für die Ausbildung von Synapsen und die Signalweiterleitung essentiell (Shen *et al*., 2000). Dabei scheint das Proteingerüst in der PSD eine grundlegende Rolle zu spielen (Kim und Lisman, 1999). Die Proteine 4.1G und 4.1N sind in PSDs angereichert (Scott *et al*., 2001; Trinidad *et al*., 2008) und können aufgrund ihrer Domänen-Struktur und ihrer Interaktionspartner zu den Gerüstproteinen der PSD gezählt werden. Interaktionen der CTD von Protein 4.1G und 4.1N konnten u.a. mit den AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 nachgewiesen werden (Cai *et al*., 2002; Coleman *et al*., 2003; Rumbaugh *et al*., 2003). In *Drosophila* bindet das 4.1-Homolog *coracle* ebenfalls an die AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluRIIA (Chen *et al*., 2005). Die Bindung der Proteine 4.1G und 4.1N reguliert deshalb vermutlich den Transport und die Lokalisation von GluR1 und GluR4 an der postsynaptischen Plasmamembran (Coleman *et al*., 2003; Shen *et al*., 2000). Diese Vermutungen basieren jedoch bis heute auf den nachgewiesenen Interaktionen und Kolokalisationen in postsynaptischen Bereichen von Neuronen. Die konkreten Aufgaben der Proteine 4.1G und 4.1N sowie der anderen 4.1-Proteine als Mitglieder des Proteingerüsts in der PSD sind noch ungeklärt.

1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die schnelle synaptische Transmission in exzitatorischen Synapsen wird im Gehirn von Vertebraten überwiegend durch AMPA-Rezeptoren vermittelt. Der Transport in die PSD und die synaptische Lokalisation der AMPA-Rezeptoren sind dabei entscheidende Kriterien für eine schnelle Signalweiterleitung und werden durch Interaktionen mit dem Proteingerüst in der PSD reguliert. Die Proteine 4.1G und 4.1N können zu den Mitgliedern dieses weit verzweigten und eng geknüpften Proteingerüsts gezählt werden. Sie binden mittels ihrer FERM-Domäne an verschiedene transmembrane und Membran-assoziierte Proteine und verbinden diese durch ihre Spektrin-Aktin-Bindedomäne mit Proteinen des Zytoskeletts. Interaktionen ihrer C-terminalen Domäne konnten mit den AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 nachgewiesen werden, weshalb die Proteine 4.1G und 4.1N vermutlich den Transport und die Lokalisation von AMPA-Rezeptoren in der PSD regulieren (Cai *et al*., 2002; Coleman *et al*., 2003; Rumbaugh *et al*., 2003).

Wie genau die Proteine 4.1G und 4.1N eine solche Regulation vermitteln könnten und welche Bedeutung sie für den Aufbau und die Funktion glutamaterger Synapsen exakt haben, konnte jedoch noch nicht gezeigt werden. Für andere Interaktionspartner hingegen, wie für Stargazin, γ-8, PSD93 und PSD95, konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie durch die Bindung an AMPA-Rezeptoren wichtig sowohl für den Aufbau als auch für die Funktion glutamaterger Synapsen sind (Chen *et al*., 2000; Elias *et al*., 2006; Rouach *et al*., 2005). In der hier zusammengefassten Arbeit sollte deshalb überprüft werden, welche Rolle die Proteine 4.1G und 4.1N bei der synaptischen Lokalisation von GluR1 und GluR4 in glutamatergen Synapsen ausüben und inwiefern sie dadurch für den Aufbau glutamaterger Synapsen von Bedeutung sind. Des Weiteren sollte der Einfluss dieser Proteine für die Funktion der hippocampalen und cerebellären synaptischen Transmission ermittelt werden. Dazu wurden Mausmutanten verwendet, in denen die Proteine 4.1G und 4.1N mutiert sind (Wozny *et al*., 2009). Der Aufbau und die Funktion glutamaterger Synapsen im *Hippocampus* und *Cerebellum* dieser 4.1G/N-Doppelmutanten sollte dann mit Wildtypen aus der gleichen Linie als Kontrolle verglichen werden.

2. MATERIAL

2.1 Geräte

Axon 700B Verstärker	Axon Instruments
Elektroporationsgerät	Bio-Rad Laboratories GmbH
Entwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert GmbH
Elektrotankblotter TE 22 Transphor	Amersham Biosciences
Elektrophoresesystem für Agarosegele	GIBCO Invitrogen Corporation
Elektrophoresesystem für SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories GmbH
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX61	Olympus Optical CO., (Europa) GmbH
Flüssigkulturenschüttler	New Brunswick Scientific GmbH
Gefrierschränke	Liebherr, Heraeus über Thermo Electron
Heizblöcke	Techne GmbH
Homogenisatoren	B. Braun Biotech International GmbH
Inkubatoren	Adolf Kühne AH, Heraeus GmbH
Konvokales Mikroskop	Leica GmbH
Kryostat	Jung CM 3000, Leica
Kühlschränke	Liebherr
Odyssey Imaging System	Li-Cor Biosciences
Olympus IX51 Mikroskop	Olympus Optical CO., (Europa) GmbH
P-97 Puller	Sutter Instruments
PCR-Maschine PTC 225	MJ Research, Bio-Rad Laboratories GmbH
pH-Meter	Schütt GmbH
Pipetten	Gilson
Pipettierhilfen	Drummond Scientific Company
Schüttler für 1,5mL Reaktionsgefäße	Eppendorf GmbH
Spannungsquelle EPS 301	Amersham Biosciences
Spektralphotometer	Beckmann Instruments GmbH, Amersham Biosciences
Sterilbank	Heraeus über Thermo Electron
Ultraschallbad DK 102	Bandelin

Ultra Turrax T8	IKA Labortechnik
Videoanlage für Gele	Intas GmbH
Vortex Genie 2	Bender & Hobein GmbH
Wasserbäder	Schütt GmbH
Zentrifugen	Beckmann Instruments GmbH, Eppendorf-Netheler Hinz GmbH, Heraeus über Thermo Electron, Sorvall über Thermo Electron

2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in p.A. Qualität bezogen.

Agarose	Invitrogen GmbH
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	Bio-Rad Laboratories GmbH
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich GmbH
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH
Aprotinin	Roche Holding GmbH
ATP / GTP	Sigma-Aldrich GmbH
Bacto-Agar	Becton Dickinson
Bacto-Hefeextrakt	Becton Dickinson
Bacto-Pepton	Becton Dickinson
Bacto-Trypton	Becton Dickinson
BCA Reagenzien	Pierce Biotechnology
Bradford Reagenzien	Bio-Rad Laboratories GmbH
BSA	Pierce Biotechnology
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH
DNS-Längenstandard 1kb *ladder*	Invitrogen GmbH
DNS-Probenpuffer (6 x)	Fermentas GmbH
DNaseI	Roche Holding GmbH
dNTP-Lösungen	Bioline GmbH
ECL-Reagenzien	Amersham Biosciences
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH

EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Scientific
Fast Link Ligase	Biozym Diagnostik GmbH
Ficoll 400	Amersham Biosciences
Fluoromount-G	Southern Biotechnology Associates
GABA	Sigma-Aldrich GmbH
Glycin	Bio-Rad Laboratories GmbH
Hepes	Sigma-Aldrich GmbH
Herculase II Fusion DNA Polymerase	Stratagene über Agilent Technologies
Isoba (Wirkstoff Isofluran)	Essex Tierarznei
Kainat	BioTrend
Leupeptin	Roche Holding GmbH
Lipofectamine 2000	Invitrogen GmbH
Magermilchpulver	FREMA, DE-VAU-GE Gesundkosmetik
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH
MITO+ Serum Extender	Becton Dickinson Labware
Molekulargewichtsstandards für Proteine	Fermentas GmbH
Mowiol	EMD Biosciences
NeutrAvidin Agarose	Thermo Scientific
Nystatin	Sigma-Aldrich GmbH
Odyssey Blocking Buffer	Li-Cor Biosciences
Paraformaldehyd	Serva, Boehringer Ingelheim
Pfu Polymerase	Stratagene über Agilent Technologies
PMSF	Sigma-Aldrich GmbH
Ponceau S	Sigma-Aldrich GmbH
QX-314	Sigma-Aldrich GmbH
Red Taq Polymerase	Sigma-Aldrich GmbH
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Saccharose	Sigma-Aldrich GmbH
Shrimp Alkalische Phosphatase	Roche Holding GmbH
SDS	Boehringer Mannheim GmbH
SOC-Medium	Invitrogen GmbH
Super Script III Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH
T4 DNA Ligase	Invitrogen GmbH

TAE-Cl	Sigma-Aldrich GmbH
TEMED	Bio-Rad Laboratories GmbH
TempliPhi-Reagenzien	Amersham Biosciences
Tissue Freezing Medium	Jung
Triton X-100	Roche Holding GmbH
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH
Trypsin-Inhibitor	Roche Holding GmbH
TTX	Tocris
Ziegenserum	Life-Technologies Gibco-BRL GmbH

2.3 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra Filter Einheiten (100K)	Millipore
Cell Strainer (40 µm Nylon)	Falcon
Deckgläser	Menzel Gläser
ECL-Filme	Amersham-Buchler GmbH & Co.
Elektroporationsküvetten, 0,1cm	Bio-Rad Laboratories GmbH
Glaskapillaren GB150F-8P	Science Products GmbH
Millex GP Filter Einheiten	Millipore
Nitrozellulose Protran, 0,2µm	Schleicher & Schuell
Objektträger Superfrost Plus	Menzel Gläser
PCR-Platten	Abgene House
Plastikwaren	Greiner, Falcon, Brandt
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler Hinz GmbH
Röntgenfilme	Kodak
Whatman 3MM	Whatman International Ltd.
Zellkulturgefäße	Greiner, Nunc

2.4 Kits

FirstChoice RLM-RACE	Applied Biosystems / Ambion
MSB Spin PCRapace	Invitek

nexttec Genomic DNA Isolation Kit for Tissue and Cells	Nexttec
nexttec Plasmid DNA Isolation Kit for Bacteria (E. coli)	Nexttec
PureLink HiPure Plasmid Filter Purification Kit	Invitrogen GmbH
PureLink Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen GmbH
PureLink Quick Plasmid Miniprep	Invitrogen GmbH
QuickChange (XL / Multi) Site-Directed Mutagenesis Kits	Stratagene über Agilent Technologies
RNeasy Lipid Tissue Kit	Qiagen GmbH

2.5 Medien und Lösungen

Zur Herstellung der angegebenen Medien und Lösungen wurde doppelt destilliertes H_2O verwendet.

2.5.1 Medien und Lösungen für die Kultur von *E. coli* Stämmen

1000 x Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml

400 x Kanamycin-Stammlösung: 10 mg/ml

LB-Medium:
10 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt in 1 l H_2O lösen, 100 µl 10 N NaOH zugeben und autoklavieren, für LB-Platten 15 g Bacto-Agar pro 1 l LB-Medium zugegeben.
Die Herstellung des LB-Mediums wurde freundlicherweise abteilungsintern von Frau A. Galinski und Herrn B. Hesse-Nießen durchgeführt. Entsprechende LB-Platten wurden von Frau S. Wenger und Frau M. Thevenoud bereit gestellt.

TB-Medium:

60 g Bacto-Trypton, 120 g Bacto-Hefeextrakt und 20 ml 100 % Glycerin in 4,5 l H_2O lösen, je 900 ml TB-Medium vor Gebrauch 100 ml autoklavierten 1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 (1 M KH_2PO_4 pH 4,3 + 1 M K_2HPO_4 pH 9,5) zugeben

2.5.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Alle Medien und Lösungen für die Zellkultur wurden von der Firma GIBCO Invitrogen Corporation GmbH bezogen.

Neurobasal-A Medium (NBA für hippocampale Neuronen):

100 ml Neurobasal-A, 2 ml B27-Supplement, 1 ml Glutamax I-Supplement, 0,5 ml 500 x Penicillin/Streptomycin

Neurobasal-A Medium (NBA für cerebelläre Körnerzellen):

100 ml Neurobasal-A, 2 ml B27-Supplement, 1 ml Glutamax I-Supplement, 0,5 ml 500 x Penicillin/Streptomycin, 5 mM KCl

FBS-Medium (für Astrozyten):

450 ml DMEM, 50 ml FBS, 500 µl *MITO+ Serum Extender* (1 Ampulle/5 ml DMEM), 2,5 ml 500 x Penicillin/Streptomycin

Medium für HEK293FT-Zellen:

450 ml DMEM, 50 ml FCS, 5 ml MEM, 5 ml G418 (0,5 mg/ml), 2,5 ml 500 x Penicillin/Streptomycin

HBSS(+) Medium:

HBSS, 10 mM Hepes, 10 mM $MgSO_4$, 1 x Penicillin/Streptomycin

Papain-Lösung:

2 mg Cystein, 10 ml DMEM, 100 µl 100 mM $CaCl_2$, 100 µl 50 mM EDTA, 20 – 25 U/ml Papain, mit Carbogengas (95 % Sauerstoff, 5 % CO_2) 10 Min equilibrieren, dann steril filtrieren

Papain-Inaktivierungslösung (Stopp-Lösung):
25 mg BSA, 25 mg Trypsin Inaktivator, 10 ml FBS-Medium

2.5.3 Lösungen für Elektrophysiologie

Die benötigten Lösungen für elektophysiologische Experimente wurde abteilungsintern freundlicherweise von Frau A. Galinski bereit gestellt.

ATP/GTP-Regenerations-System (10 x):
6 mM MgCl2, 40 mM ATP-Mg^{2+}, 3 mM GTP-Na_2, 150 mM Kreatinphosphat, 50 U/ml Kreatinphosphokinase

Extrazelluläre *Base-Plus*-Lösung:
140 mM NaCl, 2,4 mM KCl, 10 mM Hepes, 10 mM Glucose, 4 mM $CaCl_2$, 4 mM $MgCl_2$

Hyperosmotische Saccharose-Lösung:
0,5 M Saccharose in *Base-Plus* Lösung

Interne Nystatin-Lösung:
200 µl Nystatin (10 mg/ml Methanol), 5 ml KCl-Hepes pH 7,2 (150 mM KCl, 10 mM Hepes)

Interne QX-314-Lösung:
5 mM QX-314, 117,5 mM Cesiummethansulfonat, 10 mM Hepes, 10 mM TEA-Cl, 8 mM NaCl, 15,5 mM Cesiumchlorid, 1 mM $MgCl_2$, 0,25 mM EGTA, 4 mM ATP, 0,3 mM GTP

Interne Standard- Lösung:
136 mM KCl, 17,8 mM Hepes, 1 mM EGTA, 1 x ATP/GTP-Regenerations-System

2.5.4 Lösungen für SDS-PAGE

AMBA: 30 % Acrylamid/N, N'-Methylen-bis-Acrylamid Lösung 37,5 : 1

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS

3,75 % Sammelgel:
2,5 ml H_2O, 500 µl AMBA, 1 ml Sammelgelpuffer, 10 µl TEMED, 24 µl 10 % APS

10 % Trenngel:
2,5 ml H_2O, 2 ml AMBA, 1,5 ml Trenngelpuffer, 8 µl TEMED, 17 µl 10 % APS

3 x SDS-PAGE-Auftragspuffer:
9 Teile Stammlösung (140 mM Tris/HCl (pH 6,8), 3 mM EDTA, 10 % SDS, 30 % Glycerin, 0,1% Bromphenol-blau) und 1 Teil 1,5 M DTT

Laufpuffer: 3 g Tris Base, 14,4 g Glycin, 2 g SDS mit H_2O auf 1 Liter auffüllen, pH 8,8
Der Laufpuffer wurde abteilungsintern von Frau D. Michels-Hitzing hergestellt.

2.5.5 Weitere Lösungen

Agarosegel- und Laufpuffer Stammlösung (10 x TBE):
108 g Tris Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8
Die 10 x TBE-Lösung wurde abteilungsintern von Frau D. Michels-Hitzing hergestellt.

Blotting-Puffer für Western-Blot (10 x):
30 g Tris Base, 144 g Glycin in 1 l H_2O
1 x Blotting-Puffer (1 l): 100 ml 10 x Puffer, 200 ml Methanol, 700 ml H_2O

Lysis-Puffer:

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 1 x Protease-Inhibitoren

PBS mit Kalium (10 x):

80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4, 2,4 g KH_2PO_4, in 1 l H_2O, pH 7,4

PBS ohne Kalium (10 x):

29,7 g NaH_2PO_4 und 144,2 g Na_2HPO_4, 90 g NaCl in 1 l H_2O, pH 7,4

Phosphatpuffer (0,1 M PB)

100 ml 0,2 M PB (20 ml 0,2 M NaH_2PO_4, 80 ml 0,2 M Na_2HPO_4), 100 ml H_2O, pH 7,4

4 % Paraformaldehyd in 0,1 M PB

40 g Paraformaldehyd in 500 ml H_2O, 500 ml 0,2 M PB

Ponceau S Lösung:

0,1 % (w/v) Ponceau S, 5 % Eisessig in H_2O, filtriert

Protease-Inhibitoren:

1000 x Aprotinin-Lösung: 1 mg/ml H_2O

1000 x Leupeptin-Lösung: 0,5 mg/ml H_2O

1000 x PMSF-Lösung: 17,4 mg/ml Isopropanol

TBS (10 x):

0,2 M Tris/HCl pH 7,4, 1,4 M NaCl

2.6 Bakterienstämme

Escherichia coli Elektro10-Blue Stratagene über Agilent Technologies

Genotyp: *Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Kan^r [F' *proAB lacI^{q}ZΔM15* Tn*10* (Tet^r)]

Escherichia coli XL1-Blue MRF' strain Stratagene über Agilent Technologies

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F′ *proAB lacI*qZΔ*M15* Tn*10* (Tetr)]

Escherichia coli TOP10: Stratagene über Agilent Technologies

Genotyp: F^- *mrcA Δ(mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *deo*R *ara*D139 Δ*(ara-leu)*7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G

2.7 Vektoren

pCMVΔ8,9	(Lois *et al*., 2002)
pEGFP-C1	BD Bioscience Clontech
pFUGW	(Lois *et al*., 2002)
pHA-CMV	Clontech Laboratories
pCR2.1-TOPO	Invitrogen
pVSVG	(Lois *et al*., 2002)

2.8 Lentiviren

HA-GluR4(WT) in FUGW (#168)	(Dr. Aleksandra Ivanovic)
HA-GluR4(AAA) in FUGW (#169)	(Friederike Wolk)
HA-GluR4(EEE) in FUGW (#170)	(Friederike Wolk)

2.9 Oligonukleotide

Die verschiedenen Oligonukleotide wurden abteilungsintern von Frau I. Thanhäuser, Frau D. Schwerdtfeger und Herrn F. Benseler mit einem Oligosynthesizer (ABI 3900HT DNA Synthesizer, Applied Biosystems) synthetisiert.

2.9.1 Oligonukleotide für Genotypisierungen

Oligos zur Genotypisierung von 4.1N:

Oligo 1875: 5’- TATCGCCGCTCCCGATTCGCAGC -3’

Oligo 4715: 5’- GCTGGAAAGGAAGGATGCAGA -3’

Oligo 4716: 5’- AGCAGAGGGCAGGAGACGAACG -3’

Oligo 5806: 5’- CTCTGTCCCTCTGTCTTCCACCCCT -3’

Oligos zur Genotypisierung von 4.1G:

Oligo 9758: 5’- CACTTCAGATGCAGAGCCAACTTCAG -3’

Oligo 9759: 5’- ATTAAAGGGCCTGGCAAGGTCAAC -3’

Oligo 9760: 5’- CCTCCCCTACCCGGTAGAAT GG -3’

Oligo 9761: 5’- TTTCCATCACCTCACCACCAGACTG -3’

2.9.2 Oligonukleotide für RACE-PCR

Oligo zur Synthese des cDNS Einzelstrangs:

Oligo 8929: 5’- CGTGGGCGTGGTGGTTTGA -3’

Genspezifische Oligos für 5’-RACE-PCR:

Oligo 8966: 5’- TCGGCATCATAGTCACCCAGTTCA -3’

Oligo 8608: 5’- TGCGCTCCCGATCCCAGTCT -3’

Oligo 8965: 5’- CCAGAAGGGCATGCGTGACAAAG -3’

Oligo 8606: 5’- GATGCTGGCCTGGTGCTTCAAC -3’

Genspezifische Oligos für 3’-RACE-PCR:

Oligo 8603: 5’- CCTCAGTCAGTGAGAATCACGATGC -3’

Oligo 8604: 5’- TGAAGGAGCCCAACAGCAAACT -3’

2.9.3 Oligonukleotide für Mutagenese-PCR

13598 (vorwärts) und 13599 (rückwärts) für GluR4 T826E:

5’- CCAGGGCAGAGGCGAAGAGAATGAAGCTCGAGTTTTCCGAAGCC -3’

5’ -GGCTTCGGAAAACTCGAGCTTCATTCTCTTCGCCTCTGCCCTGG -3’

13600 (vorwärts) und 13601 (rückwärts) für GluR4 S838E:

5’- CAAAGCCAGGCTCGAGATCACTGGGAGTGTGGGAGAAAACGGC -3’

5’- GCCGTTTTCTCCCACACTCCCAGTGATCTCGAGCCTGGCTTTG -3’

13602 (vorwärts) und 13603 (rückwärts) für GluR4 T851E:

5’- GTGTGGGAGAAAATGGCCGTGTGCTGGAGCCTGACTGCC -3’

5’- GGCAGTCAGGCTCCAGCACACGGCCATTTTCTCCCACAC -3’

13604 (vorwärts) und 13605 (rückwärts) für GluR4 T826A:

5’- GAGGCGAAGAGAATGAAGCTTGCTTTTTCCGAAGCCATAAGAAACAAA -3’

5’- GCTTTGTTTCTTATGGCTTCGGAAAAAGCAAGCTTCATTCTCTTCGCC -3’

13606 (vorwärts) und 13607 (rückwärts) für GluR4 S838A:

5’- GAAACAAAGCCAGGTTAGCCATCACTGGATCCGTGGGAGAAAACGG -3’

5’- GCCGTTTTCTCCCACGGATCCAGTGATGGCTAACCTGGCTTTGTTTC -3’

13608 (vorwärts) und 13609 (rückwärts) für GluR4 T851A:

5’- GTGTGCTGGCCCCTGACTGCCCCAAGGCCGTGCACACAGGAACTG -3’

5’- CAGTTCCTGTGTGCACGGCCTTGGGGCAGTCAGGGGCCAGCACAC -3’

2.10 Antikörper

2.10.1 Primäre monoklonale Antikörper

anti-4.1N-mAK (Klon 4), 1:1000	BD Transduction Laboratories
anti-HA.11 (Klon 16B12), 1:1000	Convance Research Products über

	Hiss Diagnostics GmbH
anti-NMDA Rezeptor 1 (Klon M68), 1:500	Synaptic Systems
anti-Rab3a (Klon 42.2), 1:5000	Synaptic Systems
anti-ß-Tubulin (Klon Tub 2.1), 1:5000	Sigma-Aldrich GmbH

2.10.2 Primäre polyklonale Antikörper

anti-4.1B (Meerschwein, AS 614-788), 1:1000	(Dr. Aleksandra Ivanovic)
anti-4.1G (Kaninchen, AS 26-151), 1:1000	(Dr. Aleksandra Ivanovic)
anti-4.1N CTD (Kaninchen, AS 696-879), 1:2000	(Dr. Antje Neeb)
anti-4.1N Exon 1 (Kaninchen, AS 1-15), 1:500	(Friederike Wolk)
anti-Glutamat-Rezeptor 1, (Klon C3T), 1:800	Upstate
anti-Glutamat-Rezeptor 1, phospho Ser845, 1:200	Upstate
anti-Glutamat-Rezeptor 1, phospho Ser831, 1:500	Upstate
anti-Glutamat-Rezeptor 2/3, 1:500	Chemicon
anti-Glutamat-Rezeptor 4, 1:800	Upstate
anti-ProSAP1, 1:1000	(Boeckers *et al*., 1999)
anti-VGLUT1 (Meerschwein), 1:10000	Chemicon
anti-VGLUT2 (Meerschwein), 1:10000	Chemicon

2.10.3 Sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen (aus Ziege), HRP-konjugiert, affinitätsgereinigt, 1:5000	Jackson Laboratory
anti-Kaninchen (aus Ziege), IRDye700-konjugiert, affinitätsgereinigt, 1:5000	Rockland Immunochemicals, Inc.
anti-Kaninchen (aus Ziege), fluoreszenzmarkiert (Alexa-350,-488,-555,-633), 1:5000	Molecular Probes
anti-Maus (aus Ziege), HRP-konjugiert, affinitätsgereinigt, 1:5000	Jackson Laboratory
anti-Maus (aus Ziege), IRDye700-konjugiert, affinitätsgereinigt, 1:5000	Rockland Immunochemicals, Inc.

anti-Meerschwein (aus Ziege), HRP-konjugiert, affinitätsgereinigt, 1:5000	Jackson Laboratory
anti-Meerschwein (aus Ziege), fluoreszenzmarkiert (Alexa-350,-488,-555,-633), 1:5000	Molecular Probes

2.11 Tiere

Die Mäuse der Linie G4.1NC (4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen) werden aus institutseigenen Tierställen bezogen. Die Tiere werden in klimatisierten Ställen von 22 °C und 55 - 60 % relativer Luftfeuchtigkeit, sowie einem definierten Hell- Dunkelrhythmus von zwölf Stunden gehalten. Ihnen steht eine pelletierte Zuchtdiät und Wasser zur freien Verfügung.

Um die Versorgung der Tiere haben sich freundlicherweise die Mitarbeiter des institutseigenen Tierhauses um Frau A. Ohle und Frau I. Schauenberg gekümmert.

3. METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Kettenreaktion der DNS-Polymerase (kurz PCR für engl. *polymerase chain reaction*) ermöglicht die Vervielfältigung eines definierten Abschnitts von einer Matrizen-DNS. Dabei wird eine DNS-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Der zu vervielfältigende Abschnitt wird durch ein zum 5'-Ende und ein zum 3'-Ende komplementäres Oligonukleotid, den so genannten Oligo, terminiert. Der typische Ablauf einer PCR besteht aus drei Schritten, die üblicherweise 20 - 30-mal wiederholt werden und auf jede PCR-Reaktion individuell eingestellt werden müssen:

1. Denaturierung: In diesem Schritt werden die beiden DNS-Doppelstränge voneinander getrennt. Üblicherweise geschieht diese Trennung bei 94 °C. Um Beschädigungen der DNS und die Denaturierung der Polymerase gering zu halten, wird die Zeitdauer möglichst kurz gehalten.
2. Anlagerung: Die Oligonukleotide lagern sich an die entsprechende komplementäre DNS-Sequenz an. Die Temperatur für diesen Schritt ist von der Nukleotidsequenz des Oligos abhängig.
3. Elongation: Die Verlängerung der DNS Stränge durch die *Taq* Polymerase wird bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, durchgeführt. Die Dauer ist abhängig von dem zu amplifizierenden DNS-Fragment.

3.1.1.1 Genotypisierungs-PCR

Für die Genotypisierung der Mäuse der Linie G4.1NC werden an isolierter genomischer DNS (nexttec™ Genomic DNA Isolation Kit for Tissue and Cells, Nexttec) folgende PCR-

Reaktionen mit der *Red Taq* Polymerase (Sigma) und den unter 2.9.1 aufgeführten Oligonukleotiden durchgeführt:

Oligos 1875, 4715, 4716:	1 x	95 °C - 5 Min		
	30 x	94 °C - 30 Sek,	60 °C - 30 Sek,	72 °C - 1 Min
	1 x	72 °C - 10 Min		
Oligos 1875, 5806:	1 x	98 °C - 45 Sek		
	30 x	96 °C - 45 Sek,	63,5 °C - 45 Sek,	72 °C - 90 Sek
	1 x	72 °C - 10 Min		
Oligos 9758 - 9761:	1 x	94 °C - 1 Min		
	35 x	94 °C - 30 Sek,	60 °C - 30 Sek,	72 °C - 30 Sek
	1 x	72 °C - 3 Min		

Die genomische DNS wurde in den meisten Fällen abteilungsintern zur Verfügung gestellt.

3.1.1.2 Reverse Transkription

Mit Hilfe der reversen Transkription (RT) wird aus isolierter RNS (RNeasy Lipid Tissue Kit, Qiagen) cDNS synthetisiert, die anschließend für weitere PCR Reaktionen eingesetzt werden kann. So werden die Transkription eines Gens in bestimmten Geweben nachgewiesen oder Spleißvarianten untersucht. Aufgrund ihrer verminderten RNaseH Aktivität und einer erhöhten Stabilität bei hohen Temperaturen wurde für die Synthese der 4.1N cDNS die *Super Script III* Reverse Transkriptase (Invitrogen) nach Herstellerangaben eingesetzt.

3.1.1.3 RLM-RACE-PCR

Mit Hilfe der RACE (für engl. *rapid amplification of cDNA ends*) PCR können komplette Sequenzen einer cDNS kloniert werden, obwohl nur ein Teil dieser cDNS-Sequenz vorliegt. Bei der RLM-RACE-PCR (für engl. *RNA ligase mediated* RACE) wird zunächst

an den RNS Strang entweder am 5'-Ende (5'-RACE) oder dem 3'-Ende (3'-RACE) ein so genannter Adapter mit einer definierte Basensequenz angefügt. Nach reverser Transkription mit der *Super Script III* Reversen Transkriptase (Invitrogen) (s. 3.1.1.2) können mit Oligos, die innerhalb der Adapter-Sequenz liegen und genspezifischen Oligos (s. 2.9.2) anschließend die 5'-Enden bzw. 3'-Enden einer cDNS amplifiziert werden.

Die 5'-PCR von 4.1N wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei zwei genspezifische Oligos (s. 2.9.2, rückwärts) und zwei mit dem Kit gelieferte Oligos (vorwärts, s.u.) in zwei verschiedenen Kombinationen verwendet wurden. Die 3'-PCR von 4.1N wurde entsprechend durchgeführt. Die amplifizierten Produkte wurden gereinigt (PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen), in pCR2.1-TOPO kloniert und sequenziert.

5'-RACE-Oligos (Ambion):
5'-GCT GAT GGC GAT GAA TGA ACA CTG-3'
5'-CGC GGA TCC GAA CAC TGC GTT TGC TGG CTT TGA TG-3'
3'-RACE-Oligos (Ambion):
5'-GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA CT-3'
5'-CGC GGA TCC GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG-3'

3.1.1.4 Positions-orientierte Mutagenese-PCR

Mit Hilfe der Positions-orientierten Mutagenese-PCR können bestimmte Mutationen durch die *Pfu* Polymerase (verschiedene Quick Change Mutagenesis Kits, Stratagene) in eine DNS eingeführt werden. Bei größeren DNS-Konstrukten, in die eine Mutation eingeführt werden soll, empfiehlt sich aufgrund ihrer verbesserten Korrekturlese-Aktivität eine Mutagenese-PCR mit der *Herculase II Fusion DNA* Polymerase (Stratagene) nach Herstellerangaben. In den PCR-Reaktionen werden Oligonukleotide mit der gewünschten Basenveränderung (s. 2.9.3) eingesetzt. Im Anschluss wird der Ansatz mit der Endonuklease DpnI inkubiert, die methylierte und hemimethylierte DNS und somit das ursprüngliche DNS-Konstrukt verdaut. So kann die synthetisierte DNS mit der gewünschten Mutation isoliert werden. Zur Analyse der eingefügten Mutation sollte neben der gewünschten Basenveränderung zusätzlich eine Restriktionsstelle eingefügt oder

entfernt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass es sich um eine so genannte stille Mutation handelt, die keine Änderung der Aminosäuresequenz bewirkt.

3.1.2 Restriktionsverdau von DNS

Restriktionsendonukleasen spalten innerhalb oder in der Nähe von kurzen, in der Regel palindromischen Erkennungssequenzen doppelsträngiger DNS-Moleküle. Diese Eigenschaft kann zur qualitativen Analyse von DNS-Molekülen (analytischer Verdau) eingesetzt werden oder zu präparativen Zwecken (Subklonierungen). Der Restriktionsansatz enthält den vom Hersteller mitgelieferten zehnfach konzentrierten Puffer, die zu spaltende DNS und das entsprechende Restriktionsenzym. Die benötigte Menge Enzym ergibt sich aus der Aktivität des Enzyms (Aktivitätseinheit U), der Dauer der Reaktion, sowie der zu schneidenden Menge DNS: 1 U schneidet 1 µg DNS innerhalb 1 Std. Diese und weitere relevante Eigenschaften wie die optimale Reaktionstemperatur sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

3.1.3 Dephosphorylierung der 5'-Enden mit Alkalischer Phosphatase

Oft ist es ratsam, die durch den Restriktionsverdau entstandenen 5'-terminalen Phosphatgruppen durch alkalische Phosphatase abzuspalten, um eine Religation von einem nur mit einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektor oder zwei kompatiblen Enden zu verhindern. Die Dephosphorylierung der 5'-Enden wird mit Hilfe der *Shrimp* Alkalischen Phosphatase nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.4 Ligation

T4 DNA Ligasen katalysieren die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-OH-Ende einer DNS-Kette und dem 5'-Phosphat Ende einer anderen Kette. So werden komplementäre Enden verknüpft, um zum Beispiel DNS-Fragmente in zuvor geschnittene Vektoren einzufügen. Die Ligation mit der *T4 DNA* Ligase erfolgt über Nacht bei

Raumtemperatur. Schneller geht es mit der *Fast Link Ligase* (Biozym Diagnostik GmbH), bei der die Ligation bereits nach 5 Min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgen kann.

3.1.5 Elektrotransformation von Plasmid-DNS in Bakterien (Elektroporation)

Plasmid-DNS wird in elektrokompetente *E. coli*-Bakterien transformiert, die abteilungsintern von Frau T. Hellmann und Frau D. Michels-Hitzing hergestellt werden. Die Transformation erfolgt in Elektroporationsküvetten bei 1,8 kV in einem Bio-Rad *E. coli*-Pulser. Zur Regeneration werden anschließend die *E. coli*-Bakterien sofort in SOC- oder LB-Medium aufgenommen und mindestens 1 Std bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Bakterien abzentrifugiert, das Sediment in einem geringeren Volumen Medium aufgenommen und auf einer LB-Platte mit den entsprechenden Selektionschemikalien ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37 °C im Brutschrank.

3.1.6 Plasmid-DNS-Präparation

Zur Isolation sauberer DNS aus Bakterien werden je nach Volumen der Bakteriensuspension Mini-, Midi- oder Maxi-Präparations-Kits der Firmen Invitrogen oder Invitek verwendet. Die genauen Protokolle sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

In manchen Fällen, z.B. für einen analytischen Restriktionsverdau, reicht eine schnelle Plasmid-DNS-Präparation („*quick and dirty*“) aus. Diese schnelle Präparation basiert ebenfalls auf einer alkalischen Lyse und anschließender Neutralisation mittels Kalium-Azetat-Puffer. Die Bakteriensuspension wird nur kurz zentrifugiert. Das Sediment wird in 50 µl Resuspensions-Puffer aufgenommen. Anschließend werden 60 µl Lysis-Puffer zugefügt und die Probe durch drehen gemischt. Nach der Zugabe von 75 µl Präzipitations-Puffer und erneutem Mischen durch drehen werden die Proben 4 Min bei 22.200 g (15.000 U/Min, Eppendorf 5403) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird zu 500 µl Ethanol gegeben, erneut 2 Min zentrifugiert und das Sediment zum Schluss mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNS-Sediment kann nach dem Trocknen in einem entsprechenden Volumen Elutions-Puffer oder H_2O aufgenommen werden.

3.1.7 DNS-Präzipitation

Um DNS aus einer Plasmid-DNS-Präparation (s. 3.1.6) oder nach einer Ligation (s. 3.1.4) aufzukonzentrieren oder zu entsalzen, wird sie mit 1/20 Volumen Glykogen, 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat und 2 Volumen 100 % Ethanol gefällt, indem sie nach Zugabe der jeweiligen Chemikalie stark gemischt wird, anschließend für mindestens 2 Std bei -80 °C inkubiert wird und dann für 40 Min bei 22.200 g (15.000 U/Min, Eppendorf 5403) zentrifugiert wird. Das entstandene DNS-Sediment wird mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut für 5 Min zentrifugiert und dann in einem der Größe des Sediments entsprechenden Volumen Elutions-Puffer oder H_2O aufgenommen.

3.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion

Neben der Möglichkeit, DNS über eine Säule zu reinigen oder zu konzentrieren kann auch die Phenol-Chloroform-Extraktion eingesetzt werden. Die DNS wird nacheinander mit einem Volumen Phenol, einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, v/v) und einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Zwischen den einzelnen Extraktionsschritten wird der zuvor stark gemischte Ansatz 1 Min bei 22.200 g (15.000 U/Min, Eppendorf 5403) zentrifugiert und die obere, wässrige Phase abgenommen und für den nächsten Extraktionsschritt eingesetzt. Durch eine Alkoholfällung (DNS-Präzipitation, s. 3.1.7) mit anschließender Resuspension in einem geringeren Volumen kann die DNS-Lösung aufkonzentriert werden.

3.1.9 TempliPhi DNS-Matrizen-Präparation

Mit Hilfe der TempliPhi-Methode der DNS-Matrizen-Präparation lassen sich aus geringen DNS-Mengen in Pikogramm DNS-Matrizen in der Größenordnung von Mikrogramm gewinnen. Dazu wird der Mechanismus der *rolling-circle*-Amplifikation der DNS-Polymerase aus dem Bakteriophagen Phi29 genutzt. In kurzer Zeit können DNS-Matrizen von guter Qualität gewonnen werden ohne zunächst Flüssigkulturen aufzuziehen. Diese Methode ist hilfreich, wenn nach einer Transformation einer Klonierung ein positiver Klon identifiziert werden soll, da bis zu 100 Klone in einem Durchgang analysiert werden

können und mit der gewonnen DNS ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt werden kann. Das genaue Protokoll ist den Herstellerangaben zu entnehmen.

3.1.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Durch Auftragen auf einem Agarosegel mit mitgeführtem Mengenstandard kann die DNS-Menge abgeschätzt werden. Eine genaue Angabe der DNS-Konzentration erhält man durch eine photometrische Messung, bei der die OD der DNS-Lösung bei 260 nm gemessen wird. DNS und RNS absorbieren aufgrund der physikalisch-chemischen Eigenschaften ihrer aromatischen Basen Licht im UV-Bereich einer Wellenlänge von 260 nm. Diese Absorption kann im Spektralphotometer gemessen werden. Für die Relation zwischen der gemessenen OD und der DNS-Konzentration gilt: OD_{260} = 1 entspricht 50 µg/ml für Doppelstrang-DNS. Die Konzentration einer RNS-Lösung kann auf die gleiche Weise ermittelt werden.

3.1.11 Agarosegelelektrophorese

Durch Agarosegelelektrophorese lassen sich DNS-Fragmente entsprechend ihrer Größe auftrennen und mit einem DNS-Längenstandard mit DNS-Fragmenten definierter Größe vergleichen. So können Restriktionsmuster nach einem analytischen Verdau vergleichen oder auch ausgeschnittene Fragmente von einem Vektor isolieren werden. Die DNS-Banden werden durch Zugabe von Ethidiumbromid (10 mg/ml entsprechen 10.000 x) zum Agarosegel und zum Laufpuffer im UV-Licht sichtbar gemacht. In der Regel werden 0,7 bis 2 % ige Gele verwendet, je nach gewünschtem Trennschärfebereich. Die entsprechende Menge Agarose wird in 1 x TBE durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und in den Gelträger der Elektrophoresekammer gegossen. Die DNS-Proben werden in 6 x Probenpuffer aufgenommen und in Taschen pipettiert, die in das Gel eingelassen sind. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt bei einer Spannung von 80 bis 100 V in 1 x TBE. Die Isolierung von DNS-Fragmenten aus der Agarose erfolgt mittels PureLink Quick Gel Extraction Kit der Firma Invitrogen.

3.1.12 DNS-Sequenzierung, modifiziert nach Sanger *et al.* (1977)

Die Sequenzierung von Plasmid-DNS erfolgt durch *Cycle-Sequencing* mit fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Terminatoren und einem ABI DNA Analyzer 3730 XL (Applied Biosystems). Diese Arbeiten wurden abteilungsintern von Frau I. Thanhäuser, Frau D. Schwerdtfeger und Herrn F. Benseler durchgeführt.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen können mit dem *Protein Assay* der Firma Bio-Rad, basierend auf der Bradford-Methode (Bradford, 1976), nach Herstellerangaben bestimmt werden. Die optische Dichte wird bei 595 nm gemessen. Wurden bereits Detergenzien den Proteinlösungen zugefügt, empfiehlt sich jedoch eine Konzentrationsbestimmung mit dem *BCA-Assay* der Firma Pierce (Rockland, USA) gemäß Herstellerangaben. Die optische Dichte wird dabei ebenfalls bei 595 nm gemessen. Als Kalibrierungsgerade dienen die Messwerte von BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen.

3.2.2 SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen (Fling und Gregerson, 1986)

Durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Das für die Denaturierung verwendete SDS ist in der Lage, Polypeptidketten aufzuspalten und diese dann einheitlich mit einer negativen Ladung (ca. ein SDS-Molekül pro drei Peptidreste) zu beladen. Die mit dem Molekulargewicht zunehmende negative Gesamtladung der Proteine führt im elektrischen Feld zur Auftrennung der Proteine nach Größe. Durch die Verwendung von Dithiothreitol werden vorhandene Disulfidbrücken reduziert und damit die Protein-Tertiärstruktur aufgelöst. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE, die für optimale Proteinauftrennung genutzt wird, ist das Gel in ein Sammel- und ein Trenngel unterteilt.

Die Komponenten des Trenngels werden gemischt und zwischen zwei Glasplatten in eine Gießapparatur gegossen. Durch Beschichtung mit wassergesättigtem Butanol wird eine homogene Polymerisierung des Trenngels erzielt. Dieses wird nach der Polymerisation des Gels mit H_2O abgespült und die Kammer wird mit Filterpapier getrocknet. Nun werden die Komponenten des Sammelgels gemischt und auf das Trenngel gegossen. Durch das Einsetzen eines Kammes werden Taschen für das Beladen der Proben in das Sammelgel geformt. Das fertige Gel wird in eine Elektrophoresekammer gesetzt, die mit Laufpuffer gefüllt wird. Dann werden der Molekulargewichtsstandard und die Proben (in SDS-PAGE-Auftragspuffer) in die Taschen geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei konstanter Stromstärke (20 mA pro Gel).

3.2.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran (Towbin *et al*., 1979)

Mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens und anschließender Immundetektion lässt sich ein spezifisches Protein aus einem Proteingemisch mit sehr hoher Sensitivität nachweisen. Die Proben werden zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt, dann elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

Der Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose wird mit Hilfe eines Elektrotankblotters (Hoefer TE 42 Transphor) durchgeführt und erfolgt bei 40 mA und 4 °C über Nacht oder bei 250 mA und 4 °C für 2 Stunden in Blotting-Puffer. Das Gel wird zunächst luftblasenfrei auf eine mit Blotting-Puffer getränkte Nitrozellulosemembran aufgelegt. Sowohl unter die Membran als auch auf das Gel werden je drei Lagen mit Blotting-Puffer getränktes Whatman 3MM Papier gelegt und alles wird in der Blotkammer verschlossen. Zum Schluss kann durch Anfärben der Membran mit Ponceau S der Transfer sichtbar gemacht und somit überprüft werden. Diese Färbung kann mit PBS oder H_2O entfernt werden.

3.2.4 Immundetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz

Zum Nachweis eines immobilisierten Proteins auf einer Membran wird eine indirekte Markierung mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Zunächst werden unspezifische

Antikörperbindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in Blockierungslösung (1 x TBS; 0,1 % Tween 20; 5 % Ziegenserum; 5 % Magermilch) für mindestens 30 Min abgesättigt. Die Zugabe des primären Antikörpers, der ein Epitop des gesuchten Proteins bindet, erfolgt ebenfalls in Blockierungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Membran fünfmal für je 5 Min in 1 x TBS-T (1 x TBS; 0,1 % Tween 20) gewaschen. Der sekundäre Antikörper wird für 1 Std bei Raumtemperatur in Blockierungslösung inkubiert. Er ist Spezies-spezifisch und reagiert mit den schweren Ketten des primären Antikörpers. Durch die Kopplung einer Meerrettich-Peroxidase an den sekundären Antikörper kann eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert werden. Die Membran wird danach wieder fünfmal für je 5 Min in 1 x TBS-T und zweimal je 5 Min in 1 x TBS gewaschen. Dann wird sie auf eine Glasplatte gelegt und mit 40 µl ECL-Reagenz pro 1 cm^2 Membran für 1 Min inkubiert. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und atomaren Sauerstoff. Dieser kann Luminol unter Abspaltung von Stickstoff oxidieren, wobei Luminol Licht emittiert. Das verstärkte Chemilumineszenz-System (ECL), deren wesentliche Komponenten Wasserstoffperoxid und Luminol sind, erzeugt stärkere Signale, die über einen längeren Zeitraum konstant bleiben. Die Visualisierung des Signals erfolgt in einer Dunkelkammer durch Exposition eines Röntgenfilms auf der Membran, wobei die Expositionszeit je nach Intensität der Banden und der Antikörpersensitivität variiert. Der Film wird durch Auflegen einer Transparentfolie vor Feuchtigkeit geschützt und anschließend in einer Entwicklermaschine fixiert und entwickelt.

3.2.5 Quantifizierung von Proteinen mittels ECL-Western-Blot

Die durch den ECL-Western-Blot visualisierten Banden können mit Hilfe der *ImageJ*-Software quantifiziert werden. Dazu werden zunächst gleiche Mengen der jeweiligen Protein-Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. Bei der anschließenden Immundetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz (ECL-Western-Blot) wird auch in den Waschschritten 5 % Ziegenserum zugegeben, um schärfere Signale und möglichst keine Hintergrundsignale zu erhalten. Die Intensitäten dieser Banden werden dann mittels der *ImageJ*-Software bestimmt. Um Verfälschungen der Ergebnisse durch das Auftragen variierender Proteinmengen zu vermeiden, wird jeweils der Quotient zu einer entsprechenden Ladekontrolle (Rab3a oder Tubulin) gebildet.

3.2.6 Immundetektion von Proteinen durch Fluoreszenz

Unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran werden durch die Inkubation in *Odyssey Blocking Buffer* (1:1 in 1 x PBS verdünnt) für 1 Std abgesättigt. Die Zugabe des primären Antikörpers erfolgt in *Odyssey Blocking Buffer* (1:1 in 1 x PBS verdünnt) mit 0,1 % Tween 20 für 1 Std bei Raumtemperatur. Die Membranen werden dann viermal für 10 Min in 1 x PBS-T (1 x PBS; 0,1 % Tween 20) gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper in *Odyssey Blocking Buffer* (1:1 in 1 x PBS verdünnt) mit 0,1 % Tween 20 für 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert wird. Da der sekundäre Antikörper mit Alexa Fluor 680 fluoreszenzmarkiert ist, erfolgt die Inkubation und alle folgenden Schritte im Dunkeln. Zum Schluss wird die Membran viermal für 10 Min in 1 x PBS-T gewaschen und in 1 x PBS bei 4 °C aufbewahrt. Die Visualisierung der Signale erfolgt mit Hilfe des Li-Cor *Odyssey Infrared Imaging System*.

3.2.7 Quantifizierung von Proteinen mittels Odyssey-Western-Blot

Durch den Odyssey-Western-Blot visualisierte Banden werden mit Hilfe der *Odyssey Software* quantifiziert. Dazu werden zunächst gleiche Mengen der jeweiligen Protein-Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgt nun mittels Fluoreszenz, da die sekundären Antikörper Alexa Fluor 680 fluoreszenzmarkiert sind. Mit Hilfe des Li-Cor *Odyssey Infrared Imaging System* können die Fluoreszenzsignale visualisiert und mit der entsprechenden Software analysiert werden. Auch mit dieser Methode muss jeweils der Quotient zu einer entsprechenden Ladekontrolle (Rab3a oder Tubulin) gebildet werden, da die Menge der aufgetragenen Proben trotz vorheriger Konzentrationsbestimmung variieren kann.

3.2.8 Entfernen der Antikörper von einer Nitrozellulosemembran

Zur Entfernung der Antikörper von einer Nitrozellulosemembran wird diese in 2 % SDS, 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7 auf 50 °C vorgewärmt. Dann wird β-Mercaptoethanol bis zur Endkonzentration von 10 mM zugegeben und die Membran für weitere 20 - 60 Min bei

50 °C inkubiert. Die Lösung wird abgegossen und die Membran zweimal für 10 Min bei Raumtemperatur mit TBS gewaschen.

Eine sanftere Methode ist die Entfernung der Antikörper von der Membran bei 37 °C in 100 mM Glycin pH 2,5 - 3 für 30 Min. Anschließend wird die Membran zwei- bis dreimal in 1 x TBS; 5 % Ziegenserum gewaschen.

In beiden Fällen können die Membranen anschließend neu für Immundetektionen eingesetzt werden.

3.2.9 Präparation von P2-Fraktionen aus Mausgehirn

Die Mäuse werden zunächst durch Inhalation des Anästhetikums Isofluran betäubt. Alle anschließenden präparativen Schritte erfolgen auf Eis. Das Gehirn wird herauspräpariert, gegebenenfalls eine gewünschten Gehirnregionen isoliert und in 1 ml eiskalte gepufferte 320 mM Saccharose-Lösung (20 mM Hepes pH 7,4; 5 mM EDTA; Protease-Inhibitoren) gegeben. Die Homogenisierung erfolg auf mittlerer Stufe mit dem Dispergiergerät Ultra-Turrax. Das Homogenat wird anschließend 10 Min bei 4.900 g und 4 °C zentrifugiert (3.300 U/Min, Eppendorf 5403), um Zellkerne und unzureichend zerkleinertes Gewebe zu sedimentieren. Der Überstand wird nochmals bei 19.000 g (12.800 U/Min, Eppendorf 5403) und 4 °C für 10 Min zentrifugiert und das ungereinigte, synaptosomale Sediment (engl. *pellet*, P2-Fraktion) wird in einem entsprechenden Volumen gepufferter Saccharose-Lösung aufgenommen.

3.2.10 Präparation von Synaptosomen aus Mausgehirn

Alle Schritte nach der Gehirnentnahme erfolgen auf Eis und alle Zentrifugationsschritte bei 4 °C. Pro präpariertes Gehirn werden 10 ml eiskalte 320 mM Saccharose-Lösung zugegeben. Mit Hilfe eines Glas-Teflon-Potters werden die Gehirne jeweils durch achtmaliges Auf- und Abziehen bei 9000 U/Min homogenisiert und anschließend bei 2.990 g (5.000 U/Min) für 2 Min in einem SS34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und erneut bei 14.500 g (11.000 U/Min) für 12 Min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wird in Ultra-Clear Zentrifugationsgefäßen (14 x 89 mm, Beckmann) ein diskontinuierlicher Ficoll-Gradient vorbereitet, indem 4 ml 12 % Ficoll in 320 mM

Saccharose-Lösung mit 1 ml 9 % Ficoll in 320 mM Saccharose-Lösung und als letztes mit 4 ml 6 % Ficoll in 320 mM Saccharose-Lösung überschichtet werden. Anschließend wird das Sediment aus dem letzten Zentrifugationsschritt in 1 ml 320 mM Saccharose-Lösung aufgenommen und vorsichtig auf den Gradienten gegeben. Die Gefäße werden in Zentrifugationsbehälter gegeben und mit 320 mM Saccharose-Lösung austariert. Die Zentrifugation erfolgt in einem SW 41-Ti *swing-out* Rotor in einer Ultrazentrifuge bei 81.000 g (22.500 U/Min) für 35 Min. An den Grenzen der Gradienten sammeln sich jeweils zwei Banden, die entnommen und nochmals bei 22.200 g für 20 Min zentrifugiert werden (15.000 U/Min, Eppendorf 5403). Das Sediment wird je nach Größe in einem entsprechenden Volumen (100 - 200 µl) H_2O aufgenommen.

Anschließend wird eine Proteinkonzentrationsbestimmung mit der BCA-Methode durchgeführt (s. 3.2.1) und die Proben so mit H_2O und SDS-PAGE-Auftragspuffer versetzt, dass sie eine einheitliche Proteinkonzentration aufweisen. Zur Quantifizierung bestimmter Proteine wird das Proteingemisch durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit Hilfe des Odyssey-Western-Blot-Verfahrens analysiert (s. 3.2.6).

3.2.11 Präparation von PSD enthaltenen Fraktionen aus Mausgehirn

Die entsprechenden Gehirnregionen werden wie in 3.2.9 präpariert, in 1,5 ml gepufferte 320 mM Saccharose-Lösung gegeben und in einem 5 ml Glas-Teflon-Potter bei 9000 U/Min homogenisiert. Die Homogenate werden wie unter 3.2.9 beschrieben zentrifugiert und die erhaltene P2 Fraktionen in einem entsprechenden Volumen (50 - 100 µl) 20 mM Tris pH 7,4; 2 mM EGTA; 1 mM PMSF aufgenommen. Die Konzentrationen der Proteinproben werden mit der Bradford-Methode (s. 3.2.1) gemessen und einheitlich auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml mit einer Endkonzentration von 1 % Triton X-100 eingestellt. In einem Ultraschallbad werden die Proben dreimal 30 Sek bei 70 % sonifiziert (Ultraschallbad DK 102 von Bandelin) und zwischendrin für 30 Sek auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Proben für 1 Std auf einem sich langsam drehenden Rad bei 4 °C inkubiert. Das Solubilisat enthält die Triton X-100 löslichen Proteine und wird mittels Ultrazentrifugation (1 Std bei 136.600 g, 57.000 U/Min im TLA 120.1 Rotor bei 4 °C) von der PSD enthaltenen Fraktion mit den Triton X-100 unlöslichen Proteinen getrennt. Das Sediment der gereinigten PSD-Fraktionen wird in 0,1 Volumen des Solubilisats 1 % SDS

aufgenommen. Anschließend werden 0,9 Volumen 20 mM Tris pH 7,4, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF und 1 % Triton X-100 zugefügt und die Proben erneut auf einem sich langsam drehenden Rad bei 4 °C für 1 Std inkubiert.

Die Proteinkonzentrationen werden mit Hilfe der BCA-Methode (s. 3.2.1) gemessen und auf eine einheitliche Konzentration (optimal 2 mg/ml) in SDS-PAGE Auftragspuffer gebracht. Um die in den Fraktionen enthaltenen Proteine zu quantifizieren werden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mittels des ECL-Western-Blot-Verfahrens (3.2.4) untersucht.

3.3 Immunfärbungen

3.3.1 Immunhistologie

Eine adulte Maus wird mit einem dem Körpergewicht entsprechenden Volumen (0,5 - 0,8 ml) Avertin, einer Tribromoethanol/Amylalkohol-Mischung mit PBS, anästhesiert. Nach Öffnen des Brustkorbes wird eine Injektionskanüle in den linken Ventrikel des Herzens eingeführt. Um den Blutkreislauf zu unterbrechen, wird in das rechte Atrium eingestochen. Nach kurzem Spülen mit ca. 5 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) mit 0,2 % $NaNO_2$ wird die Maus mit ca. 30 ml 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M PB fixiert. Das Gehirn wird herauspräpariert und für mindestens 1 Std in der Paraformaldehyd-Lösung bei 4 °C nachfixiert. Dann wird das Gehirn in 30 % Saccharose in 0,1 M PB zur Kryoprotektion bei 4 °C inkubiert, bis das Gehirn auf den Grund des Gefäßes gesunken ist. Das Gehirn wird in *Tissue Freezing Medium* auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Am Kryostat werden 18 µm dicke sagittale Schnitte des Gehirns bei -22 °C angefertigt, die sofort auf Objektträger aufgezogen werden. Die Objektträger werden bis zur Immunfärbung bei -80 °C gelagert. Zur Färbung werden die Schnitte zunächst aufgetaut, in 0,1 M PB gewaschen und dann für maximal 30 Min in Blocklösung (0,1 M PB; 2 % Ziegenserum; 0,1 % Triton X-100) inkubiert. Der primäre Antikörper wird in Blocklösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach drei Waschschritten für je 10 Min mit 0,1 M PB wird der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper in Blocklösung verdünnt und die Schnitte werden darin für 1 Std bei

Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird wieder dreimal für 10 Min mit 0,1 M PB gewaschen.

Die Objektträger werden kurz getrocknet und die Schnitte luftblasenfrei mit Fluoromount-G eingedeckelt.

3.3.2 Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen

Um immunhistochemische Färbungen zu quantifizieren und miteinander vergleichen zu können, müssen sie zunächst unter gleichbleibenden Bedingungen und Einstellungen dokumentiert werden (konvokales Mikroskop Leica DM IRE 2). Die Analyse der Färbungen erfolgt dann mit einer geeigneten Software wie Analysis von Olympus, mit der die Anzahl der gefärbten Partikel pro Fläche quantifiziert werden können.

3.3.3 Immunzytochemie

Die kultivierten Zellen werden bis zum gewünschten Differenzierungsgrad im Brutschrank inkubiert, dann einmal mit PBS ohne Kalium vorsichtig gewaschen und für 30 Min bei 4 °C mit 4 % Paraformaldehyd mit Glucose in PBS fixiert. Die Paraformaldehyd-Lösung wird durch dreimaliges Waschen mit PBS ohne Kalium entfernt. Zur Färbung werden die Zellen dann für maximal 30 Min in Blocklösung (PBS ohne Kalium; 2 % Ziegenserum; 0,1 % Triton X-100) inkubiert. Der primäre Antikörper wird in Blocklösung verdünnt, über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert und am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen für 10 Min mit PBS ohne Kalium entfernt. Der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper wird in Blocklösung verdünnt und im Dunkeln für 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 Min mit PBS ohne Kalium werden die Deckgläser mit Fluoromount-G auf Objektträgern befestigt. Die Dokumentation erfolgt mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX61 und einer entsprechenden Software (Analysis von Olympus).

3.4 Zellkulturtechniken

Die Zellkulturarbeiten werden in einer Sterilbank durchgeführt. Die anschließende Kultivierung erfolgt in Begasungsbrutschränken bei 37 °C und 5 % CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die verwendeten Medien und Lösungen werden durch einen Sterilfilter filtriert oder autoklaviert und vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Die Verbrauchsmaterialien sind steril verpackt oder autoklaviert.

3.4.1 Beschichtungen von Zellkulturgefäßen für kontinentale Kulturen

Zellen kontinentaler Kulturen werden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Kulturgefäßen oder Deckgläsern aufgezogen, an dem sich die Zellen anhaften können. Dazu werden die Zellkulturgefäße über Nacht im Brutschrank mit einer 1:12 Lösung Poly-L-Lysin in PBS inkubiert. Die Platten werden dann zwei- bis dreimal mit D-PBS gewaschen und mit HBSS nochmals für mindestens 30 Min im Brutschrank inkubiert, bevor die Zellen in Medium ausplattiert werden.

3.4.2 Auftauen und Kultivierung von HEK293FT-Zellen

Die Zelllinien werden kryokonserviert und, um Zellschäden durch Bildung von Eiskristallen zu vermeiden, zuvor mit DMSO versetzt. Nach dem Auftauen müssen die Zellen schnell in vorgewärmtem Medium (s. 2.5.2) aufgenommen werden. Je nach Verbrauch des Mediums und Dichte der Zellen erfolgt ein Wechsel des Mediums oder das Passagieren der Zellen. Dazu werden die Zellen mit D-PBS gewaschen und 3 Min im Brutschrank mit 0,5 % Trypsin-EDTA inkubiert. Anschließend werden die Zellen in entsprechenden Verdünnungen in frischem Medium ausplattiert.

3.4.3 Präparation von Astrozyten-Zellen

Autaptische Neuronen bieten ein geeignetes System, um ein Neuron elektrophysiologisch zu analysieren, da in einem einzelnen Neuron sowohl ein Stimulus gegeben als auch die

synaptische Antwort auf diesen Stimulus gemessen werden können. Da die Neuronen auf Astrozyten-Inseln ausgesät werden, können darauf vereinzelte Neuronen heranwachsen, die aufgrund ihrer Isolation von anderen Neuronen Autapsen, also Synapsen auf eigene Dendriten, ausbilden.

Zunächst werden Deckgläser so behandelt, dass Astrozyten nur an definierten Mikropunkten anhaften und wachsen können, damit später Astrozyten-Inseln entstehen können. In den Kammern der Kulturplatten werden die Deckgläser mit einem dünnen 0,15 % Agarosefilm überzogen. Auf diesem werden nach Trocknen und 20 Min UV-Sterilisation Mikropunkte einer Kollagen/Poly-D-Lysin-Lösung mit einem Stempel aufgebracht.

Zur Präparation der Astrozyten werden Kortizes aus neugeborenen Mäusen 20 Min in Trypsin (1 ml/Kortex) bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und die Kortizes für 15 Min bei 37 °C in Stopp-Lösung (1 ml/Kortex) inkubiert. Die Kortizes werden dann in 0,2 ml FBS-Medium trituriert, d.h. in einer Pipette hoch- und runtergezogen, und der Überstand anschließend zu FBS-Medium gegeben. Die Zellen werden gezählt in pro T-75 Kulturflasche 800.000 Zellen ausplattiert. Das Medium wird einen Tag später gewechselt.

Sobald die Zellen einen dichten Teppich gebildet haben werden sie mit 5 ml Trypsin geerntet und gezählt. Pro Vertiefung in einer 6er Kulturschale werden 12.000 Zellen auf den zuvor präparierten Deckgläsern ausplattiert.

Diese Kulturplatten mit Astrozyten-Inseln wurden abteilungsintern freundlicherweise von Frau A. Galinski hergestellt.

3.4.4 Präparation hippocampaler Ratten-Neuronen

Die Neuronen werden am Tag 19 der Embryonalentwicklung präpariert. Dazu wird eine trächtige Ratte anästhesiert und geöffnet. Die Rattenembryonen werden entnommen, die Gehirne herauspräpariert und in 4 °C kaltes HBSS-Medium gegeben. Die *Hippocampi* werden unter dem Binokular herauspräpariert und in frisches HBSS-Medium (4 °C) gegeben. Dann werden sie dreimal mit ca. 10 ml HBSS gewaschen, für 15 Min bei 37 °C in Trypsin-Lösung inkubiert und viermal mit HBSS gewaschen. Die gesamte Lösung wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellcluster werden homogenisiert, indem die Lösung 10 - 20-mal in einer Pasteurpipette hoch- und runtergesaugt wird. Zur Abtrennung

von Geweberesten wird der Überstand der Lösung über Filter (*cell strainer*) gegeben, die auf 50 ml Reaktionsgefäße gesetzt wurden. Die Filter werden mit 10 % FCS; 1% Penicillin/Streptomycin; Glutamat in 1 ml DMEM gewaschen. Zu den Zellclustern wird erneut 1 ml der DMEM-Lösung gegeben. Mit einer Spritze und einer mittelfeinen Nadel wird die Neuronenlösung erneut homogenisiert, indem die Lösung dreimal langsam aufgezogen und wieder abgegeben wird. Der Vorgang wird mit einer feinen Nadel wiederholt. Der Überstand wird ebenfalls über den Filter gegeben und dieser mit 1 ml DMEM-Lösung gewaschen. Die Zellcluster werden in 1 ml DMEM-Lösung mit der mittelfeinen Nadel noch mal homogenisiert und über den Filter gegeben. Das Volumen wird durch Zugabe von DMEM-Lösung über den Filter auf 20 ml aufgefüllt. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wird die Zellzahl bestimmt. Für eine Färbung werden 30.000 Neuronen und zur Transfektion 60.000 Neuronen pro Poly-L-Lysin beschichteter Vertiefung einer 24er Platte ausplattiert.

Diese Präparationen wurde abteilungsintern von Frau N. Dankenbrink-Werder und Herrn M. Doerre durchgeführt.

3.4.5 Präparation hippocampaler Maus-Neuronen

Die neu geborene Mausembryonen werden am Tag ihrer Geburt (P0) dekaptiert und die Gehirne herauspräpariert. Für eine spätere Analyse der Genotypen werden zur Kontrolle die Enden der Schwänze abgeschnitten und die DNS isoliert (nexttec™ Genomic DNA Isolation Kit for Tissue and Cells, Nexttec). In eiskaltem HBSS(+) Medium werden die *Hippocampi* unter dem Binokular herauspräpariert. Der Verdau der *Hippocampi* erfolgt für 60 Min bei 37 °C und leichtem Bewegen in 0,5 ml Papain-Lösung (25 U Papain/ml). Die Papain-Lösung wird dann gegen die Stopp-Lösung ausgetauscht und in dieser nochmals unter gleichen Bedingungen für 15 Min inkubiert. Anschließend wird die Stopp-Lösung entfernt und die verdauten *Hippocampi* in 0,1 ml NBA-Medium gewaschen, um restliche Stopp-Lösung zu entfernen. Zur Vereinzelung der Neuronen werden die *Hippocampi* vorsichtig in 0,1 ml NBA-Medium zehnmal trituriert, d.h. in einer Pipette hoch- und runtergezogen. Nachdem sich die *Hippocampi* abgesetzt haben, wird der Überstand zu 1 ml NBA-Medium gegeben. Je nach Anzahl der benötigten Zellen kann dieser Schritt wiederholt werden. Die Zellzahl wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die gewünschte Anzahl an Zellen (4.000 Zellen pro Vertiefung einer 6er Kulturschale mit Astrozyten-Inseln für elektrophysiologische Experimente, 300.000 Zellen pro 20 cm^2 Poly-L-Lysin beschichtete Kulturschale für biochemische Experimente) wird zu dem bereits in den Kulturschalen vorgewärmten NBA-Medium gegeben und durch vorsichtiges Mischen für 2 Min gleichmäßig verteilt.

3.4.6 Präparation cerebellärer Körnerzellen

Cerebelläre Körnerzellen werden aus 5 Tage alten Mäusen (P5) präpariert. Die *Cerebelli* werden auf Eis in HBSS(+) herauspräpariert, in 4 Teile geteilt und für 10 Min in 2 ml 0,05 % Trypsin bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden sie zweimal mit je 2 ml 10 mg/ml Trypsin-Inhibitor in HBSS(+) und zweimal mit 5 ml HBSS(+) gewaschen. In 1 ml NBA-Medium mit 1000 *Kunitz*-Einheiten DNaseI pro ml werden die *Cerebelli* in 3 verschiedenen Glaspipetten mit kleiner werdenden Durchmessern insgesamt ca. 15-mal hoch- und runtergezogen. Die Durchmesser der Glaspipetten wurden zuvor durch Drehen in einer Flamme verkleinert. Die Zellen werden durch Zugabe von 5 ml NBA-Medium gewaschen und 4 Min zentrifugiert. Das Sediment wird in 1 ml NBA-Medium aufgenommen und über ein Zellsieb (*cell strainer*) gegeben, das zusätzlich mit 2 ml NBA-Medium gewaschen wird. Die Zellen werden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in gewünschter Dichte in NBA-Medium ausplattiert (6.000 Zellen pro Vertiefung einer 6er Kulturschale mit Astrozyten Inseln für elektrophysiologische Experimente, 800.000 Zellen pro 55 cm^2 Poly-L-Lysin beschichtete Kulturschale für biochemische Experimente).

3.4.7 Biotinylierung von membranständigen Proteinen in Zellkultur

Die Zellen werden in der dritten Woche *in vitro* (ca. DIV 21) bzw. eine Woche nach der Virusinfektion (DIV 8) zunächst zweimal mit eiskaltem D-PBS gewaschen und anschließend in 0,5 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin in D-PBS bei 4 °C für 30 Min inkubiert. Um überschüssiges Biotin zu entfernen, werden die Zellen anschließend zweimal mit eiskalten 0,1 M Glycin in D-PBS und einmal mit eiskaltem D-PBS gewaschen. Die Zellen werden dann 30 Min bei 4 °C in Lysis-Puffer (s. 2.5.5) inkubiert und geerntet. Die Überstande der einzelnen Proben nach Zentrifugation (15 Min bei

22.200 g, 15.000 U/Min und 4 °C in Eppendorf 5403) werden nach der Proteinkonzentrationsbestimmung mit der BCA-Methode (s. 3.2.1) auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt. Diese Proben enthalten alle Proteine aus den Gesamtlysaten der Zellen (= Total). Um aus diesen Proben die membranständigen Proteine zu isolieren, werden sie über Nacht auf einem sich drehenden Rad bei 4 °C mit zuvor gewaschenen Biotin-bindenden NeutrAvidin-Agarose-Kügelchen inkubiert. Diese werden am nächsten Tag zentrifugiert (1 Min bei 5.180 g, 3.500 U/Min und 4 °C) und der Überstand mit den ungebundenen Proteinen entfernt. Die Avidin-Agarose-Kügelchen werden nach zweimal Waschen mit Lysis-Puffer und einmal mit D-PBS in Auftragspuffer aufgenommen. Die Proben enthalten die biotinylierten, membranständigen Proteine (= PM, Plasmamembran).

3.4.8 Herstellung und Transfektion rekombinanter Lentiviren

Lentiviren gehören zu der Gattung der Retroviridae. Sie können eine erhebliche Menge an genetischer Information in Wirtszellen einführen. Ist der Virus in die Wirtszelle eingedrungen, erfolgen die reverse Transkription der viralen RNA und der Transport in den Nukleus, wo ein Einbau in die genomische DNA der Wirtszelle erfolgt.

Rekombinante Lentiviren werden üblicherweise durch die Transfektion einer Zelllinie wie HEK293FT mit drei verschiedenen Plasmiden produziert: das Transfer-Plasmid (pFUGW), welches das zu untersuchende Gen und ein Reportergen enthält, das Verpackungs-Plasmid (pCMVΔ8,9) und ein Plasmid, welches das Gen für die Hülle eines anderen Viruses enthält (pVSVG aus *Vesicular Stomatitis Virus*). Das virale Genom wurde mehrfach modifiziert, um zur Replikation inkompetente Viren zu erhalten, was sowohl für die biologische Sicherheit als auch für die Reduktion des pathologischen Effektes der Virusinfektion wichtig ist.

Die Transfektion der Viruskonstrukte erfolgt in HEK293FT Zellen, die zu einem gleichmäßigen Teppich gewachsen sind (80 - 90 % konfluent). Einen Tag vor der Transfektion sollten die Zellen mit Antibiotika freiem Medium versetzt werden. Das Transfektionsgemisch aus 13,3 µg pVSVG; 20 µg pCMVΔ8,9; 27 µg pFUGW-Konstrukt und 2,25 ml OptiMEM wird zunächst 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zu einem Gemisch aus 150 µl Lipofectamine 2000 und 2,25 ml OptiMEM gegeben und 20 Min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Währenddessen wird den Zellen 7 mM

Natriumbutyrat zugegeben, um die Transfektionseffizienz zu steigern. Das Transfektionsgemisch wird zu den HEK293FT in 15 cm Kulturschalen gegeben und diese einen Tag im Brutschrank inkubiert.

Zum Ernten der Lentiviren wird der Zellüberstand 5 Min bei 4.000 U/Min und 4 °C (Falcon *Swinging bucket rotor*) in einer *EASYset* Multifuge 1 S-R (Sorvall) zentrifugiert. Der Überstand wird durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert und anschließend durch ca. 20 Min zentrifugieren in Amicon Ultra Filter Einheiten (100K) eingeengt. Der eingeengte Überstand wird noch zweimal mit NeurobasalA-Medium gewaschen. Den Virensuspensionen wird 1/10 Volumen Hepes zugefügt und das Gemisch in Röhrchen mit Schraubverschluss in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese Virensuspensionen können nach dem Auftauen dann zur Infektion von Neuronen mit den entsprechenden pFUGW-Konstrukten genutzt werden. Zur Infektion wird ein zuvor auf die Transfektionseffizienz getestetes Volumen der Virensuspension an DIV 1 zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.5 Elektrophysiologie

3.5.1 *Patch-clamp*-Techniken

Die *patch-clamp*-Technik ist eine Messmethode in der Elektrophysiologie, mit welcher der Ionenfluss über die in der Zellmembran gelegene Ionenkanäle einer Zelle gemessen werden kann. Dabei sind zwei Ableitungstechniken zu unterscheiden: Bei der *current-clamp* Technik wird der Stromfluss konstant gehalten (engl. *clamp*, befestigen) und die Spannung gemessen, bei der *voltage-clamp* Technik hingegen wird die Spannung kontrolliert und der Stromfluss gemessen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der *voltage-clamp*-Technik gearbeitet und das Membranpotential konstant gehalten. Um den Stromfluss zu messen, wird eine Glaspipette mit einem Durchmesser von ca. 1 µm, die gleichzeitig als Messelektrode dient, mit einem kleinen Membranausschnitt (engl. *patch*, Flicken) in Kontakt gebracht. Während ein geringer, negativer Druck vom Innenbereich der Pipette zugefügt wird, entwickelt sich ein sehr hoher Widerstand, die so genannte Gigaohm-Dichtung (engl. *giga seal*) von ca. 1 - 3 GΩ, zwischen der auf (üblicherweise)

-70 mV geklemmten Membran und der Glaspipette. Dieser Zustand wird als *cell-attached*-Modus bezeichnet.

3.5.1.1 *Whole-cell patch-clamp*-Technik

Bei der *whole-cell patch-clamp*-Technik wird im *cell-attached*-Modus die Membran unter der Pipette durch Saugen gebrochen. In diesem so genannten *whole-cell*-Modus ist nun ein direkter Kontakt zwischen dem Innenbereich der Elektrode, die mit einer internen Lösung gefüllt ist, und dem intrazellulären Raum möglich. Diese Messungen werden an autaptischen Neuronen durchgeführt, die aufgrund ihrer Isolation von anderen Zellen Synapsen auf eigene Dendriten, so genannte Autapsen, ausbilden (s. Abb. 2 A). Bei einem autaptischen Neuron können nun sowohl verschiedene Stimuli erzeugt werden, als auch die Antworten dieses Neurons auf die Stimuli über ihre Autapsen gemessen werden.

Durch Depolarisation der Zelle von -70 mV auf 0 mV für 2 ms wird ein exzitatorischer postsynaptischer Strom (kurz EPSC für engl. *excitatory postsynaptic current*) ausgelöst. Bei Hochfrequenz-Stimulationen werden EPSCs mit 10 Hz für 50 Stimuli bzw. 40 Hz für 100 Stimuli ausgelöst.

Durch die Applikation von 0,5 M Saccharose-Lösung für 6 s entlassen die fusionskompetenten Vesikel aus der Präsynapse Neurotransmitter und lösen ein Potential in der Postsynapse aus. So können die Größe des fusionskompetenten Vesikelvorrats (kurz RRP für engl. *ready releasable pool*) und die Wahrscheinlichkeit ihrer Freisetzung (kurz Pvr für engl. *release probability*) ermittelt werden. Der genaue Mechanismus, der durch die Saccharose-Applikation ausgelöst wird, ist unbekannt.

Es können die durch Applikation von 3 µM GABA und 30 µM Kainat für 2 s induzierten Ströme gemessen werden, da diese extrazellulär zugefügten Agonisten ihre entsprechenden Rezeptoren aktivieren.

Durch die Applikation von 300 nM TTX können spontane EPSCs, so genannte *minis* also mEPSCs, analysiert werden, da TTX die Natrium-Kanäle blockiert und somit eine Ausbildung von Aktionspotentialen gehemmt wird. Es werden dadurch lediglich Ströme durch spontane Freisetzungen aus fusionskompetenten Vesikeln gemessen.

3.5.1.2 *Perforated-patch-clamp*-Technik

Eine weitere Möglichkeit, einen Kontakt zwischen dem Innenbereich der Elektrode und dem intrazellulären Bereich herzustellen, ist die *perforated-patch-clamp*-Technik, bei der im *cell-attached*-Modus durch das in der internen Lösung enthaltene Antibiotikum Nystatin kleine Poren in der Zellmembran unter der Pipette entstehen. Nystatin fügt in Säugerzellmembranen kleine Poren ein, die aufgrund ihrer Größe selektiv für einfach geladene Ionen sind. Nach einer Einwirkzeit von ca. 10 Min wird der *whole-cell*-Modus erreicht.

Von *perforated-patch-clamp*-Messungen wird bei der Ermittlung so genannter Strom-Spannungs-Kurven Gebrauch gemacht, bei denen das Verhältnis vom induzierten Strom zu verschiedenen Haltepotentialen ermittelt wird. Veränderungen z.B. in der Zusammensetzung von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten würden Rezeptoreigenschaften wie die Durchlässigkeit von Kalzium-Ionen beeinflussen. Um diese Eigenschaft messen zu können, ist es wichtig, dass der Kalzium-Strom nur durch die entsprechenden Kanäle fließen kann und nicht etwa durch einen Riss unter der Pipette.

Ist der *whole-cell*-Modus erreicht, werden die durch Applikation von 30 µM Kainat für 2 s bzw. 3 µM GABA für 2 s induzierten Ströme bei den Haltepotentialen -70 mV, -30 mV, -10 mV, 10 mV, 30 mV und 50 mV gemessen. Vor und nach jeder einzelnen Messung bei einem der genannten Haltepotentiale wird der Strom bei -50 mV gemessen. In der späteren Analyse werden die Daten auf diese Zwischenmessungen normalisiert.

3.5.1.3 Gepaarte *patch-clamp*-Technik

Sollen ausschließlich die Eigenschaften an synaptischen Membranen untersucht werden, sind gepaarte *patch-clamp*-Messungen eine gute Methode. Im Prinzip wird sie wie die unter 3.5.1.1 beschriebene *whole-cell patch-clamp*-Technik durchgeführt. Die Messung erfolgt allerdings nicht an autaptischen Neuronen, sondern an zwei Neuronen, die miteinander Synapsen bilden. In einem Neuron wird durch die Elektrode ein Stimulus gegeben und in dem anderen Neuron wird das ankommende Aktionspotential gemessen (s. Abb. 2 B). Um zu verhindern, dass dieses Neuron ein zusätzliches Aktionspotential ausbildet, ist QX-314 in der internen Lösung des postsynaptischen Neurons enthalten. QX-314 blockiert die Natrium-Kanäle und verhindert somit das Ausbilden eines

Aktionspotentials. Ein zusätzliches Aktionspotential des postsynaptischen Neurons könnte in diesem Neuron die Antwort auf den ursprünglich gegebenen Stimulus durch eine zusätzliche autaptische Antwort verändern. Genauso könnte es in dem präsynaptischen Neuron die autaptische Antwort auf den ursprünglich gegebenen Stimulus beeinflussen. Mit Hilfe der internen QX-314-Lösung in der Messelektrode des postsynaptischen Neurons können somit saubere Signale gemessen werden.

Für die Analyse der Strom-Spannungs-Kurven wird die Membran der post-synaptischen Zelle nacheinander auf die Haltepotentiale -70 mV, -30 mV, -10 mV, 10 mV, 30 mV und 50 mV geklemmt und durch Depolarisation von -70 mV auf 0 mV für 2 ms in der präsynaptischen Zelle ein Aktionspotential ausgelöst.

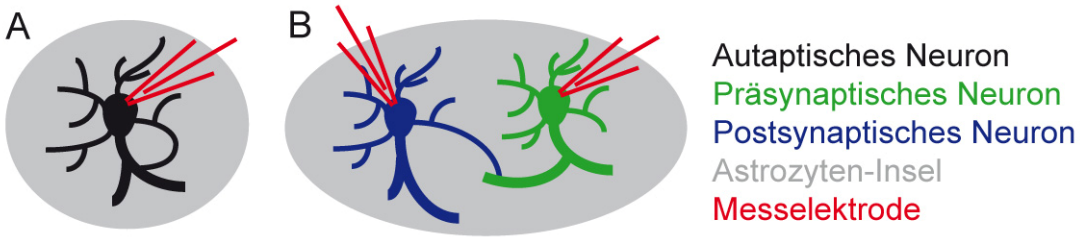

Abbildung 2: Schematische Darstellung der *patch-clamp*-Techniken. (A) *Patch-clamp*-Technik an einem autaptischen Neuron (*whole-cell* und *perforated-patch-clamp*). Das Neuron bildet aufgrund der Isolation auf einer Astrozyten-Insel Synapsen auf eigene Dendriten aus. Mit einer einzigen Messelektrode kann sowohl ein Stimulus gegeben werden als auch die Antwort darauf gemessen werden. (B) Gepaarte *patch-clamp*-Technik an zwei Neuronen, die miteinander Synapsen bilden. In dem präsynaptischen Neuron wird ein Stimulus gegeben, dessen Antwort im postsynaptischen Neuron gemessen werden kann.

3.5.2 Messplatz für *patch-clamp*-Techniken und Analyse der Daten

Die verwendeten *patch-clamp*-Messplätze bestehen aus einem schwingungsgedämpften Tisch über dem zur Abschirmung ein Faraday-Käfig aufgebaut ist. Auf diesem Tisch ist ein Mikroskop invertierter Bauweise (Olympus IX51) montiert, in dessen Objektebene eine Badkammer auf einem mobilen Tisch eingelassen ist, in dem die Messungen durchgeführt werden.

Als Messelektrode dient ein chlorierter Silberdraht, auf den die mit intrazellulärer Lösung gefüllte Glaspipette gesteckt wird. Die Glaspipetten werden einheitlich mit einem P-97 *Puller* aus Glaskapillaren (1,5 mm äußerer und 0,86 mm innerer Durchmesser)

gezogen. Der Widerstand der Elektrode in der Badkammer sollte 2 - 4 MΩ betragen. Die Referenzelektrode ist mit Silberchlorid beschichtet und wir in die Badlösung getaucht. Ein elektronisch steuerbares Perfusionssystem sorgt durch Öffnen und Schließen von Ventilen für die schnelle Applikation gewünschter Lösungen durch ein als *flowpipe* bezeichnetes Düsensystem, das mit einem Schrittmotorsystem in die richtige Position gebracht werden kann. Für einen konstanten Flüssigkeitsspiegel in der Badkammer sorgt ein angeschlossenes Pumpensystem.

Die Messpipetten können mit Hilfe eines Mikromanipulator-Systems exakt an die zu messende Zelle herangeführt werden. Die gemessenen synaptischen Ströme werden über einen Axon 700B Verstärker aufgezeichnet und über eine Digidata 1440A Kopplungsstelle an einen Windows PC Rechner übertragen. Als Steuerungs- und Aquisitionssoftware diente Clampex 10.1 (Molecular Devices). Die Analyse der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software Axograph 4.9.

4. ERGEBNISSE

Um die Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für den Aufbau und die Funktion glutamaterger Synapsen zu untersuchen, wurden Experimente mit einem transgenen Mausmodell und Wildtyp-Kontrollen verglichen. Die 4.1G/N-Doppelmutanten (in den folgenden Abbildungen abgekürzt als DKO) wurden jeweils durch eine konditionelle Mutagenese-Strategie der Gene 4.1G und 4.1N generiert. In dem 4.1G-Gen aus der Maus (*Ebp4.1L2*) und dem 4.1N-Gen aus der Maus (*Ebp4.1L1*) wurde jeweils das erste kodierende Exon ausgeschnitten. Die so entstandenen 4.1G-*knockout*-Mäuse wurden mit 4.1N-Mausmutanten verpaart, um 4.1G/N-Doppelmutanten zu erzeugen (Wozny *et al*., 2009).

4.1 Expressionsmuster der Proteine 4.1G und 4.1N im Zentralnervensystem der Maus

Zunächst wurden 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen auf die Expression der Proteine 4.1G und 4.1N im Zentralnervensystem der Maus untersucht. Dazu wurden aus den Gehirnen einzelne Regionen herauspräpariert und P2-Fraktionen hergestellt, welche die ungereinigten, synaptosomalen Sedimente enthalten. Die Proteine aus den einzelnen Regionen des Zentralnervensystems wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mittels des ECL-Western-Blot-Verfahrens analysiert.

Beide Proteine werden in allen untersuchten Regionen des Zentralnervensystems in Wildtypen exprimiert (s. Abb. 3 oben). Dabei wird Protein 4.1G in allen Regionen vergleichbar stark exprimiert, die Expression von Protein 4.1N hingegen unterscheidet sich in den einzelnen Regionen des Zentralnervensystems. In den Regionen des *Bulbus olfactorius*, *Cortex*, *Corpus striatum* und *Hippocampus* wird Protein 4.1N relativ stark exprimiert, im *Truncus cerebri* und der *Medulla spinalis* hingegen nur sehr schwach. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass in den 4.1G/N-Doppelmutanten (s. Abb. 3 unten) kein Protein 4.1G exprimiert wird, jedoch noch eine Restexpression der kürzeren Isoform von Protein 4.1N vorzufinden ist, wenngleich erheblich schwächer als in den Wildtypen.

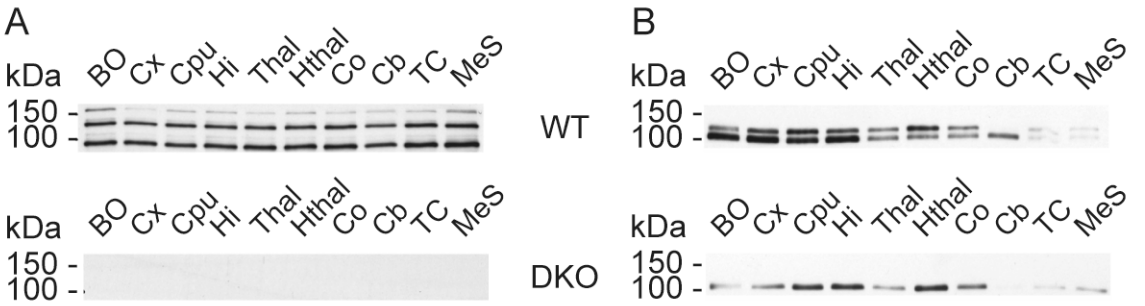

Abbildung 3: Expressionsmuster der Proteine 4.1G und 4.1N im ZNS von Wildtypen und 4.1G/N-Doppelmutanten. (A) Western-Blot-Analyse mit gegen Protein 4.1G gerichteten Antikörpern, die ein Epitop im ersten kodierenden Exon erkennen. Obere Abbildung: Banden für Protein 4.1G werden in allen untersuchten Regionen des ZNS in Wildtypen (WT) erkannt. Untere Abbildung: In den 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) werden keine Banden für Protein 4.1G erkannt. (B) Western-Blot-Analyse mit monoklonalen, gegen Protein 4.1N gerichteten Antikörpern. Obere Abbildung: Banden für Protein 4.1N werden in allen untersuchten Regionen des ZNS in WT erkannt. Untere Abbildung: In den DKO werden Banden der kürzeren Isoform von Protein 4.1N erkannt. BO, *Bulbus olfactorius* (Riechkolben); Cx, *Cortex* (Hirnrinde); Cpu, *Corpus striatum*; Hi, *Hippocampus*; Thal, *Thalamus*; Hthal, *Hypothalamus*; Co, *Colliculus*; Cb, *Cerebellum* (Kleinhirn); TC, *Truncus cerebri* (Hirnstamm); MeS, *Medulla spinalis* (Rückenmark).

4.2 Strukturelle Analysen der Spleißvarianten von 4.1N

Während in den 4.1G/N-Doppelmutanten Protein 4.1G nicht exprimiert wird, ist in allen untersuchten Regionen des Zentralnervensystems eine Restexpression von Protein 4.1N vorhanden (s. Abb. 3). Die Struktur dieser verbleibenden 4.1N Variante sollte in 4.1N-Mutanten, aus denen die 4.1G/N-Doppelmutanten hervorkommen (Wozny *et al*., 2009), analysiert und mit den Varianten in Wildtypen verglichen werden. Dazu wurden in Wildtypen und 4.1N-Mutanten Experimente mit RACE-PCR durchgeführt. Dabei wurde isolierter RNS aus dem Gehirn an das 5'-Ende (5'-RACE) bzw. an das 3'-Ende (3'-RACE) ein kurzer Abschnitt mit einer definierten DNS-Sequenz angefügt, der so genannte RACE-Adapter. Nach reverser Transkription in cDNS konnten mit Hilfe von Oligonukleotiden, die innerhalb dieser Adapter-Sequenzen liegen, und genspezifischen Oligonukleotiden, die innerhalb der für 4.1N kodierenden DNS-Sequenz liegen (s. Abb. 4 B), PCR-Reaktionen durchgeführt werden, durch die das 5'-Ende bzw. das 3'-Ende der für 4.1N kodierenden DNS-Sequenz amplifiziert wurden. Die gewonnenen Transkripte wurden dann isoliert, in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und sequenziert.

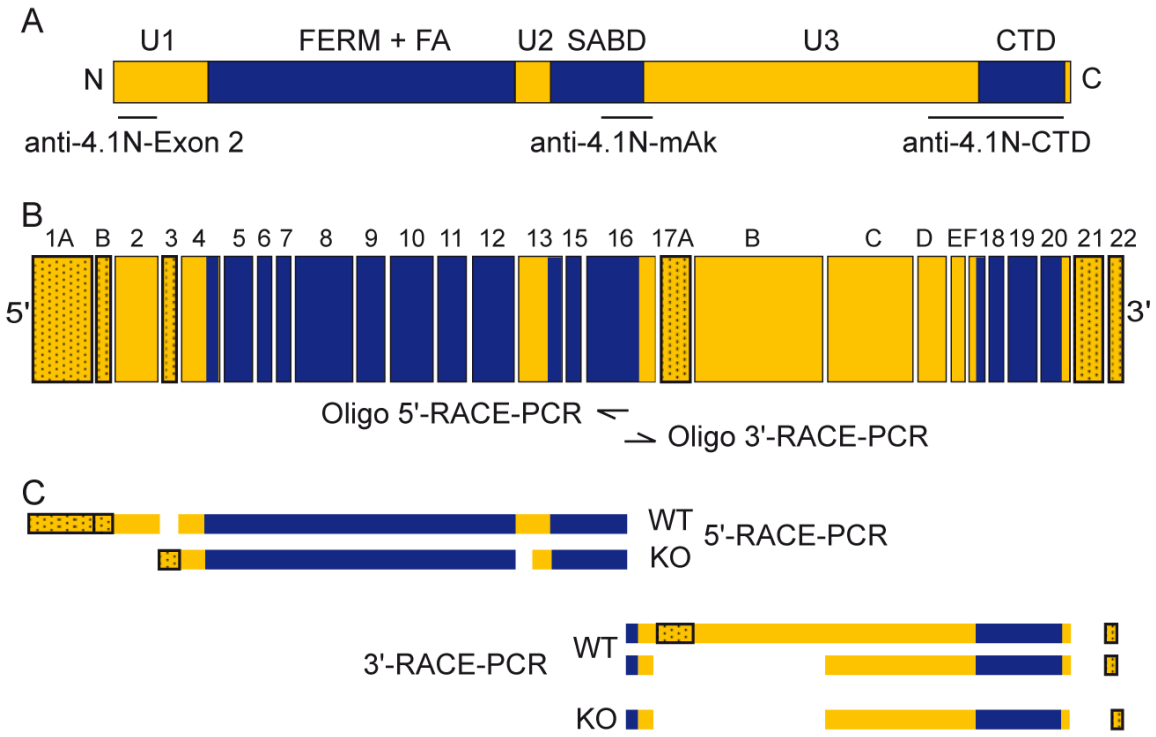

Abbildung 4: Charakterisierung der 4.1N-Isoformen in 4.1N-Mutanten und Wildtypen mittels RACE-PCR. (A) Schematische Darstellung des Proteins 4.1N aus der Maus. Die Positionen der Epitope der gegen 4.1N gerichteten Antikörper, die in dieser Arbeit genutzt wurden, sind eingezeichnet. (B) Exon-Karte des 4.1N-Gens (*Epb41L1*) aus dem Gehirn der Maus mit der Nummerierung aus Ramez *et al*. (2003). Die Positionen der spezifischen 5'-RACE-Oligos und spezifischen 3'-RACE-Oligos sind durch Pfeile markiert. (C) Schematische Darstellung der Transkripte aus Wildtypen (WT) und 4.1N-Mutanten (KO). U1 - 3, einzigartige (engl. *unique)* Region 1 - 3; FERM, Vier-Punkt-Eins (engl. *four-point-one*), Ezrin, Radixin, Moesin Homologie Domäne; FA, FERM-anschließende Region; SABD, Spektrin-Aktin-Bindedomäne; CTD, C-terminale Domäne. Einzigartige Regionen sind gelb dargestellt, innerhalb der 4.1-Familie konservierte Regionen blau. Nicht transkribierte Exone sind gepunktet dargestellt.

Alle Wildtyp-Transkripte, die aus der 5'-RACE-PCR gewonnen wurden, enthalten Exon 2 mit dem Start-Kodon, jedoch nicht Exon 3, wohingegen alle entsprechenden Transkripte aus den 4.1N-Mutanten erst mit Exon 3 beginnen. Das Start-Kodon in den 4.1N-Mutanten ist in Exon 4 lokalisiert. Des Weiteren fehlt in den 4.1N-Mutanten der erste Teil von Exon 13. Mit der 3'-RACE-PCR wurden im Wildtyp zwei verschiedene Gruppen von Transkripten gewonnen. Der eine Teil der Transkripte kodiert für die lange Isoform von 4.1N, welche die Exone 17A und 17B mit einschließt. Der andere Teil der Transkripte kodiert für die kurze Isoform von 4.1N, in der die Exone 17A und 17B fehlen. In den 4.1N-Mutanten wurden nur Transkripte gefunden, die weder Exon 17A noch Exon 17B

enthalten und dem Teil der Transkripte aus den Wildtypen gleichen, die für die kurze Isoform von 4.1N kodieren (s. Abb. 4 C).

In Wildtypen schließt die für die lange Isoform von 4.1N kodierende DNS-Sequenz die Exone 17A und 17B ein, die in der für die kurze Isoform kodierenden DNS-Sequenz fehlen. Der in den 4.1N-Mutanten verbleibenden Variante fehlen ebenfalls die Exone 17A und 17B. Zu der für die kurze Isoform kodierenden DNS-Sequenz in Wildtypen unterscheidet sie sich jedoch in der N-terminalen Sequenz und dort vor allem in der Lokalisation des Start-Kodons. Die verleibende Variante in den 4.1N-Mutanten und somit auch in den 4.1G/N-Doppelmutanten ähnelt der kurzen Isoform von 4.1N, ist mit ihr aber nicht identisch.

4.3 Expression von Protein 4.1N im *Hippocampus*

In den 4.1G/N-Doppelmutanten ist trotz der Mutagenese-Strategie in allen untersuchten Regionen des Zentralnervensystems noch eine Restexpression von Protein 4.1N vorhanden (s. Abb. 3). Die DNS-Struktur dieser verbleibenden Variante wurde im zuvor beschriebenen Experiment bereits analysiert (s. Abb. 4 C). Die Protein-Struktur kann mit Hilfe des ECL-Western-Blot-Verfahrens und der Immundetektion mit verschiedenen gegen 4.1N gerichteten Antikörpern untersucht werden. Der Antikörper anti-4.1N-Exon 2 erkennt die ersten 15 Aminosäuren des N-Terminus von Protein 4.1N, anti-4.1N-mAk eine C-terminale Region der Spektrin-Aktin-Bindedomäne und anti-4.1N-CTD den C-Terminus (s. Abb. 4 A). Während der erste Antikörper lediglich Banden der langen Isoform von Protein 4.1N in hippocampalen P2-Fraktionen aus Wildtypen erkennt, erkennen die letzten beiden Antikörper sowohl Banden der langen als auch der kurzen Isoform von Protein 4.1N in Wildtypen. In den 4.1G/N-Doppelmutanten werden lediglich Banden einer kürzeren Isoform erkannt (s. Abb. 5 A - C).

Erste Experimente zur Untersuchung der glutamatergen Synapsen sollten im *Hippocampus* durchgeführt werden. Deshalb musste dort neben der DNS- und Protein-Struktur der verbleibenden Variante von 4.1N vor allem die Restexpression von Protein 4.1N bestimmt werden. Dazu wurden zunächst die Proteine aus P2-Fraktionen des *Hippocampus* isoliert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und eine quantitative Analyse der mit Hilfe verschiedener für 4.1N spezifischer Antikörper detektierten Banden durchgeführt.

Bei der quantitativen Analyse wurden die Signalstärken der Banden von Protein 4.1N durch die Signalstärken der Banden einer Ladekontrolle (hier Tubulin) aus derselben Probe dividiert. Mit der Ladekontrolle wird die auf ein SDS-Gel „geladene“ Gesamtproteinmenge untersucht, da sich diese Mengen trotz vorheriger Konzentrationsbestimmungen durch z.B. die nachfolgenden Pipettierschritte leicht unterscheiden können. Zur Ladekontrolle wird stets ein Protein gewählt, das in den zu vergleichenden Proben gleiche Proteinmengen aufweist. In allen aufgeführten Experimenten dieser Arbeit wurden je nach Signalstärke entweder Tubulin oder Rab3a als Ladekontrolle eingesetzt, da bei diesen beiden Proteinen von einer unveränderten Proteinmenge in der Abwesenheit der Proteine 4.1G und 4.1N ausgegangen werden kann. Die so normalisierten Werte aus den Wildtyp-Proben wurden auf 100 % festgelegt und die Werte aus den Proben der 4.1G/N-Doppelmutanten dazu entsprechend ins Verhältnis gesetzt.

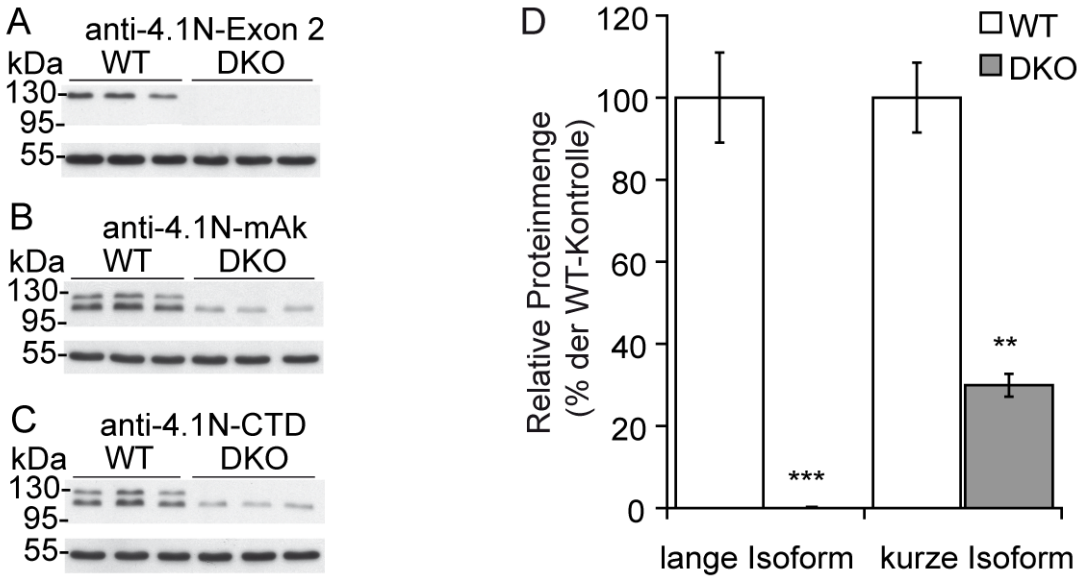

Abbildung 5: Restexpression von Protein 4.1N im *Hippocampus* der 4.1G/N-Doppelmutanten. (A - C) Western-Blots mit Proben aus *Hippocampus*-Präparationen (P2-Fraktionen) von 3 Wochen alten Wildtypen (WT, links) und 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO, rechts) mit den folgenden Antikörpern: (A) Anti-4.1N-Exon 2, der gegen die ersten 15 Aminosäuren des N-Terminus gerichtet ist. (B) Anti-4.1N monoklonaler Antikörper (anti-4.1N-mAk), der eine C-terminale Region der Spektrin-Aktin-Bindedomäne erkennt. (C) Anti-4.1N-CTD, der den C-Terminus von 4.1N erkennt. (D) Quantitative Analyse der detektierten Banden in WT und DKO aus den Abbildungen (B) und (C) mit Tubulin (55 kDa) als Ladekontrolle. (WT, weiß, $n = 6$; DKO, grau, $n = 6$, ** $P < 0{,}01$, *** $P < 0{,}001$, *t*-Test; ± Standardfehler)

Die quantitative Analyse der durch die Antikörper anti-4.1N-mAk und anti-4.1N-CTD detektierten Banden ergibt eine Restexpression von 30,0 % (± 2,8 %) einer kurzen Isoform von Protein 4.1N in 4.1G/N-Doppelmutanten im Vergleich zu Wildtypen (100,0 % ± 8,5 %) und einen Verlust der langen Isoform (DKO = 0 % ± 0 %, WT = 100 % ± 11 %, s. Abb. 5 D). Da das berechnete Verhältnis der kurzen Isoform zur langen Isoform 2,6 (± 0,7) ist, entsprechen eine Reduktion um 70 % einer kurzen Isoform und der komplette Verlust der langen Isoform insgesamt einer Reduktion der totalen Protein 4.1N-Expression in 4.1G/N-Doppelmutanten von 78 %. Das Verhältnis der Expression von Protein 4.1N zu Protein 4.1G entspricht 1:0,94 in postsynaptischen Präparationen aus dem *Hippocampus* der Maus (Trinidad *et al*., 2008). Somit bewirken der Verlust von Protein 4.1G und die erhebliche Reduktion von Protein 4.1N im *Hippocampus* der 4.1G/N-Doppelmutanten eine Reduktion der kombinierten Expression von zusammen 88 - 89 % im Vergleich zu den Wildtypen.

4.4 Synaptische Morphologie im *Hippocampus*

Ziel der Arbeit war die Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für den Aufbau und die Funktion glutamaterger Synapsen zu ermitteln, indem diese zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen verglichen wurden. Deshalb musste zuvor jedoch geprüft werden, ob die Proteine 4.1G und 4.1N wichtig für die Ausbildung dieser Synapsen sind und ob sich in Wildtypen und 4.1G/N-Doppelmutanten die Anzahl an Synapsen unterscheidet.

Dazu wurden immunhistochemische Färbungen von prä- und postsynaptischen Proteinen in 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen durchgeführt und die Anzahl der synaptischen Markierungen im *Hippocampus* miteinander verglichen. Dabei dienten gegen ProSAP1 (für engl. *proline-rich synapse-associated protein-1*) gerichtete Antikörper zur Markierung der glutamatergen Postsynapsen und eine Kombination aus gegen VGLUT1 und VGLUT2 (für engl. *vesicular glutamate transporter*) gerichteten Antikörpern zur Markierung der glutamatergen Präsynapsen (s. Abb. 6 A). Als sekundäre Antikörper wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper genutzt, die sich in der Farbe ihrer Emissions-Spektren unterscheiden: Nach Anregung im entsprechenden Wellenlängenbereich erscheinen mit ProSAP1 gefärbte Strukturen rot, mit VGLUT1/2 gefärbte Strukturen grün und Überlagerungen unterschiedlicher Strukturen gelb.

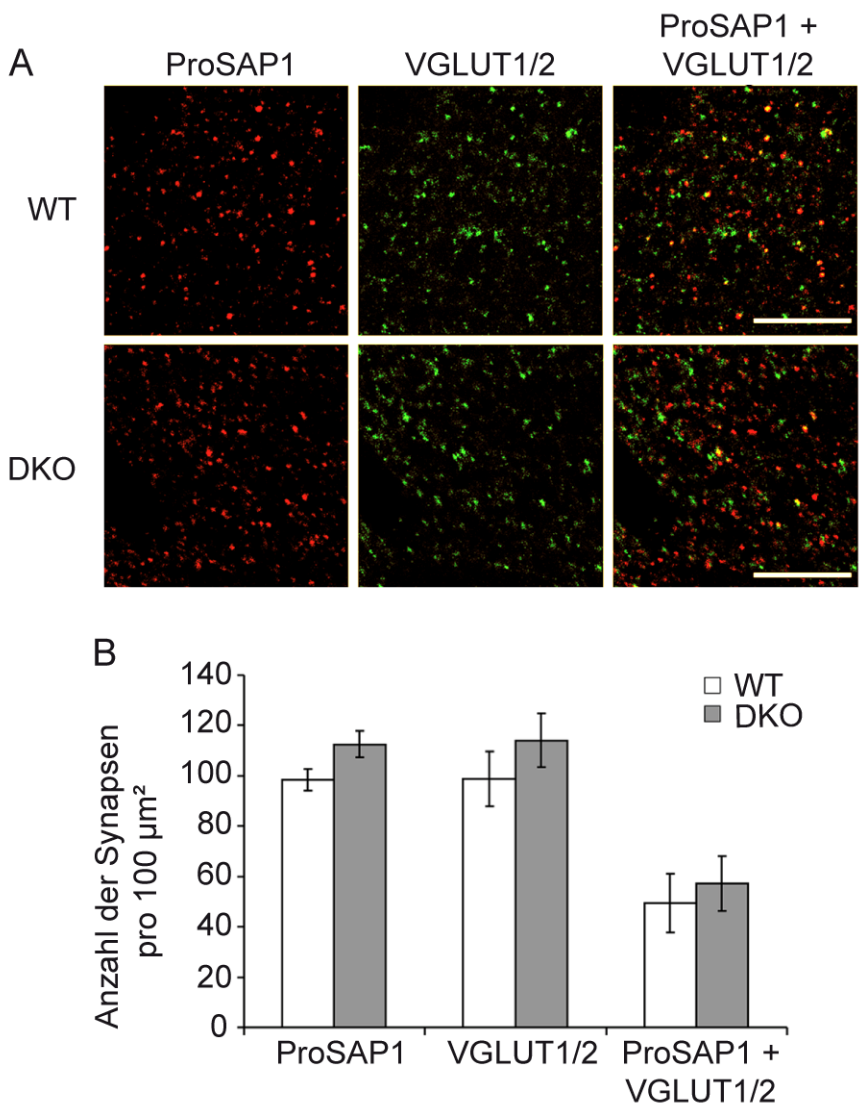

Abbildung 6: Anzahl der Synapsen im *Hippocampus* von 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen. (A) In 18 µm Hirnschnitten von 3 Wochen alten 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) und Wildtypen (WT) wurden im *Stratum radiatum* der hippocampalen Region CA1 mit Markern für exzitatorische Postsynapsen (ProSAP1, rot) und exzitatorische Präsynapsen (VGLUT1/2, grün) immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Der gezeigte Maßstab entspricht 8 µm. (B) Isolierte und überlagerte Markierungen von ProSAP1 und VGLUT1/2 in der CA1 Region von DKO und WT. (WT, n = 3; DKO, n = 3; ± Standardabweichung)

Die Anzahl der jeweiligen Markierungen sowie der überlagerten Markierungen wurden im *Stratum radiatum* der CA1 Region im *Hippocampus* untersucht. Dazu wurden mit einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop zunächst Bilder aufgenommen, die dann mit dem Computer-Programm Analysis (Olympus) auf die Anzahl der gefärbten Partikel innerhalb einer definierten Fläche analysiert wurden.

Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der gefärbten ProSAP1-Partikel oder der gefärbten VGLUT1/2-Partikel zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen festzustellen. Ebenso war die Anzahl der Partikel mit überlagerten Färbungen in 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen gleich (s. Abb. 6 B).

Die berechnete Anzahl an glutamatergen Synapsen pro 100 μm^2 im *Stratum radiatum* des *Hippocampus* von 4.1G/N-Doppelmutanten unterscheidet sich also nicht von Wildtypen. Da die Synapsenanzahl in 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen gleich ist, konnten nun zunächst der Aufbau und schließlich die Funktion glutamaterger Synapsen zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen verglichen werden.

4.5 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die Lokalisation von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten im *Hippocampus*

In früheren Studien wurden Interaktionen der Proteine 4.1G und 4.1N mit den AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 nachgewiesen. Es besteht die Vermutung, dass die Proteine 4.1G und 4.1N für die Lokalisation und Verankerung von AMPA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran eine wichtige Rolle spielen (Cai *et al*., 2002; Coleman *et al*., 2003; Rumbaugh *et al*., 2003). Deshalb sollte zunächst der Aufbau glutamaterger Synapsen zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen verglichen werden. Dazu wurden sowohl verschiedene synaptische Fraktionen als auch hippocampale Neuronen aus 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen auf die Lokalisation und relativen Proteinmengen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten hin untersucht.

4.5.1 AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in Synaptosomen

Zunächst sollten die Proteinmengen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in synaptischen Fraktionen, den so genannten Synaptosomen, zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen verglichen werden. Dazu wurden Synaptosomen durch Dichtegradienten-Zentrifugation aus Mausgehirnen isoliert. Die enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Hilfe einer quantitativen Analyse von Odyssey-Western-Blots auf die Proteinmengen verschiedener Rezeptor-Untereinheiten hin untersucht. Dazu gehörten die Bindungspartner GluR1 und

GluR4, die mit den Proteinen 4.1G und 4.1N interagieren (Cai *et al*., 2002; Coleman *et al*., 2003; Rumbaugh *et al*., 2003).

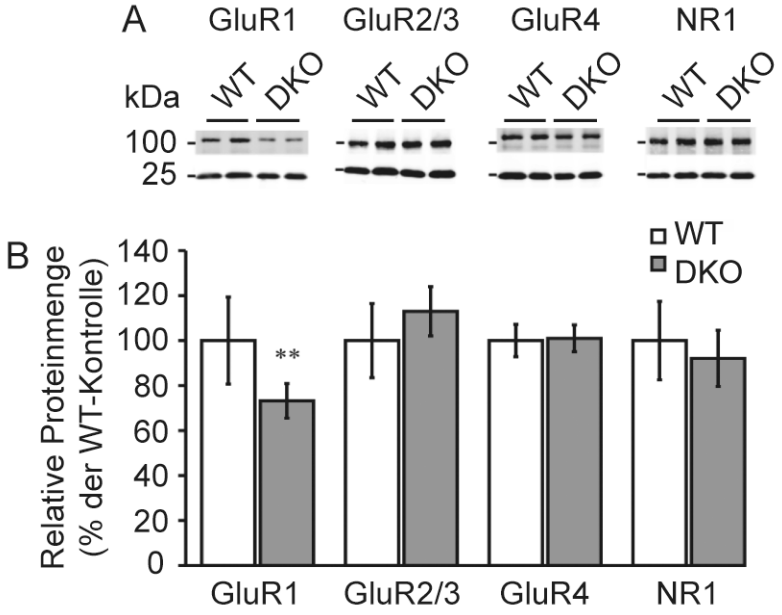

Abbildung 7: Relative Proteinmengen von Rezeptor-Untereinheiten in Synaptosomen von 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen. (A) Western-Blots mit synaptosomalen Proben von 3 Wochen alten Tieren mit Banden, die durch die gegen die angegebenen Rezeptor-Untereinheiten gerichteten Antikörper detektiert wurden (bei ca. 100 kDa). Gegen Rab3a (25 kDa) gerichtete Antikörper wurden zur Überprüfung der Gesamtproteinmenge verwendet. (B) Die Proteinmengen in den synaptosomalen Fraktionen wurden durch eine quantitative Analyse der detektierten Banden in den entsprechenden Western-Blots in (A) ermittelt und sind für die 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) als Prozentsatz der Proteinmengen in den Wildtypen (WT) dargestellt. (DKO, grau, $n = 6$, ** $P < 0{,}01$, *t*-Test; WT, weiß, $n = 6$; ± Standard-abweichung)

Zur quantitativen Analyse wurden die Signale der zu untersuchenden Proteine auf die dazu gehörigen Signale der Ladekontrolle Rab3a wie unter 4.3 beschrieben normalisiert. Die Werte aus den Wildtyp-Kontrollen wurden auf 100 % festgelegt und die Werte aus den 4.1G/N-Doppelmutanten entsprechend dazu ins Verhältnis gesetzt.

Sowohl die nicht 4.1-bindenden NR1 und GluR2/3 als auch der Interaktionspartner GluR4 werden in den Synaptosomen aus 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen in gleichen Mengen exprimiert. Die Proteinmenge der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR1 hingegen ist in 4.1G/N-Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp (100 % ± 19 %) auf 73 % (± 7%) reduziert (s. Abb. 7 B).

4.5.2 AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in hippocampalen PSDs

Die Reduktion der GluR1-Expression in Synaptosomen wurde in Synaptosomen-Präparationen aus dem gesamten Gehirn beobachtet. Im Folgenden sollte sich die Untersuchung auf eine einzelne Gehirnregion, den *Hippocampus*, fokussieren. Des Weiteren sollten die postsynaptischen Bereiche des *Hippocampus* analysiert werden. Synaptosomen enthalten Proteine sowohl aus prä- als auch aus postsynaptischen Bereichen, deshalb sollten im nächsten Schritt die Proteinmengen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1, GluR2/3 und GluR4 in postsynaptischen Fraktionen, den PSD-Fraktionen, aus dem *Hippocampus* untersucht werden.

Die PSD-Fraktionen wurden aus dem *Hippocampus* durch einen Solubilisierungsschritt mit dem Detergenz Triton X-100 aus hippocampalen P2-Fraktionen gewonnen. Dabei lässt sich eine Triton X-100 lösliche Fraktion durch Ultrazentrifugation von einer Triton X-100 unlöslichen PSD-Fraktion trennen. Die in der PSD-Fraktion enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose-membran übertragen. Im ECL-Western-Blot-Verfahren wurden die Proteinmengen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten quantitativ analysiert, wobei Rab3a als Ladekontrolle diente. Da in diesem Verfahren nur geringe Proteinmengen gewonnen werden konnten, wurden nur die Proteinmengen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1, GluR4 und GluR2/3 untersucht und nicht wie zuvor auch die NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR1 (s. Abb. 8 A).

Wie in den synaptosomalen Fraktionen aus dem Gehirn waren auch in den PSD-Fraktionen aus dem *Hippocampus* keine Unterschiede der relativen Proteinmengen von GluR4 zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen festzustellen. Die Proteinmengen von GluR1 allerdings sind in den PSD-Fraktionen aus 4.1G/N-Doppelmutanten um 17 % reduziert (DKO = 83 % ± 5 %, WT = 100 % ± 3 %). Auch die Proteinmengen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR2/3 sind in den PSDs von 4.1G/N-Doppelmutanten um 18 % reduziert (s. Abb. 8 B, DKO = 82 ± 5 %, WT = 100 ± 3 %).

In Abwesenheit der Proteine 4.1G und 4.1N sind die relativen Proteinmengen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR2/3 in den postsynaptischen Fraktionen des *Hippocampus* vermindert. Die Proteinmengen von GluR1 und GluR2/3 betragen im Vergleich zu Wildtypen 82 - 83 %.

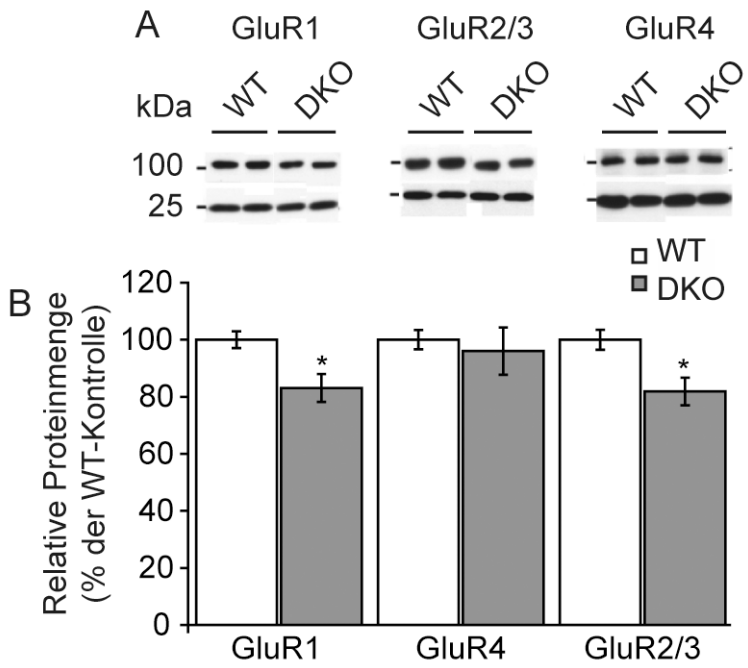

Abbildung 8: Relative Proteinmengen von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in hippocampalen PSD-Fraktionen von 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen. (A) Western-Blots mit hippocampalen PSD-Proben von 3 Wochen alten Tieren mit Banden, die durch die gegen die angegebenen AMPA-Rezeptor-Untereinheiten gerichteten Antikörper detektiert wurden (bei ca. 100 kDa). Gegen Rab3a (25 kDa) gerichtete Antikörper wurden zur Überprüfung der Gesamtproteinmenge verwendet. (B) Die in PSD-Fraktionen aus dem *Hippocampus* enthaltenen Proteinmengen wurden durch eine quantitative Analyse der detektierten Banden in entsprechenden Western-Blots in (A) ermittelt und sind für DKO als Prozentsatz der Proteinmengen in WT dargestellt. (DKO, grau, $n = 7$, * $P < 0{,}05$; WT, weiß, $n = 7$; ± Standardfehler)

4.5.3 AMPA-Rezeptor-Untereinheiten an der Plasmamembran hippocampaler Neuronen

Die Proteinmengen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR2/3 sind *in vivo* in synaptischen Fraktionen des *Hippocampus* in Abwesenheit der Proteine 4.1G und 4.1N reduziert. Um eine postsynaptische Signalweiterleitung zu gewährleisten müssen Rezeptoren an die Zelloberfläche, also an die postsynaptische Plasmamembran transportiert werden. Eine mögliche Funktion der Proteine 4.1G und 4.1N in dieser Hinsicht wurde als nächstes in kultivierten hippocampalen Neuronen aus 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen *in vitro* untersucht.

In diesem Experiment wurden die hippocampalen Neuronen nach drei Wochen in Kultur (DIV 21), also wenn sie ausdifferenziert waren und die Synapsenbildung

abgeschlossen war, mit einem Biotin-Reagenz inkubiert, das an Proteine bindet. Da das Biotin nicht in die Zelle eindringen konnte, wurden ausschließlich Proteine, die an der Plasmamembran der hippocampalen Neuronen lokalisiert waren, biotinyliert. Nach dem Aufschluss der Zellen mit Lysis-Puffer wurden die Gesamtlysate (= Total) mit Biotin-bindenden Avidin-Agarose-Kügelchen inkubiert und die biotinylierten Proteine dabei an diese gekoppelt. Die an der Plasmamembran lokalisierten Proteine (= PM) wurden so von den intrazellulären Proteinen getrennt. Die Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und im ECL-Western-Blot-Verfahren quantitativ auf die Proteinmengen von GluR1 und GluR4 analysiert (s. Abb. 9 A), wobei Rab3a als Ladekontrolle diente. Auch hier wurden die Werte aus den Wildtypen auf 100 % festgelegt und die Werte aus 4.1G/N-Doppelmutanten entsprechend dazu ins Verhältnis gesetzt. Des Weiteren wurde der Quotient aus den Proteinmengen an der Plasmamembran zu den Proteinmengen in den Gesamtlysaten der Zellen berechnet, um den Anteil der membranständigen Proteine zu untersuchen. In diesem Experiment musste auf eine Analyse der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR2/3 aufgrund der sehr geringen Proteinmengen verzichtet werden. Die Untersuchung konzentrierte sich deshalb auf die Bindungspartner GluR1 und GluR4.

Weder für GluR1 noch für GluR4 konnten signifikante Unterschiede in den Konzentrationen an der Plasmamembran zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen festgestellt werden (s. Abb. 9 C). Die Gesamtkonzentrationen der beiden AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 in den Lysaten der Zellen sind ebenfalls nicht signifikant verschieden (s. Abb. 9 D). Das Verhältnis der Konzentration von GluR1 an der Plasmamembran zur Gesamtkonzentration jedoch ist in 4.1G/N-Doppelmutanten um 40 % höher als in Wildtypen (WT = 1,1 ± 0,1, DKO = 1,5 ± 0,1). Für GluR4 ist das Verhältnis dieser Konzentrationen nicht verschieden (s. Abb. 9 B).

In der Abwesenheit der Proteine 4.1G und 4.1N ist *in vitro* der Anteil der an der Plasmamembran lokalisierten GluR1 zu der Gesamtkonzentration von GluR1 in hippocampalen Neuronen an DIV 21 höher als in Wildtypen.

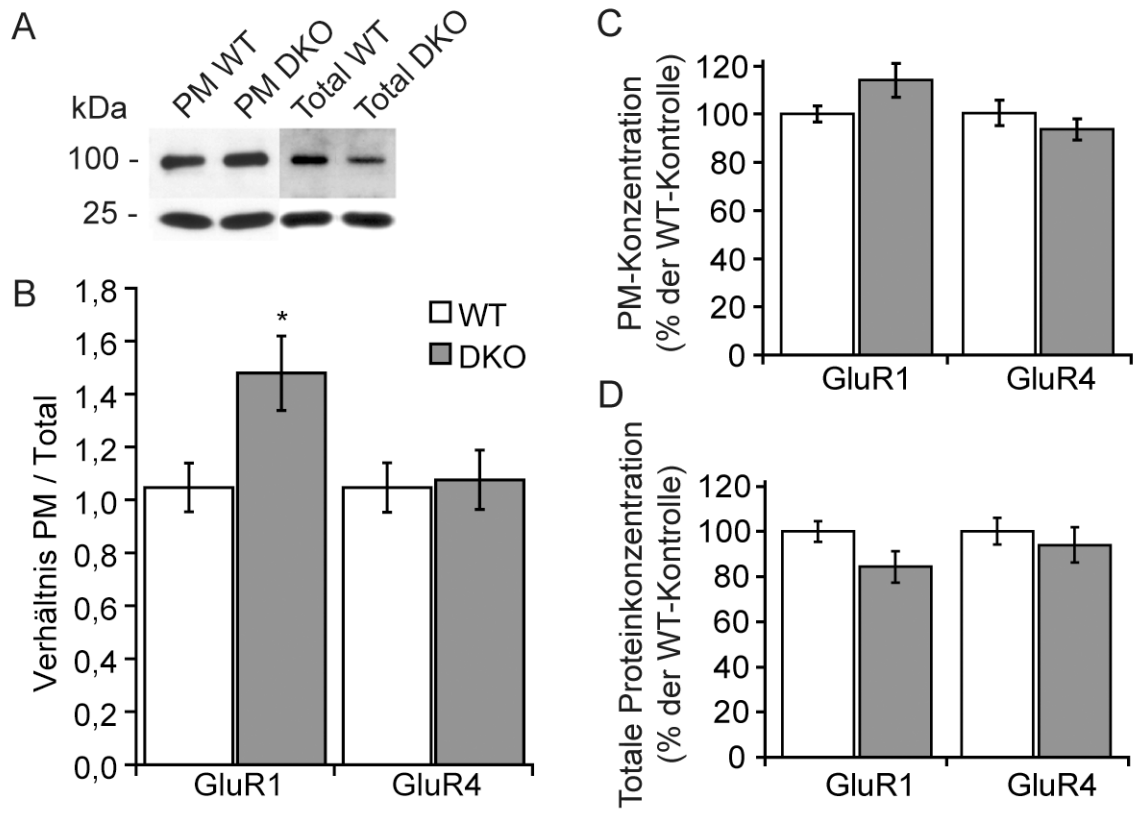

Abbildung 9: Lokalisation der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in kultivierten Neuronen aus dem *Hippocampus* an DIV 21. (A) Western-Blot mit Banden, die durch die gegen GluR1 gerichteten Antikörper an der Plasmamembran (PM) und im Gesamtlysat der Zellen (Total) detektiert wurden. Gegen Rab3a (25 kDa) gerichteten Antikörper wurden zur Überprüfung der Gesamtproteinmenge verwendet. (B) Das Verhältnis der Proteinkonzentration an der Zelloberfläche (PM) zur gesamten Proteinkonzentration (Total) in den 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) und Wildtypen (WT). (C) Die Lokalisation an der Plasmamembran wurde durch Biotinylierung analysiert. Die Proteinkonzentrationen in den DKO sind als Prozentsatz der Konzentrationen in den WT dargestellt. (D) Die Gesamtkonzentrationen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten wurden im Lysat der Zellen vor der Kopplung der biotinylierten Proteine bestimmt. (DKO, grau, n = 12, * $P < 0{,}05$, t-Test; WT, weiß, n = 12; ± Standardfehler)

4.6 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die Phosphorylierung von GluR1 im *Hippocampus*

In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten einen wichtigen Aspekt für den Transport in die Postsynapse und für die Zusammensetzung der Untereinheiten darstellt (Derkach *et al*., 2007). Diese Modifikation ist demnach sowohl für den Aufbau als auch für die Funktion der glutamatergen Synapsen von Bedeutung. Da in der Aminosäuresequenz der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR1

auf die 4.1N-bindende Region unmittelbar verschiedene Phosphorylierungs-Stellen folgen (Malinow und Malenka, 2002), wurde untersucht, ob die Proteine 4.1G und 4.1N einen Einfluss auf die Phosphorylierung von GluR1 besitzen. Dazu wurden spezifische Antikörper eingesetzt, die gegen an Serin 831 phosphoryliertes GluR1 bzw. gegen an Serin 845 phosphoryliertes GluR1 gerichtet sind (s. Abb. 10).

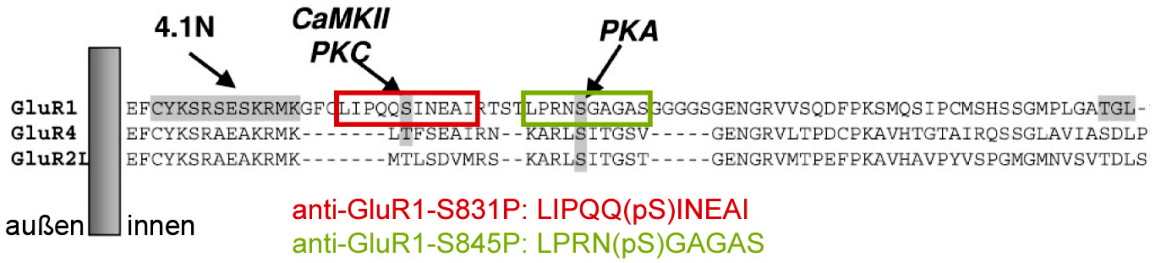

Abbildung 10: Phosphorylierung von GluR1. Aminosäuresequenzen des zytoplasmatischen C-Terminus der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten mit Phosphorylierungs-Stellen (kursiv) und der Bindungsstelle für Protein 4.1N. Die Epitope der phospho-spezifischen Antikörper anti-GluR1-S831P und anti-GluR1-S845P sind farblich markiert. Modifiziert nach Malinow und Malenka (2002).

4.6.1 Anteil phosphorylierter GluR1 in hippocampalen PSDs

Um herauszufinden, ob die Proteine 4.1G und 4.1N eine Rolle für die Phosphorylierung von GluR1 spielen, sollte das Verhältnis der Konzentrationen der phosphorylierten GluR1 zu den Gesamtkonzentrationen von GluR1 untersucht werden und somit der Anteil an phosphorylierten GluR1 in hippocampalen PSD-Fraktionen in 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen verglichen werden. Dazu wurden von den Nitrozellulosemembranen aus 4.5.2 die GluR1-Antikörper entfernt und neu mit den phosphorylierungs-spezifischen GluR1-Antikörpern (anti-GluR1-S831P und anti-GluR1-S845P) inkubiert.

Für eine quantitative Analyse der detektierten Banden wurden die Werte für die Proteinmengen der phosphorylierten GluR1 aus den Wildtypen auf 100 % gesetzt und die Werte aus den 4.1G/N-Doppelmutanten entsprechend dazu ins Verhältnis. Die so ermittelten relativen Proteinmengen der phosphorylierten GluR1 wurden letztendlich durch die entsprechenden Werte der GluR1-Konzentration aus 4.5.2 geteilt, um den Anteil an phosphorylierten GluR1 zur Gesamtkonzentration von GluR1 wiederzugeben und zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen vergleichen zu können.

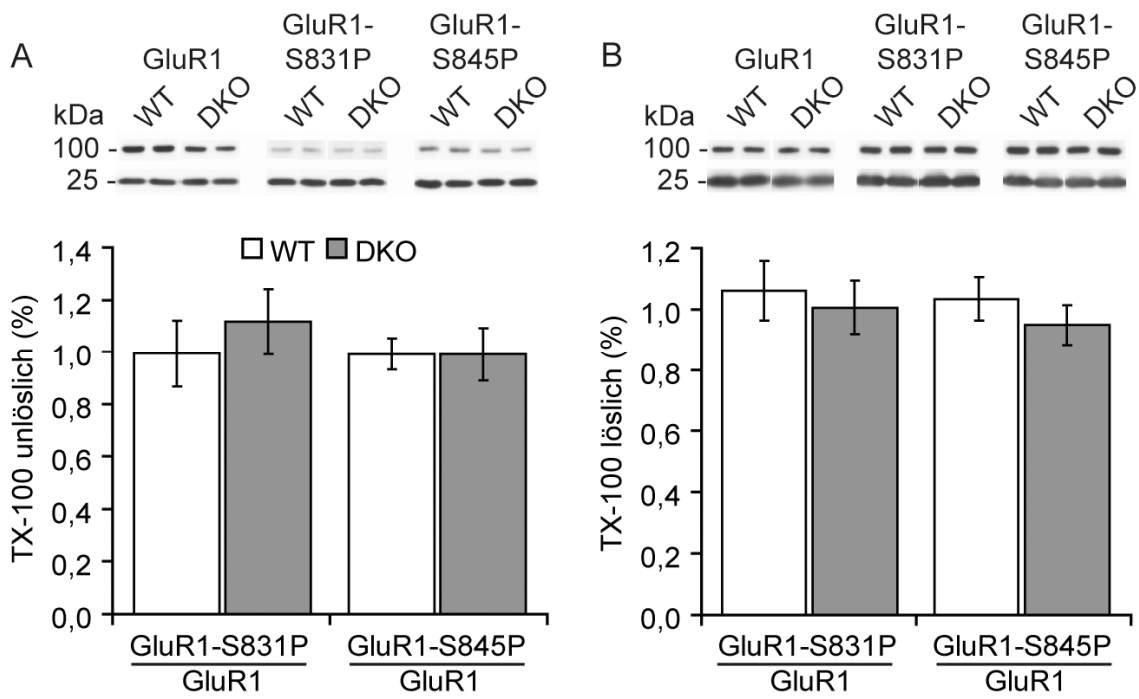

Abbildung 11: Phosphorylierung von GluR1 in PSD-Präparationen aus dem *Hippocampus*. (A) Die gegen GluR1 gerichteten Antikörper (s. Abb. 8 in 4.5.2) wurden von den Nitrozellulosemembranen entfernt. Die Membranen wurden mit den phospho-spezifischen GluR1-Antikörpern anti-GluR1-S831P und anti-GluR1-S845P inkubiert. Als Ladekontrolle diente Rab3a (25 kDa). Die Proteinmenge der phosphorylierten GluR1 wurde ins Verhältnis zur Gesamtmenge von GluR1 gesetzt. (B) Western-Blots mit Proteinen aus den in Triton X-100 löslichen Fraktionen (oben) und quantitative Analyse der detektierten Banden. (DKO, grau, $n = 7$; WT, weiß, $n = 7$; ± Standardfehler)

Sowohl der Anteil der an Serin 831 als auch der an Serin 845 phosphorylierten GluR1 zur GluR1-Gesamtkonzentration sind in den PSD-Fraktionen (s. Abb. 11 A) von 4.1G/N-Doppelmutanten nicht von denen aus Wildtypen zu unterscheiden. Auch in der löslichen Fraktion sind die Anteile an Serin 831 und Serin 845 phosphorylierten GluR1 gleich (s. Abb. 11 B).

Die Proteine 4.1G und 4.1N haben keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von GluR1 an den Phosphorylierungs-Stellen Serin 831 und Serin 845 in hippocampalen PSD-Fraktionen und löslichen Fraktionen.

4.6.2 Anteil phosphorylierter GluR1 in hippocampalen Neuronen

Die Phosphorylierung von GluR1 in 4.1G/N-Doppelmutanten sollte auch *in vitro* in hippocampalen Neuronen analysiert werden. Wie in dem Experiment zuvor wurden auch

hier die gegen GluR1 gerichteten Antikörper von der Nitrozellulosemembran aus dem vorausgehenden Experiment in 4.5.3 entfernt und neu mit den phospho-spezifischen GluR1-Antikörpern inkubiert. Die Konzentrationen der phosphorylierten GluR1 wurden quantitativ analysiert und die Werte aus den Wildtypen auf 100 % gesetzt. Die Werte aus den 4.1G/N-Doppelmutanten wurden dazu entsprechend ins Verhältnis gesetzt. Um den Anteil an phosphorylierten GluR1 zu berechnen, wurden die Konzentrationen der phosphorylierten GluR1 durch die entsprechenden Konzentrationen von GluR1 in 4.5.3 geteilt.

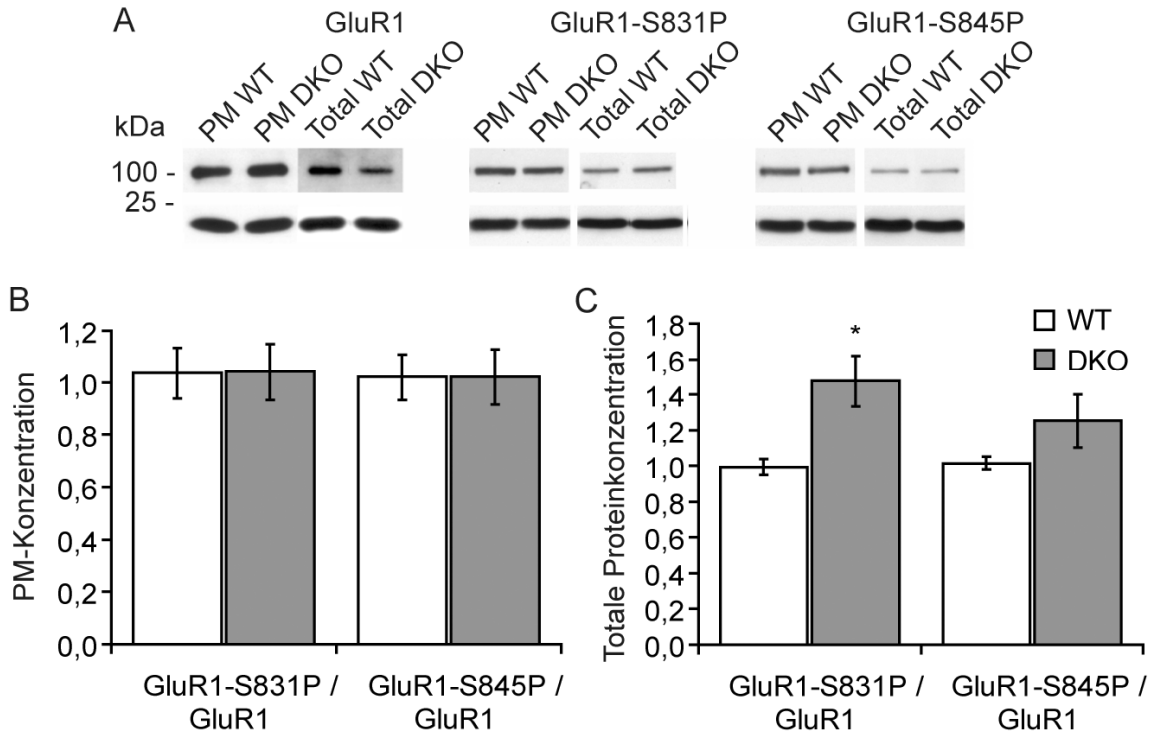

Abbildung 12: Phosphorylierung von GluR1 in hippocampalen Neuronen an DIV 21. (A) Die gegen GluR1 gerichteten Antikörpern (s. Abb. 9 in 4.5.3) wurden von der Nitrozellulosemembran entfernt und diese anschließend mit gegen phosphorylierte GluR1 gerichteten Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle diente Rab3a (25 kDa). (B) Die Konzentration der an der Plasmamembran (PM) lokalisierten phosphorylierten GluR1 im Verhältnis zu der Gesamtkonzentration von GluR1 an der Plasmamembran in 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) und Wildtypen (WT). (C) Das Verhältnis der Konzentration phosphorylierter GluR1 zur Gesamtkonzentration von GluR1 in den Gesamtlysaten (Total) in DKO und WT. (DKO, grau, $n = 12$, * $P < 0{,}05$, *t*-Test; WT, weiß, $n = 12$; ± Standardfehler)

Der Anteil der an beiden Phosphorylierungs-Stellen phosphorylierten GluR1 an der Plasmamembran unterscheidet sich in 4.1G/N-Doppelmutanten nicht von Wildtypen (s. Abb. 12 A). In den Gesamtlysaten der Zellen ist der Anteil der an Serin 831

phosphorylierten GluR1 um 50 % erhöht (DKO = 1,5 ± 0,1, WT = 1,0 ± 0,1). Der Anteil der an Serin 845 phosphorylierten GluR1 jedoch ist nicht verschieden (s. Abb. 12 B).

In Abwesenheit der Proteine 4.1G und 4.1N ist der Anteil der an Serin 831 phosphorylierten GluR1 im Gesamtlysat hippocampaler Neuronen erhöht, jedoch nicht an der Zelloberfläche.

4.7 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die synaptischen Transmission im *Hippocampus*

Protein 4.1G und 4.1N binden die AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 (Cai *et al*., 2002; Coleman *et al*., 2003; Rumbaugh *et al*., 2003) und in ihrer Abwesenheit ist die Konzentration von GluR1 in der hippocampalen Postsynapse signifikant reduziert (s. Abb. 8). Deshalb sollte nach der Untersuchung des Aufbaus glutamaterger Synapsen im *Hippocampus* von 4.1G/N-Doppelmutanten nun überprüft werden, ob der Verlust von Protein 4.1G und die starke Reduktion von Protein 4.1N auch zu Änderungen in der Funktion glutamaterger Synapsen und somit in der synaptischen Transmission im *Hippocampus* führen. Dazu wurden verschiedene elektrophysiologische Techniken eingesetzt.

4.7.1 Messungen in hippocampalen Autapsen

Zunächst wurden Messungen in hippocampalen Autapsen durchgeführt. Die Messungen an Autapsen bieten ein einfaches System zur Untersuchung der synaptischen Transmission, da alle Synapsen von einem einzigen Axon entspringen und das Neuron aufgrund der Isolation von anderen Neuronen Synapsen auf eigene Dendriten, Autapsen genannt, ausbildet. So reicht es, Messungen an einem einzelnen Neuron durchzuführen, da in diesem sowohl ein Stimulus ausgelöst als auch die Antwort der Autapsen darauf gemessen werden können (s. Abb. 2 A). Eine Vereinzelung der Neuronen erfolgt durch das Aussähen einer geringen Anzahl von Neuronen auf mit Astrozyten-Inseln präparierten Deckgläsern, so dass auf einer solchen Astrozyten-Insel ein einzelnes Neuron heranwachsen kann. Die Plasmamembran der Neuronen wurde bei den nachfolgenden Messungen nach dem

Heranführen der Messpipette im *cell-attached*-Modus auf ein Haltepotential von -70 mV geklemmt und durch kurzes Saugen aufgebrochen.

Durch eine somatische Depolarisation auf 0 mV für 2 ms wird ein Aktionspotential ausgelöst, auf das ein exzitatorischer postsynaptischer Strom (kurz EPSC für engl. *excitatory postsynaptic current*) folgt, dessen Amplitude gemessen werden kann. Es gibt keine Unterschiede der EPSC Amplituden zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen (s. Abb. 13 A).

Mittels der Applikation einer hyperosmotischen Lösung von 0,5 M Saccharose in *Base-Plus* Lösung für 6 s werden Neurotransmitter aus fusionskompetenten Vesikeln entlassen. Die dabei gemessene Ladung gibt Aufschluss über die Größe des Vorrats an fusionskompetenten Vesikeln (kurz RRP für engl. *ready releasable pool*). Die Wahrscheinlichkeit der Freisetzung der Neurotransmitter aus fusionskompetenten Vesikeln (kurz Pvr für engl. *release probability*) kann durch das Verhältnis der Ladung eines einzelnen EPSC Stimulus zu der des RRP berechnet werden. Sowohl die Größe des Vesikel-Vorrats RRP (s. Abb. 13 B) als auch die Wahrscheinlichkeit der Vesikel-Freisetzung Pvr (s. Abb. 13 C) sind in 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen gleich.

Die spontane synaptische Transmission kann während der Applikation von 300 nM TTX gemessen werden. TTX blockiert Natrium-Kanäle und verhindert das Auslösen von Aktionspotentialen, so dass nur die Ströme gemessen werden, die durch spontane Freisetzung von Neurotransmittern entstehen, die so genannten mini EPSCs (mEPSCs). Es wurden sowohl die Amplituden (s. Abb. 13 D) als auch die Frequenzen (s. Abb. 13 E) und Zeitkonstanten (s. Abb. 13 F) der mEPSCs gemessen. Für diese gemessenen Parameter sind keine signifikanten Unterschiede in 4.1G/N-Doppelmutanten im Vergleich zu Wildtypen zu erkennen.

Die extrazellulären Applikationen von 3 µM GABA oder 30 µM Kainat für 2 s induzieren einen postsynaptischen Strom, der gemessen werden kann. Kainat aktiviert sowohl Kainat- als auch AMPA-Rezeptoren, die an der gesamten Zelloberfläche lokalisiert sind. GABA aktiviert die inhibitorischen Rezeptoren an der gesamten Zelloberfläche und diente in diesem Experiment als Kontrolle, da eine Interaktion der Proteine 4.1G und 4.1N zu GABA-Rezeptor-Untereinheiten nicht bekannt ist und eine Veränderung der GABA-induzierten Ströme in 4.1G/N-Doppelmutanten somit nicht zu erwarten war. Weder die durch GABA noch die durch Kainat induzierten Ströme sind in 4.1G/N-Doppelmutanten von Wildtypen signifikant verschieden (s. Abb. 13 G und H).

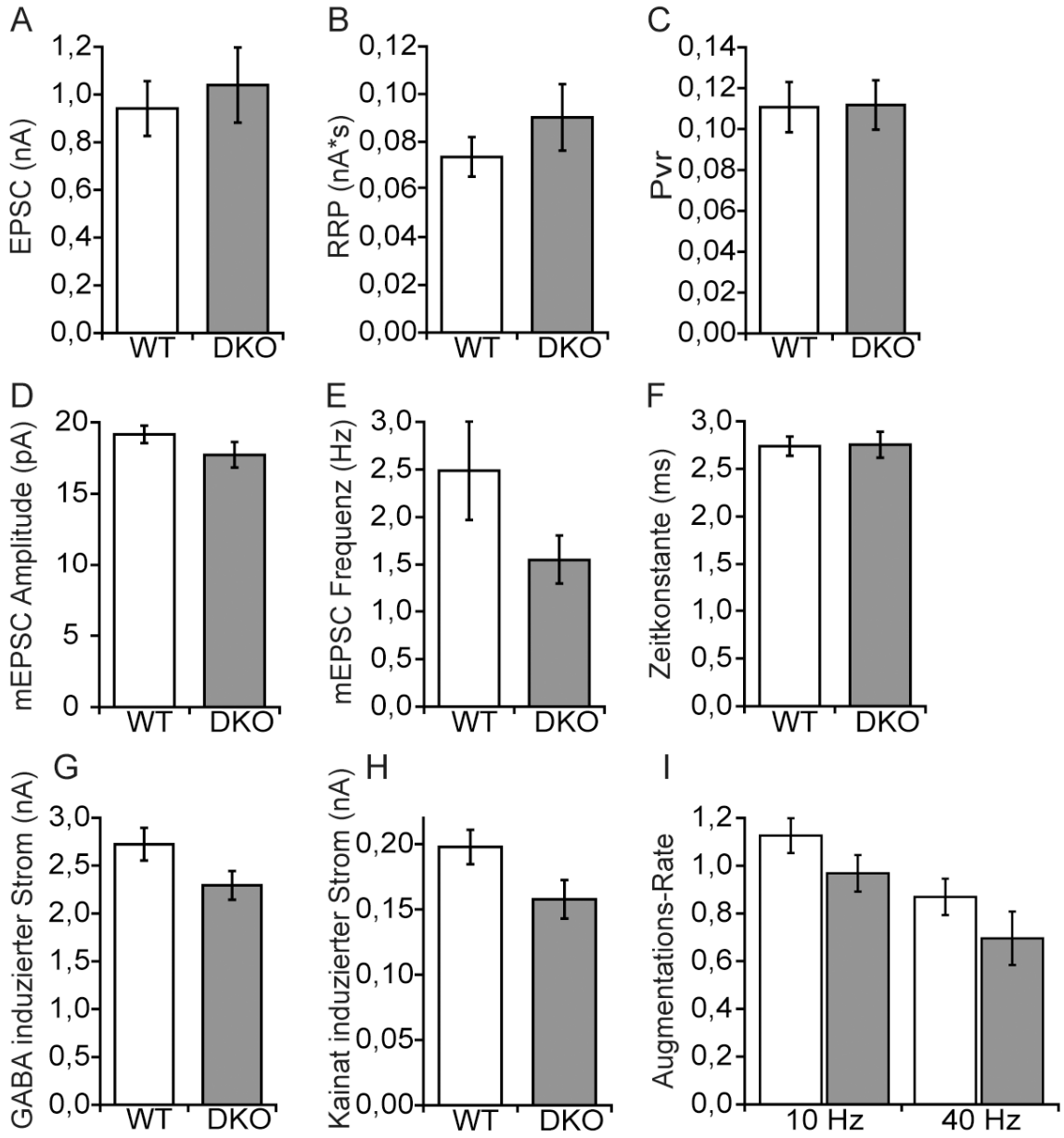

Abbildung 13: Synaptische Transmission in hippocampalen Autapsen aus 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen an DIV 12 - 15. In autaptischen hippocampalen Neuronen aus 4.1G/N-Doppelmutanten (grau, *n* = 40) und Wildtypen (weiß, *n* = 35) wurden folgende Parameter der synaptischen Transmission (± Standardfehler) analysiert: (A) Durchschnittliche EPSC Amplitude. (B) Durchschnittliche Größe des Vorrats an fusionskompetenten Vesikeln (RRP), ermittelt durch die Ladung, die nach Applikation einer 0,5 M Saccharose-Lösung gemessen wurde. (C) Durchschnittliche Wahrscheinlichkeit der Freisetzung der fusionskompetenten Vesikel (Pvr), berechnet durch das Verhältnis der Ladung nach einer einzelnen EPSC Stimulation zur RRP-Ladung. (D) Durchschnittliche EPSC Amplitude, (E) durchschnittliche EPSC Frequenz und (F) durchschnittliche Zeitkonstante während extrazellulärer Applikation von 300 nM TTX. (G) Durch die extrazelluläre Applikation von 3 µM GABA bzw. (H) 30 µM Kainat induzierter Strom. (I) Verhältnis der ersten EPSC Amplitude während einer Hochfrequenz-Stimulation (10 Hz bzw. 40 Hz) zu der ersten EPSC Amplitude nach der Hochfrequenz-Stimulation.

Durch Hochfrequenz-Stimulationen kann die Kurzzeitplastizität (kurz STP für engl. *short-term plasticity*) untersucht werden. Diese präsynaptische Plastizität tritt während und nach hochfrequenten Stimulationen auf. In diesem Experiment wurden 50 Stimuli bei 10 Hz und 100 Stimuli bei 40 Hz ausgelöst, die in hippocampalen Synapsen zur Depression, also Abnahme der EPSCs (kurz STD für engl. *short-term depression*) führen. Dieser Effekt steht mit den präsynaptischen Eigenschaften der RRP, des Auffüllens des RRPs und der Pvr im Zusammenhang (Junge *et al*., 2004; Liley und North, 1953). Für die Berechnung der Augmentations-Rate wird die Amplitude des ersten EPSCs einer Hochfrequenz-Stimulation ins Verhältnis zu der Amplitude eines an die Hochfrequenz-Stimulation anschließenden EPSCs gesetzt. Es waren zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen keine Unterschiede zu messen. (s. Abb. 13 I).

Die Messungen in hippocampalen Autapsen zeigen, dass die synaptische Transmission und Kurzzeitplastizität in glutamatergen hippocampalen Neuronen in den 4.1G/N-Doppelmutanten nicht wesentlich beeinträchtigt sind. Einige Parameter (z.B. mEPSC Frequenz, s. Abb. 13 E) zeigen Unterschiede, die jedoch nicht signifikant sind.

4.7.2 Ermittlung der Zusammensetzung von AMPA-Rezeptoren in hippocampalen Autapsen mittels *perforated-patch-clamp*-Messungen

Die funktionellen Eigenschaften und der Transport von AMPA-Rezeptoren hängen auch von ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung ab. Die AMPA-Rezeptor-Untereinheiten unterscheiden sich in ihren biophysikalischen Eigenschaften: Homomere aus der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR2 sind kalziumimpermeabel, zeigen eine geringe Leitfähigkeit und eine lineare Strom-Spannungs-Kurve (Burnashev *et al*., 1992). Heteromere aus den AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR2 zeigen eine geringe Kalziumpermeabilität, eine hohe Leitfähigkeit und sind nicht rektifizierend (Washburn *et al*., 1997). Die glutamatergen Synapsen in der CA Region des Hippocampus enthalten AMPA-Rezeptoren, die vorwiegend aus den Untereinheiten GluR1 und GluR2 zusammengesetzt sind (Derkach *et al*., 2007). Da die biochemischen Daten eine Reduktion von GluR1 in synaptischen Fraktionen der 4.1G/N-Doppelmutanten zeigen, jedoch in den elektrophysiologischen Standard-Messungen keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen und Wildtypen festgestellt werden konnten, stellte sich die Frage nach einer Kompensation anderer AMPA-Rezeptor-Untereinheiten für die reduzierten GluR1. Die

damit einhergehenden Veränderungen in den biophysikalischen Eigenschaften des Rezeptors können durch das Verhältnis eines induzierten Stroms zu verschiedenen Haltepotentialen (Strom-Spannungs-Kurve) und durch das Verhältnis vom Auswärtsstrom zum Einwärtsstrom (Rektifikationsindex) festgestellt werden.

Da diese Methode der Ermittlung von Strom-Spannungs-Kurven und Rektifizierungsverhalten sensitiv für den Strom von Kalzium-Ionen ist, wurde die Plasmamembran der autaptischen Neuronen im *cell-attached*-Modus nicht durch Saugen aufgebrochen, sondern durch das Einwirken des Antibiotikums Nystatin perforiert. Die Elektrode wird bei dieser Methode mit interner Nystatin-Lösung gefüllt und an die Zelle herangeführt. Nach ca. 10 Min Einwirkzeit im *cell-attached*-Modus wird der *whole-cell*-Modus erreicht. Die durch das Einwirken von Nystatin geformten Poren in der Plasmamembran sind aufgrund ihrer Größe selektiv für einwertige Ionen.

Die Plasmamembran der Neuronen wurde auf verschiedene Haltepotentiale geklemmt und der durch die extrazelluläre Applikation von Agonisten induzierte Strom gemessen. Zum einen wurden 30 µM Kainat für 2 Min appliziert, wodurch die Kainat- und AMPA-Rezeptoren in exzitatorischen Synapsen aktiviert werden. Zum anderen wurden in einer weiteren Messung zur Kontrolle 3 µM GABA für 2 Min appliziert, wodurch die GABA-Rezeptoren in inhibitorischen Synapsen aktiviert werden. Die Haltepotentiale wurden in folgender Reihenfolge eingestellt: -70 mV, -30 mV, -10 mV, 10 mV, 30 mV und 50 mV. Für die Ermittlung von Strom-Spannungs-Kurven ist es wichtig, möglichst viele Messwerte zu erhalten. Dabei sollten die Messwerte in einem möglichst konstanten Abstand zueinander sein und sowohl den negativen als auch den positiven Bereich der geklemmten Haltepotentiale umfassen. Nach jeder Messung bei einem der aufgeführten Haltepotentiale wurden die durch Kainat bzw. durch GABA ausgelösten Ströme bei einem Haltepotential von -50 mV gemessen. Auf diesen Wert wurden in der Auswertung die Daten normalisiert, da sich der Zustand der Neuronen aufgrund der Belastungen durch die Messungen und das Einwirken von Nystatin mit der Zeit verschlechtert, was sich z.B. in abnehmenden Amplituden bemerkbar machen kann. Die vollständigen Messreihe eines Neurons beinhaltete also die durch GABA bzw. Kainat induzierten Ströme bei -50 mV, -70 mV, -50 mV, -30 mV, -50 mV, -10 mV, -50 mV, 10 mV, -50 mV, 30 mV, -50 mV, 50 mV, -50 mV. Für die Normalisierung wurden die Amplituden bei -50 mV vor und nach jeder Messung bei den genannten Haltepotentialen gemittelt und die Amplitude der Messung durch diesen Mittelwert dividiert. Das Rektifizierungsverhalten wird durch den

Rektifikationsindex wiedergegeben. Dieser wird aus dem Quotienten des normalisierten Auswärtsstroms bei 30 mV durch den normalisierten Einwärtsstrom bei -30 mV berechnet.

Sowohl die durch die Applikation von GABA und Kainat ermittelten Strom-Spannungs-Kurven als auch das Rektifikationsverhalten zeigen keine Unterschiede zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen (s. Abb. 14 A, B und E). Die Amplituden bei -50 mV und -70 mV sind in 4.1G/N-Doppelmutanten ebenfalls nicht verschieden (s. Abb. 14 C und D).

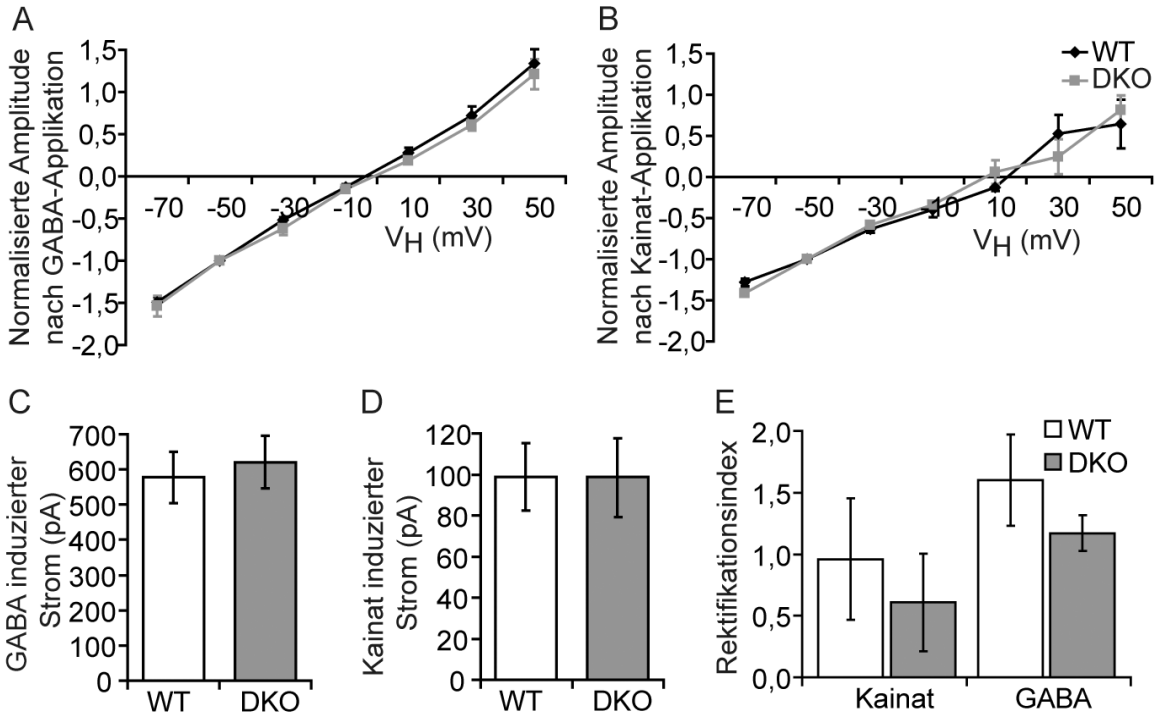

Abbildung 14: Das Verhältnis vom Haltepotential zur synaptischen Transmission in hippocampalen Autapsen an DIV 12 - 15. In autaptischen hippocampalen Neuronen aus 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) und Wildtypen (WT) wurde der durch GABA bzw. Kainat induzierte Strom bei verschiedenen Haltepotentialen gemessen. (A) Die normalisierten Amplituden nach extrazellulärer Applikation von 3 µM GABA bzw. (B) 30 µM Kainat bei -70 mV, -30 mV, -10 mV, 10 mV, 30 mV und 50 mV von Neuronen aus DKO und WT wurden gegen das jeweilige Haltepotential aufgetragen. (C) Die durchschnittliche Amplitude nach der Applikation von GABA und (D) Kainat bei -50 mV. (E) Verhältnis des Auswärtsstroms bei 30 mV zum Einwärtsstrom bei -30 mV. (DKO, grau, *n* = 15; WT, weiß bzw. schwarz, *n* = 13; ± Standardfehler)

Die untersuchten biophysikalischen Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren glutamaterger hippocampalen Autapsen ändern sich in der Abwesenheit von Protein 4.1G und Protein 4.1N nicht. Die Zusammensetzung aus den einzelnen AMPA-Rezeptor-Untereinheiten ist

elektrophysiologisch mittels der *perforated-patch-clamp*-Messungen nicht von Wildtypen zu unterscheiden.

4.7.3 Ermittlung der Zusammensetzung von AMPA-Rezeptoren in hippocampalen Neuronen mit Hilfe gepaarter *patch-clamp*-Messungen

Durch die Ermittlung der Strom-Spannungs-Kurve und des Rektifikationsindex mittels der *perforated-patch-clamp*-Messungen kann keine Veränderung der Zusammensetzung von AMPA-Rezeptoren aus seinen Untereinheiten festgestellt werden. Bei dieser Methode werden durch die extrazelluläre Applikation von Agonisten alle membranständigen Rezeptoren aktiviert. Die Reduktion von GluR1 in 4.1G/N-Doppelmutanten ist jedoch direkt in den postsynaptischen Bereichen zu beobachten. Deshalb sollte überprüft werden, ob eine Veränderung der Zusammensetzung der Untereinheiten direkt an der postsynaptischen Membran elektrophysiologisch gemessen werden kann. Um alle anderen Rezeptoren aus der Messung auszuschließen, wurde die synaptische Transmission zwischen zwei einzelnen Neuronen, die miteinander Synapsen ausbilden, mittels gepaarter *patch-clamp*-Messungen untersucht (s. Abb. 2 B). Dazu wurden in Kulturen Neuronenpaare auf Astrozyten-Inseln untersucht. Die beiden Messelektroden wurden an die Neuronen herangeführt und im *cell-attached*-Modus die Plasmamembranen durch kurzes Saugen aufgebrochen. Bei folgenden geklemmten Haltepotentialen des postsynaptischen Neurons wurden durch Depolarisation Aktionspotentiale in dem auf -70 mV geklemmten präsynaptischen Neuron ausgelöst: -70 mV, -30 mV, -10 mV, 10 mV, 30 mV, 50 mV. Dazwischen wurden die EPSCs bei -50 mV gemessen, um bei der Auswertung die Daten (wie zuvor in 4.7.2 beschrieben) auf diesen Wert normalisieren zu können. In der intrazellulären Lösung des postsynaptischen Neurons war QX-314 enthalten, das Natrium-Kanäle blockiert und somit die Ausbildung eines weiteren Aktionspotentials im postsynaptischen Neuron verhinderte. Ein zusätzliches Aktionspotential könnte durch autaptische Verbindungen des postsynaptischen Neurons die Antwort auf den Stimulus des präsynaptischen Neurons verfälschen oder durch Verbindungen zum präsynaptischen Neuron dort eine mögliche autaptische Antwort beeinflussen.

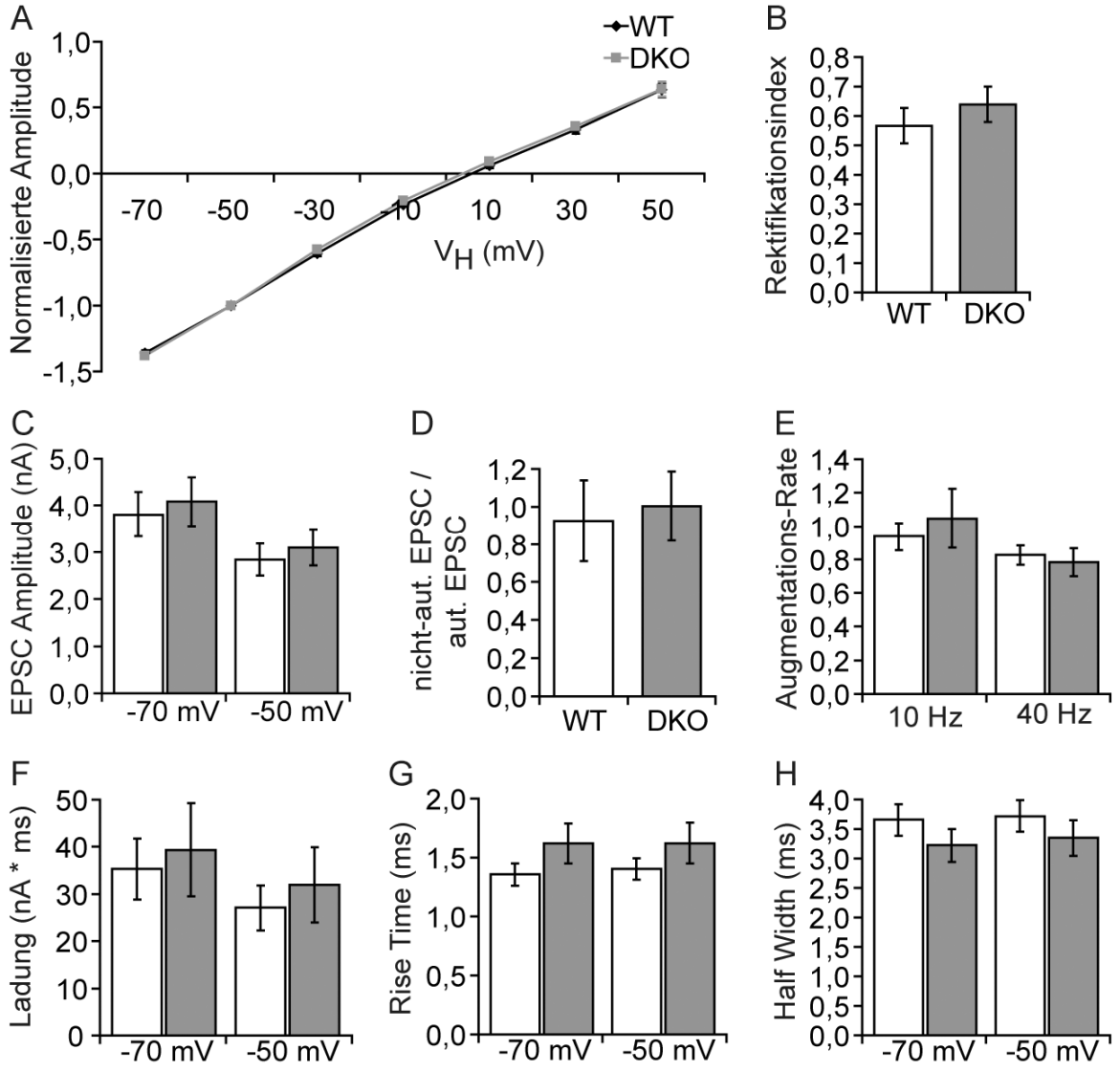

Abbildung 15: Synaptische Transmission zwischen zwei hippocampalen Neuronen in 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen an DIV 12 - 15. Um die synaptische Transmission zwischen hippocampalen Neuronen aus 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) und Wildtypen (WT) zu vergleichen, wurde ein Neuron stimuliert und in einem synaptisch verbundenem Neuron die EPSC Amplitude bei verschiedenen Haltepotentialen gemessen. Es wurden folgende Parameter untersucht: (A) Verhältnis der EPSC Amplituden (normalisiert zu EPSC Amplituden bei -50 mV) zum Haltepotential. (B) Verhältnis des Auswärtsstroms bei 30 mV zum Einwärtsstrom bei -30 mV. (C) Durchschnittliche EPSC Amplituden bei -70 mV bzw. -50 mV. (D) Verhältnis der autaptischen EPSC Amplitude des präsynaptischen Neurons zur EPSC Amplitude des postsynaptischen Neurons. (E) Verhältnis der ersten EPSC Amplitude während einer Hochfrequenz-Stimulation (10 Hz bzw. 40 Hz) zu der ersten EPSC Amplitude nach der Hochfrequenz-Stimulation. (F) Durchschnittliche Ladung bei -70 mV bzw. -50 mV. (G) Durchschnittliche Zeit vom Ankommen des Aktionspotentials bis zum Erreichen der maximalen Amplitude (engl. *rise time*). (H) Hälfte der durchschnittlichen Dauer des EPSCs (engl. *half width*). (DKO, grau, $n = 26$; WT, weiß bzw. schwarz, $n = 24$; ± Standardfehler)

Sowohl das Strom-Spannungs-Verhältnis glutamaterger EPSCs als auch der Rektifikationsindex zeigen keine Unterschiede zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen. Die Amplituden bei -50 mV und -70 mV sind ebenfalls nicht zu unterscheiden (Abb. 15 A - C).

Des Weiteren wurde das Verhältnis der Amplitude des präsynaptischen Neurons, also die Amplitude ihrer autaptischen Antwort, bei -70 mV zu der Amplitude des postsynaptischen Neurons bei -70 mV ermittelt. Auch hier wurden keine Unterschiede gemessen (s. Abb. 15 D).

Die Augmentations-Raten der Hochfrequenz-Stimulationen zeigen ebenfalls keine Unterschiede (s. Abb. 15 E). Sie geben das Verhältnis der ersten EPSC Amplitude während einer Hochfrequenz-Stimulation zur ersten EPSC Amplitude nach der Hochfrequenz-Stimulation wieder.

Eine Veränderung in der Zusammensetzung der Untereinheiten würde sich auch auf die Ladung, sowie die Zeitkomponenten *rise time* und *half width* der EPSC-Amplitude auswirken. Die Analyse dieser Parameter ergibt jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen (Abb. 15 F - H).

In den postsynaptischen Bereichen hippocampaler Neuronen, in denen in Abwesenheit von Protein 4.1G und Protein 4.1N die Konzentration von GluR1 reduziert ist, ist keine Beeinträchtigung der synaptischen Transmission mittels der gepaarten *patch-clamp*-Messungen festzustellen. Es kann ebenfalls keine Veränderung in der Untereinheiten-Zusammensetzung von AMPA-Rezeptoren beobachtet werden.

4.8 Untersuchungen auf Kompensation durch Protein 4.1B im *Hippocampus*

Die Abwesenheit von Protein 4.1G und die starke Reduktion von Protein 4.1N im *Hippocampus* wirken sich zwar auf die Lokalisation des Bindungspartners GluR1 aus, jedoch nicht auf die Funktion der diesen Bindungspartner enthaltenden Rezeptoren in hippocampalen Neuronen. Neben Protein 4.1G und Protein 4.1N wird eine weitere Isoform dieser Familie, Protein 4.1B, im *Hippocampus* exprimiert. Zwar ist eine Interaktion zwischen Protein 4.1B und AMPA-Rezeptor-Untereinheiten nicht publiziert, dennoch könnte Protein 4.1B aufgrund der Homologie zu den anderen 4.1-Proteinen einen kompensatorischen Effekt haben.

Deshalb wurde in P2-Fraktionen aus dem *Hippocampus* untersucht, ob sich die Proteinmengen von Protein 4.1B in 4.1G/N-Doppelmutanten von denen in Wildtypen unterscheiden. Dazu wurden die Proteine aus den hippocampalen P2-Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend eine quantitative Analyse der durch die gegen 4.1B spezifischen Antikörper detektierten Banden in ECL-Western-Blots durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden auf die entsprechenden Werte von Tubulin normalisiert. In Wildtypen wurden diese normalisierten Werte auf 100 % festgelegt und die Werte aus den 4.1G/N-Doppelmutanten entsprechend dazu ins Verhältnis gesetzt.

Im *Hippocampus* von 4.1G/N-Doppelmutanten unterscheidet sich die relative Proteinmenge von Protein 4.1B nicht von der Konzentration im *Hippocampus* der Wildtypen (s. Abb. 16).

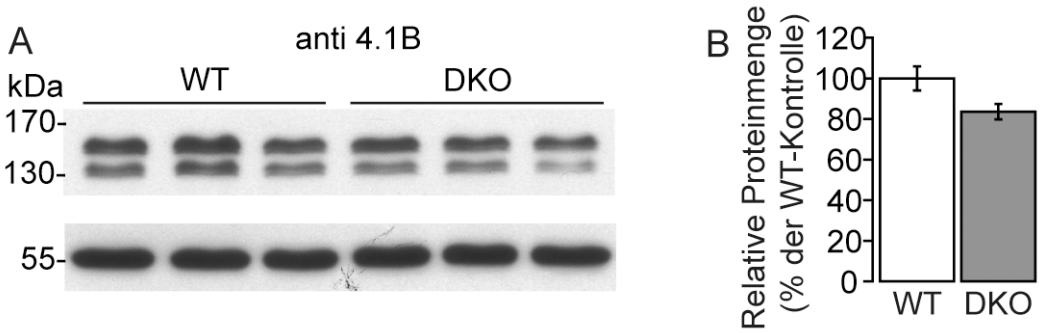

Abbildung 16: Expression von Protein 4.1B im *Hippocampus* von 4.1G/N-Doppelmutanten im Vergleich zu Wildtypen. (A) Western-Blot von hippocampalen P2-Präparationen aus drei Wochen alten Tieren mit einem gegen 4.1B gerichteten Antikörper und mit einem gegen Tubulin (55 kDa) gerichteten Antikörper als Kontrolle. (B) Die Proteinmengen von 4.1B in 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) und Wildtypen (WT) im *Hippocampus* wurden durch eine quantitative Analyse der detektierten Banden in (A) ermittelt und sind in DKO als Prozentsatz der Proteinmengen in WT dargestellt. (DKO, grau, n = 6; WT, weiß, n = 6; ± Standardfehler)

4.9 Expression von Protein 4.1N im *Cerebellum*

Die Funktion der Proteine 4.1G und 4.1N in der Lokalisation des Bindungspartners GluR1 wurde im *Hippocampus* detailliert untersucht. Die Proteine 4.1G und 4.1N binden neben GluR1 auch die AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR4 (Coleman *et al*., 2003). Um die Lokalisation und Funktionalität von GluR4 in 4.1G/N-Doppelmutanten zu untersuchen, stellt das *Cerebellum* gegenüber dem *Hippocampus* das besser geeignete System dar. Im

Hippocampus wird GluR4 vorwiegend in der frühen postnatalen Phase in Neuronen exprimiert (Zhu *et al*., 2000). In der Tat war in den vorausgehenden Experimenten aufgrund der sehr geringen Proteinmengen von GluR4 eine genauere Untersuchung schwierig. Im *Cerebellum* hingegen wird GluR4 sowohl während der frühen postnatalen Entwicklung als auch danach in Neuronen exprimiert, wohingegen die Expression von GluR1 nach der postnatalen Entwicklungsphase in cerebellären Neuronen abnimmt (Douyard *et al*., 2007). Deshalb wurden die folgenden Experimente im *Cerebellum* durchgeführt, wobei der Fokus auf die Lokalisation und Funktion von GluR4 gerichtet wurde.

Im *Cerebellum* der 4.1G/N-Doppelmutanten ist ebenfalls trotz der Mutagenese-Strategie noch eine Restexpression von Protein 4.1N vorhanden (s. Abb. 17), die zunächst quantitativ analysiert werden musste. Dazu wurden die Proteine aus P2-Fraktionen aus dem *Cerebellum* mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit Hilfe von ECL-Western-Blots mit verschiedenen für 4.1N spezifischen Antikörpern untersucht. Die Signalstärken der Banden von Protein 4.1N wurden auf die dazugehörigen Signalstärken der Banden von Rab3a normalisiert. Die Werte aus Wildtypen und 4.1G/N-Doppelmutanten wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt, wobei in Wildtypen eine Proteinmenge von 100 % vorausgesetzt wurde.

Auch im *Cerebellum* wird von den Antikörpern anti-4.1N-mAk und anti-4.1N-CTD in 4.1G/N-Doppelmutanten lediglich eine kurze Variante von Protein 4.1N erkannt (s. Abb. 17 B und C). In Wildtypen werden sowohl die lange als auch die kurze Isoform erkannt. Anti-4.1N-Exon 2 erkennt lediglich in Wildtypen die lange Isoform von 4.1N (s. Abb. 17 A). In diesem Experiment konnten die Banden der einzelnen Isoformen nicht quantitativ analysiert werden, da sie sich nicht sauber genug voneinander abgrenzen. Es wurden deshalb in Wildtypen die Signalstärken beider Banden zusammen quantifiziert. Die quantitative Analyse ergibt im *Cerebellum* von 4.1G/N-Doppelmutanten eine Restexpression des Proteins 4.1N von 9 % (± 2 %) verglichen zu den Wildtypen (WT = 100 ± 3 %, s. Abb. 17 B). Im *Hippocampus* liegt die entsprechende Restexpression von Protein 4.1N noch bei 27 % (s. 4.3).

Das Verhältnis von Protein 4.1N zu Protein 4.1G in postsynaptischen Präparationen aus dem *Cerebellum* der Maus entspricht 1:0,85 (Trinidad *et al*., 2008). Der Verlust von Protein 4.1G und die starke Reduktion von Protein 4.1N im *Cerebellum* der 4.1G/N-

Doppelmutanten entsprechen somit einer kombinierten Expression von 5 % im Vergleich zu Wildtypen.

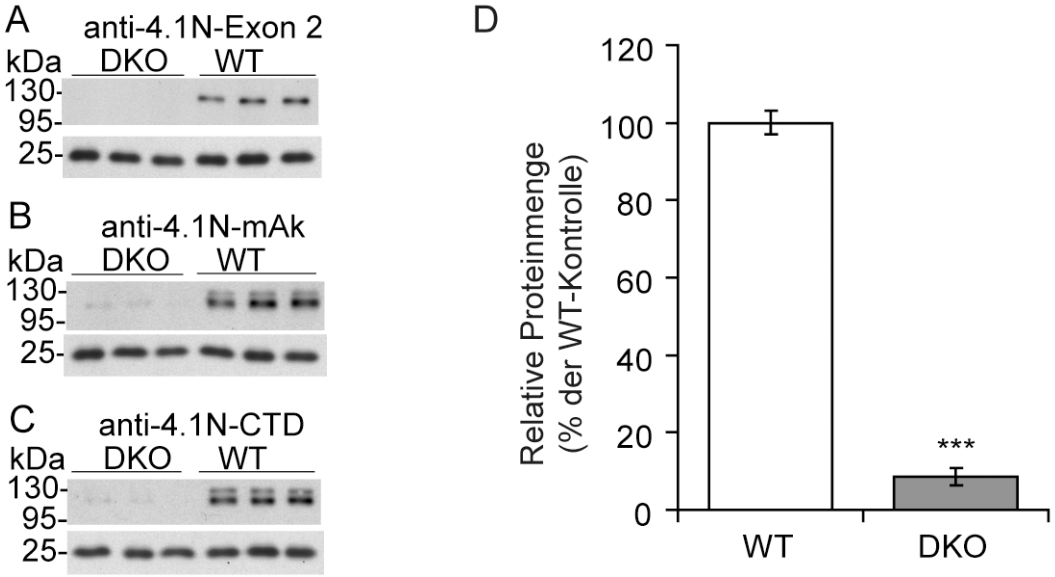

Abbildung 17: Restexpression von Protein 4.1N im *Cerebellum* von 4.1G/N-Doppelmutanten. (A - C) Western-Blots mit Proben aus *Cerebellum*-Präparationen (P2-Fraktionen) von 3 Wochen alten Wildtypen (WT, links) und 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO, rechts) mit den folgenden Antikörpern: (A) Anti-4.1N-Exon 2, der gegen die ersten 15 Aminosäuren des N-Terminus gerichtet ist. (B) Anti-4.1N monoklonaler Antikörper (anti-4.1N-mAk), der eine C-terminale Region der Spektrin-Aktin-Bindedomäne erkennt. (C) Anti-4.1N-CTD, der den C-Terminus von 4.1N erkennt. (D) Quantitative Analyse der detektierten Banden in WT und DKO aus den Abbildungen (B) und (C). Als Ladekontrolle diente Rab3a (25 kDa). (DKO, grau, $n = 6$, *** $P < 0{,}001$, *t*-Test; WT, weiß, $n = 6$; ± Standardfehler)

4.10 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die Lokalisation von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten im *Cerebellum*

Wie zuvor erwähnt besteht aufgrund der publizierten Interaktionen der Proteine 4.1G und 4.1N mit der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR4 (Coleman *et al*., 2003) die Vermutung einer Funktion dieser Proteine in der Lokalisation und Verankerung von GluR4 an der postsynaptischen Membran. Im *Hippocampus* konnte eine Veränderung der Lokalisation von GluR1 in 4.1G/N-Doppelmutanten sowohl *in vivo* in verschiedenen synaptischen Fraktionen als auch *in vitro* in hippocampalen Neuronen bereits nachgewiesen werden. Ob die Proteine 4.1G und 4.1N eine Funktion in der Lokalisation und Verankerung von GluR4 an der postsynaptischen Membran haben, wurde nun im *Cerebellum* von 4.1G/N-

Doppelmutanten untersucht. Dazu wurden synaptische Fraktionen aus 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen auf die Proteinmengen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten hin untersucht. Für die *in-vitro*-Untersuchung wurden cerebelläre, glutamaterge Neuronen, die Körnerzellen, kultiviert und die Lokalisation von GluR4 analysiert.

4.10.1 AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in cerebellären PSDs

Während für GluR1 in den synaptosomalen Fraktionen aus den Gehirnen von drei Wochen alten 4.1G/N-Doppelmutanten eine Reduktion von 27 % beobachtet wird, ist die Proteinmenge von GluR4 in diesen Fraktionen aus 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen nicht verschieden (s. Abb. 7 A). Da diese Fraktionen zum einen aus dem gesamten Gehirn isoliert wurden und zum anderen sowohl prä- als auch postsynaptische Proteine enthalten, wurden in einem weiteren Experiment die Proteinmengen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in den postsynaptischen Fraktionen aus dem *Cerebellum* von 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen untersucht. Diese PSD-Fraktionen wurden (wie unter 4.5.2 zuvor beschrieben) durch einen Solubilisationsschritt aus P2-Fraktionen isoliert. Die enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und im ECL-Western-Blot-Verfahren auf die Proteinmengen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten hin untersucht. Für die quantitative Analyse wurden die Werte auf Rab3a normalisiert, die so erhaltenen Werte aus den Wildtypen auf 100 % festgelegt und die Werte aus den 4.1G/N-Doppelmutanten dazu entsprechend ins Verhältnis gesetzt. Die Signalintensität für GluR2/3 war zu schwach, um ausgewertet werden zu können. Auf eine quantitative Analyse dieser AMPA-Rezeptor-Untereinheiten wurde deshalb verzichtet (s. Abb. 18 A).

In diesem Experiment konnten weder für die Konzentration von GluR1 noch für die Konzentration von GluR4 signifikante Unterschiede in cerebellären PSD-Fraktionen festgestellt werden (s. Abb. 18 B).

Der Verlust von Protein 4.1G und die starke Reduktion von Protein 4.1N haben demnach keinen Einfluss auf die Lokalisation der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 in den postsynaptischen Fraktionen des *Cerebellums*.

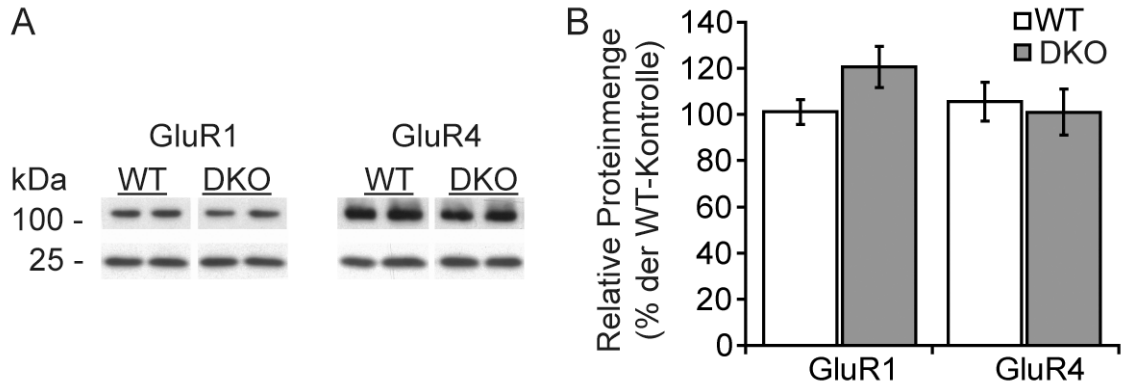

Abbildung 18: Relative Proteinmengen von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in cerebellären PSD-Fraktionen von 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen. (A) Western-Blots mit cerebellären PSD-Proben von 3 Wochen alten Tieren mit Banden, die mit Hilfe der gegen die angegebenen AMPA-Rezeptor-Untereinheiten gerichteten Antikörper (bei ca. 100 kDa) detektiert wurden. Gegen Rab3a (25 kDa) gerichtete Antikörper wurden zur Überprüfung der Gesamtproteinmenge genutzt. (B) Die in PSD-Fraktionen aus dem *Cerebellum* enthaltenen Proteinmengen wurden durch eine detektierten der Banden in entsprechenden Western-Blots in (A) ermittelt und sind in DKO als Prozentsatz zu den Proteinmengen in WT dargestellt. (DKO, grau, $n = 7$; WT, weiß, $n = 7$; ± Standardfehler)

4.10.2 AMPA-Rezeptor-Untereinheiten an der Plasmamembran cerebellärer Körnerzellen

Im *Cerebellum* ist die Lokalisation der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 in PSD-Fraktionen in Abwesenheit der Proteine 4.1G und 4.1N unverändert. Wichtig für die postsynaptische Signalweiterleitung ist jedoch auch eine Verankerung der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten an der postsynaptischen Plasmamembran. Im *Hippocampus* aus 4.1G/N-Doppelmutanten konnte bereits ein erhöhter Anteil von membranständigen GluR1 verglichen zur Gesamtkonzentration in Neuronen festgestellt werden. Deshalb sollte in einem weiteren Experiment die Lokalisation der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten an der Plasmamembran in cerebellären Körnerzellen untersucht werden.

Dazu wurden Körnerzellen aus dem *Cerebellum* kultiviert und nach 3 Wochen in Kultur an DIV 21 (wie zuvor in 4.5.3 beschrieben) zunächst mit einem Biotin-Reagenz inkubiert, das membranständige Proteine biotinyliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Gesamtlysate der Zellen (= Total) mit Biotin-bindenden Avidin-Agarose-Kügelchen inkubiert. So wurden die biotinylierten, membranständigen Proteine (= PM) von den intrazellulären Proteinen getrennt. Die Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE

aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen, in ECL-Western-Blots die Proteinmengen von GluR1 und GluR4 quantitativ analysiert (s. Abb. 19 A) und auf die Proteinmengen von Rab3a normalisiert.

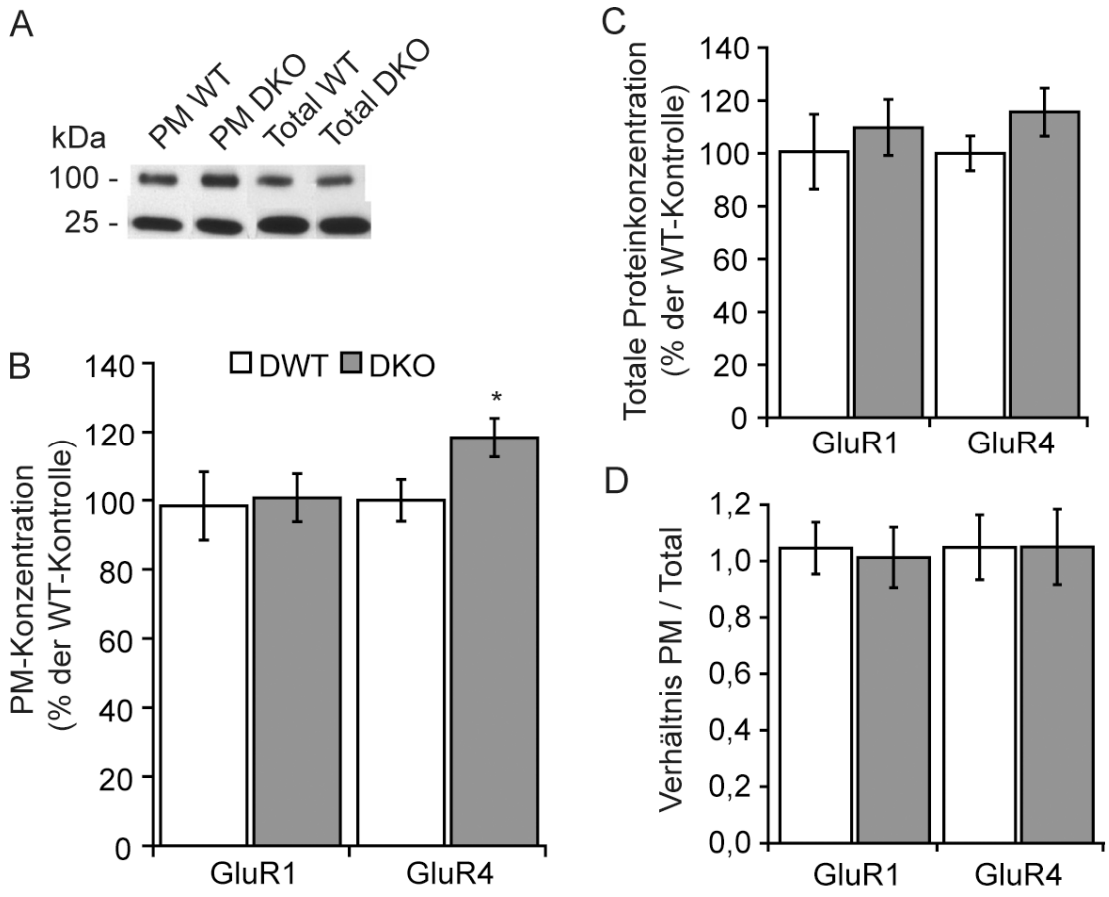

Abbildung 19: Lokalisation der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in kultivierten Neuronen aus dem *Cerebellum* an DIV 21. (A) Western-Blot mit Banden, die durch die gegen GluR4 gerichteten Antikörper an der Plasmamembran (PM) und im Lysat der Zellen (Total) detektiert wurden. Gegen Rab3a (25 kDa) gerichteten Antikörper wurden zur Kontrolle der Gesamtproteinmenge eingesetzt. (B) Die Lokalisation an der Plasmamembran wurde durch Biotinylierung analysiert. Die Proteinmengen in den 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) sind als Prozentsatz der Konzentrationen in den Wildtypen (WT) dargestellt. (C) Die Gesamtkonzentrationen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten wurden im Gesamtlysat der Zellen vor der Kopplung der biotinylierten Proteine bestimmt. (D) Das Verhältnis der Proteinkonzentration an der Plasmamembran zur Gesamtkonzentration in DKO und WT. (DKO, grau, $n = 12$, * $P < 0{,}05$, *t*-Test; WT, weiß, $n = 12$; ± Standardfehler)

GluR1 ist in 4.1G/N-Doppelmutanten verglichen zu den Wildtypen in gleichen Konzentrationen sowohl an der Membranoberfläche als auch im Lysat der cerebellären Körnerzellen lokalisiert. Die Konzentration von GluR4 an der Plasmamembran

cerebellärer Körnerzellen ist in 4.1G/N-Doppelmutanten um 18 % erhöht (WT = 100 ± 6 %, DKO = 118 ± 6 %), im Lysat der Zellen hingegen nicht. Der Anteil der membranständigen GluR1 und GluR4 relativ zu ihren Konzentrationen im Gesamtlysat ist zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen nicht verschieden (s. Abb. 19 B - D).

In 4.1G/N-Doppelmutanten ist die Konzentration von GluR4 an der Plasmamembran cerebellärer Körnerzellen an DIV 21 erhöht, jedoch nicht im Gesamtlysat. Ein erhöhter Anteil von membranständigen GluR1 wie im *Hippocampus* (s. 4.5.3) konnte im *Cerebellum* nicht festgestellt werden.

4.11 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die Phosphorylierung von GluR4 im *Cerebellum*

Nicht nur in GluR1, sondern auch in GluR4 befinden sich nahe der Protein 4.1N-bindenden Region verschiedene Phosphorylierungs-Stellen (Malinow und Malenka, 2002). Die Phosphorylierung von GluR4 ist wichtig für die Lokalisation an die postsynaptische Membran (Esteban *et al*., 2003). Um zu untersuchen, ob die Proteine 4.1G und 4.1N eine Funktion bei der Phosphorylierung von GluR4 haben, wurden phosphorylierungsdefiziente und phosphomimetische Mutanten von GluR4 kloniert.

Abbildung 20: Phosphorylierung von GluR4. Aminosäuresequenzen des zytoplasmatischen C-Terminus der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten mit Phosphorylierungs-Stellen (kursiv) und der Bindungsstelle für Protein 4.1N. Die mutierten Phosphorylierungs-Stellen sind farblich markiert. Modifiziert nach Malinow und Malenka (2002).

Durch positionsgerichtete Mutagenese-PCR wurden an den Phosphorylierungs-Stellen Threonin 826, Serin 838 und Threonin 851 die entsprechenden Aminosäuren in den phosphomimetischen Mutanten (EEE) gegen jeweils eine Glutaminsäure und in den phosphorylierungsdefizienten Mutanten (AAA) gegen jeweils ein Alanin getauscht

(s. Abb. 20). Durch den Austausch gegen Glutaminsäure wird eine zusätzliche negative Ladung in das Protein eingefügt. Werden Threonin und Serin gegen Alanin getauscht, fallen die Hydroxylgruppen aus den Seitenketten weg, die phosphoryliert werden können. Die phosphorylierungsdefizienten Mutanten simulieren also das Protein im nicht-phosphorylierten Zustand und können nicht mehr phosphoryliert werden. Die phosphomimetischen Mutanten simulieren durch die Größe und die Ladung der eingetauschten Glutaminsäure das Protein im phosphorylierten Zustand. Als Kontrolle diente ein Konstrukt, in dem diese Phosphorylierungs-Stellen nicht verändert wurden. Alle Konstrukte enthalten eine Signalsequenz, die so genannte HA-Sequenz, um sie von endogenen GluR4 unterscheiden zu können und sind in den Lentivirus-Vektor pFUGW integriert. Aus diesen Konstrukten können Lentiviren durch Transfektion in HEK293FT-Zellen gewonnen werden. Diese Lentiviren wiederum werden zur Infektion von Neuronen genutzt, um dort die entsprechenden Mutanten zu exprimieren. Folgende Konstrukte stehen zur Verfügung:

- HA-GluR4 in FUGW als Wildtyp-Kontrolle
- HA-GluR4(AAA) in FUGW als phosphorylierungsdefiziente Mutante
- HA-GluR4(EEE) in FUGW als phosphomimetische Mutante

4.11.1 Expression der GluR4-Phosphomutanten in Neuronen

Zunächst wurde die Expression der GluR4-Phosphomutanten in hippocampalen Ratten-Neuronen überprüft. Dazu wurden Ratten-Neuronen an DIV 3 mit den Lentiviren infiziert, indem verschiedene Volumina von 1 - 20 µl der Virensuspensionen zu den Ratten-Neuronen gegeben wurden. Ein Teil der Ratten-Neuronen wurde an DIV 11 geerntet, d.h. in vorgewärmtem SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Die Proteine aus der Zellsuspension wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die jeweiligen Konstrukte enthalten eine HA-Sequenz, so dass mit gegen HA gerichteten Antikörpern mittels ECL-Western-Blot-Analyse die infizierten Ratten-Neuronen auf die Expression der Konstrukte untersucht werden konnten (s. Abb. 21 A). Anhand der verschiedenen eingesetzten Volumina der Virensuspensionen konnte für spätere Experimente der optimale Viren-Titer ermittelt werden, bei dem die entsprechenden Konstrukte exprimiert werden.

Ein anderer Teil der infizierten Neuronen wurde an DIV 11 für 30 Min in Paraformaldehyd auf Eis fixiert und mittels immunzytochemischer Färbungen mit den gegen HA gerichteten Antikörpern auf die Expression der Konstrukte untersucht (s. Abb. 21 B).

Sowohl die gegen HA gerichteten als auch die gegen GluR4 gerichteten Antikörper detektieren die GluR4-Konstrukte in ECL-Western-Blots. Die immunzytochemischen Färbungen mit gegen HA gerichteten Antikörpern zeigen ebenfalls die Expressionen der Konstrukte. Demnach werden die phosphomimetischen und phosphorylierungsdefizienten Mutanten von GluR4, sowie das GluR4 Wildtyp-Konstrukt in Ratten-Neuronen nach der Virusinfektion exprimiert.

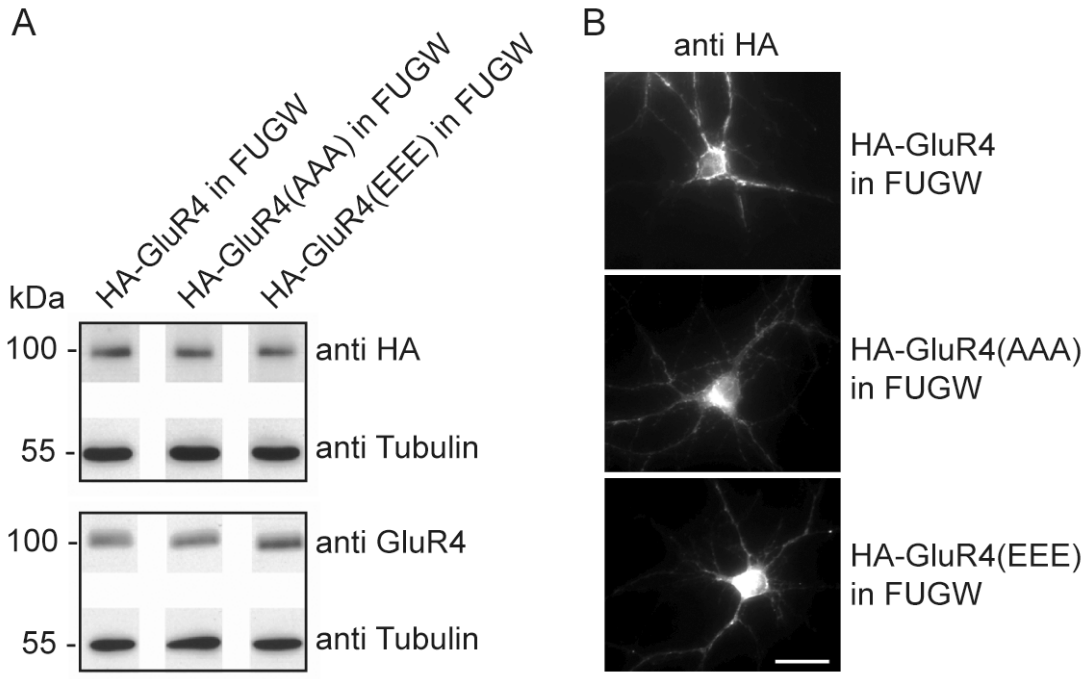

Abbildung 21: Virustest mit phosphomimetischen und phosphorylierungsdefizienten Mutanten von HA-GluR4 in hippocampalen Ratten-Neuronen an DIV 11: Mit den Konstrukten HA-GluR4 in FUGW (WT), HA-GluR4(AAA) in FUGW (phosphorylierungsdefiziente Mutante) und HA-GluR4(EEE) in FUGW (phosphomimetische Mutante) an DIV 3 infizierte hippocampale Ratten-Neuronen. (A) Western-Blots mit gegen HA bzw. gegen GluR4 gerichteten Antikörpern und Tubulin als Ladekontrolle. (B) Immunzytochemische Färbungen mit gegen HA gerichteten Antikörpern. Der Maßstab entspricht 25 µm.

4.11.2 Lokalisation der GluR4- Phosphomutanten in cerebellären Körnerzellen

Da die Phosphorylierung von GluR4 wichtig für die Lokalisation an der postsynaptischen Membran ist (Esteban *et al*., 2003), wurde in cerebellären Körnerzellen die Lokalisation

der GluR4-Mutanten an der Plasmamembran untersucht. Dazu wurden cerebelläre Körnerzellen aus 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen an DIV1 mit den Lentiviren der verschiedenen GluR4-Konstrukte infiziert. An DIV 8 wurden die membranständigen Proteine biotinyliert und mit Hilfe Biotin-bindender Avidin-Agarose-Kügelchen von den Proteinen aus dem Zytosol getrennt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit gegen HA gerichteten Antikörpern auf ECL-Western-Blots quantitativ analysiert. Die zu den Signalstärken von Rab3a normalisierten Werte aus den Wildtypen wurden auf 100 % gesetzt und die normalisierten Werte aus den 4.1G/N-Doppelmutanten dazu entsprechend ins Verhältnis.

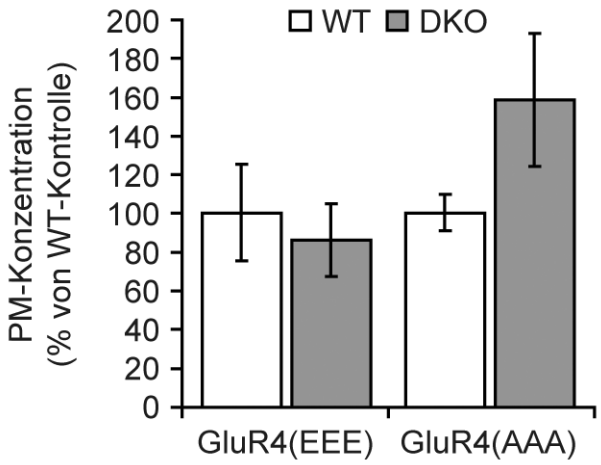

Abbildung 22: Lokalisation von phosphomimetischen und phosphorylierungsdefizienten Mutanten in cerebellären Körnerzellen an DIV 8. Die Konzentration der phosphomimetischen Mutante HA-GluR4(EEE) und der phosphorylierungsdefizienten Mutante HA-GluR4(AAA) an der Plasmamembran (PM) cerebellärer Körnerzellen aus 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) und Wildtypen (WT) wurde durch Biotinylierung analysiert. (DKO, grau, $n = 6$; WT, weiß, $n = 6$; ± Standardfehler)

Während die phosphomimetische Mutante von GluR4 in den cerebellären Körnerzellen aus 4.1G/N-Doppelmutanten verglichen mit cerebellären Körnerzellen aus Wildtypen in gleichen Konzentrationen an der Plasmamembran lokalisiert wird, zeigt die phosphorylierungsdefiziente Mutante von GluR4 die Tendenz einer höheren Konzentration an der Plasmamembran von 4.1G/N-Doppelmutanten, die jedoch nicht signifikant ist (DKO = 159 % ± 34 %, WT = 100 % ± 9 %, s. Abb. 22).

Der Verlust von Protein 4.1G und die starke Reduktion von Protein 4.1N im *Cerebellum* haben keinen signifikanten Einfluss auf die Lokalisation der

phosphomimetischen und phosphorylierungsdefizienten GluR4 an der Plasmamembran in cerebellären Körnerzellen.

4.12 Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für die synaptische Transmission im *Cerebellum*

Im *Hippocampus* von 4.1G/N-Doppelmutanten ist trotz der postsynaptischen Reduktion von GluR1 die synaptische Transmission nicht beeinträchtigt. Im *Cerebellum* ist die Konzentration von GluR4 an der Plasmamembran cerebellärer Körnerzellen erhöht. Gegenüber der Situation im *Hippocampus* ist im *Cerebellum* zusätzlich die Restexpression von Protein 4.1N erheblich geringer. Deshalb sollte überprüft werden, ob sich in Abwesenheit der Proteine 4.1G und 4.1N die erhöhte Konzentration von GluR4 an der Plasmamembran cerebellärer Körnerzellen auf die synaptische Transmission auswirkt. Dazu wurden verschiedene elektrophysiologische Experimente an cerebellären Körnerzellen durchgeführt.

4.12.1 Ermittlung der Zusammensetzung von AMPA-Rezeptoren in cerebellären Körnerzellen mittels *perforated-patch-clamp*-Messungen

Die Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren aus den verschiedenen Untereinheiten beeinflusst wie zuvor bereits beschrieben ihren Transport und ihre biophysikalischen Eigenschaften. An der Plasmamembran cerebellärer Körnerzellen aus 4.1G/N-Doppelmutanten ist die Konzentration von GluR4 erhöht. Deshalb sollte zunächst mittels *perforated-patch-clamp*-Messungen untersucht werden, ob sich die Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren aus den Untereinheiten in 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen unterscheidet. Dazu wurden entsprechende biophysikalische Eigenschaften des Rezeptors, wie das Strom-Spannungs-Verhältnis und das Rektifizierungsverhalten, untersucht.

Wie bereits unter 4.7.2 beschrieben wurde auch in cerebellären Körnerzellen das Verhältnis von Haltepotential zum induzierten Strom durch die extrazelluläre Applikation von 3 µM GABA für 2 s bzw. 30 µM Kainat für 2 s im *perforated-patch-clamp*-Modus bei folgenden Haltepotentialen gemessen: -70 mV, -30 mV, -10 mV, 10 mV, 30 mV und 50 mV. Auch hier wurde vor und nach jeder Messung bei einer der aufgeführten

Spannungen der induzierte Strom bei -50 mV gemessen. Auf diesen Wert wurden die ermittelten Daten normalisiert.

Weder die durch die Applikation von GABA noch die durch die Applikation von Kainat ermittelten Strom-Spannungs-Kurven zeigen Unterschiede zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen (s. Abb. 23 A und B). Auch der Rektifikationsindex war zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen nicht verschieden (s. Abb. 23 E). Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede der Amplituden bei -70 mV und -50 mV nach der Applikation von Kainat oder GABA zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen festgestellt werden (s. Abb. 23 C und D).

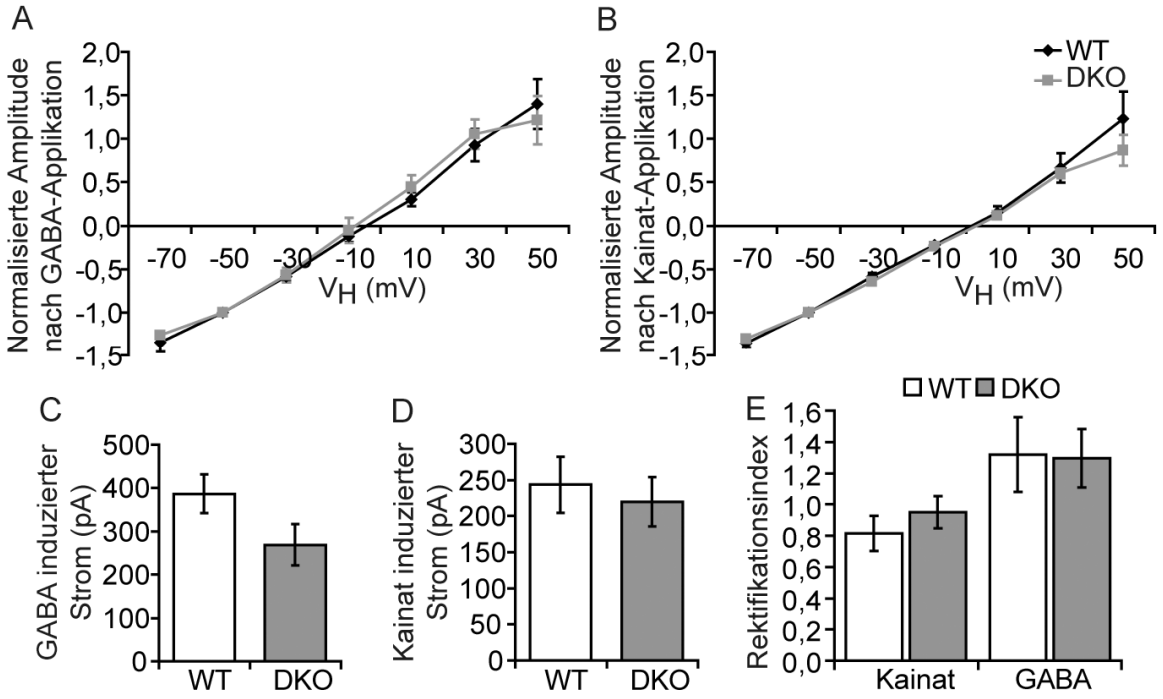

Abbildung 23: Das Verhältnis vom Haltepotential zur synaptischen Transmission in Autapsen cerebellärer Körnerzellen an DIV 12 - 15. In autaptischen Neuronen aus dem *Cerebellum* von 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) und Wildtypen (WT) wurde der durch GABA bzw. Kainat induzierte Strom bei verschiedenen Haltepotentialen gemessen. (A) Die normalisierte Amplitude nach extrazellulärer Applikation von 3 µM GABA bzw. (B) 30 µM Kainat bei -70 mV, -30 mV, -10 mV, 10 mV, 30 mV und 50 mV von Neuronen aus DKO und WT wurde gegen das jeweilige Haltepotential aufgetragen. (C) Die durchschnittliche Amplitude nach der Applikation von GABA bzw. (D) von Kainat bei -50 mV. (E) Verhältnis des Auswärtsstroms bei 30 mV zum Einwärtsstrom bei -30 mV. (DKO, grau, n = 11; WT weiß, n = 12; ± Standardfehler)

Es können keine Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen festgestellt werden. In den

Körnerzellen aus dem *Cerebellum* ist damit die Zusammensetzung der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in den 4.1G/N-Doppelmutanten elektrophysiologisch durch die *perforated-patch-clamp*-Messungen nicht von den Wildtypen zu unterscheiden.

4.12.2 Ermittlung der Zusammensetzung von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in cerebellären Körnerzellen mit Hilfe gepaarter *patch-clamp*-Messungen

Die erhöhte Expression von GluR4 an der Zellmembran cerebellärer Körnerzellen wirkt sich nicht auf die biophysikalischen Eigenschaften der membranständigen AMPA-Rezeptoren aus, deren Funktion mittels *perforated-patch-clamp*-Messungen untersucht wurde. Zur Überprüfung einer Veränderung der Zusammensetzung der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten direkt an der postsynaptischen Plasmamembran wurde (wie unter 4.7.3 beschrieben) mittels gepaarter *patch-clamp*-Messungen die synaptische Transmission zwischen zwei cerebellären Körnerzellen elektrophysiologisch ermittelt. Dabei wurden bei folgenden Haltepotentialen an dem postsynaptischen Neuron durch Depolarisation an dem präsynaptischen Neuron Aktionspotentiale ausgelöst: -70 mV, -30 mV, -10 mV, 10 mV, 30 mV und 50 mV. Wie in den Experimenten zuvor wurden die ermittelten Daten auf -50 mV normalisiert.

Weder die Amplituden bei -50 mV und -70 mV noch das ermittelte Strom-Spannungs-Verhältnis glutamaterger EPSCs oder der Rektifikationsindex zeigen Unterschiede zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen (s. Abb. 24 A - C). Des Weiteren wurden die Ladung, sowie die Zeitkomponenten *rise time* und *half width* der Amplituden untersucht. Die Analyse zeigt auch bei diesen Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen (s. Abb. 24 D und E). Weitere Parameter, die in 4.7.3 aufgeführt sind (s. Abb. 15) konnten in den Experimenten mit cerebellären Körnerzellen nicht analysiert werden.

In der Abwesenheit von Protein 4.1G und 4.1N ist in cerebellären Körnerzellen die AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR4 vermehrt an der Zelloberfläche lokalisiert. Dieser Effekt hat jedoch weder einen Einfluss auf die synaptische Transmission noch auf die Zusammensetzung der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten.

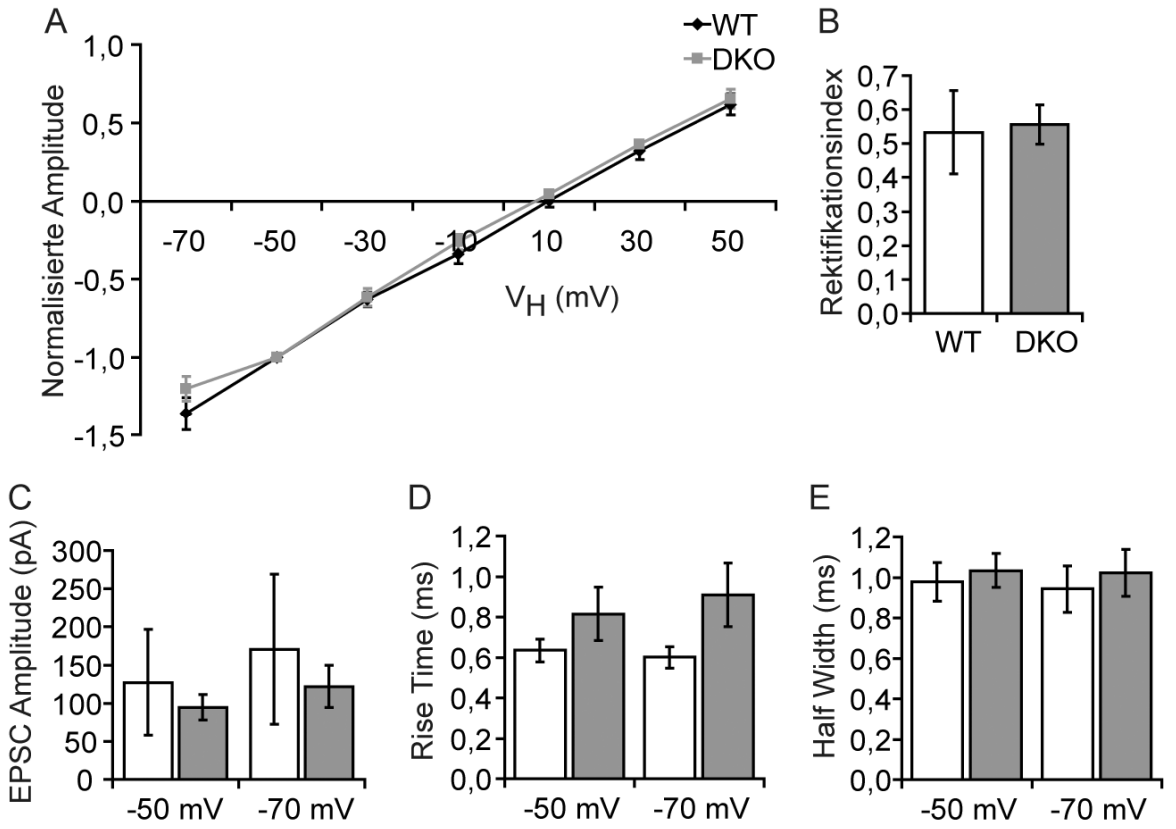

Abbildung 24: Die synaptische Transmission zwischen zwei Körnerzellen in 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen an DIV 12 - 15. Um die synaptische Transmission zwischen Körnerzellen aus 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) und Wildtypen (WT) zu vergleichen wurde ein Neuron stimuliert und in einem synaptisch verbundenen Neuron die EPSCs bei verschiedenen Haltepotentialen gemessen. Es wurden folgende Parameter gemessen: (A) Verhältnis der EPSC Amplituden (normalisiert zu EPSC Amplituden bei -50 mV) zum Haltepotential. (B) Verhältnis des Auswärtsstroms bei 30 mV zum Einwärtsstrom bei -30 mV. (C) Durchschnittliche EPSC Amplituden bei -70 mV bzw. -50 mV. (D) Durchschnittliche Zeit vom Ankommen des Aktionspotentials bis zum Erreichen der maximalen Amplitude (engl. *rise time*). (E) Hälfte der durchschnittlichen Dauer des EPSCs (engl. *half width*). (DKO, grau, n = 8; WT, weiß bzw. schwarz, n = 6; ± Standardfehler)

4.13 Untersuchung auf Kompensation durch Protein 4.1B im *Cerebellum*

Im *Cerebellum* ist die Restexpression von Protein 4.1N in 4.1G/N-Doppelmutanten verglichen zum *Hippocampus* wesentlich geringer. Diese starke Reduktion von Protein 4.1N und der Verlust von Protein 4.1G bewirken in cerebellären Körnerzellen eine vermehrte Lokalisation von GluR4 an der Plasmamembran. Die Zusammensetzung und Funktion der AMPA-Rezeptoren im *Cerebellum* ist jedoch nicht beeinträchtigt. Wie auch

im *Hippocampus* wird Protein 4.1B ebenfalls im *Cerebellum* exprimiert, weshalb es auf eine kompensatorische Überexpression untersucht werden sollte.

Dazu wurden Proteine aus cerebellären P2-Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und eine quantitative Analyse der durch die gegen 4.1B gerichteten Antikörper detektierten Banden in ECL-Western-Blots durchgeführt. Dabei wurden die ermittelten Werte auf die entsprechenden Werte von Rab3a normalisiert. In Wildtypen wurde von einer Proteinmenge von 100 % ausgegangen und die Werte aus den 4.1G/N-Doppelmutanten entsprechend dazu ins Verhältnis gesetzt.

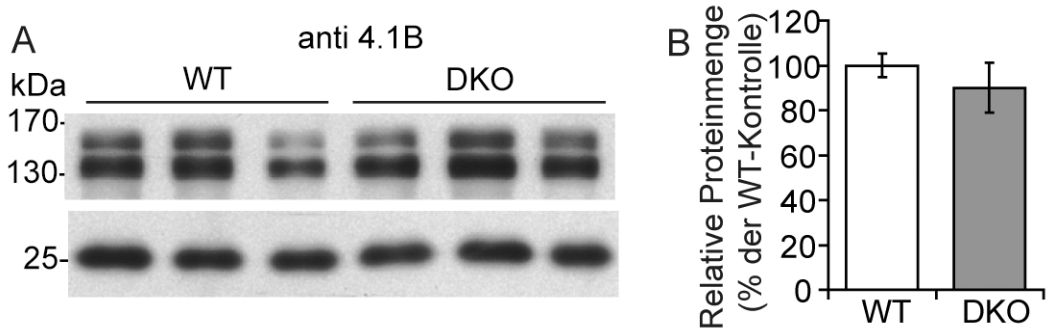

Abbildung 25: Expression von Protein 4.1B im *Cerebellum* von 4.1G/N-Doppelmutanten im Vergleich zu Wildtypen. (A) Western-Blot von cerebellären P2-Präparationen mit gegen 4.1B gerichteten Antikörpern und Rab3a (25 kDa) als Ladekontrolle. (B) Die Proteinmengen von 4.1B in 4.1G/N-Doppelmutanten (DKO) und Wildtypen (WT) im *Cerebellum* wurden durch eine quantitative Analyse der detektierten Banden in (A) bestimmt und sind in DKO als Prozentsatz der Proteinmengen in WT dargestellt. (DKO, grau, $n = 6$; WT, weiß, $n = 6$; ± Standardfehler)

Die Konzentration von Protein 4.1B im *Cerebellum* von 4.1G/N-Doppelmutanten unterscheidet sich nicht von der Konzentration im *Cerebellum* von Wildtypen (s. Abb. 25).

5. DISKUSSION

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für den Aufbau und die Funktion glutamaterger Synapsen untersucht werden. Dazu wurden Experimente an einem mutanten Mausmodell (Wozny *et al*., 2009) durchgeführt, in dem Protein 4.1G gar nicht und Protein 4.1N nur in geringen Mengen exprimiert wird. Die aus der Analyse dieser 4.1G/N-Doppelmutanten erhaltenen Ergebnisse wurden mit Ergebnissen aus Wildtyp-Kontrollen verglichen. Für *in-vivo*-Experimente wurden die Tiere in einem Alter von 3 - 4 Wochen analysiert. Entsprechende Kulturen wurden für biochemische Experimente ebenfalls nach 3 Wochen (DIV 21) und für elektrophysiologische Experimente an DIV 12 - 15, dem Standard-Zeitrahmen für Messungen an autaptischen Kulturen, untersucht. Der Fokus der Analysen wurde auf die Gehirnregionen *Hippocampus* und *Cerebellum* gerichtet. Im *Hippocampus* wurde vorwiegend die Rolle der Proteine 4.1G und 4.1N bei der Interaktion mit der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR1 untersucht, während sich die Studien im *Cerebellum* auf die AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR4 konzentrierten. Insgesamt wurden nur sehr wenige signifikante Veränderungen in 4.1G/N-Doppelmutanten gefunden, die zudem nicht funktionell relevant zu sein scheinen.

5.1 Funktion der Proteine 4.1G und 4.1N bei der glutamatergen synaptischen Transmission

Für viele AMPA-Rezeptor-bindende Proteine konnte nachgewiesen werden, dass sie für die Rekrutierung dieser Rezeptoren an der glutamatergen Postsynapse und somit für die postsynaptische Signalweiterleitung von essentieller Bedeutung sind. Dazu gehören unter anderem Mitglieder der TARP-Proteinfamilie, wie Stargazin und γ-8, sowie einige Mitglieder der MAGUK-Proteinfamilie, wie PSD93 und PSD95. In Stargazin-defizienten Mausmutanten ist die synaptische Lokalisation der AMPA-Rezeptoren in cerebellären Körnerzellen gestört (Chen *et al*., 2000) und γ-8-*knockout*-Mäuse weisen erhebliche Defizite in der hippocampalen synaptischen Transmission auf (Rouach *et al*., 2005). Auch in PSD93/PSD95-*double-knockout*-Mäusen ist die schnelle exzitatorische Transmission stark beeinträchtigt (Elias *et al*., 2006). Die Proteine 4.1G und 4.1N gehören ebenfalls zu den AMPA-Rezeptor-bindenden Proteinen und interagieren mit den AMPA-Rezeptor-

Untereinheiten GluR1 und GluR4 (Cai *et al*., 2002; Coleman *et al*., 2003; Rumbaugh *et al*., 2003). Aufgrund ihrer Domänen-Struktur und ihrer Anreicherung in PSDs (Scott *et al*., 2001; Trinidad *et al*., 2008) wurde eine essentielle Bedeutung von 4.1-Proteinen bei der Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren in der Synapse und der synaptischen Transmission postuliert (Coleman *et al*., 2003; Shen *et al*., 2000). Deshalb wurde in der vorliegenden Studie die glutamaterge synaptische Transmission in 4.1G/N-Doppelmutanten mit Hilfe verschiedener elektrophysiologischer Methoden untersucht.

Überraschenderweise konnten in den 4.1G/N-Doppelmutanten keine Beeinträchtigungen der glutamatergen synaptischen Transmission festgestellt werden. Es sind weder die basale synaptische Transmission im *Hippocampus* (s. Abb. 13) noch die Kurzzeitplastizität, das Strom-Spannungs-Verhältnis glutamaterger EPSCs oder das Rektifikationsverhalten von Glutamat-Rezeptoren im *Hippocampus* (s. Abb. 14 und 15) und *Cerebellum* (s. Abb. 23 und 24) signifikant gestört. Bei einer gestörten Rekrutierung einer der benötigten AMPA-Rezeptor-Untereinheiten wäre im Fall einer unveränderten basalen synaptischen Transmission eine Veränderung der Untereinheiten-Zusammensetzung in AMPA-Rezeptoren zu erwarten. Angesichts der unveränderten biophysikalischen Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren im *Hippocampus* und *Cerebellum* können Veränderungen in der AMPA-Rezeptor-Zusammensetzung aus den Untereinheiten in den 4.1G/N-Doppelmutanten jedoch ausgeschlossen werden. In weiteren elektrophysiologischen Untersuchungen konnte außerdem festgestellt werden, dass auch in hippocampalen Hirnschnitten drei Wochen alter 4.1G/N-Doppelmutanten weder die synaptische Transmission noch die Langzeitplastizität beeinträchtigt sind (Wozny *et al*., 2009).

Die 4.1G/N-Doppelmutanten weisen also eine unveränderte synaptische Transmission sowie eine unveränderte synaptische Kurz- und Langzeitplastizität auf. Außerdem sind die biophysikalischen Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren in den 4.1G/N-Doppelmutanten nicht verändert. Diese Erkenntnisse widersprechen somit der Hypothese einer essentiellen Rolle der Proteine 4.1G und 4.1N bei der synaptischen Rekrutierung und der Funktion von AMPA-Rezeptoren. Die Proteine 4.1G und 4.1N sind demnach im Widerspruch zu bereits publizierten Annahmen für die Funktion glutamaterger Synapsen entbehrlich. Ein wesentlicher Grund hierfür könnte sein, dass andere Proteine in 4.1G/N-Doppelmutanten den Verlust der Proteine 4.1G und 4.1N kompensieren.

5.2 Charakterisierung der Restexpression von Protein 4.1N in den 4.1G/N-Doppelmutanten

Im Zusammenhang mit der Diskussion über die Gründe für die sehr milden phänotypischen Veränderungen in den 4.1G/N-Doppelmutanten muss zunächst bedacht werden, dass in allen untersuchten Regionen des Zentralnervensystems von 4.1G/N-Doppelmutanten eine Restexpression von Protein 4.1N festgestellt wurde (s. Abb. 3). Um zu überprüfen, ob diese verbleibende Expression von Protein 4.1N für eine unveränderte synaptische Transmission verantwortlich ist, wurde diese Restexpression zunächst detailliert charakterisiert und quantifiziert.

Die Analyse der verbleibenden Variante von Protein 4.1N in 4.1N-Mausmutanten mittels RACE-PCR ergab eine große Ähnlichkeit zu der kurzen Isoform von Protein 4.1N in Wildtypen. Die größten Unterschiede treten in der N-terminalen Sequenz auf, was durch eine Western-Blot-Analyse bestätigt werden konnte, da das Epitop des gegen die ersten 15 Aminosäuren gerichteten Antikörpers (anti-4.1N-Exon 2) in den 4.1G/N-Doppelmutanten fehlt (s. Abb. 4 und 5). Allerdings erkennt dieser Antikörper auch nicht die kurze Isoform von Protein 4.1N in Wildtypen, in der das Epitop für den Antikörper anti-4.1N-Exon 2 offenbar nicht zugänglich ist. Eine der langen Isoform von Protein 4.1N entsprechende Variante ist in den 4.1G/N-Doppelmutanten nicht vorhanden (s. Abb. 4 und 5).

In Abb. 3 ist zu erkennen, dass die Expression von Protein 4.1N in den 4.1G/N-Doppelmutanten im Vergleich zu Wildtypen stark reduziert ist. Tatsächlich beträgt die Restexpression von Protein 4.1N im *Hippocampus* von 4.1G/N-Doppelmutanten nur noch 22 % (s. Abb. 5 D) und im *Cerebellum* sogar nur noch 9 % (s. Abb. 17 D). Aufgrund der stöchiometrischen Verhältnisse der Proteine 4.1G und 4.1N in postsynaptischen Fraktionen des *Hippocampus* und des *Cerebellums* (Trinidad *et al*., 2008) beträgt die kombinierte Expression der Proteine 4.1G und 4.1N in 4.1G/N-Doppelmutanten lediglich noch 11 - 12 % im *Hippocampus* und 5 % im *Cerebellum*. Das stöchiometrische Verhältnis zwischen der Kombination von Protein 4.1G und 4.1N zu der Kombination der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 in Wildtypen ist 0,8:1 (Trinidad *et al*., 2008). Dieses Verhältnis ist in 4.1G/N-Doppelmutanten auf bis zu 0,08:1 reduziert.

Sollten die Proteine 4.1G und 4.1N also eine essentielle Rolle bei der Regulation von AMPA-Rezeptoren spielen (Cai *et al*., 2002; Coleman *et al*., 2003; Rumbaugh *et al*., 2003) und sollte diese aufgrund einer Kompensation bzw. Redundanz elektrophysiologisch

nicht nachweisbar sein, so ist es trotz der Restexpression von Protein 4.1N in den 4.1G/N-Doppelmutanten höchst unwahrscheinlich, dass diese verbleibende Variante für die Aufrechterhaltung der normalen Funktion ausreichend ist.

5.3 Kompensation und Redundanz in 4.1G/N-Doppelmutanten

Da viele AMPA-Rezeptor-bindende Proteine parallel in der Synapse zusammenarbeiten, könnten einige dieser Proteine den Verlust der Proteine 4.1G und 4.1N kompensieren. So wurde z.B. eine Interaktion von Stargazin und anderen TARPs mit AMPA-Rezeptoren nachgewiesen (Nicoll *et al*., 2006). Diese Bindung ist wesentlich stärker als andere bekannte Interaktionen, wie z.B. die mit den Proteinen 4.1G und 4.1N (Fukata *et al*., 2005; Vandenberghe *et al*., 2005). Tatsächlich sind die Interaktionen von TARPs wie γ-8 mit AMPA-Rezeptoren essentiell für deren Transport und synaptische Verankerung (Rouach *et al*., 2005). Einige Cornichon-Proteine, wie CNIH-2 und CNIH-3, interagieren ebenfalls mit AMPA-Rezeptor-Untereinheiten und sind für deren Rekrutierung an die Plasmamembran von Bedeutung (Schwenk *et al*., 2009). Prinzipiell steht also eine Reihe verschiedener synaptischer Proteine zur Verfügung, die ein Fehlen der Proteine 4.1G und 4.1N kompensieren könnten.

Aufgrund der Homologie in der Proteinstruktur ist eine Redundanz innerhalb der 4.1-Proteinfamilie jedoch am wahrscheinlichsten. Zudem sind alle 4.1-Proteine in postsynaptischen Fraktionen verschiedener Gehirnregionen detektierbar, u.a. auch im *Hippocampus* und *Cerebellum* (Trinidad *et al*., 2008). Für andere AMPA-Rezeptor-bindende Proteine konnten bereits Redundanzeffekte innerhalb der jeweiligen Proteinfamilie nachgewiesen werden. So konnten keine Beeinträchtigungen der synaptischen Transmission in Mausmutanten festgestellt werden, in denen PSD95 deletiert ist bzw. lediglich eine verkürzte Version von PSD95 exprimiert wird (Migaud *et al*., 1998). Gleiches gilt für PSD93-*knockout*-Mäuse (Elias *et al*., 2006). Fehlen jedoch sowohl PSD95 als auch PSD93, wird eine drastische Reduktion der glutamatergen synaptischen Transmission in entsprechenden DKO-Mäusen beobachtet (Elias *et al*., 2006).

Angesichts dieser dokumentierten Redundanzeffekte wurde in der vorliegenden Studie überprüft, ob in den 4.1G/N-Doppelmutanten die Expression von Protein 4.1B kompensatorisch heraufreguliert ist. Dies ist offenbar weder im *Hippocampus* noch im *Cerebellum* der Fall (s. Abb. 16 und 25). Dennoch könnte Protein 4.1B das Fehlen von

Protein 4.1G und Protein 4.1N kompensieren, da die basale Expression von Protein 4.1B in den untersuchten Regionen sehr hoch ist (Trinidad *et al*., 2008). Die Annahme einer Redundanz von 4.1-Proteinen wird durch Ergebnisse einer Studie in Invertebraten unterstützt. Eine Deletion von *coracle*, dem einzigen 4.1-Protein in *Drosophila*, bewirkt den Verlust der *coracle*-bindenden GluRIIA-Rezeptoren in postsynaptischen Bereichen. Die Lokalisation von GluRIIB-Rezeptoren hingegen, die nicht mit *coracle* interagieren, ist nicht beeinträchtigt. Dies deutet auf eine wichtige Rolle der 4.1-Proteine für die Verankerung von AMPA-Rezeptoren in Synapsen von Invertebraten hin (Chen *et al*., 2005).

Zur abschließenden Klärung der Frage, ob die 4.1-Proteine in Säugern redundante Funktionen wahrnehmen, sind weiterführende Studien an Mausmutanten nötig, denen neben den Proteinen 4.1G und 4.1N auch das Protein 4.1B fehlt oder in denen keines der vier 4.1-Proteine exprimiert wird. Um kompensatorische Mechanismen auszublenden, könnten des Weiteren *knockdown*-Experimente durchgeführt werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass ein spezifischer *knockdown* von PSD95 oder PSD93 mit Hilfe von shRNS jeweils zu einer verminderten glutamatergen Transmission in hippocampalen Hirnschnitten führt (Elias *et al*., 2006). Zusammen mit den entsprechenden Ergebnissen aus Maumutanten deuten diese Untersuchungen darauf hin, dass PSD95 und PSD93 funktionell redundant sind und den Verlust des jeweils anderen Proteins kompensieren können, sofern genügend Zeit für die kompensatorischen Mechanismen vorhanden ist. Angesichts dieser Überlegungen ist es wahrscheinlich, dass entsprechende *knockdown*-Experimente weitere Aufschlüsse über die Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für den Aufbau und die Funktion glutamaterger Synapsen liefern können.

5.4 Einfluss der Proteine 4.1G und 4.1N auf die Ausbildung glutamaterger Synapsen im *Hippocampus*

Protein 4.1N könnte nach einer kürzlich publizierten Studie (Li *et al*., 2007) eine Rolle bei der Ausbildung der dendritischen Dornfortsätze (engl. *dendritic spines*) spielen und somit wichtig für die Synapsenbildung sein. Derselben Studie zufolge soll dieser Funktion auf eine Interaktion von Protein 4.1N mit dem Protein KCC2, einem Mitglied aus der Familie der Kation-Chlorid-Kotransporter, zurückzuführen sein. Ein Einfluss der Interaktion von Protein 4.1N und KCC2 auf die Ausbildung und Morphologie dendritischer Dornfortsätze

wurde in corticalen Kulturen an DIV 14 beobachtet.

Die Länge und Verästelung von Dendriten in den 4.1G/N-Doppelmutanten wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Es konnte hier jedoch gezeigt werden, dass sich die Anzahl glutamaterger Synapsen *in vivo* im *Stratum radiatum* des *Hippocampus* in 3 Wochen alten 4.1G/N-Doppelmutanten nicht von der in Wildtypen unterscheidet (s. Abb. 6). Auch die Länge und Breite der PSDs dieser Synapsen sind in 3 Wochen alten 4.1G/N-Doppelmutanten nicht verschieden (Wozny *et al*., 2009). Des Weiteren sind die basale synaptische Transmission in kultivierten Neuronen (s. Abb. 13) und in hippocampalen Schnitten (Wozny *et al*., 2009) sowie die Langzeitplastizität in der CA1-Region des Hippocampus (Wozny *et al*., 2009) in 4.1G/N-Doppelmutanten nicht verändert. Vor diesem Hintergrund ist eine Rolle der Proteine 4.1G und 4.1N bei der Ausbildung von Synapsen und dendritischen Dornfortsätzen eher unwahrscheinlich. Auf eine weitergehende Analyse wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

5.5 Funktion der Proteine 4.1G und 4.1N bei der Lokalisation von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in glutamatergen Synapsen

Verschiedene AMPA-Rezeptor-bindende Proteine sind wichtig für die Lokalisation dieser Rezeptoren an der Oberfläche der postsynaptischen Membran. So kann in Zellen, welche die Cornichon-Homologe CNIH-2 oder CNIH-3 überexprimieren, eine bis zu zehnfach erhöhte Expression von AMPA-Rezeptoren an der Plasmamembran festgestellt werden (Schwenk *et al*., 2009). Obwohl funktionelle Beeinträchtigungen nicht detektierbar waren, konnten in glutamatergen Synapsen von 4.1G/N-Doppelmutanten Veränderungen in deren Aufbau festgestellt werden.

In synaptosomalen Fraktionen aus dem Gehirn von 3 Wochen alten 4.1G/N-Doppelmutanten wurde eine Reduktion der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR1 von 27 % festgestellt (s. Abb. 7). Nähere Untersuchungen der postsynaptischen Fraktionen aus dem *Hippocampus* ergaben eine Reduktion der Expression von GluR1 um 17 %. Die Expression von GluR2/3 war ebenfalls um 18 % reduziert (s. Abb. 8), obwohl eine direkte Interaktion zwischen Protein 4.1G oder Protein 4.1N und dieser AMPA-Rezeptor-Untereinheit nicht bekannt ist. Da AMPA-Rezeptoren *in vivo* aus Heteromeren aufgebaut sind, die in der CA Region des *Hippocampus* größtenteils aus den Untereinheiten GluR1 und GluR2 zusammengesetzt sind (Derkach *et al*., 2007), könnte eine Reduktion von

GluR1 somit auch gleichzeitig eine Reduktion von GluR2/3 bewirken. In hippocampalen Neuronen an DIV 21 konnte zudem verglichen mit den Gesamtmengen an GluR1 ein um 40 % erhöhter Anteil an membranständigen GluR1 festgestellt werden (s. Abb. 9). Obwohl also GluR1 in postsynaptischen Fraktionen aus dem *Hippocampus* von 3 Wochen alten 4.1G/N-Doppelmutanten reduziert ist, wird GluR1 in entsprechenden Neuronen an DIV 21 verstärkt an der Plasmamembran lokalisiert. Diese Ergebnisse deuten auf eine vermehrte Konzentration von GluR1 an der perisynaptischen Plasmamembran in 4.1G/N-Doppelmutanten hin.

In postsynaptischen Fraktionen aus dem *Cerebellum* von 3 Wochen alten 4.1G/N-Doppelmutanten konnten, wie in den synaptosomalen Fraktionen (s. Abb. 7) auch, keine Veränderungen in den Konzentrationen der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR4 festgestellt werden (s. Abb. 18). Die Konzentration von GluR4 an der Plasmamembran cerebellärer Körnerzellen war an DIV 21 in 4.1G/N-Doppelmutanten jedoch um 18 % erhöht (s. Abb. 19). Demnach weist auch GluR4 eine verstärkt perisynaptische Lokalisation im *Cerebellum* von 4.1G/N-Doppelmutanten auf.

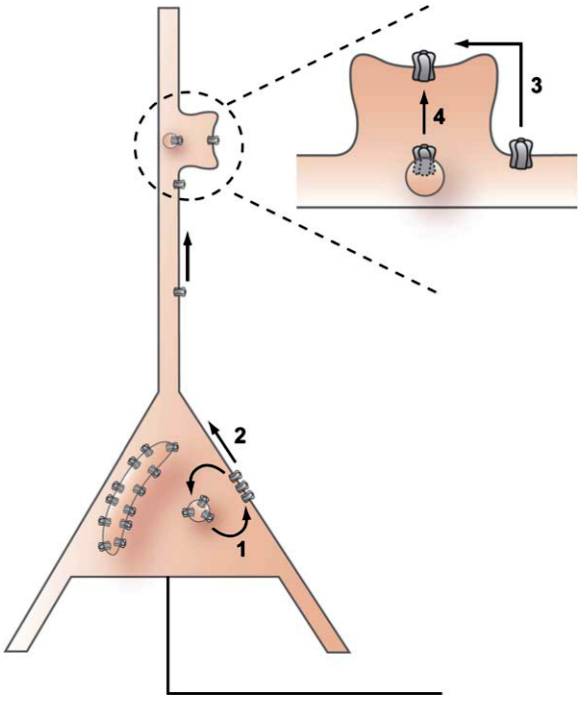

Abbildung 26: Modell der Lokalisation von AMPA-Rezeptoren. (1) Austausch von extrasynaptischen AMPA-Rezeptoren aus einem großen, intrazellulären Vorrat mit membranständigen AMPA-Rezeptoren. (2) Neu an der extrasynaptischen Plasmamembran lokalisierte AMPA-Rezeptoren aus (1) diffundieren entlang der Dendriten in Richtung der dendritischen Dornfortsätze. (3) Laterale Diffusion perisynaptischer AMPA-Rezeptoren in die Synapse. (4) Austausch intrazellulärer AMPA-Rezeptoren mit synaptischen AMPA-Rezeptoren. Modifiziert nach Adesnik *et al*. (2005).

In der Literatur sind verschiedene Wege für den Transport von AMPA-Rezeptoren in die Synapse beschrieben (Adesnik *et al*., 2005). Unter anderem gelangen membranständige AMPA-Rezeptoren durch laterale Diffusion aus perisynaptischen Bereichen an die

postsynaptische Plasmamembran (s. (3) in Abb. 26). Dieser Schritt der Lokalisation scheint in den 4.1G/N-Doppelmutanten beeinträchtigt zu sein, da die AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 im Vergleich zu Wildtypen vermehrt an der perisynaptischen Plasmamembran lokalisiert sind. In früheren Experimenten (Wolk, 2005) wurde eine vorwiegend perisynaptische Lokalisation von Protein 4.1N festgestellt, was die These einer Funktion der Proteine 4.1G und 4.1N bei der lateralen Diffusion von GluR1 und GluR4 aus perisynaptischen Bereichen zusätzlich stützt.

Nach publizierten Vermutungen (Coleman *et al*., 2003; Shen *et al*., 2000) stabilisieren die Proteine 4.1G und 4.1N die Lokalisation der AMPA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran. Dabei interagieren sie offenbar im *Hippocampus* vornehmlich mit GluR1 und im *Cerebellum* vornehmlich mit GluR4. Die für GluR1 beobachteten Unterschiede im *Hippocampus* von 4.1G/N-Doppelmutanten sind im *Cerebellum* von 4.1G/N-Doppelmutanten nicht vorhanden. Genauso unterscheidet sich die Lokalisation von GluR4 im *Cerebellum* von 4.1G/N-Doppelmutanten zu Wildtypen, jedoch nicht im *Hippocampus*. Dies könnte auf die entwicklungsabhängigen Konzentrationsabnahmen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in den entsprechenden Gehirnregionen zurückzuführen sein. Der Vergleich der Ergebnisse aus *in-vivo*-Experimenten mit 3 Wochen alten Tieren zu Ergebnissen aus *in-vitro*-Exprimenten mit Neuronenkulturen an DIV 21 bleibt jedoch problematisch, da der jeweilige Entwicklungsstatus der Neuronen nicht direkt vergleichbar ist.

Die hier durchgeführten biochemischen und zellbiologischen Experimente zeigen, dass die Proteine 4.1G und 4.1N durchaus eine Rolle bei der Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren in glutamatergen Synapsen spielen. Die in den 4.1G/N-Doppelmutanten festgestellten Unterschiede im Aufbau der glutamatergen Synapsen schlagen sich jedoch nicht in funktionellen Veränderungen nieder, da sich elektrophysiologisch keine Beeinträchtigungen der Transmission an diesen Synapsen feststellen lassen. In γ-8 *knockout*-Mäusen sind die Konzentrationen der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR2/3 im *Hippocampus* um 80 - 90 % reduziert, die synaptische Transmission jedoch nur um 30 - 40 % (Rouach *et al*., 2005). Diese Daten zeigen, dass sogar erhebliche Reduktionen von 80 - 90 % in AMPA-Rezeptor-Konzentrationen keine ähnlich starken Beeinträchtigungen in der synaptischen Transmission bewirken. Dieses offensichtliche Fehlen einer linearen Beziehung zwischen der AMPA-Rezeptor-Konzentration und der Funktion dieser AMPA-Rezeptoren in der Synapse könnte erklären, warum in den 4.1G/N-

Doppelmutanten die schwache Reduktion der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in postsynaptischen Bereichen nicht mit einer Beeinträchtigung der synaptischen Transmission einhergeht.

5.6 Funktion der Proteine 4.1G und 4.1N bei der Phosphorylierung von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten

Einige Funktionen des *Hippocampus*, wie Gedächtnis und Lernen, sind eng mit der Regulation der Phosphorylierung von AMPA-Rezeptoren verknüpft (Lee *et al*., 2003; Whitlock *et al*., 2006), da die Phosphorylierung u.a. Auswirkungen auf den Transport dieser Rezeptoren an die Plasmamembran hat (Derkach *et al*., 2007). In der Aminosäure-sequenz der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 folgen auf die Protein-4.1N-bindende Region verschiedene Phosphorylierungs-Stellen, die für diese Funktion wichtig sind (s. Abb. 10 und Abb. 20). Deshalb sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden, ob die Proteine 4.1G und 4.1N einen Einfluss auf die Phosphorylierung von GluR1 und GluR4 haben.

Für die Untersuchung der Phosphorylierung von GluR1 im *Hippocampus* konnten phospho-spezifische anti-GluR1-Antikörper zur Bestimmung der Konzentrationen phosphorylierter GluR1 genutzt werden, die gegen an Serin 831 phosphoryliertes GluR1 (anti-GluR1-S831P) bzw. gegen an Serin 845 phosphoryliertes GluR1 (anti-GluR1-S845P) gerichtet sind (s. Abb. 10). Zwar gibt es neben diesen beiden Phosphorylierungs-Stellen noch weitere in unmittelbarer Nähe zur 4.1N-bindenden Region bzw. sogar innerhalb dieser Region, doch gab es für diese keine kommerziell erhältlichen Antikörper, die für eine Analyse genutzt werden konnten. Die Untersuchungen ergaben für beide Phosphorylierungs-Stellen unveränderte Anteile der phosphorylierten GluR1 sowohl in hippocampalen PSD-Fraktionen und TX-100 löslichen Fraktionen aus 3 Wochen alten 4.1G/N-Doppelmutanten als auch an der Plasmamembran hippocampaler Neuronen an DIV 21 (s. Abb. 11 und 12 B). Es konnte jedoch ein um 50 % erhöhter Anteil von an Serin 831 phosphoryliertem GluR1 im Lysat entsprechender hippocampaler Neuronen an DIV 21 nachgewiesen werden (s. Abb. 12 C).

In einer Reihe früherer Studien wurden die Phosphorylierung und der Transport von GluR1 untersucht (z.B. Derkach *et al*., 2007). Die Phosphorylierung von GluR1 an Serin 845 durch die Protein-Kinase A (PKA) bewirkt die Lokalisation extrasynaptischer

AMPA-Rezeptoren an die Plasmamembran und die darauf folgende Diffusion in Richtung der glutamatergen Synapse (s. Abb. 27; (1) und (2) in Abb. 26). Durch die Kalzium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CamKII) und Protein-Kinase C (PKC) wird GluR1 an Serin 831 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt die laterale Diffusion der AMPA-Rezeptoren in die Synapse (s. Abb. 27; (3) in Abb. 26).

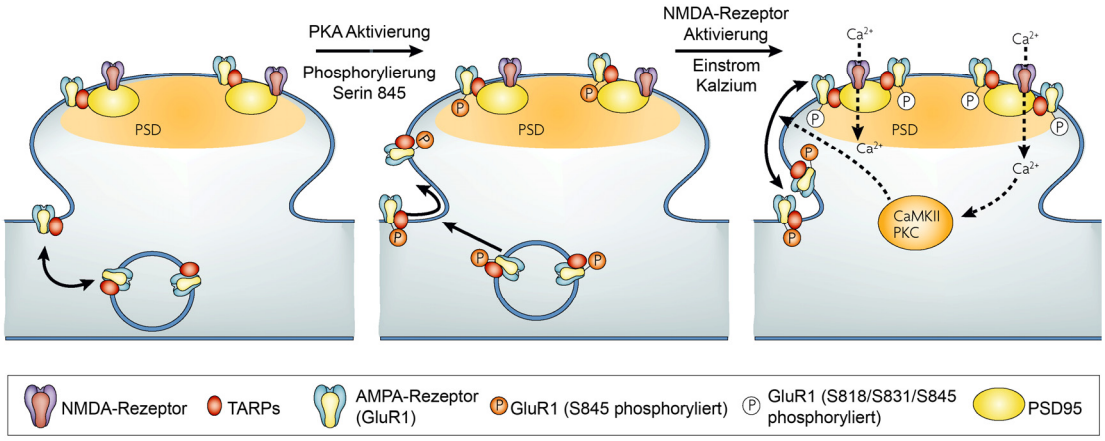

Abbildung 27: Phosphorylierung und Transport von GluR1 enthaltenden AMPA-Rezeptoren. (A) Austausch von extrasynaptischen AMPA-Rezeptoren zwischen Zytoplasma und synaptischer Plasmamembran. (B) Die Aktivierung der PKA und Phosphorylierung an S845 von GluR1 bewirken den Transport von phosphorylierten GluR1 enthaltenden AMPA-Rezeptoren an die extrasynaptische Plasmamembran. (C) Gefördert durch den Einstrom von Kalzium-Ionen durch NMDA-Rezeptoren und die Aktivierung von CamKII und PKC werden extrasynaptische AMPA-Rezeptoren in die Synapse transportiert. Modifiziert nach Derkach *et al*. (2007).

Wie zuvor diskutiert, spielen die Proteine 4.1G und 4.1N vermutlich eine wichtige Rolle bei der lateralen Diffusion der AMPA-Rezeptoren von der perisynaptischen Plasmamembran in die Synapse. Die Phosphorylierung von GluR1 an Serin 831 bewirkt eine erhöhte Lokalisation von GluR1 in der Synapse. Da in Abwesenheit der Proteine 4.1G und 4.1N der Anteil an Serin 831 phosphorylierter GluR1 erhöht ist, könnte diese Phosphorylierung eine regulatorische Kompensation des Verlustes der 4.1-Proteine bewirken. Aufgrund der Lokalisation der AMPA-Rezeptoren an der Oberfläche der Plasmamembran bleibt jedoch die Frage, warum im Gesamtlysat der Neuronen der Anteil an Serin 831 phosphorylierter GluR1 erhöht ist und nicht an der Plasmamembran. Im Lysat wäre eher ein erhöhter Anteil an Serin 845 phosphorylierter GluR1 zu erwarten.

Bezüglich der Phosphorylierung von GluR4 sollte überprüft werden, wie sich phosphomimetische und phosphorylierungsdefiziente Mutanten von GluR4 in Neuronen aus 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen verhalten. Trotz sich abzeichnender Tendenzen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Lokalisation dieser Mutanten an der Plasmamembran festgestellt werden (s. Abb. 22). Da die phosphorylierungsdefiziente Mutante in 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen in gleichen Konzentrationen an der Plasmamembran cerebellärer Körnerzellen lokalisiert ist (s. Abb. 22) und demnach dort weniger konzentriert ist als das endogene GluR4 (s. Abb. 19), könnte der Mechanismus fehlen, der zu dieser verstärkten Lokalisation endogener GluR4 an der Plasmamembran führt. Ob dies durch Phosphorylierung reguliert wird, bleibt fraglich, denn die phosphomimetische Mutante weist ebenfalls keine Unterschiede in den Konzentrationen an der Plasmamembran von 4.1G/N-Doppelmutanten und Wildtypen auf. Verglichen zur Untersuchung der Lokalisation endogener GluR4 an der Plasmamembran cerebellärer Körnerzellen wurde diese Untersuchung aufgrund der Virusinfektion bereits nach einer Woche in Kultur an DIV 8 durchgeführt, wodurch sich die Diskrepanzen in den Ergebnissen erklären könnten.

Wie für die Phosphorylierung von GluR1 wird auch bezüglich der Phosphorylierung von GluR4 vermutet, dass sie wichtig für die Lokalisation der Rezeptoren an der synaptischen Membran ist (Gomes *et al*., 2007). Im hier vorliegenden Fall könnten wiederum veränderte Phosphorylierungsprozesse eine Kompensation der fehlenden Proteine 4.1G und 4.1N widerspiegeln.

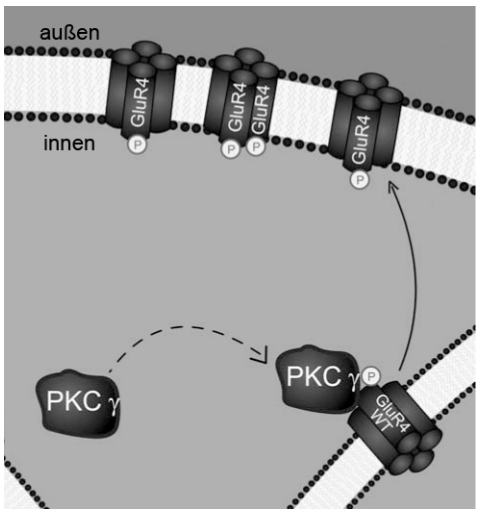

Abbildung 28: Phosphorylierung und Transport von GluR4 enthaltenden AMPA-Rezeptoren. Die Interaktion von PKC mit GluR4 ist wichtig für die Phosphorylierung der AMPA-Rezeptor-Untereinheit. Phosphoryliertes GluR4 wird an die Plasmamembran lokalisiert. Andere interagierende Proteine, wie Protein 4.1N, könnten für den weiteren Transport an die synaptische Plasmamembran wichtig sein. Modifiziert nach Gomes *et al*. (2007)

Die Proteine 4.1G und 4.1N scheinen *in vitro* einen Einfluss auf die Phosphorylierung von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten und somit auch auf deren Rekrutierung an die Postsynapse zu haben. Die Phosphorylierung von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten wirkt sich auf die synaptische Transmission aus und spielt besonders bei Langzeit-Potenzierungen eine wichtige Rolle (Lee *et al*., 2003; Whitlock *et al*., 2006). Da in den 4.1G/N-Doppelmutanten mit Hilfe entsprechender elektrophysiologischer Experimente keine Beeinträchtigungen der synaptische Transmission und der Langzeitplastizität festgestellt werden konnten (Wozny *et al*., 2009), scheint es jedoch unwahrscheinlich, dass der hier in *in vitro* beobachtete Effekt auch *in vivo* eine essentielle Rolle spielt. Von einer weiterführenden Analyse der Phosphorylierung von GluR1 und GluR4 in 4.1G/N-Doppelmutanten wurde deshalb in der vorliegenden Studie abgesehen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In unserem Gehirn wird die schnelle exzitatorische Transmission überwiegend durch AMPA-Rezeptoren vermittelt. Dabei sind der Transport dieser Rezeptoren in die PSD und ihre Lokalisation an der postsynaptischen Membran Voraussetzungen für die schnelle Signalweiterleitung. Innerhalb der PSD regulieren Mitglieder eines weit verzweigten Netzwerkes aus verschiedenen Proteinen die Rezeptor-Dichte an der postsynaptischen Membran. Einige dieser Proteine interagieren mit AMPA-Rezeptor-Untereinheiten. Dazu zählen die Proteine 4.1G und 4.1N, die mit den AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR4 interagieren (Cai *et al*., 2002; Coleman *et al*., 2003; Rumbaugh *et al*., 2003). Aufgrund ihrer Lokalisation in der PSD und ihrer charakteristischen Proteinstruktur wird vermutet, dass die Proteine 4.1G und 4.1N eine entscheidende Bedeutung für den Transport von GluR1 und GluR4 in die PSD und somit auch für die synaptische Transmission glutamaterger Synapsen haben (Coleman *et al*., 2003; Shen *et al*., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde in 4.1G/N-Doppelmutanten die Rolle der Proteine 4.1G und 4.1N bei der Lokalisation von AMPA-Rezeptoren und der Transmission in glutamatergen Synapsen untersucht. Während die Abwesenheit anderer AMPA-Rezeptor-bindender Proteine wie Stargazin und γ-8 zu drastischen Beeinträchtigungen der synaptischen Transmission führt (Chen *et al*., 2000; Rouach *et al*., 2005), wurden hier in elektrophysiologischen Experimenten an 4.1G/N-Doppelmutanten weder eine veränderte synaptische Transmission noch eine veränderte synaptische Plastizität gefunden. Die Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren aus ihren Untereinheiten ist in 4.1G/N-Doppelmutanten ebenfalls nicht beeinträchtigt.

Während in 4.1G/N-Doppelmutanten Protein 4.1G nicht exprimiert wird, konnte die Restexpression einer Variante von Protein 4.1N festgestellt werden, die für das Aufrechterhalten des Wildtyp-Phänotyps jedoch nicht ausreichend ist. Vermutlich sind Kompensationsmechanismen für die Aufrechterhaltung der Funktion glutamaterger Synapsen in 4.1G/N-Doppelmutanten verantwortlich. Neben einer Kompensation durch andere AMPA-Rezeptor-bindende Proteine ist eine Redundanz innerhalb der 4.1-Proteinfamilie und somit eine Kompensation durch Protein 4.1B die wahrscheinlichste Ursache für die Abwesenheit funktioneller phänotypischer Veränderungen in 4.1G/N-Doppelmutanten.

Die 4.1G/N-Doppelmutanten zeigen keine Unterschiede in der Anzahl glutamaterger Synapsen im *Hippocampus*. Die Expression von GluR1 in synaptischen Fraktionen des *Hippocampus* ist jedoch reduziert. Gleichzeitig konnten ein erhöhter Anteil von GluR1 an der Plasmamembran hippocampaler Neuronen und eine erhöhte Konzentration von GluR4 an der Plasmamembran cerebellärer Neuronen festgestellt werden. Demnach sind die Proteine 4.1G und 4.1N wichtig für den Transport von AMPA-Rezeptoren von perisynaptischen Bereichen in die PSD und somit für den Aufbau glutamaterger Synapsen im *Hippocampus* und *Cerebellum* drei Wochen alter Tiere. Im *Hippocampus* von 4.1G/N-Doppelmutanten wird GluR1 verstärkt phosphoryliert, was die laterale Diffusion der phosphorylierten GluR1 in die PSD bewirkt. Ein Teil des Verlustes der Proteine 4.1G und 4.1N könnte durch diese Regulation kompensiert werden.

In 4.1G/N-Doppelmutanten können also Veränderungen im Aufbau glutamaterger Synapsen nachgewiesen werden, die auf eine Rolle der Proteine 4.1G und 4.1N bei der Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren in der Postsynapse hindeuten. Allerdings ist diese Funktion aufgrund der unveränderten glutamatergen synaptischen Transmission in 4.1G/N-Doppelmutanten funktionell ohne Folgen. Entgegen bestehender Vermutungen spielen die Proteine 4.1G und 4.1N überraschenderweise keine essentielle Rolle für die Funktion der glutamatergen Synapsen und sind vermutlich aufgrund von Kompensationsmechanismen für die synaptische Transmission entbehrlich.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abbott, L. F. and Nelson, S. B. (2000). Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci* **3**, 1178-1183.

Adesnik, H., Nicoll, R. A. and England, P. M. (2005). Photoinactivation of Native AMPA Receptors Reveals Their Real-Time Trafficking. *Neuron* **48**, 977-985.

Barry, M. F. and Ziff, E. B. (2002). Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Current Opinion in Neurobiology* **12**, 279-286.

Beique, J.-C. and Andrade, R. (2003). PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. *J Physiol* **546**, 859-867.

Bekkers, J. M. and Stevens, C. F. (1991). Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7834-7838.

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. *et al.* (1999). Proline-Rich Synapse-Associated Protein-1/Cortactin Binding Protein 1 (ProSAP1/CortBP1) Is a PDZ-Domain Protein Highly Enriched in the Postsynaptic Density. *J. Neurosci.* **19**, 6506-6518.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*

Braithwaite, S. P., Meyer, G. and Henley, J. M. (2000). Interactions between AMPA receptors and intracellular proteins. *Neuropharmacology* **39**, 919-930.

Bredt, D. S. and Nicoll, R. A. (2003). AMPA Receptor Trafficking at Excitatory Synapses. *Neuron* **40**, 361-379.

Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H. and Sakmann, B. (1992). Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* **8**, 189-198.

Cai, C., Coleman, S. K., Niemi, K. and Keinanen, K. (2002). Selective Binding of Synapse-associated Protein 97 to GluR-A alpha -Amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole Propionate Receptor Subunit Is Determined by a Novel Sequence Motif. *J. Biol. Chem.* **277**, 31484-31490.

Chen, K., Merino, C., Sigrist, S. J. and Featherstone, D. E. (2005). The 4.1 Protein Coracle Mediates Subunit-Selective Anchoring of Drosophila Glutamate Receptors to the Postsynaptic Actin Cytoskeleton. *J. Neurosci.* **25**, 6667-6675.

Chen, L., Chetkovich, D. M., Petralia, R. S., Sweeney, N. T., Kawasaki, Y., Wenthold, R. J., Bredt, D. S. and Nicoll, R. A. (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* **408**, 936-943.

Chen, X., Winters, C., Azzam, R., Li, X., Galbraith, J. A., Leapman, R. D. and Reese, T. S. (2008). Organization of the core structure of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 4453-4458.

Choquet, D. and Triller, A. (2003). The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci* **4**, 251-265.

Coleman, S. K., Cai, C., Mottershead, D. G., Haapalahti, J.-P. and Keinanen, K. (2003). Surface Expression of GluR-D AMPA Receptor Is Dependent on an Interaction between Its C-Terminal Domain and a 4.1 Protein. *J. Neurosci.* **23**, 798-806.

Collingridge, G. L., Isaac, J. T. R. and Wang, Y. T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**, 952-962.

Connors, B. W. and Long, M. A. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* **27**, 393-418.

Couteaux, R. and Pécot-Dechavassine, M. (1970). Synaptic vesicles and pouches at the level of "active zones" of the neuromuscular junction. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* **25**, 2346-2349.

Cull-Candy, S., Brickley, S. and Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* **11**, 327-335.

del Castillo, J. and Stark, L. (1952). The effect of calcium ions on the motor end-plate potentials. *J Physiol* **116**, 507-515.

Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S. and Soderling, T. R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **8**, 101-113.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. and Traynelis, S. F. (1999). The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol Rev* **51**, 7-62.

Douyard, J., Shen, L., Huganir, R. L. and Rubio, M. E. (2007). Differential neuronal and glial expression of GluR1 AMPA receptor subunit and the scaffolding proteins SAP97 and 4.1N during rat cerebellar development. *The Journal of Comparative Neurology* **502**, 141-156.

Ehrlich, I. and Malinow, R. (2004). Postsynaptic Density 95 controls AMPA Receptor Incorporation during Long-Term Potentiation and Experience-Driven Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* **24**, 916-927.

Elias, G. M., Funke, L., Stein, V., Grant, S. G., Bredt, D. S. and Nicoll, R. A. (2006). Synapse-Specific and Developmentally Regulated Targeting of AMPA Receptors by a Family of MAGUK Scaffolding Proteins. *Neuron* **52**, 307-320.

Esteban, J. A., Shi, S.-H., Wilson, C., Nuriya, M., Huganir, R. L. and Malinow, R. (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci* **6**, 136-143.

Fatt, P. and Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* **117**, 109-128.

Fehon, R. G., Dawson, I. A. and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). A Drosophila homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the coracle gene. *Development* **120**, 545-557.

Feng, W. and Zhang, M. (2009). Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci* **10**, 87-99.

Fling, S. P. and Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Analytical Biochemistry* **155**, 83-88.

Fukata, Y., Tzingounis, A. V., Trinidad, J. C., Fukata, M., Burlingame, A. L., Nicoll, R. A. and Bredt, D. S. (2005). Molecular constituents of neuronal AMPA receptors. *J. Cell Biol.* **169**, 399-404.

Gallagher, P. G., Zhang, Z., Morrow, J. S. and Forget, B. G. (2003). Mutation of a highly conserved isoleucine disrupts hydrophobic interactions in the [alpha][beta] spectrin self-association binding site. *Lab Invest* **84**, 229-234.

Gomes, A. R., Correia, S. S., Esteban, J. A., Duarte, C. B. and Carvalho, A. L. (2007). PKC Anchoring to GluR4 AMPA Receptor Subunit Modulates PKC-Driven Receptor Phosphorylation and Surface Expression. *Traffic* **8**, 259-269.

Greger, I. H., Ziff, E. B. and Penn, A. C. (2007). Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends in Neurosciences* **30**, 407-416.

Hollmann, M. and Heinemann, S. (1994). Cloned Glutamate Receptors. *Annual Review of Neuroscience* **17**, 31-108.

Holzwarth, G., Yu, J. and Steck, T. L. (1976). Heterogeneity in the conformation of different protein fractions from the human erythrocyte membrane. *J Supramol Struct* **4**, 161-168.

Hoover, K. B. and Bryant, P. J. (2000). The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 229-234.

Junge, H. J., Rhee, J.-S., Jahn, O., Varoqueaux, F., Spiess, J., Waxham, M. N., Rosenmund, C. and Brose, N. (2004). Calmodulin and Munc13 Form a Ca2+ Sensor/Effector Complex that Controls Short-Term Synaptic Plasticity. *Cell* **118**, 389-401.

Katz, B. and Miledi, R. (1967). The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol* **189**, 535-544.

Kennedy, M. B. (1993). The postsynaptic density. *Curr Opin Neurobiol* **3**, 732-737.

Kim, C.-H. and Lisman, J. E. (1999). A Role of Actin Filament in Synaptic Transmission and Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* **19**, 4314-4324.

Kim, C. H., Chung, H. J., Lee, H. K. and Huganir, R. L. (2001). Interaction of the AMPA receptor subunit GluR2/3 with PDZ domains regulates hippocampal long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11725-11730.

Kim, J. H. and Huganir, R. L. (1999). Organization and regulation of proteins at synapses. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 248-254.

Lee, H.-K., Takamiya, K., Han, J.-S., Man, H., Kim, C.-H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R. S. *et al.* (2003). Phosphorylation of the AMPA Receptor GluR1 Subunit Is Required for Synaptic Plasticity and Retention of Spatial Memory. *Cell* **112**, 631-643.

Li, H., Khirug, S., Cai, C., Ludwig, A., Blaesse, P., Kolikova, J., Afzalov, R., Coleman, S. K., Lauri, S., Airaksinen, M. S. *et al.* (2007). KCC2 Interacts with the Dendritic Cytoskeleton to Promote Spine Development. *Neuron* **56**, 1019-1033.

Liley, A. W. and North, K. A. K. (1953). An electrical investigation of effectors of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction. *J Neurophysiol* **16**, 509-527.

Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J. and Baltimore, D. (2002). Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science* **295**, 868-872.

Lüscher, B. and Keller, C. A. (2004). Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacology & Therapeutics* **102**, 195-221.

Lüthi, A., Chittajallu, R., Duprat, F., Palmer, M. J., Benke, T. A., Kidd, F. L., Henley, J. M., Isaac, J. T. R. and Collingridge, G. L. (1999). Hippocampal LTD Expression Involves a Pool of AMPARs Regulated by the NSF-GluR2 Interaction. *Neuron* **24**, 389-399.

Malinow, R. and Malenka, R. C. (2002). AMPA Receptor Treafficking And Synaptic Plasticity. *Annual Review of Neuroscience* **25**, 103-126.

Marfatia, S. M., Lue, R. A., Branton, D. and Chishti, A. H. (1995). Identification of the Protein 4.1 Binding Interface on Glycophorin C and p55, a Homologue of the Drosophila discs-large Tumor Suppressor Protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 715-719.

Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L. C., Watabe, A. M., Makhinson, M., He, Y., Ramsay, M. F., Morris, R. G. M., Morrison, J. H. *et al*. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **396**, 433-439.

Nicoll, R. A., Tomita, S. and Bredt, D. S. (2006). Auxiliary Subunits Assist AMPA-Type Glutamate Receptors. *Science* **311**, 1253-1256.

Ohno, N., Terada, N., Tanaka, J., Yokoyama, A., Yamakawa, H., Fujii, Y., Baba, T., Ohara, O. and Ohno, S. (2005). Protein 4.1 G localizes in rodent microglia. *Histochemistry and Cell Biology* **124**, 477-486.

Parra, M., Gascard, P., Walensky, L. D., Gimm, J. A., Blackshaw, S., Chan, N., Takakuwa, Y., Berger, T., Lee, G., Chasis, J. A. *et al.* (2000). Molecular and Functional Characterization of Protein 4.1B, a Novel Member of the Protein 4.1 Family with High Level, Focal Expression in Brain. *J. Biol. Chem.* **275**, 3247-3255.

Parra, M., Gascard, P., Walensky, L. D., Snyder, S. H., Mohandas, N. and Conboy, J. G. (1998). Cloning and Characterization of 4.1G (EPB41L2), a New Member of the Skeletal Protein 4.1 (EPB41) Gene Family. *Genomics* **49**, 298-306.

Peters, L. L., Weier, H.-U. G., Walensky, L. D., Snyder, S. H., Parra, M., Mohandas, N. and Conboy, J. G. (1998). Four Paralogous Protein 4.1 Genes Map to Distinct Chromosomes in Mouse and Human. *Genomics* **54**, 348-350.

Ramez, M., Blot-Chabaud, M., Cluzeaud, F., Chanan, S., Patterson, M., Walensky, L. D., Marfatia, S., Baines, A. J., Chasis, J. A., Conboy, J. G. *et al.* (2003). Distinct distribution of specific members of protein 4.1 gene family in the mouse nephron. *Kidney Int* **63**, 1321-1337.

Rosenmund, C., Stern-Bach, Y. and Stevens, C. F. (1998). The Tetrameric Structure of a Glutamate Receptor Channel. *Science* **280**, 1596-1599.

Rouach, N., Byrd, K., Petralia, R. S., Elias, G. M., Adesnik, H., Tomita, S., Karimzadegan, S., Kealey, C., Bredt, D. S. and Nicoll, R. A. (2005). TARP [gamma]-8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity. *Nat Neurosci* **8**, 1525-1533.

Rumbaugh, G., Sia, G.-M., Garner, C. C. and Huganir, R. L. (2003). Synapse-Associated Protein-97 Isoform-Specific Regulation of Surface AMPA Receptors and Synaptic Function in Cultured Neurons. *J. Neurosci.* **23**, 4567-4576.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**.

Scannevin, R. H. and Huganir, R. L. (2000). Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* **1**, 133-141.

Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Bredt, D. S. and Nicoll, R. A. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 13902-13907.

Schwenk, J., Harmel, N., Zolles, G., Bildl, W., Kulik, A., Heimrich, B., Chisaka, O., Jonas, P., Schulte, U., Fakler, B. *et al.* (2009). Functional Proteomics Identify Cornichon Proteins as Auxiliary Subunits of AMPA Receptors. *Science* **323**, 1313-1319.

Scott, C., Keating, L., Bellamy, M. and Baines, A. J. (2001). Protein 4.1 in forebrain postsynaptic density preparations. *European Journal of Biochemistry* **268**, 1084-1094.

Setou, M., Seog, D.-H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M. and Hirokawa, N. (2002). Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* **417**, 83-87.

Shen, L., Liang, F., Walensky, L. D. and Huganir, R. L. (2000). Regulation of AMPA Receptor GluR1 Subunit Surface Expression by a 4.1N-Linked Actin Cytoskeletal Association. *J. Neurosci.* **20**, 7932-7940.

Sheng, M. and Kim, E. (1996). Ion channel associated proteins. *Current Opinion in Neurobiology* **6**, 602-608.

Sloper, J. J. and Powell, T. P. (1978). Gap junctions between dendrites and somata of neurons in the primate sensori-motor cortex. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **203**, 39-47.

Sun, C.-X., Robb, V. A. and Gutmann, D. H. (2002). Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci* **115**, 3991-4000.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* **76**, 4350–4354.

Trinidad, J. C., Thalhammer, A., Specht, C. G., Lynn, A. J., Baker, P. R., Schoepfer, R. and Burlingame, A. L. (2008). Quantitative Analysis of Synaptic Phosphorylation and Protein Expression. *Mol Cell Proteomics* **7**, 684-696.

Vandenberghe, W., Nicoll, R. A. and Bredt, D. S. (2005). Interaction with the Unfolded Protein Response Reveals a Role for Stargazin in Biosynthetic AMPA Receptor Transport. *J. Neurosci.* **25**, 1095-1102.

Walensky, L. D., Blackshaw, S., Liao, D., Watkins, C. C., Weier, H.-U. G., Parra, M., Huganir, R. L., Conboy, J. G., Mohandas, N. and Snyder, S. H. (1999). A Novel Neuron-Enriched Homolog of the Erythrocyte Membrane Cytoskeletal Protein 4.1. *J. Neurosci.* **19**, 6457-6467.

Washburn, M. S., Numberger, M., Zhang, S. and Dingledine, R. (1997). Differential Dependence on GluR2 Expression of Three Characteristic Features of AMPA Receptors. *J. Neurosci.* **17**, 9393-9406.

Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G. and Bear, M. F. (2006). Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Science* **313**, 1093-1097.

Wisden, W. and Seeburg, P. H. (1993). A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J. Neurosci.* **13**, 3582-3598.

Wolk, F. (2005). Charakterisierung von 4.1N-defizienten Mäusen. *Diplomarbeit*.

Wozny, C., Breustedt, J., Wolk, F., Varoqueaux, F., Boretius, S., Zivkovic, A. R., Neeb, A., Frahm, J., Schmitz, D., Brose, N., Ivanovic, A. (2009). The function of glutamatergic synapses is not perturbed by severe knockdown of 4.1N and 4.1G expression. *J Cell Sci* **122**, 735-744.

Yamakawa, H. and Ohara, O. (2000). Comparison of mRNA and protein levels of four members of the protein 4.1 family: The type II brain 4.1/4.1B/KIAA0987 is the most predominant member of the protein 4.1 family in rat brain. *Gene* **248**, 137-145.

Yamakawa, H., Ohara, R., Nakajima, D., Nakayama, M. and Ohara, O. (1999). Molecular characterization of a new member of the protein 4.1 family (brain 4.1) in rat brain. *Molecular Brain Research* **70**, 197-209.

Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y. and Malinow, R. (2000). Postnatal synaptic potentiation: Delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* **3**, 1098-1106.

8. ANHANG

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weisen unterstützt und somit die Anfertigung dieser Dissertation möglich gemacht haben:

Zuerst möchte ich **Prof. Dr. Nils Brose** für die Möglichkeit der Promotion in seinem Labor danken. Aufgrund der exzellenten Arbeitsbedingungen wurden mir Einblicke in ein weites neurowissenschaftliches Feld ermöglicht. Ich danke ihm herzlich für die wissenschaftliche Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Für seine Betreuung von Seiten der Georg-August-Universität in Göttingen und sein außerordentliches Interesse an dem Fortgang meiner Forschungsarbeit möchte ich mich herzlich bei **Prof. Dr. Ralf Heinrich** bedanken. Ich danke ihm für die Übernahme des Referats dieser Arbeit, sowie **Prof. Dr. Oliver Einsle** für die Übernahme des Korreferats.

Ein großer Dank geht an **Dr. Aleksandra Ivanovic**, die mich betreut und unterstützt hat. Sie forderte stets mein Wissen und Können heraus und förderte somit meine wissenschaftliche Arbeit. Ich danke ihr für ihre tatkräftige Hilfe und das in mich gesetzte Vertrauen!

Dr. Jeong Seop Rhee danke ich für die Betreuung der elektrophysiologischen Experimente und für seine Ideen, die für neuen Aufschwung und neue Motivation gesorgt haben.

Prof. Dr. Dietmar Schmitz, **Dr. Christian Wozny** und **Dr. Jörg Breustedt** vom Neurowissenschaftliches Forschungszentrum der Charité-Universitätsmedizin Berlin danke ich für ihre Unterstützung und Mitarbeit am Forschungsprojekt.

Ein besonders herzlicher Dank geht an **Anja Galinski.** Ihr verdanke ich nicht nur den reibungslosen Ablauf aller elektrophysiologischen Experimente, sondern auch all die kleinen Aufmunterungen und Freuden im Laboralltag!

Für ihre Hilfe bei Problemen und Nöten im Elektrophysiologie-Labor möchte ich mich herzlich bei **Dr. Wolf Jockusch** und **Dr. Christoph Gertler** bedanken. **Dr. Kerstin Reim, Dr. Ellen Reisinger** und **Simon Bungers** waren wunderbare Büro-Kollegen, die stets für eine angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre sorgten.

Viele Mitarbeiter haben die Laborarbeit erleichtert und ein herzlicher Dank geht an jeden einzelnen von ihnen, besonders an **Nina Dankenbrink-Werder**, **Ivonne Thanhäuser, Dayana Schwerdtfeger** und **Fritz Benseler**. Bei **allen Kollegen** der Abteilung Molekulare Neurobiologie möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein ausdrücklicher Dank geht an **Astrid Ohle** und **Inga Schauenberg** samt Team für ihre enorme Unterstützung bei der Versorgung unserer Mauslinien!

Letztendlich möchte ich mich bei meiner **Familie** (Hannelore, Reinhard, Benni Wolk und Jörg Predöhl) und meinen **Freunden** für ihre unglaubliche Unterstützung sehr herzlich bedanken. Ihr habt mich pausenlos bestärkt und immer ein großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt. Auf Euer Verständnis und Eure Hilfe konnte ich mich immer verlassen.

PUBLIKATIONEN

Christian Wozny*, Jörg Breustedt*, Friederike Wolk*, Frédérique Varoqueaux, Susann Boretius, Aleksandar Zivkovic, Antje Neeb, Jens Frahm, Dietmar Schmitz, Nils Brose, Aleksandra Ivanovic (2009). The function of glutamatergic synapses is not perturbed by severe knockdown of 4.1N and 4.1G expression. *J Cell Sci* **122**, 735-744.
* These authors contributed equally to this work.

Friederike Wolk, Christian Wozny, Jörg Breustedt, Dietmar Schmitz, Nils Brose, Jeong Seop Rhee, Aleksandra Ivanovic (2008). Analysis of the function of proteins 4.1G and 4.1N in AMPA receptor trafficking and synaptic transmission.
Posterpräsentation, 6th Forum of European Neuroscience (FENS), Genf 2008

LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name:	Wolk
Vorname:	Friederike
Geburtsdatum/ -ort:	14.10.1981 in Salzgitter-Bad
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

08/1988 - 06/1992	Grundschule am Geitelplatz in Wolfenbüttel
08/1992 - 06/1994	Orientierungsstufe Wallstraße in Wolfenbüttel
08/1994 - 06/2001	Gymnasium Große Schule in Wolfenbüttel
06/2001	Abitur mit Note 2,1

Hochschulausbildung

10/2001 - 12/2005	Biologie-Studium an der Georg-August-Universität in Göttingen
06/2003	Vordiplom mit Note „gut“ in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Chemie, Physik
08/2004 - 12/2004	Studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen
01/2005 - 12/2005	Diplomandin am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Molekulare Neurobiologie (Prof. Dr. Nils Brose) Diplomarbeit zum Thema „Analyse der Funktion von Protein-4.1N“
12/2005	Diplom mit Note „sehr gut“ in den Fächern Biochemie, Mikrobiologie und Chemie
Seit 01/2006	Doktorandin am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Molekulare Neurobiologie (Prof. Dr. Nils Brose) Dissertation zum Thema „Die Bedeutung der Proteine 4.1G und 4.1N für den Aufbau und die Funktion glutamaterger Synapsen“

Göttingen, 26. Mai 2009