

**Untersuchung des Proteins Muskelin im
Nervensystem von *Mus musculus***

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
am Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg**

vorgelegt von

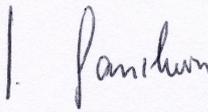
**Frank Friedrich Heisler
aus Melsungen an der Fulda**

**Hamburg
August 2009**

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. M. KNEUSSEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. T. BURMESTER
Tag der Disputation: 09. Oktober 2009

Hamburg, den 25. September 2009




Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

**“JEDES NATURGESETZ, DAS SICH DEM
BEOBACHTER OFFENBART, LÄSST AUF EIN HÖHERES, NOCH UNBEKANNTES
SCHLIEßEN“**

Alexander von Humboldt

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	
1.1 Das Nervensystem der Säugetiere	3
1.2 Neuronen	4
1.2.1 Die exzitatorische Synapse	5
1.2.2 Die inhibitorische Synapse	7
1.2.3 Der GABA _A -Rezeptor	10
1.3 Motorproteine vermitteln Transport entlang des Zytoskeletts	12
1.3.1 Transport von ionotropen Rezeptoren	15
1.3.2 Endozytose, Transport und Abbau des GABA _A -Rezeptors	17
1.4 Muskelin	20
1.4.1 Expression von Muskelin in Neuronen	21
1.4.2 Direkte Interaktion von Muskelin und dem GABA _A -Rezeptor	23
1.5 Ziele der Arbeit	23
2 MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Material	25
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	25
2.1.2 Geräte	25
2.1.3 Medien und Lösungen	26
2.1.4 Tiere	29
2.1.5 Zelllinien	29
2.1.6 Bakterienstämme	29
2.1.7 Größenstandards	29
2.1.8 Reaktionskomplettausstattungen (Kits)	30
2.1.9 Antikörper	32
2.1.10 Vektoren	32
2.1.11 Oligonukleotide	33
2.2 Molekularbiologie	33
2.2.1 Transformation von <i>E. coli</i>	33
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA	34

2.2.3	Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit	34
2.2.4	Phenol / Chloroform-Extraktion	34
2.2.5	Fällung von DNA	35
2.2.6	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	35
2.2.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	35
2.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.9	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.2.11	Subklonierung von DNA-Fragmenten	36
2.2.12	DNA-Sequenzierung	37
2.2.13	<i>Knockout</i> von Muskelin in <i>Mus musculus</i>	37
2.2.14	Genotypisierung von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen mittels PCR	38
2.2.15	Genotypisierung von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen mittels Southern Blot	39
2.3	Proteinbiochemie	41
2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	41
2.3.2	Western Blot	41
2.3.3	Immundetektion	42
2.3.4	Koimmunpräzipitation	42
2.3.5	Differentielle Zentrifugation	44
2.3.6	<i>Sucrose</i> gradienten-Dichtezentrifugation	44
2.3.7	Zelloberflächen-Rezeptor-Studie	45
2.3.8	Rezeptor-Degradation-Studie	46
2.4	Histologie und Zellbiologie	47
2.4.1	Nissl-Färbung	47
2.4.2	Elektronenmikroskopie	47
2.4.3	Immunhistochemie	48
2.4.4	Kultur von HEK293T-Zellen	49
2.4.5	Präparation und Kultur primärer hippokampaler Neuronen	49
2.4.6	Immunzytochemie	50
2.4.7	Transfektion kultivierter Zellen	50
2.4.8	<i>Time-lapse</i> Videomikroskopie	51
2.4.9	Rezeptor-Internalisierung-Studie	52
2.5	Quantitative Analyse und Statistik	53

3 ERGEBNISSE

3.1	<i>Knockout des Mkn1 Gens in Mus musculus</i>	55
3.2	Depletion von Muskelin im Gehirn von <i>Mus musculus</i>	57
3.3	Entwicklung des Säugergehirns nach Depletion von Muskelin	59
3.4	Aufhellung der Fellfarbe nach Depletion von Muskelin in <i>Mus musculus</i>	60
3.5	Transport von Muskelin in hippokampalen Neuronen	61
3.6	Kotransport von GABA _A -Rezeptor und Muskelin	63
3.7	Koimmunpräzipitation von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette	65
3.8	Kofraktionierung von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette	66
3.9	Kolokalisation von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette	67
3.10	GABA _A -Rezeptor Anreicherung in intrazellulären Vesikeln von Dynamitin überexprimierenden Mäusen	68
3.11	Überexpression von Dynamitin hat keinen Einfluss auf die GABA _A -Rezeptor Konzentration der Zelloberfläche	70
3.12	Kofraktionierung von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit Proteinmarkern endozytotischer Vesikel	72
3.13	Nachweis von Muskelin in multivesikulären Körpern (MVBs)	73
3.14	Lysosomale Degradation von GABA _A -Rezeptoren aufgrund von Mikrotubuli-abhängigem Transport	74
3.15	Muskelin stabilisiert die Interaktion von GABA _A -Rezeptor mit Dynein Intermediärer Kette	76
3.16	GABA _A -Rezeptor Anreicherung in intrazellulären Vesikeln nach Depletion von Muskelin	77
3.17	Die Depletion von Muskelin verringert die Degradation von GABA _A -Rezeptoren	78
3.18	Koimmunpräzipitation von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit Myosin VI	81
3.19	Kofraktionierung von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit Myosin VI	83
3.20	Kolokalisation von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit Myosin VI	84

3.21	Eine stabile Interaktion von GABA _A -Rezeptor mit Myosin VI erfolgt unabhängig von Muskelin	85
3.22	Anreicherung des GABA _A -Rezeptors an der Zelloberfläche nach Depletion von Muskelin	86
3.23	Degradation des GABA _A -Rezeptors aufgrund von Aktinfilament-abhängigem Transport	89
3.24	Reduzierte Internalisierung des GABA _A -Rezeptors nach Depletion von Muskelin	91
4	DISKUSSION	
4.1	<i>Knockout</i> des <i>Mkln1</i> Gens in <i>Mus musculus</i>	94
4.2	Aufhellung der Fellfarbe bei Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen und Kottransport von Muskelin mit dem GABA _A -Rezeptor	96
4.3	Interaktion des GABA _A -Rezeptor-Muskelin Komplexes mit den Motorproteinen Myosin VI und zytoplasmatischem Dynein	98
4.4	Myosin VI und der Einfluss von Muskelin auf die Endozytose des GABA _A -Rezeptors	105
4.5	Zytoplasmatisches Dynein und der Einfluss von Muskelin auf die Degradation des GABA _A -Rezeptors	108
4.6	Verknüpfung von Aktinfilament- und Mikrotubuli-abhängigen Motorprotein-vermitteltem Transport	111
4.7	Ausblick	115
	LITERATURVERZEICHNIS	117
	ANHANG	
A	Abbilungsverzeichnis	I
B	Tabellenverzeichnis	III
C	Abkürzungsverzeichnis	III
D	Einheiten	VII
E	Präfixe	VII
F	Wissenschaftlicher Werdegang	VIII
G	Publikationen	IX
H	Danksagung	X

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die intrazellulären Transportprozesse der Proteine Muskelin und GABA_A-Rezeptor in *Mus musculus* untersucht.

Der GABA_A-Rezeptor ist wesentlich an schneller synaptischer Inhibition in Gehirnen der Säugetiere beteiligt. Es handelt sich um einen ligandengesteuerten Ionenkanal, der die Permeabilität der postsynaptischen Membran für Chlorid-Ionen nach Bindung von GABA erhöht. GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche unterliegen einem kontinuierlichen Austausch durch Clathrin-vermittelte Endozytose, über ihren Transport nach der Internalisierung ist jedoch wenig bekannt. Muskelin ist ein intrazelluläres Protein mit einer in Gehirnen der Säugetiere noch unbekanntem Funktion. Es verfügt jedoch über unterschiedliche Interaktionsdomänen und wurde als direkter Interaktionspartner der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors identifiziert. Beide Proteine kolokalisieren partiell an inhibitorischen Postsynapsen.

Das Ziel der Arbeit war es daher, die biologische Funktion von Muskelin im Hinblick auf die Interaktion mit der GABA_A-Rezeptor α 1-Untereinheit zu untersuchen. Hierfür konnte zum ersten Mal eine Muskelin *Knockout* Mauslinie etabliert werden. Bei den homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen wurde eine Aufhellung der Fellfarbe beobachtet. Dies weist auf die Beteiligung von Muskelin an aktiven Transportvorgängen hin, da ähnliche Phänotypen aus einer Störung des Motorprotein-vermittelten Transports von Melanosomen resultieren. Dementsprechend konnte der retrograde Kotransport von Muskelin und der GABA_A-Rezeptor α 1-Untereinheit nachgewiesen werden. Außerdem wurde zytoplasmatisches Dynein als ein *in vitro*-Interaktionspartner des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes identifiziert, welches den retrograden Transport entlang von Mikrotubuli in Richtung Zellsoma vermittelt. Die Inhibition der Dyneinmotor-Funktion, die Depolymerisation von Mikrotubuli sowie die Depletion von Muskelin führten zur Akkumulation des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln beziehungsweise zur reduzierten lysosomalen Degradation des Rezeptors. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Muskelin den *in vitro*-Proteinkomplex stabilisiert. Muskelin scheint daher an dem Dynein-vermittelten Transport des GABA_A-Rezeptors zu Lysosomen beteiligt zu sein. Neben zytoplasmatischem Dynein wurde Myosin VI als weiterer *in vitro*-Interaktionspartner des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes identifiziert. Es ist bekannt, dass Myosin VI den Kurzstreckentransport von internalisierten

sierten Transmembranproteinen entlang der Aktinfilamente des zellulären Kortex vermitteln kann. Dementprechend wurde nach Depolymerisation der Aktinfilamente eine reduzierte Degradation des GABA_A-Rezeptors festgestellt. Des Weiteren führte die Depletion von Muskelin *per se* zu einer Akkumulation des GABA_A-Rezeptors an der Zelloberfläche. Es konnte gezeigt werden, dass diese Akkumulation auf eine beeinträchtigte Internalisierung des GABA_A-Rezeptors in Muskelin *Knockout* Mäusen zurückzuführen ist.

Entsprechend der identifizierten *in vitro*-Interaktionen konnte ein Modell des retrograden GABA_A-Rezeptor-Transports entwickelt werden. Hierbei scheint Muskelin einerseits frühe endozytotische Prozesse des GABA_A-Rezeptors vermittelt von Myosin VI, andererseits späte endozytotische Prozesse vermittelt von Dynein, zu beeinflussen. Muskelin könnte daher ein Protein darstellen, das am intrazellulären Transport des GABA_A-Rezeptors entlang der Aktinfilamente als auch Mikrotubuli beteiligt ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern somit das gegenwärtige Verständnis der intrazellulären Transportprozesse des GABA_A-Rezeptors und beschreiben darüber hinaus erstmals eine Funktion von Muskelin im Gehirn von Säugetieren. Außerdem stellen sie einen Ausgangspunkt zur Erforschung der Verknüpfung unterschiedlicher Motorprotein-Systeme dar.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Nervensystem der Säugetiere

Das Nervensystem der Säugetiere lässt sich nach anatomischen Gesichtspunkten in peripheres und zentrales Nervensystem (ZNS) unterteilen (Kandel *et al.*, 2000). Das periphere Nervensystem umfasst dabei Nerven und Ganglien, die motorische und sensorische Signale zwischen dem ZNS und dem Rest des Körpers vermitteln. Im ZNS findet die Integration von Signalen statt, was die Verarbeitung aller Erregungen beinhaltet, die sensorische Nerven nach Reizung der Sinnesorgane aufnehmen und weiterleiten. Das ZNS setzt sich aus Gehirn und Rückenmark zusammen, wobei letzteres Reflexe verarbeitet. Das Gehirn steuert den Bewegungsapparat, wirkt auf neuroendokrine Systeme und beeinflusst die Organe. Es ermöglicht außerdem die Ausbildung eines Bewusstseins, die Fähigkeit zu Lernen und sich zu Erinnern.

Das ZNS entsteht durch Einfaltung des Neuralrohrs. Sein größter Teil differenziert sich zum Rückenmark, ein kleinerer Teil unter Auffaltung und Untergliederung in fünf Hauptbereiche (Hirnstamm, Hinterhirn, Mittelhirn, Zwischenhirn und Großhirn) zum Gehirn (Kandel *et al.*, 2000). Der Hirnstamm bildet die Verbindung von Gehirn und Rückenmark über das verlängerte Mark (Medulla oblongata). Das Hinterhirn kontrolliert das sensomotorische System und unterteilt sich in Kleinhirn (Cerebellum), das ein Zentrum für Bewegungskoordination darstellt, und Brücke (Pons). Das Mittelhirn besteht aus Tegmentum, Tectum und der Vierhügelplatte, die bei Säugern einer Lokalisation visueller Objekte im Raum dient. Das Zwischenhirn (Diencephalon) ist in Thalamus und Hypothalamus unterteilt. Über den Thalamus werden akustische und visuelle Signale geleitet, der Hypothalamus bildet das Zentrum vegetativer Prozesse und steht mit dem limbischen System (Archikortex) in Kontakt, das sich aus Hippokampus und Amygdala zusammensetzt. Dieses wird bei höheren Primaten als Sitz des emotionalen Verhaltens angesehen, wobei der Hippokampus mit Lernen und Gedächtnis in Verbindung gebracht wird. Die Großhirnrinde (Neocortex) ist Teil des Großhirns (Cerebrum) und wölbt sich über die gewundenen Hemisphären, die über den Balken (Corpus callosum) miteinander verbunden sind. Der Neocortex übernimmt die Integration sensorischer und motorischer Informationen.

Im Nervensystem wird zwischen zwei Hauptzelltypen unterschieden, den Neuronen und Gliazellen (Kandel *et al.*, 2000). Neurone werden im folgenden Kapitel beschrieben. Bei den Gliazellen unterscheidet man Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten, Schwann-Zellen und Ependymzellen. Je nach Zelltyp erfüllen sie Funktionen der mechanischen Stabilisierung der Neurone, des Auf- und Abbaus neuronal wichtiger Verbindungen, des Stoffaustauschs sowie der elektrischen Isolierung der Neurone. Außerdem sind sie ein wesentlicher Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke und an der neuronalen Migration und dem Auswachsen der Neurone während der Entwicklung beteiligt.

1.2 Neurone

Neurone sind polarisierte Zellen und stellen die funktionelle Basiseinheit des Nervensystems dar. Sie empfangen chemische oder elektrische Signale und leiten sie über die Kommunikationswege des Nervensystems (Kandel *et al.*, 2000). Der Grundbauplan des Neurons wird in den Zellkörper (Soma), biosynthetisches Zentrum der Zelle, sowie ein Geäst aus Zellverzweigungen (Dendriten) und den Zellfortsatz (Axon) unterteilt. Signale werden von Dendriten aufgenommen und verarbeitet und über das Axon auf die Folgezellen übertragen. Neurone knüpfen mit bis zu 10^6 anderen Zellen Kontakte. Funktionell unterscheidet man drei Neuronentypen, die mit den Hauptfunktionen des Nervensystems einhergehen. Sensorische Neurone übermitteln mechanische, optische und chemische Eingänge an die Interneuronen des ZNS. Diese sind zwischen Neuronen geschaltet und integrieren sensorische Eingänge sowie motorische Ausgänge. Motoneurone senden motorische Ausgänge vom ZNS an Effektorzellen. Die Erregbarkeit von Neuronen beruht auf dem Membranpotential, das durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen auf der intra- und extrazellulären Seite der Plasmamembran zustandekommt (Kandel *et al.*, 2000). Dieses wird durch aktiven Ionen-Transport über die Membran aufrechterhalten. Abhängig von chemischen sowie elektrischen Signalen können ligandengesteuerte beziehungsweise spannungsabhängige Ionenkanäle die Leitfähigkeit der neuronalen Plasmamembran für Ionen selektiv erhöhen. Dadurch wird die Membran lokal depolarisiert. Sobald ein bestimmter Schwellenwert für das Membranpotential unterschritten wird, werden in benachbarten Bereichen spannungsabhängige Ionenkanäle geöffnet und die Depo-

larisation wird nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip in Form des Aktionspotentials weitergeleitet. Die Signalübertragung zwischen Neuronen findet an Synapsen statt, die in chemische und elektrische Synapsen unterteilt werden (Kandel *et al.*, 2000). Elektrische Synapsen (*gap junctions*) stellen einen direkten Kontakt des Zytoplasmas zweier Neurone über sogenannte Connexone her. Diese Proteinporen ermöglichen den Austausch von Metaboliten und elektrischen Signalen. Chemische Synapsen werden von axonalen Präsynapsen der signalleitenden Neurone mit Postsynapsen signalempfangender Neurone gebildet, wobei die Postsynapsen meist an Dendriten oder dem Zellsoma lokalisiert sind. Prä- und Postsynapse sind durch einen 20-50 nm breiten synaptischen Spalt getrennt und stehen nicht in direktem Kontakt. Präsynaptische Endigungen enthalten typischerweise hunderte Neurotransmitter-gefüllte Vesikel, welche an einer aktiven Zone konzentriert vorliegen. Dieser Bereich der präsynaptischen Membran liegt direkt gegenüber postsynaptischer Neurotransmitterrezeptoren. Erreicht ein Aktionspotential eine aktive Zone, so öffnen spannungsabhängige, Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle. Dieser Ca^{2+} -Einstrom führt zur Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran und zur Exozytose der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt. Nach ihrer Bindung an Neurotransmitterrezeptoren erhöhen diese selektiv die Ionen-Permeabilität der postsynaptischen Membran. Abhängig von der Ladung des Ions und der Stromrichtung führt dies zur Depolarisation oder Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran und resultiert in Erregung (exzitatorische Synapse) oder Hemmung (inhibitorische Synapse) der Nervenzelle. Exzitatorische und inhibitorische Synapsen unterscheiden sich in den Neurotransmittern und den entsprechenden Rezeptoren. Im Folgenden werden beide Synapsentypen mit Fokus auf die postsynaptischen Spezialisierungen genauer beschrieben.

1.2.1 Die exzitatorische Synapse

Exzitatorische Synapsen weisen eine charakteristische, assymetrische Morphologie auf (Kandel *et al.*, 2000). Präsynapsen sind durch eine Vielzahl synaptischer Vesikel gekennzeichnet und eine auffällige elektronendichte Struktur der Postsynapse ist die postsynaptische Dichte (PSD). Diese besteht aus einem dichten Proteingerüst von etwa 400 nm Länge und 40 nm Breite unterhalb der postsynaptischen Membran (Gundelfinger und tom Dieck, 2000). Exzitatorische Postsynapsen sind zumeist Teil

dendritischer Dornen (*spines*), die über einen dünnen Hals mit dem dendritischen Schaft verbunden sind und ein separiertes Kompartiment darstellen (Korkotian *et al.*, 2004). Selten werden exzitatorische Postsynapsen direkt am dendritischen Schaft gebildet (Boyer *et al.*, 1998). Als exzitatorische Neurotransmitter können Glutamat, im ZNS und Rückenmark am weitesten verbreitet, aber auch Aspartat, Dopamin, Noradrenalin und Serotonin wirken. In der postsynaptischen Membran befinden sich vier Klassen von Glutamat-Rezeptoren. Eine der Klassen besteht aus metabotropen Rezeptoren, die langsame synaptische Erregung nach Aktivierung eines G-Proteins über sekundäre Botenstoffe moduliert. Die anderen Klassen bestehen aus ionotropen Rezeptoren und sind homo-/heterotetramere Ionenkanäle, permeabel für Na^{2+} , K^+ und teilweise für Ca^{2+} . Sie übertragen schnelle synaptische Erregungen und werden anhand von Agonisten in AMPA (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propion-säure)-, NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)- und Kainat-Rezeptoren unterteilt. Am wenigsten untersucht sind die Kainat-Rezeptoren. Sie kommen vermutlich in bestimmten Neuronen an genau definierten Orten vor und erfüllen spezielle Funktionen (Lerma, 2003). AMPA-Rezeptoren besitzen vier Untereinheiten, die mit GluR1-4 bezeichnet werden (Kandel *et al.*, 2000). Die Leitfähigkeit des AMPA-Rezeptors für Na^{2+} , K^+ oder Ca^{2+} hängt von der Untereinheiten-Kombination ab. So sind GluR2 enthaltende AMPA-Rezeptoren für Ca^{2+} nicht permeabel. Bindung von Glutamat an den Rezeptor führt nach Öffnung der Kanalpore zum Na^{2+} -Einstrom und zur Depolarisation der postsynaptischen Membran (Malinow und Malenka, 2002). AMPA-Rezeptoren unterliegen, im Gegensatz zu NMDA-Rezeptoren, dem stetigen und schnellen Austausch zwischen intrazellulären Kompartimenten und Zelloberfläche (Sheng und Kim, 2002, Collingridge *et al.*, 2004). Dieser Austausch könnte die Regulation der Anzahl von AMPA-Rezeptoren in Postsynapsen und somit der Stärke synaptischer Übertragung erlauben (Groc und Choquet, 2006). NMDA-Rezeptoren sind sowohl spannungs- als auch ligandengesteuert. Unter Ruhepotential wird die für Na^{2+} -, K^+ - und in hohem Maße Ca^{2+} -permeable Kanalpore von einem Mg^{2+} -Ion blockiert. Die Depolarisation der postsynaptischen Membran nach Glutamat-Ausschüttung und Öffnung des AMPA-Rezeptors führt zur Diffusion des Mg^{2+} -Ions aus der Kanalpore und damit zur Öffnung des NMDA-Rezeptors. Einströmende Ca^{2+} -Ionen tragen nun nicht nur zur Depolarisation der postsynaptischen Membran bei, sondern wirken auch als Botenstoffe, die längerfristige Modifikationen der Postsynapse durch Regulation der Gen-

expression bewirken (Ghosh und Greenberg, 1995). NMDA-Rezeptoren bestehen aus den Untereinheiten NR1 bis NR3 und funktionelle Tetramere werden aus je zwei der verschiedenen Untereinheiten gebildet (Gundelfinger und tom Dieck, 2000).

Über die Proteine der postsynaptischen Dichte werden Glutamat-Rezeptoren immobilisiert und eine Verbindung zu intrazellulären Signalwegen hergestellt. Die postsynaptische Dichte exzitatorischer Synapsen enthält u.a. Gerüstproteine, Signaltransduktionsproteine und Zytoskelettelemente. Es wurden mehr als 370 Proteine der postsynaptischen Dichte identifiziert (Peng *et al.*, 2004). Hauptbestandteile der PSD sind die Mitglieder der PSD95/SAP90-Familie (*postsynaptic density protein 95/synapse associated protein 90*). Sie besitzen jeweils drei PDZ-Domänen (benannt nach PSD95, disc large und zonula occludens), eine SH3-Domäne (*src homology 3*) sowie eine inaktive GK-Domäne (*guanylate kinase*). Wie auch andere Mitglieder der Familie kann PSD95 über seinen N-Terminus Dimere bilden (Hsueh *et al.*, 1997) und über die PDZ-Domänen können das Zelladhäsionsprotein Neuroligin, die NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2 und der Kainat-Rezeptor direkt mit PSD95 interagieren (Kornau *et al.*, 1995, Irie *et al.*, 1997, Garcia *et al.*, 1998). AMPA-Rezeptoren werden über die Interaktion mit Stargazin an PDZ-Domänen von PSD95 gebunden (Schnell *et al.*, 2002). Das Protein GKAP (*guanylate kinase associated protein*) bindet zum einen an die GK-Domäne von PSD95 (Kim *et al.*, 1997), zum anderen an die PDZ-Domäne des Gerüstproteins Shank (Naisbitt *et al.*, 1999). Shank wiederum bindet an Cortactin, ein Aktinzytoskelett-regulierendes Protein und stellt so einen Kontakt zum Zytoskelett her (Naisbitt *et al.*, 1999). Das Shank-Gerüst bindet auch Homer, das mit dem metabotropen Glutamat-Rezeptor sowie mit dem IP3-Rezeptor interagiert (Tu *et al.*, 1998, Tu *et al.*, 1999).

1.2.2 Die inhibitorische Synapse

Die inhibitorische Synapse unterscheidet sich sowohl morphologisch als auch funktionell von der exzitatorischen (Kandel *et al.*, 2000). Der synaptische Spalt ist mit etwa 20 nm schmaler als der von exzitatorischen Synapsen und die postsynaptische Dichte ist weniger stark ausgeprägt, weshalb sie auch als symmetrische Synapsen bezeichnet werden. Inhibitorische Postsynapsen sind häufig am Schaft der Dendriten

und weit seltener an dendritischen Dornen lokalisiert, sie können aber auch direkt auf dem Soma des Neurons liegen (Megias *et al.*, 2001).

Wichtigste inhibitorische Neurotransmitter sind Glyzin und GABA. GABA stellt dabei den verbreitetsten hemmenden Neurotransmitter im Gehirn dar, Glyzin wirkt vorwiegend im Hirnstamm, Rückenmark und der Retina. Diese Neurotransmitter aktivieren ionotrope Glyzin-Rezeptoren bzw. zwei Klassen ionotroper ($GABA_A$ - und $GABA_C$ -Rezeptor) und eine Klasse metabotroper ($GABA_B$ -Rezeptor) GABA-Rezeptoren. Die ionotropen Rezeptoren bilden mit dem nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor und dem ionotropen Serotonin-Rezeptor 5-HT₃ die Familie pentamerer ligandengesteuerter Ionenkanäle (*Cys-loop*-Familie). Nach Ligandenbindung und Öffnung Cl^- -permeabler Kanäle führen sie zur Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran.

Für den Glyzin-Rezeptor wurden drei α - und eine β -Untereinheit beschrieben, die vermutlich im Verhältnis $3\alpha 2\beta$ einen pentameren Komplex bilden (Langosch *et al.*, 1988). Jede Untereinheit hat extrazelluläre N- und C-Termini sowie vier Transmembran-Domänen, die eine kleine und große intrazelluläre Schleife begrenzen. α -Untereinheiten werden in Abhängigkeit von der Entwicklung spezifisch exprimiert (Lynch, 2004). Während in frühen Entwicklungsstadien $\alpha 2$ -Untereinheiten exprimiert werden, findet man $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -Untereinheiten vorwiegend im adulten Organismus. Im adulten Organismus führt der Glyzin-Rezeptor zum Cl^- -Einstrom und damit zur Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran. In Embryonalstadien von Säugtieren liegt jedoch eine erhöhte intrazelluläre Cl^- -Konzentration in Neuronen vor, so dass Glyzin einen Cl^- -Ausstrom und dadurch eine Erregung der postsynaptischen Membran hervorruft (Boehm *et al.*, 1997).

$GABA_A$ -Rezeptoren sind ebenfalls Heteropentamere (Nayeem *et al.*, 1994), können aber im Gegensatz zu Glyzin-Rezeptoren aus 18 Isoformen der Untereinheiten aus sieben verschiedenen Klassen ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , $\epsilon 1-3$, π und θ) bestehen (Sieghart *et al.*, 1999, Whiting, 1999). Sie werden in Großteilen des Gehirns entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten $GABA_A$ -Rezeptoren werden im folgenden Kapitel genauer beschrieben. $GABA_C$ -Rezeptoren werden im adulten Organismus nur in der Retina exprimiert. Im Gegensatz zum $GABA_A$ -Rezeptor ist nur eine Untereinheit mit den drei möglichen Isoformen $\rho 1-3$

bekannt. GABA_C-Rezeptoren weisen daher eine geringe Variabilität in ihrer Zusammensetzung auf. Analog zum metabotropen Glutamat-Rezeptor aktiviert der metabotrope GABA_B-Rezeptor ein G-Protein, das über Signalkaskaden durch sekundäre Botenstoffe auf intrazelluläre Prozesse einwirkt. Die Aktivierung des GABA_B-Rezeptors führt so zu der Öffnung eines K⁺-selektiven Ionen-Kanals (Huang, 2006), und ist damit für eine langsame synaptische Hemmung verantwortlich.

Eine Akkumulation inhibitorischer Neurotransmitterrezeptoren durch Verankerung in der postsynaptischen Membran ist wie bei exzitatorischen Synapsen (Kapitel 1.2.1) von Bedeutung (Moss und Smart, 2001). Im Gegensatz zur exzitatorischen Synapse scheinen keine Proteine mit PDZ-Domänen beteiligt zu sein und ein derart dichtes Proteingerüst wie die PSD wurde an inhibitorischen Postsynapsen nicht beobachtet. Es wurden aber auch Gerüstproteine der inhibitorischen Postsynapse identifiziert, unter ihnen das Protein Gephyrin (Pfeiffer *et al.*, 1982), das direkt mit der großen intrazellulären Schleife der β -Untereinheiten des Glyzin-Rezeptors interagiert (Meyer *et al.*, 1995) und für eine Lokalisation der Glyzin-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran unerlässlich ist (Kirsch *et al.*, 1993, Feng *et al.*, 1998). Gephyrin bildet über seine dimerisierenden C- und trimerisierenden N-Termini ein hexagonales Gerüst unter der postsynaptischen Membran (Sola *et al.*, 2004, Maas *et al.*, 2006). Eine Verankerung Gephyrins könnte über seine Mikrotubuli-Bindestelle vermittelt werden, die Depolymerisation von Mikrotubuli beeinflusst die Stabilität des Gephyringerüsts und Lokalisation des Glyzin-Rezeptors an der Postsynapse (Kirsch und Betz, 1995). Daneben wurden die Interaktionen von Gephyrin mit Aktinzytoskelett-regulierenden Proteinen wie Mena, VASP und Profilin beschrieben. Auch Collybistin, ein Mitglied der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren Familie (GEF) wurde als Interaktionspartner des Glyzin-Rezeptors beschrieben (Reid *et al.*, 1999, Kins *et al.*, 2000). Collybistin scheint das Aktinzytoskelett zu beeinflussen, indem es Cdc42, einen Modulator des Aktinzytoskeletts (Erickson *et al.*, 2001), aktiviert. Allerdings akkumuliert der Glyzin-Rezeptor in einer *Knockout* Mauslinie, bei der das für Collybistin kodierende Gen ausgeschaltet wurde, unverändert. Die reduzierte Akkumulation Gephyrins in Teilen des Gehirns konnte hier aber beobachtet werden (Papadopoulos *et al.*, 2007). Die Mechanismen, die GABA_A-Rezeptoren an inhibitorischen Postsynapsen akkumulieren und mit dem Zytoskelett verankern, werden im folgenden Kapitel beschrieben.

1.2.3 Der GABA_A-Rezeptor

Wie unter 1.2.2 beschrieben weisen GABA_A-Rezeptoren eine Vielzahl von Isoformen der insgesamt sieben verschiedenen Untereinheiten auf (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ 1-3, π und θ). Sie sind Mitglieder der *Cys-loop*-Familie, und wie die Glyzin-Rezeptor-Untereinheiten bestehen die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten aus einem extrazellulären N- und C-Terminus, aus vier Transmembran-Domänen und einer kleinen und großen intrazellulären Schleife (Abb. 1.1). Die Vielzahl von möglichen Untereinheiten bedingt eine hohe Anzahl pentamerer GABA_A-Rezeptoren, die sich bezüglich ihrer Affinität zu Agonisten, ihren Kanaleigenschaften sowie in ihrer Pharmakologie unterscheiden. Hierdurch kann die Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden gesteuert werden (Hevers *et al.*, 1998). Die GABA-Bindestelle wird dabei nicht von einer Untereinheit, sondern zusammen von den Untereinheiten α und β gebildet. Mit Ausnahmen wirken Benzodiazipine und Muscimol als Agonisten. Bicucullin dagegen inhibiert die GABA-Bindestelle kompetitiv und Picrotoxinin verhindert das Durchtreten von Cl⁻-Ionen durch die Kanalpore. Allosterisch wirkende Effektoren wie Ethanol, Barbiturate und Steroide modulieren zudem den GABA_A-Rezeptor. GABA_A-Rezeptoren können sich auf Dendriten, Axon oder Soma des Neurons befinden (Pearce 1993, Zhang *et al.*, 1993, Vautrin *et al.*, 1994), wobei eine differentielle Verteilung der α 1- und α 2-Untereinheiten vorzuliegen scheint (Jones *et al.*, 1997). In hippokampalen Pyramidalzellen scheinen GABA_A-Rezeptoren mit α 2-Untereinheiten am Axonhügel lokalisiert zu sein

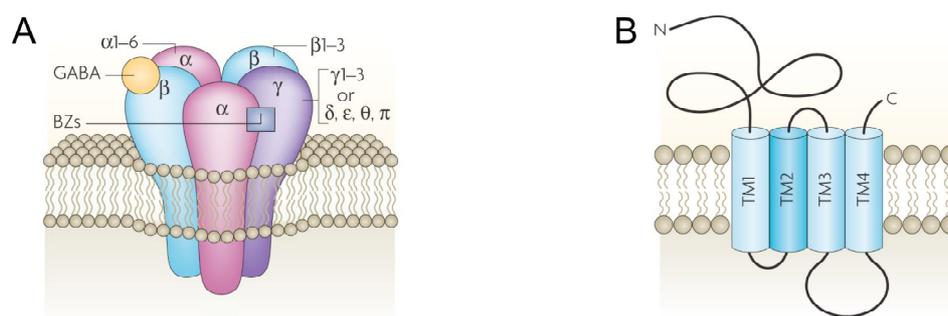


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors. Der GABA_A-Rezeptor ist ein liganden-gesteuerter pentamerer Ionenkanal (A). GABA: GABA-Bindestelle, BZs: Benzodiazipin-Bindestelle, α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ : GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. (B) Jede Untereinheit hat vier Transmembran-domänen (TM1-4) und extrazelluläre N- und C-Termini. TM1 und TM2 sowie TM3 und TM4 begrenzen eine kleine beziehungsweise große intrazelluläre Schleife. (Verändert nach Jacob *et al.*, 2008)

(Nusser *et al.*, 1996a, Fritschy *et al.*, 1998b), was zu einer effektiven Inhibition von Aktionspotentialen führen könnte (Maccaferri *et al.*, 2000, Megias *et al.*, 2001). Dagegen sind $\alpha 1$ -Untereinheiten enthaltende GABA_A-Rezeptoren meist an GABA-ergen Synapsen am Soma von Pyramidalzellen lokalisiert (Thomsen *et al.*, 2000, Klausberger *et al.*, 2002). Ein Großteil synaptischer GABA_A-Rezeptoren besteht aus den Untereinheiten α , β und γ (Adkins *et al.*, 2001), vermutlich im Verhältnis $2\alpha 2\beta 1\gamma$ (Rudolph und Mohler, 2004), wohingegen extrasynaptische Rezeptoren anstelle der γ - eine δ -Untereinheit aufweisen (Nusser *et al.*, 1996b, Brickley *et al.*, 1999). GABA_A-Rezeptoren, die $\alpha 5$ -Untereinheiten enthalten, sind im Gegensatz zu Rezeptoren mit $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Untereinheiten fast nur extrasynaptisch lokalisiert (Nusser *et al.*, 1996a, Fritschy *et al.*, 1998a, Brunig *et al.*, 2002a, Crestani *et al.*, 2002). Zudem exprimieren unterschiedliche Neuronentypen viele verschiedene Rezeptor-Untereinheiten (Lin *et al.*, 1994, Fritschy *et al.*, 1995), was auf eine hohe zeitliche und räumliche Diversität der Zusammensetzung von GABA_A-Rezeptoren schließen lässt.

Die Vielzahl theoretisch möglicher Kombinationen von GABA_A-Rezeptoren ist jedoch begrenzt, da nur GABA_A-Rezeptoren mit bestimmten Untereinheiten das endoplasmatische Retikulum (ER) verlassen und die Zelloberfläche erreichen. Homopentamere sowie heteropentamere GABA_A-Rezeptoren aus $\alpha\gamma$ und $\beta\gamma$ Untereinheiten verbleiben im ER und werden wieder abgebaut (Kittler *et al.*, 2002). ER-abhängige Degradation (ERAD) beinhaltet die Protein-Ubiquitylierung und den Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (Yi und Ehlers, 2007). Einige Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors werden ubiquityliert und eine Inhibition neuronaler Aktivität steigert deren Ubiquitylierung im ER, was zu ihrer verminderten Konzentration an der Zelloberfläche führt (Saliba *et al.*, 2007). Die Proteine PLIC1 und PLIC2 (Bedford *et al.*, 2001) können den Abbau ubiquitylierter Substrate verhindern (Kleijnen *et al.*, 2000). PLIC1 bindet an α - und β -Untereinheiten und scheint den Abbau von GABA_A-Rezeptoren während sekretorischer Wege zu beeinflussen und ihre Konzentration an der Zelloberfläche zu erhöhen (Bedford *et al.*, 2001).

Bei der Verankerung des GABA_A-Rezeptors an der Postsynapse scheint wie bei dem Glyzin-Rezeptor (Kapitel 1.2.2) Gephyrin eine Rolle zu spielen. Eine stabile, direkte Interaktion von Gephyrin mit dem GABA_A-Rezeptor konnte bislang nicht gezeigt werden, aber es wurde die Kollokalisierung von Gephyrin mit dem GABA_A-Rezeptor in höheren Hirnregionen beobachtet (Rao *et al.*, 2000, Sassoè-Pognetto *et al.*, 2000,

Brunig *et al.*, 2002b). In einer *Knockout* Mauslinie, bei der das für die $\gamma 2$ -Untereinheit kodierende Gen ausgeschaltet wurde, konnte außerdem ein Verlust von Gephyrin an Postsynapsen beobachtet werden (Essrich *et al.*, 1998, Schweizer *et al.*, 2003). Umgekehrt wurde in Abwesenheit von Gephyrin gezeigt, dass die $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Untereinheiten nicht mehr an der Postsynapse lokalisieren. Im Gegensatz dazu scheint die postsynaptische Lokalisation von GABA_A-Rezeptoren mit $\alpha 1$ -Untereinheiten nicht von Gephyrin abzuhängen (Essrich *et al.*, 1998 Kneussel *et al.*, 1999b, Kneussel *et al.*, 2001, Levi *et al.*, 2004). Ihre Akkumulation wird auch durch Depolymerisation von Mikrotubuli nicht gestört (Kirsch und Betz, 1995). Zudem werden GABA_A-Rezeptoren an Synapsen akkumuliert, bevor die Kollokalisierung mit Gephyrin nachgewiesen wird (Dumoulin *et al.*, 2000, Danglot *et al.*, 2003). Ein in Kapitel 1.2.2 beschriebener Interaktionspartner von Gephyrin ist Collybistin. Die Abwesenheit Collybistins in *Knockout* Mäusen führt zur Reduktion der Akkumulation von Gephyrin und $\gamma 2$ -Untereinheiten in bestimmten Hirnregionen (Papadopoulos *et al.*, 2007). Dementsprechend wurde in Collybistin-defizienten Mäusen eine reduzierte GABAerge synaptische Transmission, die Beeinträchtigung hippokampaler synaptischer Plastizität sowie ein gesteigertes Angstverhalten beobachtet (Papadopoulos *et al.*, 2007). Für eine fast ausschließlich extrasynaptische Lokalisation der $\alpha 5$ -Untereinheit enthaltenden GABA_A-Rezeptoren ist das Protein Radixin verantwortlich (Loebrich *et al.*, 2006). Dieses Aktin-bindende Protein liegt in verschiedenen Konformationen vor, die seine Bindung an Aktin beeinflussen. Indem Radixin mit der $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors interagiert, scheint es in Abhängigkeit von der vorliegenden Konformation die Lokalisation der $\alpha 5$ -Untereinheiten enthaltenden GABA_A-Rezeptoren zu regulieren.

1.3 Motorproteine vermitteln Transport entlang des Zytoskeletts

Die meisten Proteine in Neuriten werden im Soma der Neurone synthetisiert. Da Axone und Dendriten Längen erreichen, die den Durchmesser des Somas teilweise um das Tausendfache übertreffen, werden Proteine durch Motorproteine entlang des Zytoskeletts zu entsprechenden Bestimmungsorten transportiert (Hirokawa, 1998, Karcher *et al.*, 2002, Kneussel 2005). Für bestimmte mRNAs wurde ebenfalls ein Transport vom Soma in Neurite gezeigt (Hirokawa, 2006). Drei Familien molekularer Motorproteine, nämlich Myosin-, Dynein- und Kinesin-Motorproteine sind beschrie-

ben (Brown, 1999) (Abb. 1.2). Ein Transport der über Schwanz- (*tail*)-Domänen des Motorproteins gebundenen Fracht (*cargo*) erfolgt durch sich wiederholende Zyklen des Auf- und Abbaus der Bindung ihrer Motor-Domäne an Zytoskelettelemente unter ATP-Hydrolyse (Mallik und Gross, 2004). Während Dynein und Kinesine die Fracht entlang Mikrotubuli über lange Strecken bewegen, transportieren Myosine die Fracht über kurze Strecken entlang von Aktinfilamenten (Goode *et al.*, 2000, Vale, 2003).

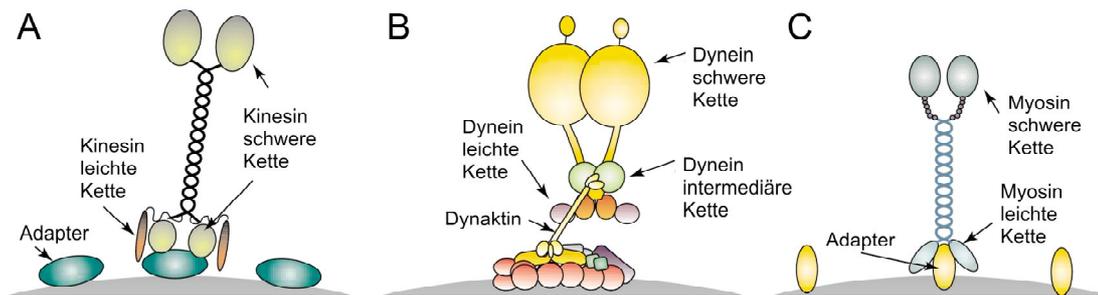


Abb. 1.2: Die drei Familien der molekularen Motorproteine. (A) Kinesin kann über Adapterproteine an Transportgüter binden. (B) Dynein bindet Fracht teilweise über den Dynaktin-Komplex. (C) Myosin kann über Adapterproteine an Transportgüter binden. (Verändert nach Karcher *et al.*, 2002)

Aktinfilamente (F-Aktin) sind hoch dynamische Strukturen, die aus zwei Ketten polymerisierter Aktinmonomere (G-Aktin) bestehen und eine strukturelle Polarität aufweisen. Aufgrund unterschiedlicher Polymerisationskinetiken bindet G-Aktin in einem Fließgleichgewicht am F-Aktin plus-Ende, wohingegen es von seinem minus-Ende dissoziiert. Dieser Vorgang wird auch als *treadmilling* bezeichnet (Dillon und Goda, 2005). Aktinfilamente sind deutlich kürzer als Mikrotubuli und sie bilden unterhalb der Plasmamembran ein Aktinzytoskelett. In für Neurone funktionell wichtigen Bereichen wie dendritischen Dornen und präsynaptischen Endigungen weisen sie Polarität auf, indem ihre plus-Enden in Richtung der Zelloberfläche gerichtet sind (Lewis und Bridgman, 1992, Svitkina *et al.*, 1997). Da sich Mikrotubuli meistens nicht bis unter die Zelloberfläche erstrecken, wird vermutet, dass ein Großteil der Transmembranproteine über Myosine entlang der Aktinfilamente zu sowie von der Plasmamembran weg bewegt werden (Bridgman, 2004, Kneussel, 2005). Alle Mitglieder der Myosin-Motorprotein-Familie besitzen Myosin schwere Ketten, die eine N-terminale Motor-Domäne mit der Aktin-Bindestelle und eine ATPase-Domäne enthalten. Die Motor-Domäne ist über eine Stiel-Domäne an die C-terminale *tail*-Domäne gebunden (Bridgman, 2004). An die *tail*-Domäne binden oft Myosin leichte Ketten, die eine

regulatorische Funktion erfüllen. Myosine bewegen sich meist vom minus- zum plus-Ende der Aktinfilamente, nur die Bewegung von Myosin VI erfolgt entgegengesetzt in Richtung minus-Ende (Wells *et al.*, 1999). Die Mehrzahl der Myosine bilden Dimere wenn ihre Stiel-Domäne eine *coiled-coil*-Region enthält.

Kinesine und Dynein bewegen sich entlang des Tubulinzytoskeletts (Laferriere *et al.*, 1997). Mikrotubuli sind zylindrische Strukturen, die sich sternförmig von Mikrotubuli Organisationszentren (MTOCs) im Soma bis in das Axon und Dendriten erstrecken und hier in longitudinaler Anordnung vorliegen. Ein Mikrotubulus setzt sich aus dreizehn Protofilamenten zusammen, die aus polymerisierenden Dimeren der globulären Proteine α - und β -Tubulin bestehen. Ähnlich den Aktinfilamenten weisen auch Mikrotubuli Polarität auf. Die Polymerisation und Depolymerisation von Tubulin-Untereinheiten findet vermehrt am dynamischen plus-Ende statt, das langsam wachsende minus-Ende ist meist am MTOC verankert. Die Mikrotubuli im Axon sowie in distalen Dendriten sind uniform ausgerichtet, die plus-Enden weisen in Richtung der Zellperipherie und ihre minus-Enden in die des Somas. In proximalen Dendriten aber weisen Mikrotubuli gemischte Orientierungen auf (Baas *et al.*, 1988). Die meisten Kinesine bewegen sich anterograd in Richtung der plus-Enden, wohingegen sich Dynein zum minus-Ende bewegt und seine Fracht daher retrograd transportiert.

Die Kinesin-Superfamilie (*kinesin superfamily proteins*, KIFs) umfasst 45 Mitglieder (Hirokawa und Takemura, 2004, Setou *et al.*, 2004). Sie setzen sich aus einer hochkonservierten Motor-Domäne, die die ATPase- und Binde-Domäne für Mikrotubuli enthält, aus einer Stiel-Domäne und aus einer *tail*-Domäne, welche die Bindung der Fracht erlaubt, zusammen. Je nach Position der Motor-Domäne wird die Kinesin-Superfamilie in 3 Gruppen unterteilt (Miki *et al.*, 2001). Bei der größten Gruppe, den N-Kinesinen, befindet sich die Motor-Domäne am N-Terminus und sie bewegen sich anterograd in Richtung Mikrotubuli plus-Ende. Die M-Kinesine, bei denen die Motor-Domäne in der Mitte des Proteins liegt, bewegen sich auch in Richtung plus-Ende, wohingegen C-Kinesine, bei denen die Motordomäne am C-Terminus liegt, sich in Richtung minus-Ende bewegen (Homma *et al.*, 2003). Die meisten Kinesine bilden Homodimere wenn ihre Stiel-Domäne eine *coiled-coil*-Region enthält. Das konventionelle Kinesin (Kinesin 1 oder KIF5) ist jedoch ein Heterotetramer, bestehend aus zwei schweren und zwei leichten Ketten (kinesin light chain, KLC). Kinesin leichte

Ketten wie auch die Bereiche außerhalb der Motor-Domäne der Kinesin schweren Ketten vermitteln direkte oder indirekte Interaktionen über Adapterproteine mit der Fracht (Hirokawa und Takemura, 2004, Setou *et al.*, 2004). Dieser Mechanismus gewährleistet eine Spezifität des Transports unterschiedlicher Frachten. Zudem kann beispielsweise die Bindung des Proteins GRIP1 an KIF5 den Transportkomplex in Dendrite steuern, wohingegen die Interaktion von JSAP mit KIF5 dieses in Axone leitet (Setou *et al.*, 2002).

Fast alle Mitglieder der Dynein-Motorfamilie sind im Gegensatz zu Kinesinen nicht zytoplasmatisch lokalisiert sondern an Bewegungen von Cilien und Flagellen beteiligt (Vallee, 2004). Nur zytoplasmatisches Dynein ist an dem intrazellulären Transport beteiligt und von fast allen Säugerzellen exprimiert. Es stellt einen großen Protein-komplex dar, der neben den zwei schweren Ketten (*dynein heavy chain*, DHC) aus intermediären Ketten (DIC), zwei intermediären leichten Ketten (DILC) sowie zwei leichten Ketten (DLC) besteht. Die Heterogenität des Motorprotein-Komplexes wird nicht wie bei Kinesinen durch unterschiedliche schwere Ketten, sondern durch viele akzessorische Proteine gewährleistet (Vallee *et al.*, 2004). Zudem assoziiert zytoplasmatisches Dynein mit dem Dynaktin-Komplex, der die Bindung an Mikrotubuli und Transportgüter fördert und für die meisten Dynein-Motorfunktionen essentiell ist (King und Schroer, 2000, Muresan *et al.*, 2001). Die Dynein leichten Ketten binden ebenfalls an unterschiedliche Frachten (Valle, 2004). Interessanterweise wurde für die Dynein leichte Kette 1 und 2 eine Assoziation mit Myosin V gezeigt (Benashski *et al.*, 1997). Dies lässt vermuten, dass ein Transportgut über dasselbe Adapterprotein mit unterschiedlichen Motorproteinen interagieren kann, was einen Transport entlang verschiedener Zytoskelettelemente gewährleisten würde (Naisbitt *et al.*, 2000).

1.3.1 Transport von ionotropen Rezeptoren

Der aktive Transport von ionotropen Rezeptoren wird durch Motorproteine vermittelt. Daneben finden passive Bewegungen der Rezeptoren in der Plasmamembran durch Diffusion statt. Der Diffusionskoeffizient des GABA_A-Rezeptors scheint zum Beispiel in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität reguliert zu werden (Bannai *et al.*, 2009).

Ein aktiver Transport der Rezeptoren in den Dendriten erfolgt hingegen durch Motorproteine und ist für AMPA- und NMDA-Rezeptoren ausführlich beschrieben. Die

GluR2-Untereinheiten der AMPA-Rezeptoren können beispielsweise über Interaktion mit GRIP1 an KIF5 binden (Wyszynski *et al.*, 1999, Setou *et al.*, 2002). Das Protein Liprin- α interagiert auch mit GRIP1 und verbindet den AMPA-Rezeptor so zusätzlich mit KIF1A (Shin *et al.*, 2003). Der Langstreckentransport des AMPA-Rezeptors in Dendriten entlang der Mikrotubuli wird so durch unterschiedliche Kinesine vermittelt. Interessanterweise interagieren Myosin Va und Myosin Vb über die GluR1-Untereinheiten ebenfalls mit dem AMPA-Rezeptor (Lise *et al.*, 2006, Correia *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2008). Der Kurzstreckentransport des AMPA-Rezeptors in dendritische Dornen und sein Transport zur Plasmamembran scheint daher von Myosinen, die sich in Richtung plus-Ende der Aktinfilamente bewegen, vermittelt zu werden. Die Internalisierung des AMPA-Rezeptors dagegen wird von Myosin VI vermittelt, das sich retrograd in Richtung minus-Ende der Aktinfilamente bewegt (Osterweil *et al.*, 2005). NMDA-Rezeptor-Transport erfolgt über Bindung der NR2B-Untereinheit an einen Proteinkomplex aus mLin-10 (mint1), mLin-2 (CASK) und mLin-7 (MALS), der mit KIF17 interagiert (Setou *et al.*, 2000). PSD95, das an NR2B-Untereinheiten bindet, kann auch mit GKAP interagieren. GKAP wiederum bindet an Dynein leichte Kette 1 und 2, die sowohl Bestandteil von Myosin V als auch von Dynein sind (Naisbitt *et al.*, 2000). Daher könnte GKAP den Transport des NMDA-Rezeptors über zwei unterschiedliche Motorprotein-Systeme gewährleisten. Außerdem wurden die NMDA-Rezeptor-Untereinheiten NR1 und NR2 als Interaktionspartner der Myosin regulatorischen leichten Kette (RLC) identifiziert, die mit Myosin II assoziiert (Ampanan *et al.*, 2005). Retrograder Transport über Dynein oder C-Kinesine wurde bislang weder für den AMPA- noch für den NMDA-Rezeptor beschrieben.

Über den intrazellulären Transport von Rezeptoren der inhibitorischen Synapsen ist weniger bekannt und für den GABA_A-Rezeptor konnte bisher kein direkter Transport gezeigt werden. Einige Interaktionspartner des GABA_A-Rezeptors, die an Transportprozessen beteiligt sein könnten, werden im folgenden Kapitel genauer beschrieben. Für den Glyzin-Rezeptor konnte dagegen ein Motorprotein-vermittelter Transport beschrieben werden. Gephyrin, das mit dem Glyzin-Rezeptor interagiert, bindet an Dynein leichte Kette 1 und 2 (Fuhrmann *et al.*, 2002) und ein retrograd gerichteter Transportkomplex bestehend aus Glyzin-Rezeptor, Gephyrin und dem Dyneinmotor-komplex wurde beschrieben (Maas *et al.*, 2006). In einem anterograd gerichteten

Transportkomplex verbindet Gephyrin darüber hinaus KIF5 mit dem Glyzin-Rezeptor. Dieser Transport scheint zudem durch aktivitätsabhängige Prozesse reguliert zu sein (Maas *et al.*, 2009).

1.3.2 Endozytose, Transport und Abbau des GABA_A-Rezeptors

Nach der Assemblierung im endoplasmatischem Retikulum (ER) werden funktionelle GABA_A-Rezeptoren über den Golgi-Apparat in sekretorische Vesikel abgegeben und zur Plasmamembran transportiert. Für den GABA_A-Rezeptor wurde aber bislang kein direkter Transport gezeigt, obgleich verschiedene Proteine mit dieser Funktion in Verbindung gebracht werden. Ein Interaktionspartner von Gephyrin (siehe Kapitel 1.2.2, 1.2.3) und der γ 2-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors ist das kleine Protein GABARAP (*GABA receptor associated protein*) (Kneussel *et al.*, 2000, Nymann-Andersen *et al.*, 2002). GABARAP ist am Golgi-Apparat und intrazellulären Vesikeln angereichert, seine Lokalisation an inhibitorischen Postsynapsen wurde bislang aber nicht beschrieben (Wang *et al.*, 1999, Kneussel *et al.*, 2000, Kittler *et al.*, 2001). Aufgrund von Interaktionen GABARAPs mit Mikrotubuli und NSF (Kittler *et al.*, 2001), einem Protein das an intrazellulärer Vesikel-Fusion beteiligt ist (Zhao *et al.*, 2007), wird vermutet, dass GABARAP beim intrazellulären Transport des GABA_A-Rezeptors eine Rolle spielen könnte. PRIP1 und PRIP2 (*phospholipase C related inactive protein*) interagieren mit GABARAP sowie mit der β - und γ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Kanematsu *et al.*, 2002, Uji *et al.*, 2002). PRIPs könnten als Adapterproteine zwischen GABARAP und GABA_A-Rezeptoren fungieren und sie scheinen den Transport von γ -Untereinheiten enthaltender GABA_A-Rezeptoren zur Zelloberfläche zu fördern (Mizokami *et al.*, 2007). Außerdem scheint Palmitoylierung, eine kovalente Bindung der Palmitinsäure an bestimmte Cysteinreste von Proteinen, an Transportvorgängen zu exzitatorischen sowie inhibitorischen Synapsen beteiligt zu sein (Huang und El-Husseini, 2005). Eine Palmitoylierung bestimmter Cysteinreste der großen intrazellulären Schleife der GABA_A-Rezeptor γ -Untereinheiten wurde nachgewiesen, und diese Modifikation scheint die GABA_A-Rezeptor-Konzentration an der Synapse zu erhöhen (Keller *et al.*, 2004, Rathenberg *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang ist auf das Protein GODZ (*Golgi-specific DHHC zinc finger protein*) verwiesen, das die γ 2-Untereinheiten palmitoylieren kann und wie auch GABARAP

vorwiegend am Golgi-Apparat, nicht aber an inhibitorischen Synapsen lokalisiert ist (Fang *et al.*, 2006). Das Protein BIG2 (*brefeldin-A-inhibited GDP/GTP exchange factor*) bindet ebenfalls an GABA_A-Rezeptoren über eine Interaktion mit ihrer β -Untereinheit. Wie auch GABARAP und GODZ lokalisiert BIG2 am Golgi-Apparat, wird aber zusätzlich an intrazellulären Vesikeln und der postsynaptischen Membran detektiert (Charych *et al.*, 2004). BIG2 könnte daher am vesikulären Transport des GABA_A-Rezeptors zur Plasmamembran beteiligt sein, wie für alle zuvor genannten Proteine konnte jedoch kein direkter Kotransport mit GABA_A-Rezeptoren beobachtet werden (Moss und Vaughan *et al.*, 1995). An die GABA_A-Rezeptor γ 2-Untereinheit bindet ebenfalls GRIF1 (*GABA_A-receptor interacting factor 1*). GRIF1 ist ein Mitglied der TRAK-Familie von *coiled-coil*-Proteinen, denen Funktionen beim intrazellulären Vesikel-Transport zugeschrieben werden (Jacob *et al.*, 2008). GRIF1 bindet an den Mikrotubuli-abhängigen KIF5-Motorkomplex und könnte daher anterograden GABA_A-Rezeptor-Transport vermitteln (Brickley *et al.*, 2005, Smith *et al.*, 2006).

Die GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche werden kontinuierlich durch Clathrin-vermittelte Endozytose ausgetauscht (Abb. 1.3). Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose führt zur verminderten Internalisierung und Anreicherung des GABA_A-Rezeptors an der Zelloberfläche (Kittler *et al.*, 2000, Herring *et al.*, 2003, van Rijnsoever *et al.*, 2005). Hierbei wurde die Interaktion von den GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten β 1-3 und γ 2 mit dem Adapterprotein 2 (AP2) beschrieben, das Transmembranrezeptoren zu Clathrin-ummantelten-Gruben rekrutiert (Kittler *et al.*, 2000). Die AP2-Bindestellen der Rezeptor-Untereinheiten enthalten Aminosäurereste, die durch Proteinkinase-A oder -C (PKA, PKC) und von der Src-Kinase phosphoryliert werden. Dadurch könnte die Stärke der Interaktion von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten mit AP2 und folglich der GABA_A-Rezeptor-Gehalt an der Zelloberfläche reguliert werden (Moss *et al.*, 1995, Kittler *et al.*, 2005, Kittler *et al.*, 2008).

Nach ihrer Internalisierung werden GABA_A-Rezeptoren entweder kurzfristig zurück zur Zelloberfläche recycelt oder über einen längeren Zeitraum im Lysosom abgebaut (Kittler *et al.*, 2004). Der Transport des GABA_A-Rezeptors von der Plasmamembran zu *sorting* Endosomen, von denen aus Rezeptoren entweder recycelt oder einem Abbauweg zugeführt werden (Bonifacio und Rojas, 2006), wurde bislang noch nicht nachgewiesen. Es ist aber möglich, dass ein Aktinfilament-abhängiger Motorprotein-Komplex den GABA_A-Rezeptor über das submembrane Aktinzytoskelett transportiert

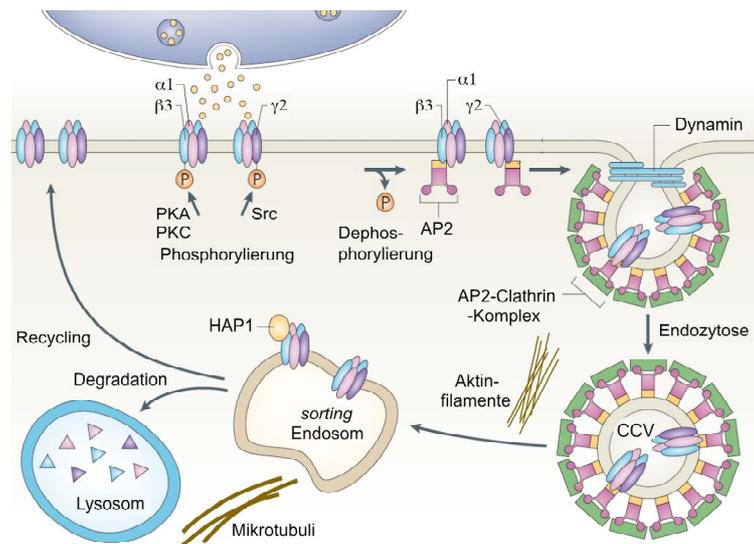


Abb. 1.3: GABA_A-Rezeptor Endozytose und post-endozytotische Sortierung. GABA_A-Rezeptoren werden durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert. Die Interaktion von $\beta 3$ und $\gamma 2$ mit dem Adapterprotein 2 (AP2) hängt von der Phosphorylierung durch Proteinkinase-A und -C (PKA, PKC) oder Src-Kinase (Scr) ab. Über Clathrin-umhüllte-Vesikel (CCV) gelangen GABA_A-Rezeptoren zum *sorting* Endosom und werden entweder recycelt oder im Lysosom abgebaut. Aktinfilamente befinden sich in submembranen Bereichen, Mikrotubuli reichen nicht bis zur Zelloberfläche. HAP1: *Huntingtin-associated protein 1*, $\beta 3, \gamma 2, \alpha 1$: GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. (Verändert nach Jacob *et al.*, 2008)

(Aschenbrenner *et al.*, 2003, Aschenbrenner *et al.*, 2004). Ein Transport solcher Art wurde für den AMPA-Rezeptor beschrieben, der vermutlich über Myosin VI, welches sich retrograd in Richtung minus-Ende der Aktinfilamente bewegt, vermittelt wird (Osterweil *et al.*, 2005). Von den *sorting* Endosomen aus könnte das Protein HAP1 (*Huntingtin-associated protein 1*), welches an die große intrazelluläre Schleife der $\beta 3$ -Untereinheit bindet, die Degradation von GABA_A-Rezeptoren negativ und daher ihr Recycling zur Plasmamembran positiv beeinflussen (Kittler *et al.*, 2004). HAP1 scheint zudem mit dem KIF5-Motorkomplex zu interagieren (McGuire *et al.*, 2006). Dagegen ist über einen retrograden Transport des GABA_A-Rezeptors von *sorting* Endosomen zu späten, den Abbau vermittelnden endozytotischen Kompartimenten nichts bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass der Dyneinmotorkomplex an einem Transport von frühen zu späten Endosomen entlang der Mikrotubuli beteiligt ist (Aniento *et al.*, 1993, Driskell *et al.*, 2007). Möglicherweise wird auch der GABA_A-Rezeptor über einen solchen Transportweg abgebaut.

1.4 Muskelin

Als ein direkter Interaktionspartner der GABA_A-Rezeptor α 1-Untereinheit wurde das intrazelluläre Protein Muskelin beschrieben (siehe Kapitel 1.4.2). Muskelin wurde erstmals in einer systematischen Studie identifiziert, bei der nach Proteinen gesucht wurde, die Zelladhäsion in Abhängigkeit von der extrazellulären Matrix-Komponente Thrombospondin-1 (TSP1) vermitteln (Adams *et al.*, 1998). Verringerte Expression von Muskelin in kultivierten Muskelzellen führte zur reduzierten Zelladhäsion an der TSP1-beschichteten Matrix, wobei Überexpression von Muskelin diese Zelladhäsion förderte. Muskelin wurde daher als ein intrazellulärer Faktor beschrieben, der an der Signalübertragung von der extrazellulären Matrix zum Zytoskelett beteiligt ist. Die Mitglieder der Thrombospondin-Familie werden entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert und über ihre Funktion im Gehirn ist bekannt, dass sie von Astrozyten oder Neuronen sezerniert werden und an der Synaptogenese des ZNS beteiligt sind (Arber und Caroni, 1995, Christopherson *et al.*, 2005). Es ist nichts darüber bekannt, ob Muskelin an der Synaptogenese beteiligt sein könnte. In diesem Zusammenhang wurde von einer Interaktion Muskelins mit p39, einem Aktivatorprotein der Cyclin-abhängigen Kinase 5 (Cdk5) berichtet. Die Abwesenheit von Cdk5 oder p39 und seinem Homolog p35 in *Knockout* Mauslinien führen jeweils zu einer Unterbrechung der neuronalen Migration und der Gehirnentwicklung (Ohshima *et al.*, 1996, Ko *et al.*, 2001). Aufgrund der beschriebenen Interaktionen könnte Muskelin eine Rolle während der neuronalen Entwicklung und Synaptogenese einnehmen.

Das einzige für Muskelin kodierende Gen in *Mus musculus* befindet sich auf dem Chromosom 6, in dem Abschnitt B1/B2 (Adams und Zhang, 1999). Auf struktureller Ebene besitzt Muskelin verschiedene Protein-Interaktions-Domänen und es gehört zu der Kelch-Wiederholung-Superfamilie (*kelch repeats superfamily*) (Abb. 1.4).

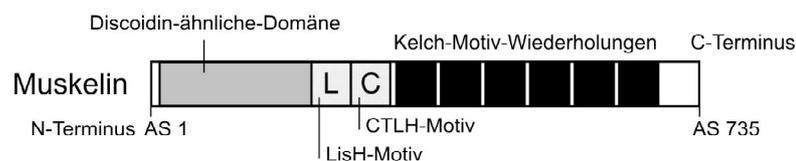


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Muskelin aus *Mus musculus*. Muskelin weist verschiedene Strukturmodule auf. LisH-Motiv: Lissencephalie 1-Homologie-Motiv, CTLH-Motiv: C-terminal von LisH-Motiv, AS: Aminosäure.

Im C-Terminus Muskelins befinden sich Kelch-Motive in sechsfacher Wiederholung, die sich strukturell zu einer β -Propeller-Domäne falten (Prag *et al.*, 2003). Obwohl die Struktur motive in anderen Proteinen Interaktionen mit Aktinfilamenten vermitteln können (Adams *et al.*, 2000), scheint Muskelin *in vitro* nicht direkt an Aktin zu binden (Prag *et al.*, 2004). Allerdings wurde von einer Kolokalisation Muskelins mit Aktinfilamenten berichtet (Ledee *et al.*, 2005). Wie die Mitglieder der Kelch-Wiederholung-Superfamilie kann Muskelin Oligomere bilden, wobei der C-Terminus mit einer im N-terminalen Bereich befindlichen Discoidin-ähnlichen (*discoidin like*)-Domäne interagiert. Die Phosphorylierung zweier Aminosäurereste durch Proteinkinase C (PKC) auf der selben Schleife des β -Propellers scheint eine Oligomerisierung Muskelins teilweise zu verhindern (Prag *et al.*, 2007). Der N-Terminus Muskelins weist des Weiteren ein Lissencephalie 1-Homologie-Motiv (LisH) sowie ein C-terminal von LisH-Motiv (CTLH) auf (Prag *et al.*, 2004). Diese beiden Motive wurden ursprünglich in dem Protein Lis1 identifiziert. Mutationen in dem für Lis1 kodierenden Gen tragen maßgeblich zur Ausbildung des Miller-Dieker-Lissencephalie-Syndroms bei (Morris *et al.*, 1998). Bei dieser Krankheit kommt es zu Gehirn-Fehlbildungen, geistiger Retardation, Epilepsie und frühem Tod. Lis1 bindet über das LisH-Motiv an Mikrotubuli sowie an den Dyneinmotorkomplex (Sapir *et al.*, 1997, Vallee *et al.*, 2000). Jüngere Studien zeigten, dass Lis1 in einem Komplex mit Dynein, KIF5 und Tubulin vorliegt und seine Aufgabe darin bestehen könnte, den Dyneinmotorkomplex an Mikrotubuli plus-Enden heranzuführen, um seinen retrograden Transport zu initiieren (Yamada *et al.*, 2008). Inwiefern das Krankheitsbild mit der Assoziation von Lis-1 mit Mikrotubuli in Verbindung gebracht werden kann, ist unklar. Abgesehen von möglichen Interaktionen Muskelins mit Zytoskelettelementen wurde von der direkten Bindung Muskelins an den Prostaglandin-EP3-Rezeptor berichtet (Hasegawa *et al.*, 2000). Muskelin scheint hier, die durch Agonisten stimulierte Internalisierung des Transmembran-Rezeptors zu regulieren.

1.4.1 Expression von Muskelin in Neuronen

Muskelin-Transkripte werden während embryonaler Entwicklungsstadien von *Mus musculus* in allen Geweben exprimiert (Prag *et al.*, 2007). Sie werden hier vermehrt im ZNS und in Muskelgeweben der Zunge und Gliedmaßen, sowie in verschiedenen

Epithelien (Leber, Niere, Zunge, Magen und Darm) nachgewiesen. Eine genauere raumzeitliche Untersuchung im Nervensystem von *Mus musculus* hat gezeigt, dass Muskelin mRNAs während der Embryonalstadien E12, E14 und E16 in den Neuroepithelien von Kortex, Hippokampus, Amygdala, Thalamus und Hypothalamus sowie in Hinterwurzelganglien vermehrt exprimiert werden (Tagnaouti *et al.*, 2007). Am Tag der Geburt (P0) sowie 42 Tage postnatal (P42) wurden Muskelin-Transkripte in allen Gehirnregionen, verstärkt aber im Hippokampus und Zerebellum nachgewiesen.

Auf Protein-Ebene wurde ebenso eine starke Expression Muskelins in Regionen des Hippokampus (CA1, CA2 und Gyrus dentatus) sowie in Körner- und Purkinjezellen des Zerebellums beobachtet (Tagnaouti *et al.*, 2007). Auf subzellulärer Ebene wurde eine Verteilung von Muskelin in Clustern beobachtet, die aus seiner Oligomerisierung resultieren könnten (Prag *et al.*, 2004). Muskelin-Cluster wurden im Soma, Axon sowie in Dendriten nachgewiesen, wobei Muskelin hier vermehrt an den kortikalen Bereichen lokalisierte, was auf eine Assoziation Muskelins mit der Plasmamembran oder mit Transmembranproteinen hindeutet. Daneben wurde die Anreicherung von Muskelin im Nukleus beobachtet, was mit einer berichteten Interaktion Muskelins mit dem Protein RanBPM (*Ran-binding protein in microtubule organizing center*), das im Zytoplasma und Nukleus vorliegt, übereinstimmt (Umeda *et al.*, 2003, Kobayashi *et al.*, 2007). Die Funktion des Muskelin-RanBPM-Komplexes scheint die Vermittlung zytoplasmatischer Signale, welche die Zellmorphologie beeinflussen, in den Nukleus zu sein (Valiyaveetil *et al.*, 2008). Über RanBPM ist zudem bekannt, dass es die Anzahl primärer dendritischer Fortsätze regulieren kann (Brunkhorst *et al.*, 2005).

In Übereinstimmung mit Muskelins Interaktionspartnern RanBPM, p39 und TSP1 (siehe Kapitel 1.4), die eine Rolle bei neuronaler Entwicklung und Synaptogenese einnehmen, wurde Muskelin an Synapsen hippokampaler Neurone sowie in synaptosomalen Präparationen nachgewiesen (Tagnaouti *et al.*, 2007). Eine entwicklungsabhängige Expressionsstudie von Muskelin in kultivierten hippokampalen Neuronen konnte Muskelin vermehrt in dem Zeitfenster nachweisen, in dem Synapsen gebildet wurden und reifen (Tagnaouti *et al.*, 2007). Unabhängig davon wurde Muskelin in dieser Studie mittels subzellulärer Fraktionierungen in mit Plasmamembran-, intrazellulären Vesikeln- und Proteinkomplex-angereicherten Fraktionen nachgewiesen.

1.4.2 Direkte Interaktion von Muskelin und dem GABA_A-Rezeptor

Mit Hilfe der Hefe-2-Hybrid-Technik wurde Muskelin als direkter Interaktionspartner der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors identifiziert (Sven Loebrich, Dissertation). Dabei beeinhaltet die Bindestellen der Interaktionspartner den C-terminalen Bereich der großen intrazellulären Schleife der α 1-Untereinheit sowie Teile von Muskelins Discodin-ähnlicher-Domäne und seinem LisH-Motiv. Die Spezifität dieser Interaktion wurde gezeigt, indem die großen intrazellulären Schleifen anderer GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im gleichen System benutzt, aber keine Interaktionen mit Muskelin nachgewiesen wurden. Die direkte Interaktion wurde *in vitro* mit Hilfe von *Pulldown*-Experimenten sowie in einer intrazellulären Umgebung durch Koimmunpräzipitation der α 1-Untereinheit mit Muskelin bestätigt (Sven Loebrich, persönliche Kommunikation). Muskelin wurde zudem in elektronenmikroskopischen Aufnahmen an der inhibitorischen Postsynapse nachgewiesen, was der Lokalisation von GABA_A-Rezeptoren entspricht. Mittels Immunzytochemie wurde gezeigt, dass die Interaktionspartner an den Synapsen kultivierter hippokampaler Neurone partiell kolokalisieren (Sven Loebrich, persönliche Kommunikation). Hierbei wurde an nichtsynaptischen, intrazellulären Bereichen vermehrt Kolokalisation beobachtet. Das lässt vermuten, dass die Assoziation Muskelins mit dem GABA_A-Rezeptor auch in anderen Zellkompartimenten von Bedeutung ist. In Anbetracht des LisH-Motivs innerhalb von Muskelin (siehe Kapitel 1.4) könnte Muskelin eine Funktion als Adapterprotein übernehmen und den GABA_A-Rezeptor mit dem Dyneinmotorkomplex verbinden. Ein ähnliches System wurde beispielsweise für den NMDA-Rezeptor beschrieben, der über die Adapterproteine mLin-2, mLin-7 und mLin-10 an den Motorprotein-Komplex KIF17 gekoppelt wird (Setou *et al.*, 2000).

1.5 Ziele der Arbeit

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass Muskelin direkt mit der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors interagiert. GABA_A-Rezeptoren sind wesentlich an der schnellen synaptischen Inhibition im ZNS beteiligt und die α 1-Untereinheit ist in einem Großteil der GABA_A-Rezeptoren vertreten. Über die Funktion von Muskelin im ZNS ist bislang nichts bekannt, jedoch wiesen seine Interaktionsdomänen auf eine physiologische Funktion hin. Aus diesem Grund wurde eine Muskelin *Knockout* Mauslinie etabliert,

bei der eine Aufhellung der Fellfarbe beobachtet wurde. Der Phänotyp deutete auf die Beteiligung Muskelins an Motorprotein-vermittelten Transportvorgängen hin. Ziel war es daher zu untersuchen, inwieweit Muskelin an den bislang weitgehend unbekannt Transportprozessen des GABA_A-Rezeptors beteiligt ist. Zunächst sollte analysiert werden, ob die Interaktionspartner gemeinsam transportiert werden. In diesem Falle sollten für den Kotransport verantwortliche Motorproteine identifiziert werden. Die Funktion eines putativen Transportkomplexes sollte dann im Hinblick auf den Transport des GABA_A-Rezeptors untersucht werden. Dazu könnten die Inhibition der Motorprotein-Funktion, Depolymerisation von Zytoskelettelementen sowie Untersuchungen der GABA_A-Rezeptor-Verteilung in Muskelin *Knockout* Mäusen beitragen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen mit dem Reinheitsgrad "zur Analyse (pro Analysis)" oder in höchstmöglicher Reinheit bezogen: SIGMA-Aldrich (Taufkirchen), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Roche (Mannheim), AppliChem (Darmstadt), Invitrogen (Carlsbad, USA) und VWR (Darmstadt).

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Roche (Mannheim), Fermentas (St.Leon-Rot) und NewEnglandBiolabs (Ipswich, USA) erworben. T4-DNA-Ligase wurde von Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen, Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) und Quick-T4-DNA-Ligase wurden von NewEnglandBiolabs (Ipswich, USA) erworben.

2.1.2 Geräte

PCR-Maschinen: T-1 Thermocycler (Biometra, Göttingen), PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, USA); Gelkammern für Agarosegele: B2, B1A (Owl Separation Systems, Portsmouth, USA); Photometer: Ultraspec 3000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK); UV-Illuminator: UVT2035 (Herolab, Wiesloch); Gelkammern für PAGE: Mini-PROTEAN 3 Cell (Biorad, München), Hoefer SE600 System (Hoefer, Inc., Holliston, USA); Western Blot-Apparatur: B2529 Semi-dry blotter (SIGMA, Taufkirchen); Homogenisator: Potter S (B. Braun Melsungen, Melsungen); Zentrifugen: L7 Ultracentrifuge, J2-21 M/E (Beckman Coulter, Fullerton, USA); Rotoren: JA-10, JA-20, SW-40Ti, SW-49Ti (Beckman Coulter, Fullerton, USA); Eppendorf Zentrifuge 5417 C (Eppendorf, Hamburg); Sterilbänke für Zellkulturarbeiten: SterilGARD Class II TypA/B3 (Baker Company, Sanford, USA); Zellkulturinkubatoren: NUAIRE IR AUTOFLOW CO₂ (Zapf Instrumente, Sarstedt); Heraeus-Inkubator (Heraeus, Hanau); Hera-Cell Inkubator (Heraeus, Hanau); Mikroskope: Inverses Mikroskop Leica DM IRBE (Leica, Wetzlar), Zeiss Axiovert 35,

Zeiss Axiovert 200M, Zeiss EM 902 (Zeiss, Göttingen); Time-lapse-Steuerung: Mac5000 (Visitron Systems, Puchheim); Sony CCD-Kamera 12.0 Monochrome w/o IR-18 (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, USA); Sequenzierer: ABI Prism, 377 DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt); Kryostat: Leica CM3050S (Leica, Wetzlar); Dynal MPC (Dynal *magnetic particle concentrator*; Dynal, Oslo, Norwegen); UV-Stratalinker 2400 (Stratagene, LaJolla, USA); Rollerofen (Biometra, Göttingen); Defraktionator (Labconco, Kansas City, USA).

2.1.3 Medien und Lösungen

Für alle Lösungen und Medien wurde über ein Milli-Q-System (Millipore, Eschborn) aufgereinigtes Wasser der Qualität *aqua bidest.* verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden pH-Werte mittels NaOH, KOH oder HCl eingestellt. Zur Sterilisation wurden die Lösungen für 20 min bei 121 °C und 2,1 bar autoklaviert oder mit Hilfe einer Membran mit der Ausschlussgrenze 0,22 µm (Millipore, Eschborn) sterilfiltriert. Zellkulturnährmedien wurden von Gibco-BRL Life Technologies (Karlsruhe) bezogen. Standardlösungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) bzw. nach Herstellerangaben angesetzt.

Blockierungspuffer (Immundetektion)

5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST

Blockierungspuffer (Immunzytochemie)

1 % (w/v) Bovines Serumalbumin (BSA) in 1x PBS

50x Denhardt's Reagenz

5 g Ficoll; 5 g Polyvinylpyrrolidone; 5 g Bovines Serumalbumin (BSA);
ad 500 ml H₂O

D-MEM/F-12 *complete* (Zellkultur)

500 ml D-MEM/F-12 (1:1, w/o L-Glu); 10% (v/v) FCS; 2 mM
L-Glutamin; 25 µg/ml Pyruvat; Penizillin/Streptomycin (50.000 U)

6x DNA-Ladepuffer

7,5 g Ficoll; 0,125 g Bromophenolblau; ad 50 ml H₂O (Aliquots wurden
bei -20 °C gelagert)

2x HBS

1,6 g NaCl; 0,074 g KCl; 0,027 g Na₂HPO₄*2 H₂O; 0,2 g Dextrose; 1 g HEPES; ad 100 ml H₂O; pH 7,05 (sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert)

HEPES-Puffer

135 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; pH 7,4; 15 mM Glukose; gelöst in H₂O

HEK293T-Medium

500 ml D-MEM (+4500 mg/l Glukose, + GlutaMAX I, - Pyruvat); 5 ml Penizillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U / ml); 50 ml FBS

IM-Ac-Puffer

20 mM HEPES; 100 mM K-Acetat; 40 mM KCl; 5 mM EGTA; 5 mM MgCl₂; pH 7,2; gelöst in H₂O

IP-Puffer

50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; gelöst in H₂O

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar (autoklaviert); nach Abkühlen der Lösung auf 50 °C wurde zur Selektion resistenter Bakterien Antibiotika supplementiert: Ampizillin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml)

LB-Medium

10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; ad 1000 ml H₂O, pH 7,5; (autoklaviert)

Neurobasalmedium

500 ml Neurobasalmedium (Invitrogen, Carlsbad, USA); 2 mM L-Glutamin; 25 µg/ml Pyruvat; 5 ml Penizillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml); 2 % (v/v) B27 (vor dem Gebrauch frisch hinzugefügt)

Prähybridisierungslösung

6x SSC; 2,5x Denhardt's Reagenz; 0,5 % SDS

Paraformaldehydlösung

40 g Paraformaldehyd; 40 g *Sucrose*; ad 1000 ml 1x PBS; pH 7,2

1x PBS

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 KH₂PO₄; ad 1000 ml H₂O;
pH 7,5 (autoklaviert)

SDS-Laufpuffer (10x)

250 mM Tris; 2,5 M Glyzin; 1 % (w/v) SDS; ad 1000 ml H₂O, pH 8,3

4x SDS-Probenpuffer

220 mM Tris (pH 6,8); 40 % (v/v) Glycerin; 8 % (w/v) SDS; 0,8 % (w/v)
Bromophenol; gelöst in H₂O; vor Gebrauch wurden 100 µl Puffer mit
8 µl β-Mercaptoethanol versetzt

Stripping-Puffer

25 mM Glyzin; 1 % SDS; pH 2,0; gelöst in H₂O

10x SSC

1,5 M NaCl; 0,15 M Natriumcitrat; gelöst in H₂O

Sucrose-Puffer A

320 mM *Sucrose*; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 5 mM MgCl₂;
4 mM HEPES; pH 7,4; gelöst in H₂O

Sucrose-Puffer B

2 M *Sucrose*; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 5 mM MgCl₂;
4 mM HEPES; pH 7,4; gelöst in H₂O

50x TAE

2 M Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA ; gelöst in H₂O

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA ; gelöst in H₂O

Tail-lysis-Puffer

0,5 % SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 50 mM EDTA

TBST (10x)

100 mM Tris (pH 8,0); 1,5 M NaCl; 0,5 % (v/v) Triton-X-100

Western Blot-Puffer

20 % (v/v) Methanol; 150 mM Tris; ad 1000 ml H₂O, pH 8,4

2.1.4 Tiere

Es wurden Wildtyp-Ratten vom Stamm Wistar sowie Wildtyp-Mäuse der Stämme FVB x C57Bl / 6J oder CBA x C57Bl / 6J benutzt. Außerdem wurden transgene Mäuse, welche den Dynein-Inhibitor Dynamitin (Burkhardt *et al.*, 1997) unter dem postnatal aktiven Thy1.2 Promotor (LaMonte *et al.*, 2002) überexprimieren sowie deren Wildtyp-Wurfgeschwister benutzt. Die Tiere wurden von Prof. E. Holzbaur (Universität von Pennsylvania, Pennsylvania, USA) zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden in dieser Arbeit Muskelin wildtypische (+/+), heterozygote (+/-) und homozygote (-/-) *Knockout* Mäuse (2.2.13), wobei letztere zwei Null-Allele für den *Mkln1* Genlocus tragen, hergestellt und analysiert.

2.1.5 Zelllinien

HEK293T-Zelllinie	humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC CRL-1537), ATCC (Manassas, USA)
-------------------	-------------------------------------------------------------------------

2.1.6 Bakterienstämme

XL 1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZDM15Tn10Tet^r</i>] Stratagene (La Jolla, USA)
-----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.1.7 Größenstandards

DNA-Standard	Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde)
Protein-Standards	Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad, München), Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)

2.1.8 Reaktionskomplettausstattungen (Kits)

ImmobilonWestern HRP Substrat (Millipore, Billerica, USA); QIAprep, Maxiprep Kit (Qiagen, Hilden); E.Z.N.A., Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab, Erlangen); E.Z.N.A., Cycle Pure Kit (Peqlab, Erlangen); E.Z.N.A., Gel Extraction Kit (Peqlab, Erlangen); Quick Ligation Kit (NewEngland Biolabs, Ipswich, USA); BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt); Prime-It RmT Random Primer Labeling Kit (Stratagene, LaJolla, USA); BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA); Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden); Quick Ligation Kit (NewEngland Biolabs, Ipswich, USA).

2.1.9 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden in der angegebenen Menge oder Verdünnung für Immunzytochemie (ICC), Immunhistochemie (IHC), Elektronenmikroskopie (EM), Koimmunpräzipitation (CoIP) oder Western Blot (WB) verwendet:

Antikörper	Spezies	Verdünnung oder eingesetzte Menge	Referenz
α -Dynein Intermediate Chain	Monoklonal, Maus	1:3000 (WB), 5 μ g (CoIP)	Chemicon (Temecula, USA)
α -GABA _A R α 1	Polyklonal, Kaninchen	1:750 (WB), 5 μ g (CoIP), 1:50 (ICC)	Chemicon (Temecula, USA)
α -GABA _A R α 1	Polyklonal, Kaninchen	1:1000 (WB)	Serotec (Oxford, UK)
α -Muskelin	Polyklonal, Meerschweinchen	1:3000 (WB), 5 μ g (CoIP), 1:15 (ICC), 1:10 (EM)	M. Kneussel (Hamburg)
α -Muskelin	Polyklonal, Kaninchen	1:1500 (WB), 1:75 (IHC)	P. Zelenka (Bethesda, USA)
α -Actin	Polyklonal, Kaninchen	1:2000 (WB)	SIGMA (Taufkirchen)
α -Pan-Cadherin	Monoklonal, Maus	1:3000 (WB)	Abcam (Cambridge, UK)
α - α -Tubulin	Monoklonal, Maus	1:20000 (WB)	SIGMA (Taufkirchen)

α -Transferrin Receptor	Monoklonal, Maus	1:700 (WB)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
α -Rab7	Polyklonal, Kaninchen	1:400 (WB)	SIGMA (Taufkirchen)
α -NSF	Monoklonal, Maus	1:5000 (WB)	BD Biosciences, (Heidelberg)
α - γ -Adaptin	Monoklonal, Maus	1:5000 (WB)	BD Biosciences, (Heidelberg)
α -Myosin VI	Polyklonal, Kaninchen	1:2000 (WB), 5 μ g (CoIP)	SIGMA (Taufkirchen)
α -Myosin VI	Monoklonal, Maus	1:50 (ICC)	SIGMA (Taufkirchen)
α -GlyR	Polyklonal, Kaninchen	1:50 (WB)	SIGMA (Taufkirchen)
α -GluR1	Polyklonal, Kaninchen	1:1000 (WB)	Chemicon (Temecula, USA)
IgG (unspezifische Immunglobuline)	Maus	5 μ g (CoIP)	SIGMA (Taufkirchen)
IgG (unspezifische Immunglobuline)	Kaninchen	5 μ g (CoIP)	SIGMA (Taufkirchen)

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Die folgenden Sekundärantikörper wurden verwendet:

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Referenz
α -Meerschweinchen-HRP	Ziege	1:15000 (WB)	Dianova (Hamburg)
α -Kaninchen-HRP	Ziege	1:15000 (WB)	Dianova (Hamburg)
α -Maus-HRP	Ziege	1:15000 (WB)	Dianova (Hamburg)
α -Kaninchen-AlexaFluor488	Ziege	1:50 (ICC)	Invitrogen (Carlsbad, USA)

α -Kaninchen-CY3	Esel	1:500 (ICH), 1:250 (ICC)	Dianova (Hamburg)
α -Kaninchen-CY5	Esel	1:500 (ICC)	Dianova (Hamburg)
α -Meerschweinchen-CY3	Esel	1:500 (ICC)	Dianova (Hamburg)
α -Maus-CY2	Esel	1:200 (ICC)	Dianova (Hamburg)
α -Meerschweinchen-Biotin	Esel	1:1000 (EM)	Vector Labs (Burlingame, USA)

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

2.1.10 Vektoren

Die folgenden Vektoren wurden verwendet:

Name	Herstellung/Herkunft	Verwendung
pmRFP	R.Y. Tsien (San Diego, USA)	Klonierung von pmRFP-Muskelin
pmRFP-Muskelin	Klonierung von mRFP als ein <i>AgeI-EcoRI</i> Fragment aus pmRFP in <i>AgeI-EcoRI</i> geschnittenen pEGFP-C1-Muskelin	Expression von mRFP-markiertem Muskelin in eukaryotischen Zellen
pmRFP-DIC	Bardo Behrend (ZMNH, Hamburg)	Expression von mRFP-markierter intermediärer Dynein-Kette in eukaryotischen Zellen
pEGFP-N2	Clontech (Heidelberg)	Expression von EGFP-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen
pEGFP-N2-GABA _A R α 1	Sven Loebrich (ZMNH, Hamburg)	Expression von EGFP-markiertem GABA _A R α 1 in eukaryotischen Zellen
pEGFP-C1-Muskelin	Sven Loebrich (ZMNH, Hamburg)	Klonierung von pmRFP-Muskelin
pEYFP-C2-Muskelin	Sven Loebrich (ZMNH, Hamburg)	Expression von EYFP-markiertem Muskelin in eukaryotischen Zellen
pBK-CMV-GABA _A R α 1	Sven Loebrich (ZMNH, Hamburg)	Expression von GABA _A R α 1 in eukaryotischen Zellen

pBK-CMV-GABA _A Rβ3	Sven Loebrich (ZMNH, Hamburg)	Expression von GABA _A Rβ3 in eukaryotischen Zellen
pCMV-Dynamitin-myc	Richard Vallee (New York, USA)	Expression von myc-markiertem Dynamitin in eukaryotischen Zellen
pEGFP-N2-Dynamitin	Richard Vallee (New York, USA)	Expression von EGFP-markiertem Dynamitin in eukaryotischen Zellen

Tabelle 3: Verwendete Vektoren

2.1.11 Oligonukleotide

Die folgenden unmodifizierten Oligonukleotide zur Sequenzierung und PCR wurden über die Firma MWG Biotech (Ebersberg) in HPSF-Qualität (*high purity salt free*) bezogen:

Name	5´-3´-Sequenz	Verwendung
EB0127-upper-s	AGCTACTTAAACCAAGTCAATGAGG	Genotypisierung von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen (PCR)
EB0127-lower-as	CTCATATGGTCATT TCAATATAGAGC	Genotypisierung von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen (PCR)
LTR-rev-as	ATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATC	Genotypisierung von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen (PCR)
YP-C2-Seq 1s	GTCGTAACAACCTCCGCCCCATTG	Sequenzierung von pmRFP-Muskelin
YP-Musk-Seq 1s	CTGGCGGGGCTGTTGCTGCGGCG	Sequenzierung von pmRFP-Muskelin
YP-RFP-Seq 2s	GGCCAAGAAGCCCGTGCAGC	Sequenzierung von pmRFP-Muskelin

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide

2.2 Molekularbiologie

2.2.1 Transformation von *E. coli*

Zur DNA-Gewinnung wurde der *E. coli* -Stamm XL1-Blue transformiert. Die Transformation wurde nach einer Methode von Inoue (Inoue *et al.*, 1990) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 100 µl chemisch kompetente *E. coli*- Zellen mit 1,7 µl β-Mercaptoethanol (1:10) auf Eis unter gelegentlichem, vorsichtigem Schütteln

für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe des Ligationsansatzes (2.2.10) oder 50 ng Plasmid-DNA und Inkubation für 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Die Zellen wurden dann mit 800 µl LB-Medium für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf das entsprechende Antibiotikum enthaltende LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Präparationen von Plasmid-DNA aus Bakterien im 5 ml Übernachtkultur-Maßstab wurden durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) mit anschließender Aufreinigung mittels Anionenaustauschersäulen mit Hilfe des E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kits I (Peqlab, Erlangen) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Aus Bakterien im 250 ml Übernachtkultur-Maßstab wurde Plasmid-DNA nach alkalischer Lyse der Bakterien mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen nach dem Protokoll des QIAprep, Maxiprep Kits (Qiagen, Hilden) isoliert.

2.2.3 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit

Eine qualitative und quantitative Überprüfung von DNA in wässriger Lösung erfolgte zum einen photometrisch mit einem Ultraspec 3000 Photometer (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) und zum anderen durch gelelektrophoretische Auftrennung (2.2.8) durch einen Intensitätsvergleich zwischen den Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmenten und denen des Längenmarker Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde). Die Konzentration der Markerfragmente wird vom Hersteller angegeben.

2.2.4 Phenol / Chloroform-Extraktion

Um Proteine aus einer DNA-haltigen Lösung zu entfernen, wurde diese mit 1 Volumen wassergesättigtem Phenol/Chloroform-Gemisch durch Schütteln versetzt. Dabei kommt es zum Ausfallen der Proteine, die anschließend in der phenolischen (Inter-) Phase vorliegen. Durch Zentrifugation bei 20.000 x g für 10 Minuten wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die obere, DNA-enthaltende Phase wurde abgenommen und die DNA anschließend mit Ethanol gefällt (2.2.5).

2.2.5 Fällung von DNA

Um DNA in einer wässrigen Lösung zu konzentrieren, wurde diese mit 2,5 Volumen Ethanol und 10 % (v/v) 3 M NaAc (pH 5,5) versetzt. Hierdurch wird Nukleinsäuren die Hydrathülle entzogen, woraufhin sie ausfallen. Danach wurde das DNA-Präzipitat für 10 min bei 20.000 x *g* abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das DNA Pellet wurde mit 1 Volumen 70 % Ethanol gewaschen, nach kurzer Zentrifugation getrocknet und in einer adäquaten Menge TE-Puffer, frisch supplementiert mit RNase H (Roche, Mannheim), aufgenommen.

2.2.6 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit den verschiedenen Restriktionsendonukleasen nach den Vorgaben der Hersteller inkubiert. In der Regel wurde pro μg DNA eine *unit* des jeweiligen Restriktionsenzym in vom Hersteller empfohlenen Puffer eingesetzt. Bei Ansätzen mit zwei Enzymen unterschiedlicher Hersteller wurden die für diese Enzymkombination bevorzugten Puffer von Roche (Roche, Mannheim) verwendet.

2.2.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Verhinderung einer Religation der mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen Vektoren (2.2.6) wurden die 5' Phosphatgruppen der DNA-Fragmente mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) (NewEngland Biolabs, Ipswich, USA) entfernt. Dazu wurden abhängig vom Volumen des Reaktionsansatzes jeweils 0,5 – 1 μl CIP (10 U/ μl) verwendet und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Produkte der PCR-Genotypisierung von Muskelin wildtypischen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) *Knockout* Mäusen (2.2.14) sowie von DNA-Fragmenten wurden in 0,8 bis 1,4 prozentigen, Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TAE durch Aufkochen gelöst und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid hinzugefügt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Die DNA

wurde entsprechend in DNA-Ladepuffer aufgenommen, auf das Gel aufgetragen, bei etwa 7-10 V pro cm Gellänge elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Der Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde) wurde als Größenmarker und zur Bestimmung der DNA-Konzentration (2.2.3) verwendet.

2.2.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Durch entsprechende Restriktionsenzyme aus Plasmiden ausgeschnittene DNA-Fragmente (2.2.6) wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.8) aufgetrennt, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Peqlab, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert und mittels Anionenaustauschersäulen aufgereinigt. Alternativ wurde zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau das Protokoll des E.Z.N.A., Cycle Pure Kits (Peqlab, Erlangen) verwendet.

2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Restriktionsfragmenten erfolgte unter Verwendung des Quick Ligation Kits (NewEngland Biolabs, Ipswich, USA). Hierzu wurden 50 ng Vektor und der dreifache stöchiometrische Überschuss an DNA-Fragment verwendet (Crouse *et al.*, 1983). Die Ligationsansätze wurden mit 10 µl 2x Quick-Ligase-Puffer und 1 µl Quick-T4-DNA-Ligase oder alternativ T4-DNA-Ligase (5 U/µl) in einem Volumen von 20 µl bei RT für 30 min inkubiert.

2.2.11 Subklonierung von DNA-Fragmenten

Zunächst wurde das rekombinante Plasmid mit der DNA-Sequenz von Interesse sowie der Zielvektor präparativ verdaut (2.2.6). Anschließend wurden die 5'-Enden des geöffneten Zielvektors dephosphoryliert (2.2.7). Der dephosphorylierte Zielvektor und das DNA-Fragment von Interesse wurden dann gelelektrophoretisch aufgereinigt und aus dem Gel extrahiert (2.2.8, 2.2.9). Nach erneuter gelelektrophoretischer Auftrennung der beiden Fragmente zur DNA Konzentrationsbestimmung (2.2.3), wurden diese ligiert (2.2.10). Mit dem Ligationsansatz wurden *E. coli*-Zellen transformiert (2.2.1) und positive Klone, die das rekombinante Plasmid von Interesse

trugen, nach Isolierung von Plasmid-DNA (2.2.2) über eine geeignete Restriktionsanalyse (2.2.6) identifiziert. Positive Klone wurden durch automatisierte Didesoxy-Sequenzierung vollständig überprüft (2.2.12).

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Service-Gruppe Sequenzierung unter Leitung von PD Dr. S. Hoffmeister-Ullerich am ZMNH (Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg) nach einem Verfahren beruhend auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Hierzu wurde ein ABI Prism 377 DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) eingesetzt. Die Elektropherogramme wurden mit der EditView-Software Version 1.0.1 (ABI Prism, Perkin Elmer, Applera, Weiterstadt) analysiert. Mit Hilfe der Macintosh-Software DNA Strider™ 1.3f9 (CEA, Frankreich) erfolgte dann die Auswertung der Sequenzen.

2.2.13 *Knockout* von Muskelin in *Mus musculus*

In das *Mkln1* Gen (mouse accession: NM_013791; chr6.31348828-31459482, NCBI) wurde in einem OmniBank® 129/SvEv embryonalem Stammzellklon (OST448976) der retrovirale OmniBank® *Gene Trapping* Vektor VICTR 48+MTII (Lexicon Pharmaceuticals, Inc, The Woodlands, USA) vom Hersteller inseriert. Eine exakte Position der Insertion wurde mittels inverser PCR bestimmt. Diese befindet sich an Position 6970 bp im Intron 1 des primären RNA-Transkripts des *Mkln1* Genlocus. Exon 1 des *Mkln1* Gens kodiert für 32 Aminosäuren. Vorausgegangene Studien über *Gene Trapping* Vektoren haben gezeigt, dass die meisten dieser Vektoren die Transkription oder Translation bestimmter endogener Informationen unterbrechen können und somit sogenannte Null-Allele erzeugen (Zambrowicz *et al.*, 1998). Die Blastozysten-Injektionen wurden von Lexicon Pharmaceuticals Inc. durchgeführt. Heterozygote Tiere wurden gekreuzt, um wildtypische (+/+), heterozygote (+/-) und homozygote (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse zu erhalten.

2.2.14 Genotypisierung von Muskelin *Knockout* Mäusen mittels PCR

Zur PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-Genotypisierung von Muskelin wildtypischen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Mäusen wurden zwei *Mkln1* Gen-spezifische Primer sowie ein VICTR 48+MTII *Gene Trapping* Vektor-spezifischer Primer benutzt. Zur Detektion des wildtyp Allels wurden der *sense*-Primer EB0127-upper-s sowie der *antisense*-Primer EB0127-lower-as verwendet, welche stromaufwärts und stromabwärts (*upstream* und *downstream*) der Insertionsposition des *Gene Trapping* Vektors der *Mkln1* DNA-Sequenz komplementär sind. Der *Sense*-Primer EB0127-upper-s wurde zusätzlich zusammen mit dem VICTR 48+MTII *Gene Trapping* Vektor-spezifischen *antisense*-Primer LTR-rev-as benutzt, um ein mutationsspezifisches Produkt zu amplifizieren, welches 96 Nukleotide der *Gene Trapping* Vektor-Sequenz enthält. Die Primer wurden nun in einer äquimolaren Multiplex-Reaktion eingesetzt, um die entsprechenden *Mkln1* Allele auf Maus Chromosom 6 zu amplifizieren. Hierzu wurde zunächst die genomische DNA aus Schwanzbiopsien von Muskelin wildtypischen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Mäusen mit Hilfe des Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert und nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. 125 ng der aufgereinigten genomischen DNA wurden als Matrize (*template*) für die PCR-Genotypisierung in einem Reaktionsvolumen von 50 µl wie folgt eingesetzt:

Reaktionskomponenten	Volumen (µl)
10x Rxn PCR Buffer (Invitrogen, Carlsbad, USA)	5,0
50 mM MgCl ₂ (Invitrogen, Carlsbad, USA)	1,75
2,5 mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, USA)	5,0
Primer EB0127-upper-s 10 pmol/µl	2,0
Primer EB0127-lower-as 10 pmol/µl	2,0
Primer LTR-rev-as 10 pmol/µl	2,0
5 U/µl Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA)	0,5
H ₂ O	30,75

125 ng genomische DNA aus Schwanzbiopsie	1,0
Absolutes Reaktionsvolumen	50,0

Tabelle 5: Reaktionskomponenten der Muskelin PCR-Genotypisierung

Es wurde folgendes Protokoll für die Temperaturzyklen verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	94 °C	4 min	
2	94 °C	15 s	
3	65 °C	30 s	-1 °C pro Zyklus
4	72 °C	40 s	Zurück zu Schritt 2, 10 Zyklen
5	94 °C	15 s	
6	55 °C	30 s	
7	72 °C	40 s	Zurück zu Schritt 5, 30 Zyklen
8	4 °C	∞	Reaktionsstop

Tabelle 6: Temperaturzyklen der Muskelin PCR-Genotypisierung

Nach Abschluß der Reaktion wurden die PCR-Produkte mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese (2.2.8) aufgetrennt, analysiert und dokumentiert.

2.2.15 Genotypisierung von Muskelin *Knockout* Mäusen mittels Southern Blot

Um die Insertion des retroviralen OmniBank[®] *Gene Trapping* Vektors VICTR 48+MTII (Lexicon Pharmaceuticals, Inc, The Woodlands, USA) in Intron 1 (Position 6970 bp des primären *Mkin1* RNA-Transkripts) zu bestätigen, wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien von Muskelin wildtypischen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Mäusen extrahiert. Hierzu wurden die Schwanzbiopsien in *Tail-lysis*-Puffer, supplementiert mit 0,5 mg/ml Proteinase K (Roche, Mannheim), über Nacht bei 55 °C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurden 10 % (v/v) 3 M NaAc (pH 5,5) zur DNA-Lösung gegeben.

Anschließend erfolgte die Präzipitation der DNA durch die Zugabe von 2,5 Volumeneinheiten absolutem Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Nach Zentrifugation für 10 min bei 20.000 x g wurde das DNA-Präzipitat in 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und jeweils in 30 µl TE-Puffer, frisch supplementiert mit RNase H (Roche, Mannheim), aufgenommen. Der Restriktionsverdau der genomischen DNA erfolgte durch Zugabe von 6 µl *SacI* (10 U/µl, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und Puffer A (Roche, Mannheim) über Nacht bei 37 °C. Die DNA wurde nun in 0,8 prozentigen Agarosegelen mittel Agarose-Gelelektrophorese (2.19) bei einer konstanten Spannung von 60 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarosegel für 1 Stunde in 0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl unter Schütteln bei RT denaturiert, bevor es für 30 min in 0,5 M Tris (pH 7,5) / 3 M NaCl unter Schütteln neutralisiert wurde. Der Transfer der DNA auf eine Nylon Membran Hybond-N+ (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) erfolgte über Nacht bei RT über einen 10x SSC-Diffusionsgradienten gemäß der Standardmethode (Sambrook *et al.*, 1989). Der Southern Blot wurde wie folgt aufgebaut: Als unterste Lage diente *Whatman*-Papier (getränkt und in Kontakt mit 10x SSC), dann folgten das Gel, die Membran, zwei Lagen *Whatman*-Papier (getränkt mit 10x SSC) und mehrere Saugtücher. Der Aufbau wurde durch ein Gewicht von ca. 500 g beschwert. Nachdem die Membran für 30 min bei RT getrocknet wurde, erfolgte die UV-Quervernetzung der DNA auf der Membran mit Hilfe eines UV-Stratalinkers 2400 (Stratagene, LaJolla, USA). Die Prähybridisierung im Rollerofen (Biometra, Göttingen) erfolgte für 3 Stunden bei 65 °C in Prähybridisierungslösung, frisch supplementiert mit 10 µg/µl zuvor bei 95 °C denaturierter Lachsspermien-DNA (Roche, Mannheim). Um eine spezifische, radioaktiv-markierte Sonde herzustellen, wurde zunächst ein PCR-Fragment unter Verwendung der Primer EB0127-upper-s und EB0127-lower-as von Muskelin wildtyp (+/+) DNA amplifiziert (2.2.14). Nach präparativem Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit *Bam*HI (2.2.6) wurden die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgereinigt und das DNA-Fragment von Interesse aus dem Gel extrahiert (2.2.8, 2.2.9). Dieses mit *Bam*HI-Verdau erzeugte DNA-Fragment war spezifisch für Position 6697-6907 (Blast, NCBI) des primären RNA Transkripts des *Mkln1* Genlocus stromaufwärts (*upstream*) der Insertionsposition des *Gene Trapping* Vektors (2.2.13). 30 ng dieses DNA-Fragments wurden nun mit Hilfe des Prime-It RmT Random Primer Labeling Kit (Stratagene, LaJolla,

USA) nach Angaben des Herstellers mit α -³²P-dCTP radioaktiv markiert (Feinberg *et al.*, 1983). Die radioaktivmarkierte Sonde wurde mit Sephadex G50-Mikrosäulen (Probe Quant G50, Amersham-Pharmacia) aufgereinigt und vor Beginn der Hybridisierung denaturiert. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde wurde daraufhin bei 65 °C im Rollerofen (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Nach 24 h Hybridisierung wurde die Membran aufeinanderfolgend mit 0,1% SDS (w/v) in 2x SSC für 30 s bei RT und zweimal mit 0,1% SDS (w/v) in 2x SSC für jeweils 30 min bei 65 °C gewaschen. Abschließend wurde die Membran auf einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) bei –80 °C exponiert oder mit Hilfe eines "Phospho-Imagers" (Fujix, BAS 2000, Raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt) entwickelt.

2.3 Proteinbiochemie

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Gelelektrophorese wurde mit Hilfe des Mini-Protean III Systems (Biorad, München) oder des Hoefer SE600 Systems (Hoefer, inc., Holliston, USA) durchgeführt. Hierzu wurden 6 bis 12 prozentige Trenngele und 5 prozentige Sammelgele aus einer 40 % (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (Roth, Karlsruhe) hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Polyacrylamidgel entsprechend mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C hitzedenaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 75 V pro Gel in 1x SDS-Laufpuffer. Anschließend wurden die Proteine durch Western Blot (2.3.2) auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Größenmarker wurde der Precision Plus Protein Standards Dual Color (Biorad, München) verwendet.

2.3.2 Western Blot

Zum Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper (Immundetektion, 2.3.3) wurden die Proteine nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (2.3.1) auf eine PVDF-Membran Hybond-P der Porengröße 0,45 µm (Amersham, Freiburg)

transferiert. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer „Semi-dry“-Blotapparatur (SIGMA, Taufkirchen) bei einer konstanten Stromstärke von $1,7 \text{ mA/cm}^2$ für 2 Stunden. Der Blot wurde ausgehend von der Anodenseite wie folgt aufgebaut: Drei Lagen *Whatman*-Papier (getränkt in Western Blot-Puffer), Membran, Gel, drei Lagen *Whatman*-Papier (getränkt in Western Blot-Puffer). Vor dem Blot wurde die Membran 10 s in Methanol aktiviert, in H_2O gewaschen und dann in Western Blot-Puffer äquilibriert.

2.3.3 Immundetektion

Für den Nachweis immobilisierter Proteine auf der PVDF-Membran (2.3.2) durch spezifische Antikörper wurde die Membran zunächst für 30 min bei 37°C oder über Nacht bei 4°C in 5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in 5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST unter leichtem Schütteln bei 4°C über Nacht oder alternativ für 2 Stunden bei RT. Die Membran wurde dann viermal für je 10 min in 1x TBST gewaschen und anschließend mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in 5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST für 45 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der zweiten Inkubation wurde erneut viermal für jeweils 10 min mit 1x TBST gewaschen, bevor die Detektion mit der auf Chemolumineszenz basierenden Reaktionskomplettausstattung ImmobilonWestern (Millipore, Billerica, USA) nach Angaben des Herstellers erfolgte. Zur Dokumentation wurden lichtsensitive Filme (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) verwendet. Für die Detektion eines weiteren Proteins auf der PVDF-Membran wurde die Membran 30 min bei RT mit *Stripping*-Puffer inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit 1x TBST wurde die Membran erneut mit Sekundärantikörper inkubiert, gewaschen und detektiert um das Verbleiben von Signal nach dem *Stripping*-Vorgang auszuschliessen. Nun wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

2.3.4 Koimmunpräzipitation

Zur Koimmunpräzipitation wurden Zelllysate aus Mäusehirn nach einem modifizierten Protokoll von Saito *et al.* hergestellt (Saito *et al.*, 1997). Alle Schritte

wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Muskelin wildtypische (+/+) und homozygote (-/-) *Knockout* Mäuse wurden dekapitiert, die Gehirne komplett entnommen, mit einer Schere zerkleinert und in eiskaltem IM-Ac-Puffer, supplementiert mit Protease Inhibitor Tabletten (Roche, Mannheim), 5 mM DTT, 2 mM MgATP und 1 mM PMSF (alle SIGMA, Taufkirchen), mit einem Glas-Teflon Homogenisator (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) mit zehn Stößen bei 800 rpm homogenisiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 1.000 x g für 10 min im Beckmann JA20-Rotor (Beckman Coulter, Fullerton, USA) geklärt. Der resultierende Überstand (S1) wurde dann im gleichen Rotor mit 10.000 x g für weitere 10 min zentrifugiert, um Plasmamembran-Bruchstücke sowie große Zellorganellen zu pelletieren (P2). Der verbleibende Überstand wurde für 1 Stunde mit 100.000 x g im Beckmann SW40Ti-Rotor (Beckman Coulter, Fullerton, USA) ultrazentrifugiert, um eine mit kleinen, intrazellulären Vesikeln angereicherte Fraktion (P3) zu gewinnen. Die Pellets P2 und P3 wurden jeweils in IM-Ac-Puffer resuspendiert. Die Fraktionen P2, P3 und S1 wurden dann jeweils für 1 Stunde in der Gegenwart von 1 % (v/v) Triton-X-100 inkubiert, um Membranen zu solubilisieren und unspezifische Anreicherungen während der Koimmunpräzipitation durch intakte Vesikel zu minimieren. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Koimmunpräzipitation wurden 5 µg Antikörper von Interesse an 30 µl Protein G-gekoppelte Dynabeads (Dyna, Oslo, Norwegen) in 800 µl IP-Puffer über Nacht immobilisiert und nicht gebundene Antikörper durch drei Waschschriffe mit IP-Puffer entfernt. Das Waschen der Matrix erfolgte über den Dynal MPC (Dyna Magnetic Particle Concentrator, Dynal, Oslo, Norwegen). Anschließend wurden die immobilisierten Antikörper mit Proteinextrakten von S1, P2 und/oder P3 Fraktionen für 4-5 Stunden im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Matrix drei bis vier mal mit 0,5 % - 1 % (v/v) Triton-X-100 in IP-Puffer, supplementiert mit Protease Inhibitor Tabletten und 1 mM PMSF, gewaschen, wobei jeder Waschschriff für 5-10 min im Über-Kopf-Schüttler erfolgte. Abschließend wurde einmal kurz mit 1x PBS gewaschen, die Matrix für 20 s bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand sauber abgenommen. Die Dynabeads, wurden in 45 µl H₂O aufgenommen, mit 15 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und immobilisierte Proteine für 10 min bei 95 °C hitzedenaturiert und eluiert. Die Proteine wurden dann über

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.3.1) aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen (2.3.2).

2.3.5 Differentielle Zentrifugation

Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C nach einem modifizierten Protokoll von Saito *et al.* (Saito *et al.*, 1997) durchgeführt. Adulte, wildtypische (+/+) und homozygote (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse sowie adulte transgene Mäuse, welche den Dynein-Inhibitor Dynamitin unter dem postnatal aktiven Thy1.2 Promotor überexpressieren, und deren Wurfgeschwister wurden dekapitiert. Die Gehirne wurden komplett entnommen, mit einer Schere zerkleinert und in *Sucrose*-Puffer A, supplementiert mit Protease Inhibitor Tabletten (Roche, Mannheim), 1 mM PMSF und 2 mM MgCl₂ (beide SIGMA, Taufkirchen), mit einem Glas-Teflon Homogenisator (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) mit zehn Stößen bei 800 rpm homogenisiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation mit 1.000 x g für 10 min im Beckmann JA20-Rotor geklärt. Der Überstand wurde im gleichen Rotor mit 10.000 x g für weitere 10 min zentrifugiert, um Plasmamembran-Bruchstücke und große Zellorganellen zu pelletieren (P2). Der verbleibende Überstand wurde für 1 Stunde mit 100.000 x g im Beckmann SW40Ti-Rotor ultrazentrifugiert, um eine mit kleinen, intrazellulären Vesikeln angereicherte Fraktion zu gewinnen (P3). Die Pellets P2 und P3 wurden dann jeweils in *Sucrose*-Puffer A resuspendiert und deren absolute Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Reaktionskomplettausstattung BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Unterschiedliche Proteinkonzentrationen zwischen den Proben der beiden Genotypen wurden durch die Zugabe von *Sucrose*-Puffer angeglichen.

2.3.6 *Sucrose*gradienten-Dichtezentrifugation

16 Gehirne von 10 Tage alten Ratten (P10) wurden wie unter (2.3.5) beschrieben entnommen, homogenisiert und differentiell zentrifugiert. Die mit intrazellulären Vesikeln angereicherte Fraktion (P3) wurde in 1,5 ml *Sucrose*-Puffer B, supplementiert mit Protease Inhibitor Tabletten (Roche, Mannheim) und 1 mM PMSF (SIGMA, Taufkirchen), aufgenommen. Anschließend wurden die Extrakte in der Gegenwart oder in der Abwesenheit von 1 % (v/v) Triton X-100 für 1 Stunde auf Eis

inkubiert, um Membranen intakter Vesikel zu solubilisieren, bevor sie auf einen linearen 0,35 - 2 M *Sucrose*-gradienten mit 0,15 M Dichte-Intervallen geladen wurden. Der *Sucrose*-Dichte-Gradient wurde bei 160.000 x g in einem SW40Ti Rotor (Beckman Coulter, Fullerton, USA) für 12 Stunden bei 4 °C zentrifugiert. Die 11 Fraktionen (jeweils ca. 600 µl) wurden aufeinander folgend mit Hilfe eines Defraktionators (Labconco, Kansas City, USA) vorsichtig abgenommen. 60 µl von jeder Fraktion wurden mit 20 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C hitzedenaturiert. Proteine wurden dann über SDS-PAGE (2.3.1) aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen (2.3.2).

2.3.7 Zelloberflächen-Rezeptor-Studie

HEK293T-Zellen, kultiviert auf 35 mm Zellkulturschalen (Sarstedt, Newton, USA), wurden zusammen mit den Plasmiden pBK-CMV-GABA_AR α 1 und pBK-CMV-GABA_AR β 3 oder zusätzlich mit pCMV-Dynamitin-myc kotransfiziert (2.4.7). Die Expressionsdauer betrug 48 Stunden. Danach wurden die Zellen in 1 mM Biotin-Reagenz (Biotinamid-hexansäure3-sulfo-N-hydroxysuccinimid-ester Natrium-Salz, SIGMA, Taufkirchen) in HEPES-Puffer bei 4 °C für 20 min inkubiert, um Rezeptoren an der Zelloberfläche mit Biotin zu markieren. Da bei 4 °C keine Endozytose mehr stattfindet, verbleiben die markierten Rezeptoren an der Zelloberfläche. Nicht gebundenes Biotin-Reagenz wurde dann durch zwei aufeinander folgende Inkubationen der Zellen für jeweils 20 min bei 4 °C in 100 mM Glyzin in HEPES-Puffer abgefangen. Die Zellen wurden mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und danach in 300 µl 1 % (v/v) Triton X-100 in 1x PBS, supplementiert mit Protease Inhibitor Tabletten (Roche, Mannheim) und 1 mM PMSF (SIGMA, Taufkirchen), mit einem Zellschaber (Sarstedt, Newton, USA) von der Zellkulturschale abgelöst. Zur Lyse der Plasmamembran wurden die Extrakte für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1.000 x g und 4 °C für 5 min wurden die Überstände abgenommen und jeweils 30 µl wurden nach Zugabe von 4x SDS-Probenpuffer und Hitzedenaturierung durch SDS-PAGE (2.3.1), Western Blot (2.3.2) und Immundetektion (2.3.3) auf die enthaltene Menge an GABA_AR α 1 hin überprüft. Im Falle ähnlicher GABA_AR α 1-Konzentrationen wurden die Überstände mit 40 µl zuvor zweimal in IP-Puffer gewaschenen Streptavidin *beads* (Dynabeads Myone TM Streptavidin C1,

Invitrogen, Carlsbad, USA) für 3 Stunden bei 4 °C in einem Überkopf-Schüttler inkubiert, um GABA_AR α 1, die sich während der Biotinylierung an der Zelloberfläche befanden, zu präzipitieren. Nach 3 Waschschritten in 1% Triton X-100 (v/v) in IP-Puffer für 7 min wurde abschließend einmal kurz mit 1x PBS gewaschen, für 20 s bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand sauber abgenommen. Die Streptavidin *beads* wurden in 45 μ l H₂O aufgenommen, mit 15 μ l 4x SDS-Probenpuffer versetzt und immobilisierte Proteine für 10 min bei 95 °C hitzedenaturiert und eluiert. Die Proteine wurden dann über SDS-PAGE (2.3.1) aufgetrennt und einer Western Blot Analyse (2.3.2) mit nachfolgender Immundetektion (2.3.3) unterzogen.

2.3.8 Rezeptor-Degradation-Studie

Um die Degradation von GABA_AR α 1 zu analysieren, wurde der Verlust an biotinylierten GABA_AR α 1 über die Zeit ermittelt. Hierzu wurden hippokampale Neurone von neugeborenen (P0) wildtypischen (+/+) und homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen kultiviert (2.4.5). Ca. 750.000 Zellen pro 35 mm Zellkulturschale (Sarstedt, Newton, USA), zwischen 14 und 18 Tagen in Kultur (DIV 14-18), wurden in 1 mM Biotin-Reagenz (Biotinamid-hexansäure3-sulfo-N-hydroxysuccinimid-ester Natrium Salz, SIGMA, Taufkirchen) in präkonditioniertem Neurobasalmedium bei 4 °C für 12 min inkubiert, um Rezeptoren an der Zelloberfläche mit Biotin zu markieren. Da bei 4 °C keine Endozytose mehr stattfindet, verbleiben die markierten Rezeptoren an der Zelloberfläche. Nicht gebundenes Biotin-Reagenz wurde dann durch drei aufeinander folgende Inkubationen der Zellen für jeweils 5 min bei 4 °C in 100 mM Glyzin in HEPES-Puffer abgefangen und die Zellen wurden mit eiskaltem Neurobasalmedium gewaschen. Die Zellen wurden dann entweder sofort in 300 μ l 1 % (v/v) Triton X-100 in 1x PBS, supplementiert mit Protease Inhibitor Tabletten (Roche, Mannheim) und 1 mM PMSF (SIGMA, Taufkirchen), mit einem Zellschaber (Sarstedt, Newton, USA) von der Zellkulturschale abgelöst und geerntet (2.3.7) oder weiter bei 37 °C für 12 Stunden in präkonditioniertem Neurobasalmedium inkubiert, um die Internalisierung und Degradation von GABA_AR α 1 zu ermöglichen (Kittler *et al.*, 2004). Hierbei wurden die hippokampalen Neuronen von Muskelin wildtypischen (+/+) und / oder homozygoten (-/-) *Knockout* Mäusen unbehandelt gelassen oder mit 1 μ M Nocodazol, 200 μ g/ml Leupeptin oder 1 μ M Zytochalasin D (alle SIGMA,

Taufkirchen) behandelt. Nach Waschen der Zellen in Neurobasalmedium wurden diese geerntet und die mit Biotin markierten Rezeptoren präzipitiert (2.3.7). Die Proteine wurden anschließend über SDS-PAGE (2.3.1) aufgetrennt und nach einem Western Blot (2.3.2) mit den entsprechenden Antikörpern immundetektiert (2.3.3).

2.4 Histologie und Zellbiologie

2.4.1 Nissl-Färbung

Gehirne von Muskelin wildtypischen (+/+) und homozygoten (-/-) *Knockout* Mäusen wurden entnommen, in 2-4 % (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS für 4 Stunden fixiert und nach einer Kryoprotektion mit 30 % (w/v) *Sucrose* bei -80 °C gelagert. Vor dem Schneiden wurde das Gewebe in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Inc., Torrance, USA) eingebettet und Gefrierschnitte (20 µm) am Kryostat Leica CM3050S (Leica, Wetzlar) angefertigt. Nach dem Aufziehen der Schnitte auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel Glaeser, Braunschweig) wurden diese in 2-4 % (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS für 2 Stunden postfixiert, 5 min in Wasser inkubiert und dann 4 min mit Kresylviolett-Acetat in 10 % Ethanol (SIGMA, Taufkirchen) gefärbt. Für die Entfärbung der Gefrierschnitte wurden diese zunächst 10 bis 20 s in 2 % (v/v) Essigsäure in Ethanol (beide Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) und zweimal für 30 bis 60 s in absolutem Ethanol gewaschen. Zuletzt wurden die Gefrierschnitte 10 min in Xylol (Roth, Karlsruhe) inkubiert und dann an einem Binokular (Leica, Wetzlar), ausgestattet mit einer AxioCam (Zeiss, Göttingen), analysiert.

2.4.2 Elektronenmikroskopie

Preembedding-Immunhistochemie sowie die elektronenmikroskopische Analyse erfolgte durch die Servicegruppe Morphologie am ZMNH (Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg) unter der Leitung von Dr. Michaela Schweizer. Adulte Mäuse wurden anästhesiert und mit 4 % (w/v) PFA und 0,1 % (w/v) Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphat-Puffer (PB, pH 7.4) fixiert. Sagittale Vibratomschnitte (150 µm) von Hippokampi adulter Mäuse wurden angefertigt und in 2,3 M *Sucrose* in PB über

Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Gefrier-Tau-Zyklen in flüssigem Stickstoff wurden die Schnitte mit 1 % NaBH₄ in 1x PBS und dann mit 0,3 % H₂O₂ in 1x PBS für jeweils 30 min behandelt. Nach Waschen in 1x PBS wurden die Schnitte mit 0,2 % (w/v) Bovines Serumalbumin (BSA) und 10 % (w/v) Pferdeserum (HS) in 1 x PBS für 15 min blockiert und dann über Nacht mit Primärantikörper (α -Muskelin, Meerschweinchen) in 1 % (w/v) HS und 0,2 % (w/v) BSA in 1x PBS inkubiert. Nach dem Waschen in 1x PBS wurden die Schnitte mit biotinyliertem Sekundärantikörper (1:1000, Vector Labs, Burlingame, USA) in 1 % (w/v) HS und 0,2 % (w/v) BSA in 1x PBS für 90 min behandelt. Nach erneutem Waschen in 1x PBS wurden die Schnitte mit einem Avidin-Biotin Konjugat (1:100, ABC, Vector Labs) in 1x PBS für 90 min inkubiert, nochmals gewaschen, und dann in Diaminobenzidin (DAB)-H₂O₂ Lösung (SIGMA, Taufkirchen) für 10 min inkubiert. Die Schnitte wurden mit 1% (w/v) OsO₄ in 1x PBS fixiert, in aufsteigenden Ethanol-Konzentrations-Reihen dehydriert und in Epon eingebettet (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Die elektronenmikroskopische Analyse erfolgte mit Hilfe eines Zeiss EM 902 (Zeiss, Göttingen).

2.4.3 Immunhistochemie

Gehirne von Muskelin wildtypischen (+/+) und homozygoten (-/-) *Knockout* Mäusen wurden entnommen, fixiert und nach Kryoprotektion bei -80 °C gelagert (2.4.1). Nach dem Einbetten der Gewebe in Tissue-Tek wurden Gefrierschnitte (20 μ m) angefertigt (2.24). Nach dem Aufziehen der Schnitte auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel Glaeser, Braunschweig) wurden diese zur Permeabilisierung der Zellmembran in 0,4 % (v/v) Triton-X-100 in 1x PBS für 20 min inkubiert und danach mit 1x PBS gewaschen. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen erfolgte eine Inkubation für 30 min in 4 % (w/v) Pferdeserum (HS) und 0,1 % Triton-X-100 in 1x PBS, gefolgt von der Inkubation in entsprechend verdünntem Primärantikörper in 2 % (w/v) HS und 0,1 % Triton-X-100 in 1x PBS für 2 Stunden bei RT. Nach viermaligem Waschen in 1x PBS wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper in 1,5 % (w/v) HS im Dunkeln bei RT inkubiert, um ein Ausbleichen zu verhindern. Nach drei weiteren Waschschritten in 1x PBS wurden die Schnitte mit AquaPolyMount (Polysciences, Warrington, USA) auf Objektträgern fixiert, getrocknet und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte durch

konfokale Lasermikroskopie mit dem inversen Mikroskop Leica DM IRBE unter Verwendung der Software LCS TCS-SP2 (beide Leica, Wetzlar).

2.4.4 Kultur von HEK293T-Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank und unter Verwendung steriler Gefäße und Reagenzien vollzogen. HEK293T-Zellen (2.1.5) wurden bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre auf 100 mm oder 35 mm Zellkulturschalen (Sarstedt, Newton, USA) kultiviert. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen alle 2 bzw. 3 Tage im Verhältnis 1:4 bis 1:8, abhängig von der Konfluenz, passagiert. Zunächst wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1x Trypsin-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, USA) für 2 min bei RT aus dem Zellverband und von der Kulturschale gelöst. Die proteolytische Aktivität von Trypsin wurde durch Zugabe von HEK293T-Medium inaktiviert, bevor die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und anschließend auf vorgelegtes Medium enthaltende Kulturschalen in entsprechender Verdünnung verteilt wurden.

2.4.5 Präparation und Kultur primärer hippokampaler Neuronen

Zur Kultivierung von hippokampalen Neuronen wurden neugeborene Muskelin wildtypische (+/+) und homozygote (-/-) *Knockout* Mäuse (P0) durch Dekapitation getötet. Die Hippokampi wurden in eiskaltem 1x PBS, versetzt mit 10 mM Glukose, präpariert und zur Vereinzlung der Zellen wurden die Gewebe mit 10 µg/ml DNase I und 0,5 mg/ml Papain (alle SIGMA, Taufkirchen) in 10 mM Glukose in 1x PBS für 25 min bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen mit *Dulbecco's Modified Eagle* Medium DMEM/F12-*complete* (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden die Zellen zum Vereinzeln vorsichtig in 2 ml desselben Mediums mit abgerundeten Pasteurpipetten trituriert. 750.000 vereinzelte Zellen wurden dann in DMEM/F12-*complete* auf 35 mm Zellkulturschalen (Sarstedt, Newton, USA) ausgesät. Alternativ wurden die Zellen auf 12 mm Glasplättchen oder in eine Kammer einer 4-Well-Lab-Tek™ *chambered coverglass* System-Schale (Nunc, Langenselbold) in einer Dichte von 140.000 Zellen pro Glasplättchen oder Kammer ausgesät. Die Glasplättchen sowie die 35 mm Zellkulturschalen wurden zuvor mit 1,5 µg/ml Poly-L-Lysin in 1x PBS und mit 20 µg/ml Laminin in H₂O (beide SIGMA, Taufkirchen) jeweils über Nacht bei 4 °C

beschichtet. Nach jedem Beschichtungsschritt erfolgten zwei Waschschrte mit H₂O. Die Kammern der 4-Well-Lab-Tek *chambered coverglass* System-Schalen wurden über Nacht mit 0,01 % (v/v) Poly-L-Ornithin (SIGMA, Taufkirchen) beschichtet. Die Kulturen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Nach 4 bis 5 Stunden wurde das Medium durch Neurobasalmedium (Invitrogen, Carlsbad, USA) ersetzt. Nach 3 Tagen in Kultur (DIV3) wurde 3 µM 1-[β-D-Arabinofuranosyl]-Cytosin (SIGMA, Taufkirchen) zu den Kulturen gegeben, um die Proliferation von Astrozyten zu stoppen. Alle 7 Tage in Kultur wurde ein Drittel des Kulturmediums durch frisches Neurobasalmedium ersetzt.

2.4.6 Immunzytochemie

Auf 12 mm-Glasplättchen kultivierte hippokampale Neurone wurden mit 1x PBS gewaschen und für 12 min in 4 % (w/v) Paraformaldehyd und 4 % (w/v) *Sucrose* in 1x PBS fixiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit 1x PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellmembran 4 min mit 0,25 % (v/v) Triton-X-100 in 1x PBS inkubiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen zur Minimierung unspezifischer Bindungen 30 min in 1 % (w/v) bovinem Serumalbumin (BSA) inkubiert, gefolgt von der Inkubation in entsprechend verdünntem Primärantikörper in 1 % (w/v) BSA für 1 Stunde bei RT. Die Zellen wurden dreimal 5 min in 1x PBS gewaschen und 45 min mit fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper in 1 % (w/v) BSA im Dunkeln bei RT inkubiert, um ein Ausbleichen zu verhindern. Nach drei weiteren Waschschrten in PBS, jeweils 5 min, wurden die Glasplättchen mit AquaPoly-Mount (Polysciences, Warrington, USA) auf Objektträgern fixiert, getrocknet und bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert. Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte durch konfokale Lasermikroskopie mit dem inversen Mikroskop Leica DM IRBE unter Verwendung der Software LCS TCS-SP2 (beide Leica, Wetzlar).

2.4.7 Transfektion kultivierter Zellen

HEK293T-Zellen (2.1.5) wurden mit Hilfe von Kalziumphosphat nach der Standardmethode (Chen und Okayama, 1987) transfiziert. Zunächst wurden die Zellen vereinzelt und auf 100 mm oder 35 mm Zellkulturschalen (Sarstedt, Newton,

USA) ausgesät. Die Kulturen wurden dann bei ca. 40 - 50 % Konfluenz transfiziert. Für eine 100 mm Zellkulturschale wurden 12 µg Plasmid-DNA in 225 µl sterilem H₂O aufgenommen, mit 75 µl 1 M CaCl₂ versetzt und gemischt. Diese Lösung wurde nun langsam und unter Vortexen schrittweise in 300 µl 2x HBS pipettiert. Für 35 mm Zellkulturschalen wurde jeweils ein fünftel der oben angegebenen Mengen in gleichen Verhältnissen eingesetzt. Nach 15 min Inkubationszeit bei RT wurde der Transfektionsmix in das Medium über den Zellen unter leichtem Schwenken hinzugegeben. Die Zellen wurden 3 Stunden bei 37 °C und 3 % (v/v) CO₂ inkubiert, um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, bevor anschließend das Medium gegen frisches ersetzt und die Zellen weiter bei 5 % (v/v) CO₂ inkubiert wurden.

Neuronale Primärkulturen (2.4.5) auf 12 mm Glasplättchen oder in 4-Well-Lab-Tek *chambered coverglass* System-Schalen (Nunc, Langensfeld) wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll mit Hilfe von Kalziumphosphat zwischen neun und zwölf Tagen in Kultur (DIV 9-12) transfiziert. 2 µg Plasmid-DNA wurden in 18,75 µl sterilem H₂O aufgenommen und mit 6,25 µl 1 M CaCl₂ versetzt. Bei Doppeltransfektionen wurde in der Regel 1 µg Plasmid-DNA pro Konstrukt eingesetzt. Diese Lösung wurde nun langsam und unter Vortexen schrittweise in 25 µl 2x HBS pipettiert und dann für 15 min bei RT inkubiert. Vom präkonditionierten Medium der zu transfizierenden Zellen wurden 700 µl abgenommen und separat aufbewahrt. Zu dem auf den Zellen verbliebenen Medium wurde der Transfektionsmix hinzugegeben. Nach Inkubation der Zellen bei 5 % (v/v) CO₂ für 1 Stunde bei 37 °C wurde das komplette Medium abgenommen, die Zellen kurz mit vorgewärmtem Neurobasalmedium gewaschen und das zuvor separierte Medium sowie zusätzlich 300 µl frisches Neurobasalmedium zurück auf die Zellen gegeben. Die Expressionsdauer betrug je nach Konstrukt 12 bis 72 Stunden.

2.4.8 Time-lapse Videomikroskopie

Für die *Time-lapse* Videomikroskopie wurden hippocampale Neuronen von P0 Mäusen präpariert und in 4-Well-Lab-Tek *chambered coverglass* System-Schalen (Nunc, Langensfeld) kultiviert (2.4.5). Die Zellen wurden zwischen neun und zwölf Tagen in Kultur (DIV 9-12) transfiziert (2.4.7), wobei die Expressionsdauer 36 bis 72 Stunden betrug. Für *Time-lapse* Experimente wurde das Medium der kultivierten

Neuronen durch vorgewärmten HEPES-Puffer ersetzt. Die *Time-lapse* Aufnahmen erfolgten an einem inversen Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M (Zeiss, Göttingen), ausgestattet mit einer Sony *charge-coupled device* Kamera SPOT TR-SE (Visitron Systems, Puchheim) mit einem ultraschnellen Filterrad für sequentielle Bildakquisition. Während der gesamten Analyse wurde die Temperatur von Kulturschale und Mikroskop durch eine Inkubationskammer (Harnischmacher-Labortechnik, Kassel) auf 37 °C gehalten. Die Aufnahmen wurden in Intervallen von 10-30 s aufgenommen. Die Auswertung und Visualisierung erfolgte mit dem Programm MetaVue 6.2r6 sowie MetaMorph 7.1 (Universal Imaging Corp., Downington, USA).

2.4.9 Rezeptor-Internalisierung-Studie

Hippokampale Neurone von neugeborenen (P0) wildtypischen (+/+) sowie homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen wurden mit einer Dichte von 140.000 Zellen pro Glasplättchen kultiviert (2.4.5). Nach 14 bis 18 Tagen in Kultur (DIV 14-18) wurden die Zellen mit dem Primärantikörper α -GABA_AR α 1 (1:50, Chemicon, Temecula, USA) in HEPES-Puffer für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Da bei 4 °C keine Endozytose mehr stattfindet, verbleiben die markierten Rezeptoren an der Zelloberfläche. Die Zellen wurden zweimal in eiskalten 1x PBS gewaschen, bevor sie dann für 2 Stunden bei 37 °C in HEPES-Puffer inkubiert wurden. Dieser Inkubationsschritt sollte die Internalisierung von GABA_AR α 1 ermöglichen (Goodkin *et al.*, 2005), die Dauer ist aber zu kurz, um die Degradation von GABA_AR α 1 zu ermöglichen (Kittler *et al.*, 2004). Anschließend wurden die Zellen kurz in 1x PBS gewaschen und mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS für 10 min bei 4 °C fixiert. Um mit Primärantikörper markierte GABA_AR α 1 an der Zelloberfläche zu detektieren, wurden die Zellen unter nicht permeabilisierenden Bedingungen mit sättigenden Konzentrationen des ersten Sekundärantikörpers in 1 % (w/v) Bovinem Serumalbumin (BSA) für 2 Stunden bei 4 °C im Dunkeln inkubiert (1:50, α -Kaninchen-AlexaFluor488, Invitrogen, Carlsbad, USA). Nach drei Waschschritten in 1x PBS wurden die Zellen zur Permeabilisierung der Zellmembran 4 min mit 0,25 % (v/v) Triton-X-100 in 1x PBS inkubiert, bevor sie zur Minimierung unspezifischer Bindungen 30 min in 1 % (w/v) BSA inkubiert wurden. Zur Detektion intrazellulärer

GABA_AR α 1 wurden die Zellen für 2 Stunden mit dem zweiten Sekundärantikörper (1:250, α -Kaninchen-CY3, Dianova, Hamburg) in 1 % (w/v) BSA im Dunkeln inkubiert. Das Protokoll erlaubt es daher, GABA_AR α 1 an der Zelloberfläche unabhängig von intrazellulärem GABA_AR α 1 zu unterscheiden (Goodkin *et al.*, 2005). Nach drei weiteren Waschschritten in PBS für jeweils 5 min wurden die Glasplättchen mit AquaPolyMount (Polysciences, Warrington, USA) auf Objektträgern fixiert, getrocknet und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte durch konfokale Lasermikroskopie mit dem inversen Mikroskop Leica DM IRBE unter Verwendung der Software LCS TCS-SP2 (beide Leica, Wetzlar).

2.5 Quantitative Analyse und Statistik

Um Signalintensitäten von Immundetektionen (2.3.3) nach Western Blot (2.3.2) zu bestimmen, wurden die Filme mit einer Auflösung von 300 dpi eingescannt und mit Hilfe der ImageJ Software, Version 1.38 (National Institutes of Health, West Chester, USA), analysiert. Alle relativen Signalintensitäten wurden anhand der Signalintensitäten der entsprechenden Kontrolldetektionen normalisiert. Die Verarbeitung der Rohdaten sowie die statistische Analyse durch Mittelwerte, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwertes und *p*-Werte nach *student's t-test* erfolgte mit dem Programm Excel (Microsoft, München). Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger gepaarter t-Test mit folgenden Irrtumswahrscheinlichkeiten gewählt: signifikant $p < 0,05$ (*), hoch signifikant $p < 0,01$ (**), extrem signifikant $p < 0,001$ (***). Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM) von der Anzahl *n* unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren dementsprechend den SEM. Zur Analyse der Rezeptor-Internalisierungs-Studie wurden morphologisch intakte Neurone, unabhängig von Fluoreszenzintensitäten, zufällig ausgewählt. Die Aufnahmen erfolgten durch konfokale Lasermikroskopie mit dem inversen Mikroskop Leica DM IRBE unter Verwendung der Software LCS TCS-SP2 (beide Leica, Wetzlar) in einem sequentiellen Mehrkanal-Aufnahme-Modus. Für konfokale Aufnahmen verschiedener Zellen wurden die gleichen Bildverstärker-Einstellungen für alle Experimente benutzt.

Die Bilder wurden im TIF-Format gespeichert und dann mit Hilfe der Software MetaMorph 7.1 (Universal Imaging, Downingtown, USA) analysiert. Um zwischen Soma und Neuriten zu unterscheiden wurden zunächst Regionen von Interesse (ROI) mit Hilfe des "regions of interest"-Werkzeuges ausgewählt. Die Mehrkanal-TIF-Formate wurden dann mit Hilfe der "color separate" Funktion in roten und grünen Kanal separiert und die ROI wurde durch das "transfer region" Werkzeug auf die Einzelkanäle übertragen. Die Definition des Bildabgleichs erfolgte über die "threshold image" Funktion. Die Messungen der Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe der "Integrated Morphometry Analysis" Funktion durchgeführt, um die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (totaler Grauwert / Fläche) pro ROI für jeden Kanal zu ermitteln. Gleichzeitig wurde die Fluoreszenzintensität der Kolo-kalisation des grünen und roten Kanals innerhalb der ROI bestimmt. Die intrazelluläre Akkumulationsrate von wildtypischen (+/+) und homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Neuronen wurde als das Verhältnis der intrazellulären Immunreaktivität zu der totalen Immunreaktivität definiert: (Durchschnittliche Fluoreszenzintensität roter Kanal abzüglich durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Kolo-kalisation von rotem und grünem Kanal) / (durchschnittliche Fluoreszenzintensität roter Kanal zuzüglich durchschnittliche Fluoreszenzintensität grüner Kanal abzüglich durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Kolo-kalisation von rotem und grünem Kanal). Die quantitative Analyse von Fluoreszenzintensitäten der Querschnitte von Soma und Neuriten wurde mit Hilfe der "Linescan" Funktion der Software MetaMorph 7.1 (Universal Imaging, Downingtown, USA) durchgeführt. Die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten wurden aus dem totalen Grauwert / Fläche (*scan-width 5*, y-Achse) für jeden Pixel entlang der identisch lang gewählten ROI (x-Achse) bestimmt. Die Verarbeitung der Rohdaten sowie die statistische Analyse durch Mittelwerte, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwertes und *p*-Werte nach *student's t-test* erfolgte mit dem Programm Excel (Microsoft, München). Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test mit folgenden Irrtumswahrscheinlichkeiten gewählt: signifikant $p < 0,05$ (*), hoch signifikant $p < 0,01$ (**), extrem signifikant $p < 0,001$ (***). Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Anzahl *n* unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren dementsprechend den SEM.

3 ERGEBNISSE

Muskelin wurde als ein direkter Interaktionspartner der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors identifiziert (siehe Kapitel 1.4.2). Über die Funktion von Muskelin ist wenig bekannt und im Nervensystem von Säugetieren wurde sie bislang nicht untersucht. Auf molekularer Ebene verfügt das hoch konservierte Protein Muskelin über unterschiedliche Interaktionsdomänen, die auf eine physiologische Funktion von Muskelin hindeuten könnten (siehe Kapitel 1.4). Ziel der Arbeit war es deshalb, die biologische Funktion von Muskelin im Nervensystem von Säugetieren im Hinblick auf den direkten Interaktionspartner, die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors, zu untersuchen.

3.1 Knockout des *Mkln1* Gens in *Mus musculus*

Um die biologische Funktion von Muskelin im Nervensystem von Säugetieren zu untersuchen, wurde eine heterozygote Muskelin *Knockout* Mauslinie etabliert. Hierfür wurde ein embryonaler Stammzell-Klon mit der Insertion eines retroviralen *Gene Trapping* Vektors an Position 6970 bp in Intron 1 des primären RNA Transkripts des *Mkln1* Genlocus verwendet, da Exon 1 des *Mkln1* Gens lediglich für 32 Aminosäuren des Proteins Muskelin kodiert (Abb. 3.1, siehe Kapitel 2.2.13).

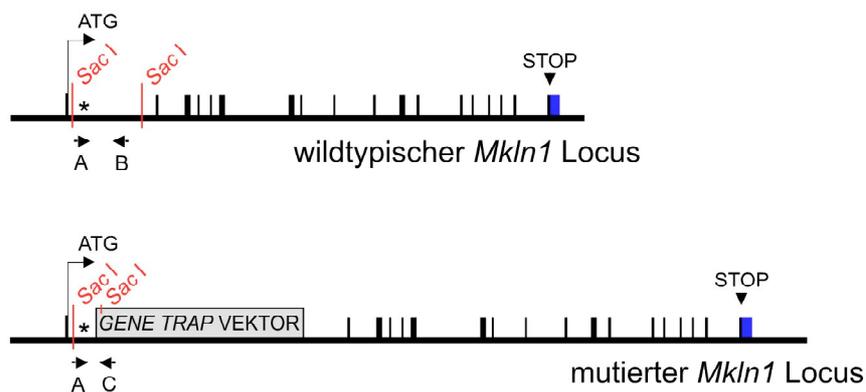


Abb. 3.1: Strategie zur Generierung von Muskelin *Knockout* Mäusen. Die schwarzen Balken repräsentieren Exons des *Mkln1* Genlocus (*mouse accession*: NM_013791; chr6.31348828-31459482; NCBI). Der mutierte Locus beinhaltet einen in Intron 1 inserierten retroviralen *Gene Trapping* Vektor. Primer, welche für die PCR-Genotypisierung verwendet wurden, sind mit A-C bezeichnet. *Sac*I Restriktionsschnittstellen (rot) sowie eine für Intron 1 spezifische Sonde (*) wurden für die Southern Blot Analyse verwendet. Blauer Kasten: nicht-translatierte Region.

Der hier eingesetzte *Gene Trapping* Vektor enthält Stop-Codons in allen drei Leserastern, um einen vorzeitigen Abbruch der Translation der *Mkln1* mRNA herbeizuführen. Vorausgegangene Studien über *Gene Trapping* Vektoren haben gezeigt, dass sie abhängig von ihrer Insertionsposition bestimmte endogene Informationen unterbrechen und somit sogenannte Null-Allele erzeugen können (Zambrowicz *et al.*, 1998). Nach erfolgreicher Blastozysteninjektion wurden die heterozygoten Mäuse gekreuzt, um wildtypische (+/+), heterozygote (+/-) und homozygote (-/-) Tiere zu erhalten. Die Auswertung der genetischen Manipulation erfolgte zunächst auf DNA-Ebene mit PCR-Genotypisierung unter Verwendung von *Mkln1* und *Gene Trapping* Vektor-spezifischen Primern, welche das Vorhandensein von einem mutierten Allel in heterozygoten (+/-) Mäusen und zwei mutierten Allelen in homozygoten (-/-) Mäusen aufzeigte. Als Kontrolle wurden die Wildtyp-Allele der entsprechenden wildtypischen (+/+) Wurfgeschwister detektiert (Abb. 3.2).

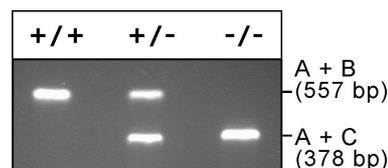


Abb. 3.2: PCR-Genotypisierung von Muskelin *Knockout* Mäusen. Die Primer A und B, spezifisch für DNA Sequenzen des *Mkln1* Gens stromaufwärts und stromabwärts der Insertionsposition des *Gene Trapping* Vektors, detektieren ein 557 bp Fragment im Falle des Wildtyp-Allels. Die 378 bp Bande repräsentiert das mutierte Allel, welches mit Hilfe der Primer A und C, letzterer spezifisch für DNA Sequenzen des *Gene Trapping* Vektors, amplifiziert wird. bp: Basenpaare.

Um die Insertion des *Gene Trapping* Vektors in Intron 1 des *Mkln1* Genlocus zu bestätigen, wurde eine unabhängige Southern Blot Analyse nach *SacI*-Restriktions-Verdau der genomischen DNA von wildtypischen (+/+), heterozygoten (+/-) sowie homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen durchgeführt. In Übereinstimmung mit der PCR-Genotypisierung konnten jeweils zwei mutierte Allele in homozygoten (-/-) und ein mutiertes Allel in heterozygoten (+/-) Mäusen detektiert werden. Die Wildtyp-Allele der entsprechenden wildtypischen (+/+) Wurfgeschwister wurden als Kontrolle detektiert (Abb. 3.3).

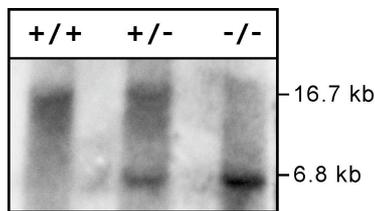


Abb. 3.3: Southern Blot Analyse von Muskelin *Knockout* Mäusen. Eine für Intron 1 des *Mkln1* Gens, stromaufwärts der Insertionsposition des *Gene Trapping* Vektors gelegene, spezifische Sonde wurde mit *SacI* verdauter, genomischer DNA hybridisiert. Der inserierte *Gene Trapping* Vektor enthält eine zusätzliche *SacI* Restriktionsschnittstelle (vergleiche mit Abb. 3.1), die zur Detektion eines 6.8 kb Fragments im Fall des mutierten Allels führt. Die 16.7 kb Bande repräsentiert das wildtypische Allel. kb: Kilobasenpaare.

3.2 Depletion von Muskelin im Gehirn von *Mus musculus*

Die Insertion des *Gene Trapping* Vektors in das *Mkln1* Gen sollte zu einem vorzeitigen Translationsabbruch der *Mkln1* mRNA und damit zur Depletion von Muskelin auf Proteinebene führen. Um dieses genauer zu untersuchen, wurden Gehirn-Lysate von adulten wildtypischen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Mäusen hergestellt und durch Zentrifugation bei 1.000 x g geklärt (S1). Die enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe eines gegen den C-Terminus von Muskelin gerichteten, spezifischen Antikörpers (P. Zelenka, Bethesda, USA) konnte Muskelin in wildtypischen (+/+) Mäusen, aber nicht in Mäusen homozygot (-/-) für die Insertion des *Gene Trapping* Vektors, nachgewiesen werden. Bei heterozygoten (+/-) Mäusen wurden, im Vergleich mit wildtypischen (+/+) Wurfgeschwistern, geringere Mengen von Muskelin detektiert (Abb. 3.4).

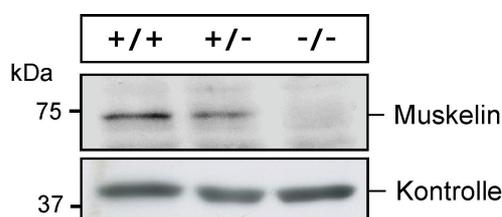


Abb. 3.4: Depletion von Muskelin in Gehirn-Lysaten von Muskelin *Knockout* Mäusen. Immundetektion von Muskelin und Aktin mit Hilfe spezifischer Antikörper. Im Vergleich mit wildtypischen (+/+) Mäusen kann Muskelin in geringeren Konzentrationen in heterozygoten (+/-), nicht aber in homozygoten (-/-) Mäusen detektiert werden. Kontrolle: Aktin-Detektion als Ladekontrolle, kDa: Molekulargewicht des Standards in Kilodalton.

Um die Depletion Muskelins auf Proteinebene in einem unabhängigen Experiment zu bestätigen, wurden Gefrierschnitte von Gehirnen adulter wildtypischer (+/+) Mäuse sowie deren homozygoter (-/-) Wurfgeschwister angefertigt. Eine immunhistochemische Analyse der Schnitte wurde mit Hilfe des zuvor beschriebenen, gegen Muskelin spezifischen, Antikörpers durchgeführt (vergleiche mit Abb. 3.4). In Übereinstimmung mit der Muskelin-Depletion in Gehirn-Lysaten von Muskelin *Knockout* Mäusen, konnten hierbei Muskelin-spezifische Signale in wildtypischen (+/+), nicht aber in Geweben homozygoter (-/-) Mäuse nachgewiesen werden (Abb. 3.5).

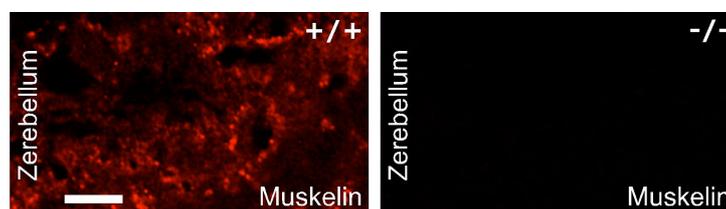


Abb. 3.5: Depletion von Muskelin in Gehirnschnitten von Muskelin *Knockout* Mäusen. Immunhistochemische Analyse adulter Zerebella mit einem Antikörper spezifisch für Muskelin. Fluoreszenzsignale (rot) werden in wildtypischen (+/+), nicht aber in Geweben homozygoter (-/-) Mäuse nachgewiesen. Größenbalken: 50 μ m.

Des Weiteren wurden Muskelin-Immünpräzipitationen mit aus wildtypischen (+/+) und homozygoten (-/-) Mäusen gewonnenen Gehirn-Lysaten, welche zuvor durch Zentrifugation bei 1.000 x g geklärt wurden (S1), durchgeführt. Hierfür wurde ein zweiter, unabhängiger Antikörper, welcher spezifisch gegen den N-Terminus von Muskelin gerichtet ist (M. Kneussel, Hamburg), eingesetzt. Als Kontrolle wurde eine Präzipitation mit unspezifischen Immunglobulinen durchgeführt. Die Präzipitate wurden in Gegenwart von Triton-X-100 gewaschen um Membranen zu solubilisieren, damit Interaktionen im Präzipitat nur auf Protein-Protein Wechselwirkungen beruhen. Nach Auftrennung der Präzipitate mittels SDS-PAGE und deren Immobilisierung auf einer PVDF-Membran konnte Muskelin mit Hilfe des für die Präzipitation benutzten, spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden, wenn Gehirn-Lysate wildtypischer (+/+) Mäuse verwendet wurden (Abb. 3.6). Aus den Lysaten von homozygoten (-/-) Mäusen hingegen konnte Muskelin unter identischen Bedingungen nicht präzipitiert werden. In den Kontrollen mit unspezifischen Immunglobulinen konnte Muskelin unabhängig von den eingesetzten Gehirn-Lysaten nicht nachgewiesen werden.

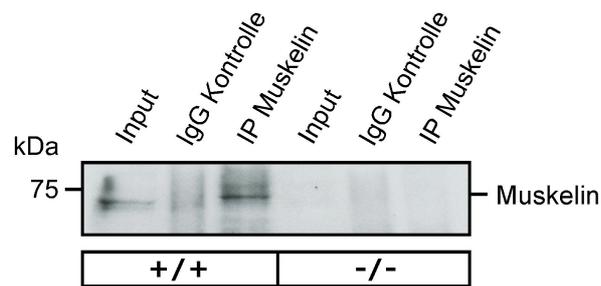


Abb. 3.6: Immunpräzipitation von Muskelin aus Gehirn-Lysaten. Immunpräzipitation mit spezifischem Antikörper gegen Muskelin und unspezifischen Immunglobulinen. Immundetektion mit spezifischem Antikörper für Muskelin. Muskelin wird aus Lysaten von wildtypischen (+/+), nicht aber aus Lysaten von homozygoten (-/-) Mäusen präzipitiert. Input: S1-Gehirn-Lysat von wildtypischen (+/+) oder homozygoten (-/-) Mäusen, kDa: Molekulargewicht des Standards in Kilodalton, IgG: unspezifische Immunglobuline, IP: Immunpräzipitat.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Insertion des *Gene Trapping* Vektors in das Intron 1 des *Mkln1* Genlocus zu einer Depletion von Muskelin auf Proteinebene führt. In Gehirnen von Mäusen, die homozygot (-/-) für den mutierten *Mkln1* Genlocus sind, lässt sich Muskelin nicht nachweisen. Somit stellen diese Tiere funktionelle Muskelin Null-Mutanten dar.

3.3 Entwicklung des Säugergehirns nach Depletion von Muskelin

Muskelin-Transkripte werden während der embryonalen und adulten Entwicklungsstadien unter anderen in Gehirnen von Säugetieren exprimiert (Tagnaouti *et al.*, 2007). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Muskelin während der Entwicklung insbesondere in dem Zerebellum und Hippokampus vermehrt exprimiert wird. Um den Einfluss der Depletion von Muskelin auf die Entwicklung und Histologie von Säugergehirnen zu untersuchen, wurden Gefrierschnitte von den Gehirnen adulter wildtypischer (+/+) Mäuse und deren homozygoter (-/-) Wurfgeschwister angefertigt. Diese wurden mit Kresylviolett in einer Nissl-Färbung angefärbt. In Gehirnen von homozygoten (-/-) Mäusen konnten im Vergleich mit wildtypischen (+/+) Wurfgeschwistern keine morphologischen Auffälligkeiten beobachtet werden. Gehirne homozygoter (-/-) Mäuse wiesen, verglichen mit den Gehirnen von wildtypischen (+/+) Mäusen, hierbei keine Unterschiede in der Morphologie des Zerebellums und

des Hippokampus auf (Abb. 3.7). Dies lässt auf eine normale Entwicklung des Gehirns von adulten, homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen schließen.

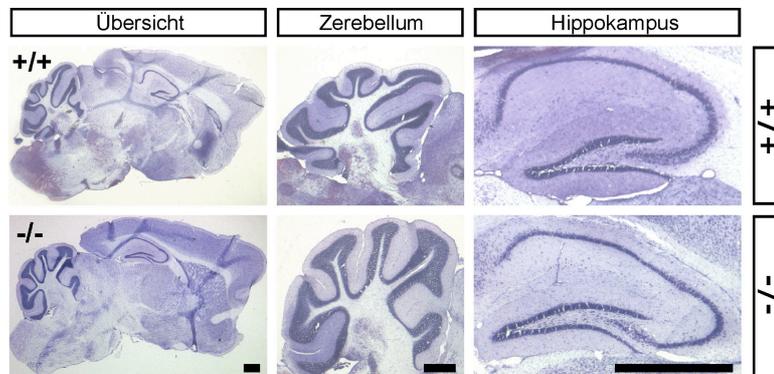


Abb. 3.7: Morphologie des Gehirns von Muskelin *Knockout* Mäusen. Sagittale Gehirnschnitte von zehn Wochen alten wildtypischen (+/+) und homozygoten (-/-) Mäusen wurden mit Kresylviolett angefärbt (Übersicht). Das Zerebellum (mittlere Spalte) sowie der Hippokampus (rechte Spalte) von homozygoten (-/-) Mäusen (unten), gezeigt in höherer Vergrößerung, weisen im Vergleich zu wildtypischen (+/+) Mäusen (oben) keine histologischen Auffälligkeiten auf. Größenbalken: 1 mm.

3.4 Aufhellung der Fellfarbe nach Depletion von Muskelin in *Mus musculus*

Homozygote (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse wiesen, verglichen mit wildtypischen (+/+) Wurfgeschwistern, keine augenscheinlichen Unterschiede auf. Nissl-Färbungen von Gehirnen adulter homozygoter (-/-) und wildtypischer (+/+) Mäuse zeigten auch keinen offensichtlichen Unterschied in der Morphologie, was darauf schließen lässt, dass die Gehirne von Muskelin *Knockout* Mäusen normal entwickelt sind (siehe Kapitel 3.3). Jedoch konnte während der Entwicklung von homozygoten (-/-), nicht aber heterozygoten (+/-) Muskelin *Knockout* Mäusen, eine Aufhellung der Fellfarbe (*dilution*) beobachtet werden. Zunächst entwickeln sowohl homozygote (-/-) als auch heterozygote (+/-) Muskelin *Knockout* Mäuse nach Geburt eine schwarze Fellfarbe, entsprechend wildtypischer (+/+) Wurfgeschwister (Abb. 3.8 A). Jedoch konnte eine Aufhellung der Fellfarbe bei homozygoten (-/-) Mäusen ungefähr zwei Wochen nach ihrer Geburt beobachtet werden und diese war nach sechs weiteren Wochen abgeschlossen (Abb. 3.8 A, B). Homozygote (-/-) Tiere wiesen zu diesem Zeitpunkt, verglichen mit wildtypischen (+/+) Tieren, eine deutlich hellere Fellfarbe auf.

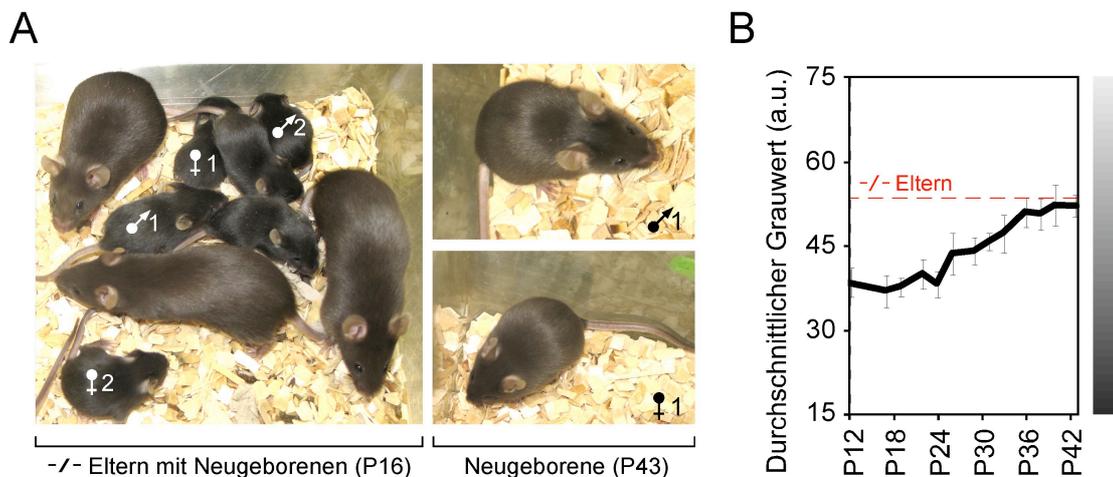


Abb. 3.8: Aufhellung der Fellfarbe von Muskelin *Knockout* Mäusen. (A) Homozygote Eltern (-/-) mit ihren 16 Tage (P16) alten Nachkommen (links). Die homozygoten Nachkommen (-/-) entwickeln zunächst eine schwarze Fellfarbe. Im postnatalen Alter von 43 Tagen (P43) weisen dieselben Tiere eine Aufhellung der Fellfarbe auf (rechts), welche der ihrer homozygoten Eltern (-/-) entspricht (links). (B) Durchschnittlicher Grauwert der Fellfarbe homozygoter (-/-) Nachkommen in Abhängigkeit vom Alter (n = 4). Im Alter von ungefähr 43 Tagen (P43) ist der Grauwert adulter homozygoter (-/-) Eltern erreicht. Rechter Balken: Kodierung für helle und dunkle Fellfarbe, a.u.: willkürliche Einheiten, P12-P42: postnatales Alter in Tagen, rote Linie: durchschnittlicher Grauwert homozygoter (-/-) Eltern (adult).

3.5 Transport von Muskelin in hippokampalen Neuronen

Bei homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen wurde eine Aufhellung der Fellfarbe beobachtet (siehe Kapitel 3.4). Eine ähnliche Aufhellung der Fellfarbe wird unter anderem bei Mäusen beobachtet, die homozygot für ein Null Allel im *dilute* Genlocus sind, welcher für die schwere Kette von Myosin Va kodiert (Mercer *et al.*, 1991). Myosin Va ist ein Motorprotein, welches sich über relativ kurze Strecken entlang von Aktinfilamenten bewegt, und es konnte gezeigt werden, dass die Aufhellung der Fellfarbe in *dilute*-Mäusen auf einen gestörten Transport von Melanosomen in den Melanozyten zurückzuführen ist. Myosin Va transportiert Melanosomen indirekt über eine Interaktion mit dem Adapterprotein Melanophilin und der Rab GTPase Rab27a (Wu *et al.*, 2002). Mutationen der für Rab27a sowie für Melanophilin kodierenden Gene führen in sogenannten *ashen*- beziehungsweise *leaden*-Mäusen ebenfalls zur Aufhellung der Fellfarbe. Melanosomen werden aber auch bidirektional, in anterograder und retrograder Richtung, über längere Strecken

entlang der Mikrotubuli mit Hilfe der Motorprotein-Komplexe Kinesin-2 und zytoplasmatischem Dynein transportiert (Soldati und Schliwa, 2006). Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse mit *dilute*-, *leaden*- sowie *ashen*-Mäusen, die allesamt eine Störung von Motorprotein-vermitteltem Transport aufweisen, wurde untersucht, ob intrazellulärer Transport von Muskelin in Neuronen des ZNS nachgewiesen werden kann. Hierfür wurde in kultivierten hippocampalen Neuronen das rot fluoreszierende Fusionsprotein mRFP-Muskelin exprimiert. Durch immunzytochemische Färbungen von endogenem Muskelin in mRFP-Muskelin exprimierenden Neuronen wurde zunächst sichergestellt, dass sich das Fusionsprotein entsprechend dem endogenen Protein normal in der Zelle verteilt (nicht gezeigt). Nach einer Expressionsdauer von 36 bis 72 Stunden wurden mittels *Time-lapse* Videomikroskopie Aufnahmen in Intervallen von 15-30 s durchgeführt. Hierbei konnte die Bewegung mehrerer mRFP-Muskelin Signale entlang der Neuriten lebender, hippocampaler Neurone beobachtet werden (Abb. 3.9, Pfeilspitzen). Die Bewegung von mRFP-Muskelin erfolgte retrograd in Richtung des Zellsomas (Abb. 3.9), konnte aber auch in anterograder Richtung nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die mit Pfeilspitzen markierten mRFP-Muskelin Signale 1 und 2 bewegten sich mit einer Geschwindigkeit von $1,08$ beziehungsweise $1,22 \mu\text{m s}^{-1}$, was der Geschwindigkeit von aktiven Motorprotein-

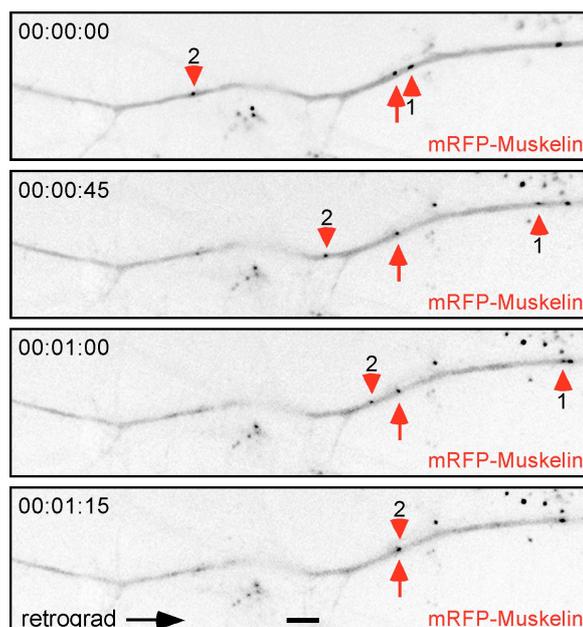


Abb. 3.9: Transport von Muskelin in hippocampalen Neuronen.

In primären hippocampalen Neuronen wurde nach 10 Tagen in Kultur mRFP-Muskelin exprimiert. Nach Expressionsdauer von 48 Stunden wurden *Time-lapse* Aufnahmen in einem Intervall von 15 s vorgenommen. Die roten Pfeilspitzen (1 und 2) markieren mRFP-Muskelin Signale, welche sich in den einzelnen Bildfolgen entlang eines hippocampalen Neuriten retrograd bewegen. Der rote Pfeil markiert ein unbewegliches mRFP-Muskelin Signal. Der Größenbalken entspricht $14 \mu\text{m}$, Zeitskala: hh:mm:ss.

vermittelten Transportvorgängen entspricht (King und Schroer, 2000, Lardong *et al.*, 2009). Daher konnten passive Diffusionsvorgänge als Ursache für die Bewegungen von mRFP-Muskelin Signalen ausgeschlossen werden.

Aufgrund der beobachteten Bewegungen von mRFP-Muskelin sollte im Folgenden untersucht werden, ob Muskelin an intrazellulären Strukturen, die auf Motorprotein-vermittelten Transport hindeuten, nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde die Lokalisation von Muskelin auf ultrastruktureller Ebene in hippokampalen Neuronen adulter Mäuse mittels Elektronenmikroskopie unter Verwendung eines für Muskelin spezifischen Antikörpers untersucht. Viele synaptische Proteine, wie beispielsweise Neurotransmitterrezeptoren, werden durch Transportvesikel entlang von Zytoskelettelementen mit Hilfe von Motorproteinen transportiert (Kennedy und Ehlers, 2006). In Übereinstimmung mit einer Rolle Muskelins in intrazellulären Transportvorgängen konnten Muskelin Signale unter anderem an den Membranen kleiner, intrazellulärer Vesikel nachgewiesen werden (Abb. 3.10, Pfeil). Die überwiegende Mehrzahl intrazellulärer Vesikel wies kein Muskelin Signal auf (Abb. 3.10, durchkreuzte Pfeile), was auf eine spezifische Assoziation Muskelins mit bestimmten Vesikeln schließen lässt.

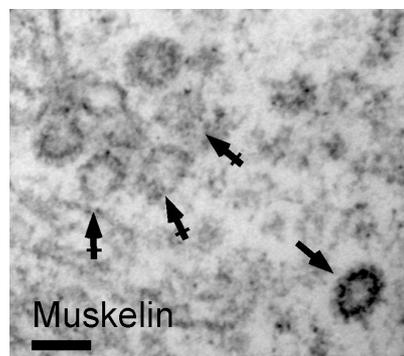


Abb. 3.10: Kolokalisation von Muskelin mit intrazellulären Vesikeln. Elektronenmikroskopie von Hippokampi adulter Mäuse unter Verwendung eines für Muskelin spezifischen Antikörpers. An der Membran eines Vesikels (Pfeil) können Muskelin-spezifische Signale nachgewiesen werden. Andere Vesikel weisen keine Muskelin Signale auf (durchkreuzte Pfeile). Der Größenbalken entspricht 0,15 μm .

3.6 Kotransport von GABA_A-Rezeptor und Muskelin

Vorausgegangene Studien haben Muskelin als direkten Interaktionspartner der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1) identifiziert (siehe Kapitel 1.4.2).

Da Muskelin eine Rolle bei intrazellulären Transportvorgängen spielen könnte (siehe Kapitel 3.5), sollte untersucht werden, ob die beiden Interaktionspartner gemeinsam transportiert werden. Zur Visualisierung von intrazellulärem Kotransport wurde eine mit EGFP fusionierte α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1-EGFP) sowie ein mit mRFP fusioniertes Muskelin (mRFP-Muskelin, siehe Kapitel 3.5) in kultivierten hippokampalen Neuronen koexprimiert. Mit Hilfe immunzytochemischer Färbungen von endogenen GABA_AR α 1 in Neuronen welche GABA_AR α 1-EGFP exprimierten, wurde sichergestellt, dass sich das Fusionsprotein entsprechend dem endogenen Protein normal in der Zelle verteilt (nicht gezeigt). Nach einer Expressionsdauer von 36 bis 72 Stunden wurden die Bewegungen von beiden fluoreszierenden Fusionsproteinen mittels *Time-lapse* Videomikroskopie analysiert. Dabei konnten gemeinsame retrograde Bewegungen von GABA_AR α 1-EGFP Signalen (grün) zusammen mit mRFP-Muskelin Signalen (rot) entlang der Neuriten lebender, kultivierter hippokampaler Neurone nachgewiesen werden (Abb. 3.11, Pfeilspitzen). Die Geschwindigkeit des in Abb. 3.11 dargestellten Kotransportes betrug $1,12 \mu\text{m s}^{-1}$. Dieses lässt auf einen aktiven Transport (vergleiche mit Kapitel 3.5) beider Interaktionspartner innerhalb desselben Transportkomplexes schließen.

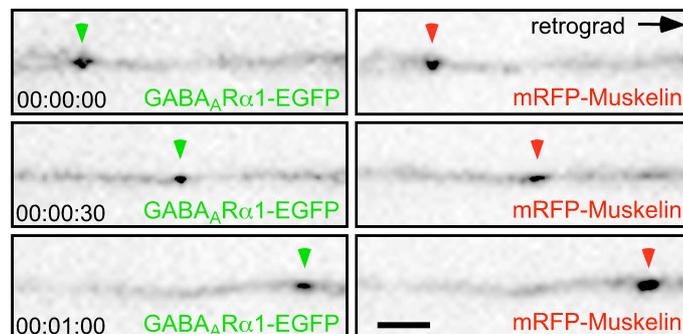


Abb. 3.11: Kotransport von Muskelin und GABA_AR α 1. In hippokampalen Neuronen wurden nach 11 Tagen in Kultur mRFP-Muskelin und GABA_AR α 1-EGFP exprimiert. Die *Time-lapse* Aufnahmen wurden nach einer Expressionsdauer von 52 Stunden in einem Intervall von 30 s vorgenommen. Identische Abschnitte desselben Neuriten werden gezeigt. Die grünen Pfeilspitzen (links) markieren ein GABA_AR α 1-EGFP Signal, das sich gemeinsam mit einem mRFP-Muskelin Signal (rechts, rote Pfeilspitzen) in einzelnen Bildfolgen bewegt. Die Bewegung erfolgte retrograd entlang des Neuriten in Richtung des Zellkörpers (nicht gezeigt). Der Größenbalken entspricht $14 \mu\text{m}$, Zeitskala: hh:mm:ss.

3.7 Koimmunpräzipitation von GABA_A-Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette

Muskelin konnte als direkter Interaktionspartner der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors *in vitro* identifiziert werden (siehe Kapitel 1.4.2). Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit der Kotransport von Muskelin zusammen mit GABA_AR α 1 in lebenden, hippocampalen Neuronen beschrieben (siehe Kapitel 3.6). Aufgrund des Vorhandenseins eines LisH- und CTLH-Motivs innerhalb von Muskelin (siehe Kapitel 1.4), welche einer Vermittlung von Interaktionen mit zytoplasmatischem Dynein und/oder Mikrotubuli zugeschrieben werden (Emes und Ponting, 2001), wurde nun untersucht, inwieweit der Dyneinmotorkomplex für den retrograden Kotransport von Muskelin mit GABA_AR α 1 verantwortlich sein könnte. Hierzu wurde die Dynein Intermediäre Kette, die Bestandteil des Dyneinmotorkomplexes ist, durch spezifische Antikörper aus einem mit intrazellulären Vesikeln angereicherten Gehirnextrakt (P3) aus adulten Mäusen immunpräzipitiert. Parallel wurde die Immunpräzipitation mit unspezifischen Immunglobulinen durchgeführt. Beide Präzipitate wurden mehrmals mit Triton-X-100 haltigem Puffer gewaschen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit spezifischen Antikörpern für Muskelin, Dynein Intermediäre Kette und der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors detektiert (Abb. 3.12). Bei Präzipitation der Dynein Intermediären Kette wurden sowohl ein Signal für Muskelin als auch für die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors detektiert. In der Kontrolle mit unspezifischen Antikörpern hingegen konnten keine entsprechenden Signale nachgewiesen werden. Dies lässt

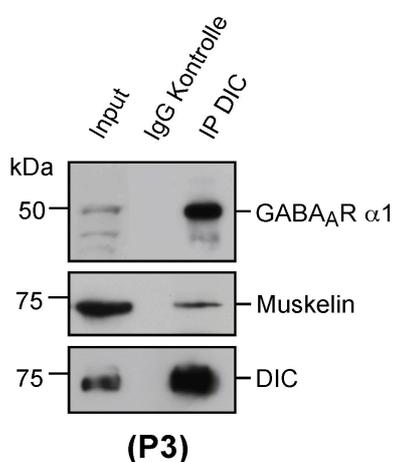


Abb. 3.12: Koimmunpräzipitation von GABA_A-Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette. Immunpräzipitation mit spezifischem Antikörper gegen Dynein Intermediäre Kette und unspezifischen Immunglobulinen aus mit Vesikeln angereichertem Gehirnextrakt (P3) aus adulten Mäusen. Immundetektion mit spezifischen Antikörpern für die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors, Muskelin und Dynein Intermediäre Kette. Input: P3-Gehirnextrakt, kDa: Molekulargewicht des Standards in Kilodalton, IP: Immunpräzipitat, DIC: Dynein Intermediäre Kette, IgG: unspezifische Immunglobuline.

darauf schließen, dass die drei Proteine innerhalb desselben Proteinkomplexes in mit intrazellulären Vesikeln angereicherten Fraktionen interagieren.

3.8 Kofraktionierung von GABA_A-Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette

Zur Bestätigung der Interaktion von Dynein Intermediärer Kette mit Muskelin und der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (siehe Kapitel 3.7) wurden mit intrazellulären Vesikeln angereicherte Gehirnextrakte (P3) adulter Mäuse über einen *Sucrose*-gradienten mittels Zentrifugation bei 160.000 x *g* ihrer Dichte nach aufgetrennt. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors, Muskelin und Dynein Intermediäre Kette mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die

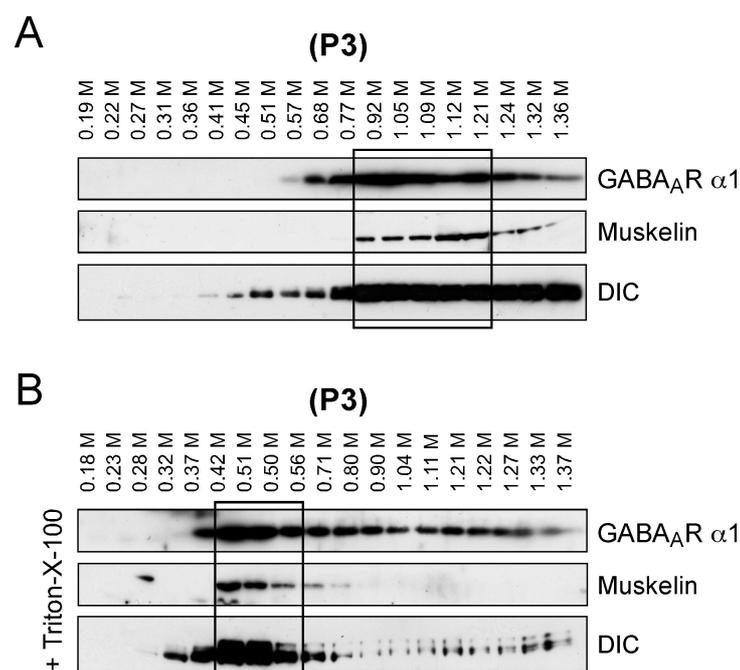


Abb. 3.13: Kofraktionierung von GABA_A-Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette. Mit Vesikeln angereicherter Gehirnextrakt (P3) wurde durch Dichtezentrifugation mittels *Sucrose*-gradienten aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern für die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors, Muskelin und Dynein Intermediäre Kette detektiert. (A) Kofraktionierung in Abwesenheit von Detergenz. (B) Kofraktionierung in der Gegenwart von Detergenz (Triton-X-100). Schwarze Rechtecke: Überschneidungen in den höchsten Signalintensitäten der drei Proteine in Abhängigkeit von der Molarität. DIC: Dynein Intermediäre Kette, M: Molar.

höchsten Signalintensitäten aller drei Proteine ließen sich bei ähnlichen Molaritäten von ungefähr 0,9 bis 1,2 M nachweisen (Abb. 3.13 A). Wenn die Zentrifugation in Gegenwart von Triton-X-100 vorgenommen wurde, verschoben sich die *Peaks* aller drei Proteine zu geringeren Molaritäten (ungefähr 0,4 bis 0,6 M), verblieben aber weiterhin in Kofraktionierung (Abb. 3.13 B). Da Triton-X-100 vesikuläre Membranen solubilisiert und somit Proteine, die denselben Vesikel teilen aber nicht miteinander interagieren, trennt, sollte diese Kofraktionierung ausschließlich auf Protein-Protein-Wechselwirkungen beruhen.

3.9 Kolokalisation von GABA_A-Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette

Kultivierte hippocampale Neurone wurden mit spezifischen Antikörpern für Muskelin, der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors sowie Dynein Intermediäre Kette immungefärbt, um die Interaktionen der drei endogenen Proteine in einer intrazellulären Umgebung zu bestätigen. Wenn der Dyneinmotorkomplex Muskelin zusammen mit dem GABA_A-Rezeptor transportiert, sollten in einer Immunfärbung alle drei Signale kolokalisieren. Die Färbung zeigte, in Übereinstimmung mit der zuvor beschriebenen Interaktion (siehe Kapitel 1.4.2), gelbe Überlagerungen der roten Muskelin mit den grünen GABA_A-Rezeptor Signalen (Abb. 3.14 B, Pfeilspitze). Daneben wurden weiße

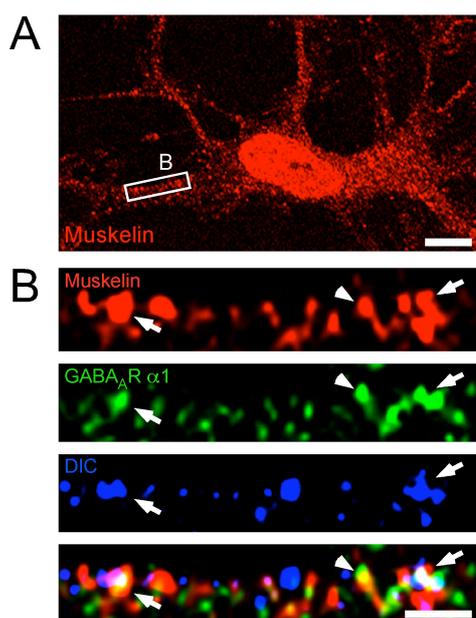


Abb. 3.14: Kolokalisation von GABA_A-Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette. (A) Immunfärbung kultivierter hippocampaler Neurone (DIV 14) mit spezifischen Antikörpern gegen Muskelin (rot), die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (grün) sowie gegen die Dynein Intermediäre Kette (blau). Nur rote Fluoreszenz-Signale sind gezeigt. (B) Vergrößerung des weißen Rechtecks aus A. Die Pfeilspitze markiert eine gelbe Überlagerung roter und grüner Signale. Die Pfeile markieren weiße Überlagerungen aller drei Signale. Größenbalken: 15 μ m in A, 3 μ m in B.

Signale (Abb. 3.14 B, Pfeile), die aus einer Überlagerung aller drei Fluoreszenzen entstehen, beobachtet. Die untersuchten Proteine scheinen somit in hippocampalen Neuronen zu kolokalisieren.

3.10 GABA_A-Rezeptor Anreicherung in intrazellulären Vesikeln von Dynamitin überexprimierenden Mäusen

In den vorausgegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors und Muskelin zusammen mit Dynein interagiert (siehe Kapitel 3.7, 3.8 und 3.9). Mit Hilfe von *Time-Lapse* Videomikroskopie wurde der retrograde Kotransport von GABA_AR α 1 mit Muskelin beobachtet (Kapitel 3.6). Zudem wurden gemeinsame, retrograde Bewegungen von Muskelin mit dem Dyneinmotorkomplex nachgewiesen (Sven Loebrich, persönliche Kommunikation). Eine mögliche Funktion des hier beschriebenen Transportkomplexes sollte deshalb im Folgenden genauer untersucht werden.

Es ist bekannt, dass Dynein den Transport von Transmembranrezeptoren während später endozytotischer Prozesse stromabwärts von *sorting* Endosomen bis zum Mikrotubuli Organisationszentrum (MTOC) vermittelt (Driskell *et al.*, 2007, Traer *et al.*, 2007). In der Nähe des MTOC befinden sich Lysosomen (Gruenberg *et al.*, 2004, Bonifacio *et al.*, 2006) und lysosomale Degradation von GABA_A-Rezeptoren konnte beschrieben werden (Kittler *et al.*, 2004). Wenn der Transport des GABA_A-Rezeptors zu Lysosomen von Dynein vermittelt wird, dann sollte sich der GABA_A-Rezeptor nach Inhibition des Dynein-vermittelten Transportes in Transportvesikeln anreichern. Dieses wurde in einer transgenen Mauslinie, in der Dynamitin unter der Kontrolle des neuronalen Thy1.2-Promotors überexprimiert wird, untersucht (LaMonte *et al.*, 2002). Der Dyneinmotorkomplex besteht neben den Dyneinketten unter anderem aus dem Dynaktinkomplex, der die Prozessivität des Motors erhöht und für viele Dyneinaktivitäten essentiell ist (King und Schroer, 2000). Die Überexpression von Dynamitin (p50), einer Untereinheit des Dynaktinkomplexes, führt zur Dissoziation des Dyneinmotorkomplexes und somit zur Inhibition der Motorfunktion (Burkhardt *et al.*, 1997). Da funktionelles Dynein für die normale Entwicklung von Neuronen benötigt wird (Reddy *et al.*, 1997, Murphey *et al.*, 1999), wurde hier ein Thy1.2-Promotor verwendet, welcher die Expression von Dynamitin ab dem zwölften Tag nach Geburt

ermöglicht (LaMonte *et al.*, 2002) und daher eine normale Entwicklung bis zu diesem Zeitpunkt zu gewährleisten. Um die subzelluläre Verteilung des GABA_A-Rezeptors nach Inhibition des Dynein-vermittelten Transportes zu untersuchen, wurden mit intrazellulären Vesikeln angereicherte Gehirnextrakte (P3) adulter wildtypischer und transgener Mäuse mittels differentieller Zentrifugation hergestellt. Die enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper für die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors und zur Kontrolle mit Aktin detektiert. Bei den Dynamitin überexprimierenden Mäusen (tg) wurden, verglichen mit wildtypischen Mäusen (wt), erhöhte GABA_AR α 1 Signale nachgewiesen (Abb. 3.15 A). Die quantitative Western Blot Analyse zeigte eine signifikante, ungefähr 1,5-fach erhöhte relative Signalintensität von GABA_AR α 1 in P3-Gehirnextrakten transgener Mäuse (Abb. 3.15 B). Die Beobachtungen lassen auf eine Anreicherung des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln nach der Inhibition des Dynein-vermittelten Transportes schließen.

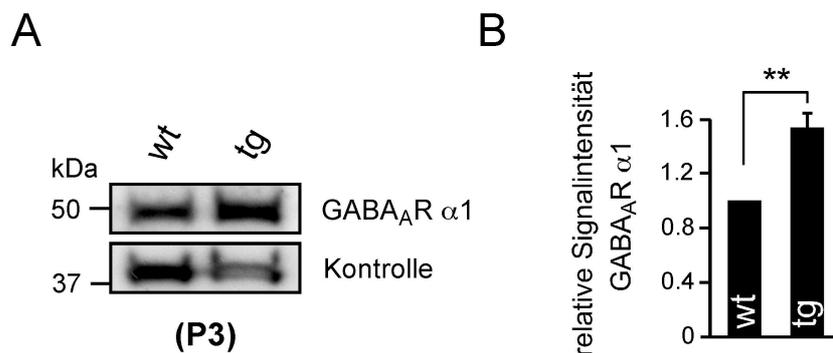


Abb. 3.15: Anreicherung des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln bei Dynamitin überexprimierenden Mäusen. Western Blot Analyse von mit intrazellulären Vesikeln angereicherten Gehirnextrakten (P3) adulter wildtypischer (wt) und transgener Mäuse (tg), die Dynamitin überexprimieren. (A) Immundetektion der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1) und Aktin als Ladekontrolle (Kontrolle) mit Hilfe spezifischer Antikörper. kDa: Molekulargewicht des Standards in Kilodalton (B) Darstellung der quantitativen Western Blot Analyse von A (n=3). In transgenen Mäusen (tg, 1,54 ± 0,10) wird eine signifikante Erhöhung der relativen Signalintensität von GABA_AR α 1 verglichen mit wildtypischen Mäusen (wt, gleich 1 gesetzt) nachgewiesen. Irrtumswahrscheinlichkeit: ** $p < 0,01$.

3.11 Überexpression von Dynamitin hat keinen Einfluss auf die GABA_A-Rezeptor Konzentration an der Zelloberfläche

Nach Inhibition der Dyneinmotor-Funktion, welche bekanntermaßen den Transport später endozytotischer Prozesse vermittelt, wurde eine Anreicherung des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln beobachtet (siehe Kapitel 3.10). Es ist aber bekannt, dass ein hoher Austausch von GABA_A-Rezeptoren bereits an der Zelloberfläche stattfindet und deren Internalisierung durch AP2-Clathrin Komplexe vermittelt wird (Kittler *et al.*, 2000, Kittler *et al.*, 2004). Sollten bereits frühe endozytotische Prozesse beziehungsweise der GABA_A-Rezeptor Transport von Plasmamembran zu *sorting* Endosomen von Dynein abhängen, so würde man nach Inhibition von Dynein eine GABA_A-Rezeptor Akkumulation bereits an der Zelloberfläche erwarten. Diese Fragestellung wurde mit Hilfe der in 3.10 beschriebenen Mauslinie untersucht. Durch differentielle Zentrifugation wurden Plasmamembran angereicherte Gehirnextrakte (P2) von adulten wildtypischen Mäusen (wt) sowie Dynamitin überexprimierenden Mäusen (tg) hergestellt. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Immobilisierung auf einer PVDF-Membran wurden die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors und Aktin mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert. In den mit Plasmamembran

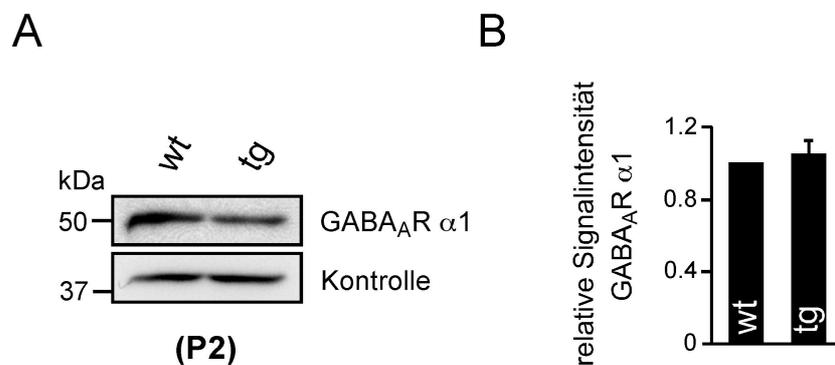


Abb. 3.16: Unveränderte GABA_A-Rezeptor Konzentration an der Zelloberfläche bei Dynamitin überexprimierenden Mäusen. Western Blot Analyse von mit Plasmamembran angereicherten Gehirnextrakten (P2) adulter wildtypischer (wt) und transgener Mäuse (tg), die Dynamitin überexprimieren. (A) Immundetektion der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1) und Aktin als Ladekontrolle (Kontrolle) mit Hilfe spezifischer Antikörper. kDa: Molekulargewicht des Standards in Kilodalton. (B) Darstellung der quantitativen Western Blot Analyse von A (n=3). Die relativen Signalintensitäten von GABA_AR α 1 in transgenen Mäusen (tg, 1,05 ±0,07) und wildtypischen Mäusen (wt, gleich 1 gesetzt) zeigen keinen signifikanten Unterschied.

angereicherten Gehirnextrakten von Dynamitin überexprimierenden Mäusen (tg) und wildtypischen Mäusen (wt) konnten keine signifikanten Unterschiede in der GABA_AR α 1-Konzentration beobachtet werden (Abb. 3.16 A, B).

Um die Unabhängigkeit der GABA_A-Rezeptor Konzentration an der Zelloberfläche von Dynein-vermittelten Transportvorgängen zu bestätigen, wurde in einem zweiten, unabhängigen Experiment die α 1- und β 3-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors allein, oder zusätzlich zusammen mit Dynamitin-myc in HEK293T-Zellen koexprimiert. Die Koexpression dieser zwei Untereinheiten gewährleistet eine Verteilung des GABA_A-Rezeptors in der Plasmamembran (Whiting, 1999, Jacob *et al.*, 2008). Nach einer Expressionsdauer von 48 Stunden wurden Rezeptoren der Zelloberfläche mit Biotin markiert und mittels Streptavidin immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden mehrmals mit Triton-X-100 haltigem Puffer gewaschen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Abschließend wurde die Membran mit Antikörpern spezifisch für die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors sowie für pan-Cadherin als Kontrolle detektiert. Unabhängig von einer Dynamitin-myc Überexpression konnten ähnliche Anteile der zuvor mit Biotin markierten GABA_AR α 1 immunpräzipitiert werden (Abb. 3.17 A, B).

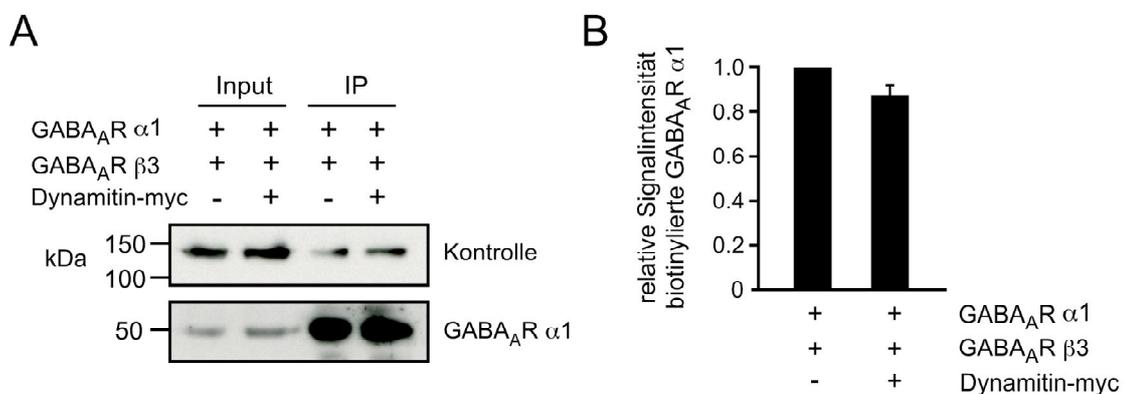


Abb. 3.17: Überexpression von Dynamitin in HEK293T-Zellen. Nach heterologer Expression der α 1- sowie der β 3-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors allein oder zusammen mit Dynamitin-myc in HEK293T-Zellen wurden die Zelloberflächen-Rezeptoren immunpräzipitiert. (A) Immundetektion der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1) und pan-Cadherin als Ladekontrolle (Kontrolle). kDa: Molekulargewicht des Standards in Kilodalton, Input: HEK293T-Zell Extrakt, IP: Immunpräzipitat. (B) Quantitative Western Blot Analyse von A (n=4). Die relative Signalintensität von biotinylierten α 1-Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors nach Dynamitin-myc Überexpression (+ Dynamitin-myc, 0,86 \pm 0,05) weist keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle ohne Dynamitin-myc auf (- Dynamitin-myc, gleich 1 gesetzt).

Die beschriebene Analyse der mit Plasmamembran angereicherten Gehirnextrakte (P2) Dynamitin überexprimierender Mäuse sowie die heterologe Expression von Dynamitin-myc in HEK293T-Zellen lassen darauf schließen, dass die Inhibition des Dynein-vermittelten Transportes keinen Einfluss auf die Konzentration von GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche hat, und Dynein somit keine Rolle bei frühen endozytotischen Prozessen des GABA_A-Rezeptors zu spielen scheint.

3.12 Kofraktionierung von GABA_A-Rezeptor und Muskelin mit Proteinmarkern endozytotischer Vesikel

Der Dyneinmotorkomplex vermittelt unter anderem den vesikulären Transport von frühen zu späten Endosomen (Aniento *et al.*, 1993). In Übereinstimmung hatte die Inhibition des Dynein-vermittelten Transportes eine Akkumulation des GABA_A-Rezeptors in mit intrazellulären Vesikeln angereicherten Gehirnextrakten zur Folge (vergleiche mit Kapitel 3.10). Da Muskelin und der GABA_A-Rezeptor sowie Dynein in einem Transportkomplex interagieren (siehe Kapitel 3.7, 3.8, 3.9), sollte untersucht werden, ob der GABA_A-Rezeptor zusammen mit Muskelin in Kompartimenten später endozytotischer Prozesse nachgewiesen werden kann. Für eine genauere Analyse wurden mit intrazellulären Vesikeln angereicherte Gehirnextrakte (P3) aus adulten Mäusen über einen *Sucrose*gradienten mittels Zentrifugation bei 160.000 x g ihrer

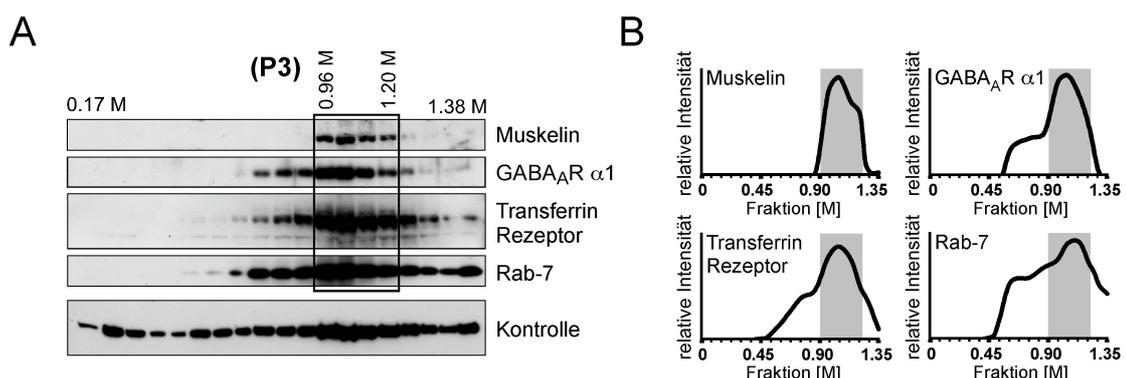


Abb. 3.18: Kofraktionierung von GABA_A-Rezeptor und Muskelin mit Proteinmarkern endozytotischer Vesikel. Dichtezentrifugation über *Sucrose*gradienten von mit intrazellulären Vesikeln angereichertem Gehirnextrakt (P3) adulter Mäuse und Immundetektion mit spezifischen Antikörpern für die α1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_ARα1), Muskelin, Transferrinrezeptor, Rab-7 und NSF als Kontrolle. (A) Muskelin und GABA_ARα1 kofraktionieren zusammen mit Transferrinrezeptor sowie mit Rab-7 (schwarzes Rechteck). (B) Darstellung der quantitativen Analyse von A (n=3). M: Molar.

Dichte nach aufgetrennt. Einzelne Fraktionen wurden nach SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert und die $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR $\alpha 1$), Muskelin sowie die Proteinmarker für frühe Endosomen (Transferrinrezeptor) und späte Endosomen (Rab-7) wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Die höchsten Signalintensitäten von GABA_AR $\alpha 1$ und Muskelin ließen sich bei Molaritäten ähnlich derer des Transferrinrezeptors und Rab-7 (ungefähr 0,9 bis 1,2 M) nachweisen (Abb. 3.18, A, B).

3.13 Nachweis von Muskelin in multivesikulären Körpern (MVBs)

In Kapitel 3.12 wurde die Kofraktionierung von Muskelin und dem GABA_A-Rezeptor zusammen mit Proteinmarkern für frühe und späte Endosomen beschrieben. Unter Verwendung eines gegen Muskelin gerichteten, spezifischen Antikörpers wurde nun die ultrastrukturelle Lokalisation von Muskelin in hippocampalen Neuronen mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Zusätzlich zu dem Nachweis von Muskelin an den Membranen kleiner intrazellulärer Vesikel (siehe Kapitel 3.5) konnten Muskelin Signale auch innerhalb von multivesikulären Körpern (*multi vesicular bodies*, MVBs) nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Diese MVBs stellen Kompartimente später endozytotischer Prozesse stromaufwärts von Lysosomen dar (Gruenberg *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit einer Rolle von Muskelin bei endozytotischen

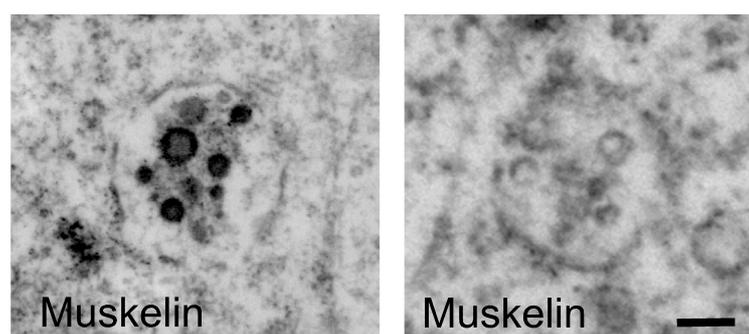


Abb. 3.19: Lokalisation von Muskelin innerhalb von multivesikulären Körpern (MVBs).

Elektronenmikroskopische Aufnahme hippocampaler Neurone von adulten Mäusen unter Verwendung eines für Muskelin spezifischen Antikörpers. An den Membranen von kleinen Vesikeln innerhalb des Lumens eines MVBs können spezifische Muskelin Signale nachgewiesen werden (links). Innerhalb eines anderen MVBs werden keine Signale spezifisch für Muskelin detektiert (rechts). Der Größenbalken entspricht 0,15 μm .

Abbauprozessen wurde Muskelin innerhalb der Lumina der MVBs an den Membranen kleiner Vesikel detektiert. Die intraluminalen Vesikel können unter anderem durch heterotypische Fusion der äußeren MVB-Membran mit der Membran von Lysosomen in das hydrolytische lysosomale Lumen entlassen und einschließlich ihrer enthaltenen Proteine abgebaut werden (Katzmann *et al.*, 2002, Babst, 2005). Andere MVBs wiesen kein Muskelin Signal auf (Abb. 3.18), was auf eine spezifische Assoziation von Muskelin mit bestimmten MVBs schließen lässt.

3.14 Lysosomale Degradation von GABA_A-Rezeptoren aufgrund von Mikrotubuli-abhängigem Transport

Die Interaktion des GABA_A-Rezeptors, Muskelin und Dynein sowie die Anreicherung von GABA_A-Rezeptoren in intrazellulären Vesikeln nach der Inhibition des Dynein-vermittelten Transportes und die Kofraktionierung mit Proteinmarkern für frühe und späte Endosomen (vergleiche mit Kapiteln 3.7-3.10, 3.12) lassen auf einen Dynein-abhängigen Transport des GABA_A-Rezeptors zu Lysosomen schließen. Der Dynein-motorkomplex bewegt sich entlang der Mikrotubuli und deren Depolymerisation führt zu einer Störung des Dynein-vermittelten Transportes (Lafont *et al.*, 1994, Caviston und Holzbaur, 2006). Erfolgt eine lysosomale Degradation des GABA_A-Rezeptors über Dynein-vermittelten Transport, so sollte die Depolymerisation von Mikrotubuli zu einer verminderten Degradation des GABA_A-Rezeptors und somit zu dessen Anreicherung führen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der Verlust an GABA_A-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Zeit analysiert. Hierfür wurden die Rezeptoren an der Zelloberfläche kultivierter hippocampaler Neurone mit Biotin markiert. Die Zellen wurden dann sofort geerntet (Zeitpunkt 0 min) oder weiter bei 37 °C inkubiert und nach weiteren 12 Stunden geerntet (Zeitpunkt 720 min), um die Internalisierung und Degradation von GABA_A-Rezeptoren zu ermöglichen (Kittler *et al.*, 2004). Hierbei wurden hippocampale Neurone entweder unbehandelt gelassen oder mit Nocodazol zur Depolymerisation von Mikrotubuli (Samson *et al.*, 1979), beziehungsweise mit Leupeptin zur Inhibition lysosomaler Proteasen (Ehlers, 2001, Kittler *et al.*, 2004), inkubiert. Mit Biotin markierte Rezeptoren wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 720 min mittels Streptavidin immunpräzipitiert und die Präzipitate nach

mehrmaligem Waschen mit Triton-X-100 haltigem Puffer durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit spezifischen Antikörpern wurden die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1) und zur Kontrolle Aktin detektiert (Abb 3.20 A, B).

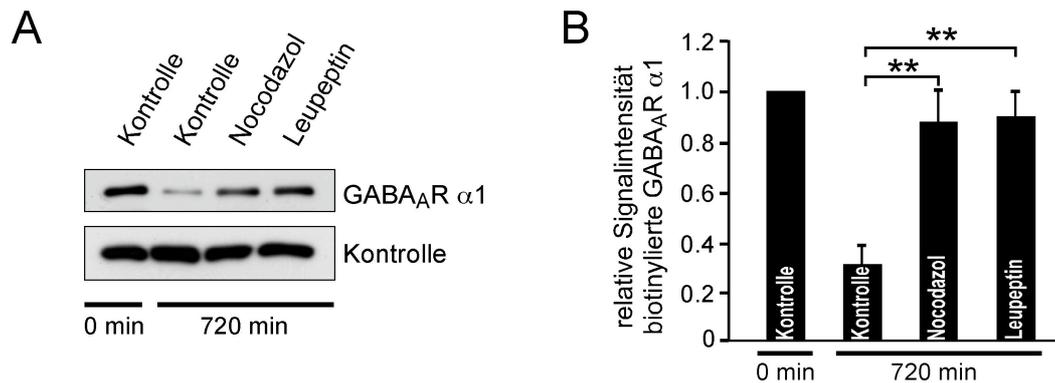


Abb. 3.20: Lysosomale Degradation von GABA_A-Rezeptoren aufgrund von Mikrotubuli-abhängigem Transport. (A) Western Blot einer Immunpräzipitation biotinierter GABA_A-Rezeptoren von hippocampalen Neuronen mit Streptavidin. Immundetektion mit Antikörpern spezifisch für die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1) und Aktin als Kontrolle. (B) Quantitative Analyse von A (n=4). Die relative Signalintensität biotinylierter GABA_AR α 1 zum Zeitpunkt 0 min wurde gleich 1 gesetzt. Etwa 30 % der am Zeitpunkt 0 min biotinylierten GABA_AR α 1 werden nach 720 min Inkubation detektiert (0,31 ± 0,07). In Gegenwart von 1 μ M Nocodazol (0,88 ± 0,12) oder 200 μ g/ μ l Leupeptin (0,89 ± 0,10) während der Inkubation werden signifikant höhere Signalintensitäten biotinylierter GABA_AR α 1 nach 720 min im Vergleich zur Kontrollbedingung nachgewiesen. Irrtumswahrscheinlichkeit: ** $p < 0,01$.

Zum Zeitpunkt 720 min wurden unter Kontrollbedingungen nur noch ungefähr 30 % der an Zeitpunkt 0 min mit Biotin markierten GABA_AR α 1 detektiert (Abb 3.20 A, B). Eine Behandlung mit Leupeptin konnte diesen Verlust an GABA_A-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Zeit größtenteils rückgängig machen, noch ungefähr 90 % der zuvor markierten GABA_AR α 1 ließen sich nachweisen. Nach Depolymerisation von Mikrotubuli mit Nocodazol wurden ebenfalls noch etwa 90 % und damit signifikant mehr biotinylierte GABA_AR α 1 als unter Kontrollbedingungen präzipitiert (Abb 3.20 A, B). Dies lässt auf einen Mikrotubuli-abhängigen, wahrscheinlich Dynein-vermittelten Transport (siehe Kapitel 3.7-3.13) des GABA_A-Rezeptors zu Lysosomen schließen.

3.15 Muskelin stabilisiert die Interaktion von GABA_A-Rezeptor mit Dynein Intermediärer Kette

Eine mögliche Funktion von Muskelin während der Endozytose und lysosomalen Degradation von GABA_A-Rezeptoren wurde nun mit Hilfe homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse und ihrer wildtypischen (+/+) Wurfgeschwister untersucht. Eine Möglichkeit wäre, dass Muskelin in einem Proteinkomplex bestehend aus GABA_A-Rezeptor, Muskelin und Dynein (siehe Kapitel 3.7-3.9) als Adapterprotein fungiert. Die Funktion von sogenannten Adapterproteinen ist unter anderem, die vesikulären Transmembranrezeptoren mit den entsprechenden Motorproteinen zu verbinden, um die Spezifität von intrazellulären Transportkomplexen zu gewährleisten (Kneussel 2005, Kneussel und Loebrich, 2007).

Wenn Muskelin für die Interaktion des GABA_A-Rezeptors mit dem Dyneinmotor-komplex benötigt wird, dann müsste die Koimmunpräzipitation beider Interaktionspartner (siehe Kapitel 3.7) in Abwesenheit von Muskelin gestört sein. Um dieses zu untersuchen, wurde der GABA_A-Rezeptor aus Gehirn-Lysaten von wildtypischen (+/+) und von homozygoten (-/-) Mäusen, welche zuvor durch Zentrifugation bei 1.000 x g geklärt wurden (S1), mit Antikörpern spezifisch für die Dynein Intermediäre Kette immunpräzipitiert. Parallel wurde zur Kontrolle eine Präzipitation mit unspezifischen Immunglobulinen durchgeführt. Die Präzipitate wurden in Gegenwart von Triton-X-100 gewaschen und nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert.

Unabhängig davon, ob Lysate wildtypischer (+/+) oder homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse verwendet wurden, konnte die GABA_A-Rezeptor α 1-Untereinheit (GABA_AR α 1) nachgewiesen werden (Abb. 3.21 A). Interessanterweise wurden aber geringere Mengen an GABA_AR α 1 im Präzipitat homozygoter (-/-) Mäuse detektiert. Durch eine quantitative Analyse wurde die signifikante Abnahme der GABA_AR α 1 Signalintensität um ungefähr 75 % in dem Präzipitat von homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen festgestellt (Abb. 3.21 B). In den Kontrollen mit unspezifischen Immunglobulinen konnte GABA_AR α 1 unabhängig von den eingesetzten Gehirn-Lysaten nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Muskelin die Interaktion des GABA_A-Rezeptors mit dem Dyneinmotorkomplex stabilisiert und somit ein wichtiger Bestandteil des Transportkomplexes sein könnte.

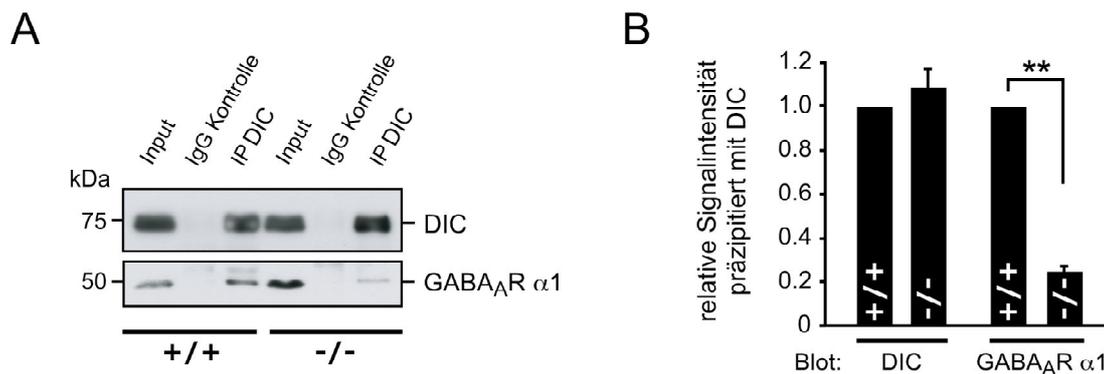


Abb. 3.21: Reduzierte Koimmunpräzipitation von GABA_A-Rezeptor mit Dynein Intermediärer Kette nach Depletion von Muskulin. Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern für Dynein Intermediäre Kette (DIC) und unspezifischen Immunglobulinen (IgG). Immundetektion von DIC und der α1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_ARα1). (A) GABA_ARα1 wird aus Lysaten wildtypischer (+/+) und homozygoter (-/-) Muskulin *Knockout* Mäuse mit DIC kopräzipitiert. Input: S1-Gehirn-Lysat wildtypischer (+/+) oder homozygoter (-/-) Mäuse, kDa: Molekulargewicht des Standards in Kilodalton, IP: Immunpräzipitat. (B) Quantitative Analyse von A (n=3). Die DIC-Signalintensität nach Präzipitation von DIC aus Lysaten wildtypischer (+/+, gleich 1 gesetzt) und homozygoter (-/-, 1,08 ± 0,08) Mäuse zeigt keinen signifikanten Unterschied. GABA_ARα1-Koprazipitationen wurden mit der DIC-Präzipitation normalisiert. In Lysaten aus homozygoten Mäusen (-/-, 0,25 ± 0,02) ist die GABA_ARα1 Signalintensität im Vergleich zu Lysaten aus wildtypischen Mäusen (+/+, gleich 1 gesetzt) signifikant reduziert. Irrtumswahrscheinlichkeit: ** $p < 0,01$.

3.16 GABA_A-Rezeptor Anreicherung in intrazellulären Vesikeln nach Depletion von Muskulin

Nach Inhibition des Dynein-vermittelten Transportes wurde eine Akkumulation des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln sowie eine reduzierte Degradation des GABA_A-Rezeptors beobachtet (siehe Kapitel 3.10, 3.14). Stabilisiert Muskulin den GABA_A-Rezeptor-Dynein Transportkomplex wie unter 3.15 beschrieben, dann sollte man nach Muskulin-Depletion eine Instabilität des Transportkomplexes und somit ähnliche Folgen wie nach Störung der Dyneinmotor-Funktion erwarten. Die Depletion von Muskulin sollte dementsprechend auch zu einer Akkumulation des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln führen. Für diese Untersuchung wurden mit intrazellulären Vesikeln angereicherte Gehirnextrakte (P3) adulter wildtypischer (+/+) sowie homozygoter (-/-) Muskulin *Knockout* Mäuse durch differentielle Zentrifugation hergestellt. Enthaltene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine

PVDF-Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern für die $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors und für γ -Adaptin als Kontrolle detektiert (Abb. 3.22 A, B).

Die quantitative Analyse ergab eine signifikante, ungefähr 1,5-fach erhöhte relative Signalintensität von GABA_AR $\alpha 1$ in P3-Gehirnextrakten homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen verglichen mit wildtypischen (+/+) Wurfgeschwistern (Abb. 3.22 A, B). Eine Depletion Muskelins *per se* führt somit zu einer Anreicherung des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln, ähnlich wie es nach der Inhibition des Dynein-vermittelten Transportes beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 3.10).

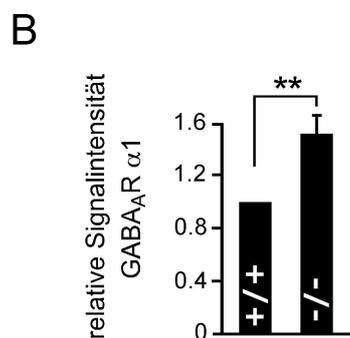
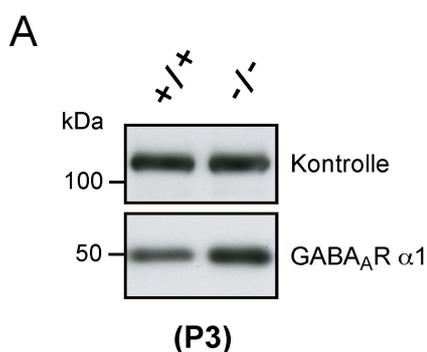


Abb. 3.22: Anreicherung des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln nach Depletion von Muskelin. (A) Western Blot Analyse von mit intrazellulären Vesikeln angereicherten Gehirnextrakten (P3) adulter wildtypischer (+/+) und homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse. Die $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR $\alpha 1$) und γ -Adaptin als Kontrolle wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. kDa: Molekulargewicht des Standards in Kilodalton. (B) Darstellung der quantitativen Western Blot Analyse von A (n=7). Im Vergleich mit wildtypischen Wurfgeschwistern (+/+, gleich 1 gesetzt) wird eine signifikante Anreicherung der relativen Signalintensität von GABA_AR $\alpha 1$ in P3-Gehirnextrakten von homozygoten Muskelin *Knockout* Mäusen (-/-, 1,52 ± 0,14) beobachtet. Irrtumswahrscheinlichkeit: ** $p < 0,01$.

3.17 Die Depletion von Muskelin verringert die Degradation von GABA_A-Rezeptoren

Die Störung des Dynein-vermittelten Transportes durch Depolymerisation von Mikrotubuli sowie die Inhibition lysosomaler Proteasen mit Leupeptin führte zu einer reduzierten Degradation des GABA_A-Rezeptors (Kapitel 3.14). Weiterhin wurde gezeigt, dass Muskelin den GABA_A-Rezeptor-Dynein Transportkomplex stabilisiert und dass die Depletion von Muskelin zu einer Anreicherung des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln führt, wie es auch nach Inhibition des Dyneinmotor-

komplexes beobachtet wurde (Kapitel 3.10, 3.15, 3.16). Im Folgenden sollte die Rolle von Muskelin während endozytischer Prozesse genauer untersucht werden. Wird Muskelin für den Dynein-abhängigen Transport des GABA_A-Rezeptors von frühen zu späten Endosomen benötigt, sollte die Depletion von Muskelin zu einer wie nach Inhibition der Dyneinmotor-Funktion beobachteten reduzierten Degradation des GABA_A-Rezeptors führen. Daher wurde erneut der Verlust an GABA_A-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Zeit analysiert. Rezeptoren an der Zelloberfläche von hippokampalen Neuronen wildtypischer (+/+) sowie homozygoter Muskelin *Knockout* Mäuse (-/-) wurden mit Biotin markiert. Biotinylierte Rezeptoren wurden entweder sofort (Zeitpunkt 0 min) oder nach einer Inkubationsphase, welche die Internalisierung und Degradation von GABA_A-Rezeptoren ermöglicht (Zeitpunkt 720 min), mittels Streptavidin immunpräzipitiert. Nach mehrmaligen Waschen mit Triton-X-100 haltigem Puffer wurden die Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern für Aktin und die α1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors detektiert (GABA_ARα1). In den hippokampalen Neuronen von wildtypischen (+/+) Mäusen wurden zum Zeitpunkt 720 min nur etwa 40 % der zuvor an Zeitpunkt 0 min mit Biotin markierten GABA_ARα1 präzipitiert (Abb. 3.23 A, B).

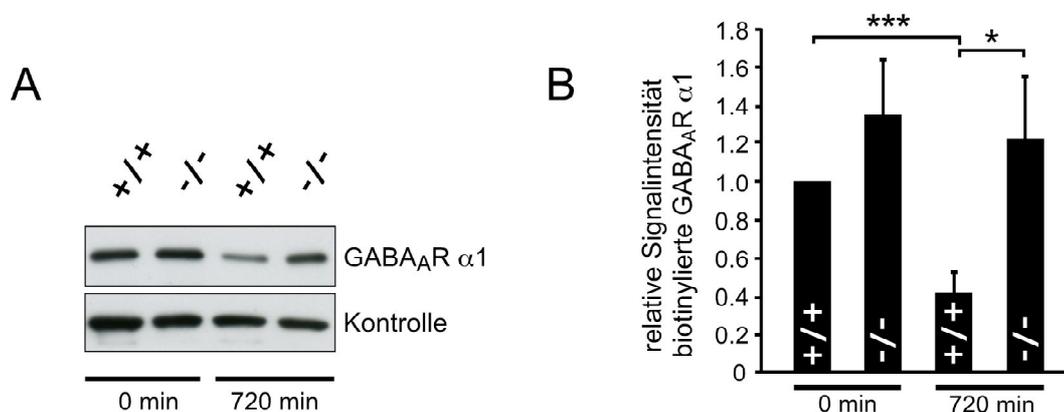


Abb. 3.23: Störung der GABA_A-Rezeptor Degradation durch Depletion von Muskelin. (A) Western Blot einer Immunpräzipitation biotinylierter Rezeptoren mit Streptavidin. Immundetektion mit Antikörpern spezifisch für GABA_ARα1 und Aktin als Kontrolle. (B) Quantitative Analyse von A (n=8). Zum Zeitpunkt 0 min weisen Neurone homozygoter Muskelin *Knockout* Mäuse (-/-, 1,34 ± 0,26) eine erhöhte relative Signalintensität biotinylierter GABA_ARα1 gegenüber wildtypischen Neuronen (+/+, gleich 1 gesetzt) auf. Nach 720 min werden etwa 40 % der zuvor biotinylierten GABA_ARα1 aus wildtypischen Neuronen (+/+, 0,42 ± 0,10) detektiert, aus Neuronen homozygoter Muskelin *Knockout* Mäuse werden etwa 90 % der biotinylierten GABA_ARα1 präzipitiert (-/-, 1,22 ± 0,30). Irrtumswahrscheinlichkeit: *p < 0,05, ***p < 0,001.

Hingegen wurden in Neuronen homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse nach 720 min ungefähr 90 % der zuvor biotinylierten GABA_AR α 1 und damit signifikant mehr als in wildtypischen (+/+) Neuronen nachgewiesen. An dem Zeitpunkt 0 min, der die GABA_AR α 1 Konzentration an der Zelloberfläche repräsentiert, wurde zudem eine Anreicherung biotinylierter GABA_AR α 1 von etwa 35 % in Muskelin *Knockout* (-/-) verglichen mit wildtypischen (+/+) Neuronen festgestellt, die jedoch keine Signifikanz aufwies. Unabhängig von dieser erhöhten GABA_AR α 1 Konzentration an der Zelloberfläche konnte eine signifikante Reduktion in der GABA_AR α 1-Degradationsrate von ungefähr 50 % nach Depletion von Muskelin ermittelt werden (Abb 3.24). Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass Muskelin für eine Dynein-vermittelte lysosomale Degradation des GABA_A-Rezeptors benötigt wird und hierbei als eine stabilisierende Komponente innerhalb des Dynein-GABA_A-Rezeptor Transportkomplexes fungieren könnte (siehe Kapitel 3.15).

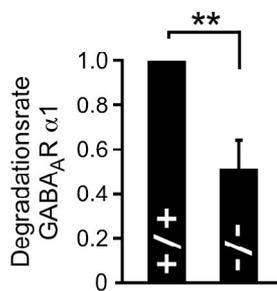


Abb. 3.24: Die Degradationsrate des GABA_A-Rezeptors ist von Muskelin abhängig. Auswertung der quantitativen Analyse aus Abb. 3.23 B. Degradationsraten des GABA_A-Rezeptors in Abhängigkeit vom Genotyp wurden aus dem Quotient der relativen Signalintensitäten biotinylierter GABA_AR α 1 zum Zeitpunkt 0 min und 720 min ermittelt. Die GABA_AR α 1-Degradationsrate in wildtypischen (+/+) Neuronen wurde gleich 1 gesetzt. Neurone von homozygoten Muskelin *Knockout* Mäusen weisen eine signifikante Reduktion (0,52 ± 0,12) in der GABA_AR α 1-Degradationsrate auf. Irrtumswahrscheinlichkeit: ** $p < 0,01$.

Die in homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen beobachtete Reduktion der GABA_AR α 1-Degradationsrate könnte auf einen gestörten Transport des GABA_A-Rezeptors zu Lysosomen, aber auch auf einen Verlust der lysosomalen Funktion zurückzuführen sein. Um letzteres auszuschließen, wurde die Degradation von GluR1, einer AMPA-Rezeptor-Untereinheit, in Abwesenheit von Muskelin untersucht. Es ist bekannt dass GluR1 in Lysosomen degradiert wird (Ehlers, 2001) und es wurde bislang keine Interaktion von GluR1 mit Muskelin beschrieben. Deshalb wurde erneut der Verlust von GluR1 in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. In hippocampalen Neuronen von wildtypischen (+/+) Mäusen wurden nach 720 min in etwa 20 % der zuvor an Zeitpunkt 0 min mit Biotin markierten GluR1 festgestellt (Abb 3.25

A, B). Aus Neuronen homozygoter Muskelin *Knockout* Mäuse (-/-) konnten ebenfalls ungefähr 20 % und somit ein ähnlicher Anteil zuvor biotinylierter GluR1 präzipitiert werden. Dieses Ergebnis lässt auf eine unveränderte, von Muskelin unabhängige Degradation von GluR1 und daher auch auf eine normale lysosomale Funktion in Abwesenheit von Muskelin schließen.

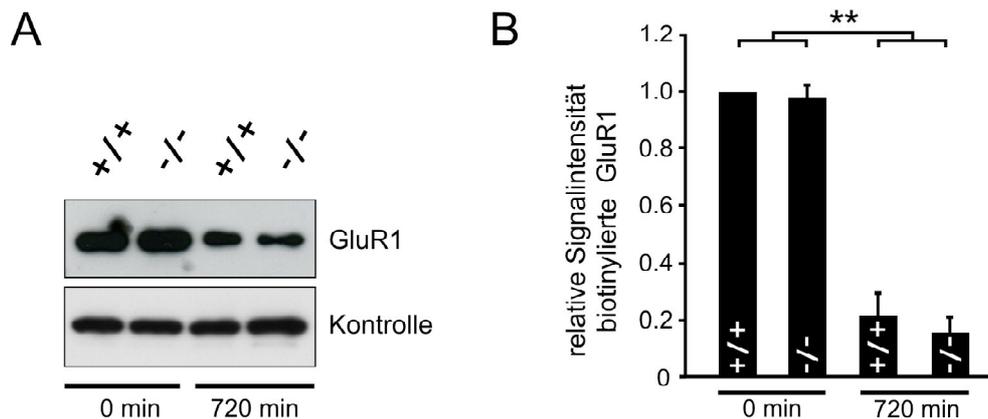


Abb. 3.25: Unveränderte Degradation von GluR1 nach Depletion von Muskelin. (A) Western Blot einer Immunpräzipitation biotinylierter Rezeptoren mit Streptavidin. Immundetektion mit Antikörpern spezifisch für GluR1 und Aktin als Kontrolle (B) Quantitative Analyse von A (n=4). Zum Zeitpunkt 0 min weisen Neurone von wildtypischen (+/+, gleich 1 gesetzt) und homozygoten Muskelin *Knockout* Mäusen (-/-, $0,98 \pm 0,04$) ähnliche Signalintensitäten biotinylierter GluR1 auf. Nach 720 min werden etwa 20 % der zuvor biotinylierten GluR1 aus wildtypischen (+/+, $0,21 \pm 0,07$) sowie aus Neuronen homozygoter Muskelin *Knockout* Mäuse (-/-, $0,16 \pm 0,05$) präzipitiert. Irrtumswahrscheinlichkeit: ** $p < 0,01$.

3.18 Koimmunpräzipitation von GABA_A-Rezeptor und Muskelin mit Myosin VI

Muskelin wurde als direkter Interaktionspartner der $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors *in vitro* identifiziert (vergleiche mit Kapitel 1.4.2). Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit ein funktioneller Transportkomplex von GABA_A-Rezeptor und Muskelin zusammen mit dem Dyneinmotorkomplex beschrieben. Die Inhibition der Dyneinmotor-Funktion führte zu einer Anreicherung des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln, nicht aber zu seiner Anreicherung an der Zelloberfläche (siehe Kapitel 3.10 und 3.11). Dieses deutet in Übereinstimmung mit der Literatur (Driskell *et al.*, 2007, Traer *et al.*, 2007) darauf hin, dass ein von Dynein unabhängiges

Motorproteinsystem die frühen endozytotischen Prozesse nach Internalisierung des GABA_A-Rezeptors vermittelt. Es wurde bereits berichtet, dass frühe endozytotische Prozesse neuronaler AMPA-Rezeptoren von Myosin VI, welches sich entlang von Aktinfilamenten in retrograder Richtung bewegt, abhängen können (Osterweil *et al.*, 2005). Zudem lässt die beobachtete Aufhellung der Fellfarbe bei homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen auf die Beteiligung von Muskelin an Myosin-vermittelten Transport entlang von Aktinfilamenten schließen (siehe Kapitel 3.4). Deshalb sollte untersucht werden, ob eine Interaktion von Myosin VI mit dem GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplex nachgewiesen werden kann, die eventuell Transportprozesse der frühen Endozytose vermittelt. Hierfür wurde Muskelin mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers aus mit Plasmamembran und intrazellulären Vesikeln angereicherten Gehirnextrakten (P2/P3) adulter wildtypischer (+/+) sowie homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse präzipitiert. Parallel wurde eine Präzipitation mit unspezifischen Immunglobulinen durchgeführt. Die Präzipitate wurden in Gegenwart von Triton-X-100 gewaschen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Abschließend wurde die Membran mit für Myosin VI spezifischem Antikörper detektiert (Abb. 3.26). In dem Präzipitat des Muskelin Antikörpers wurde ein Signal für Myosin VI detektiert, wenn Extrakte aus wildtypischen (+/+), nicht aber aus homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen präzipitiert wurden. In der Kontrolle mit unspezifischen Antikörpern dagegen wurde kein entsprechendes Signal nachgewiesen.

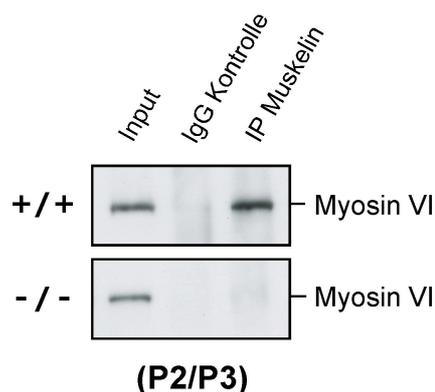


Abb. 3.26: Koimmunpräzipitation von Myosin VI mit Muskelin. Immunpräzipitation mit spezifischem Antikörper gegen Muskelin und unspezifischen Immunglobulinen (IgG) aus mit Plasmamembran und mit Vesikeln angereicherten Gehirnextrakten (P2/P3). Immundetektion mit einem für Myosin VI spezifischen Antikörper. Myosin VI wird aus dem Gehirnextrakt von adulten wildtypischen (+/+), nicht aber homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen präzipitiert. Input: P2/P3-Gehirnextrakte, IP: Immunpräzipitat.

Um diese *in vitro*-Interaktion zu bestätigen, wurden als nächstes Immunpräzipitationen mit Antikörpern spezifisch für Myosin VI und die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors wie oben beschrieben durchgeführt. Zusätzlich zu Muskelin konnten

hierbei GABA_AR α 1 mit Myosin VI und umgekehrt Myosin VI mit GABA_AR α 1 kopräzipitiert werden (Abb. 3.27 A, B). Dieses deutet auf eine Interaktion des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes mit Myosin VI hin.

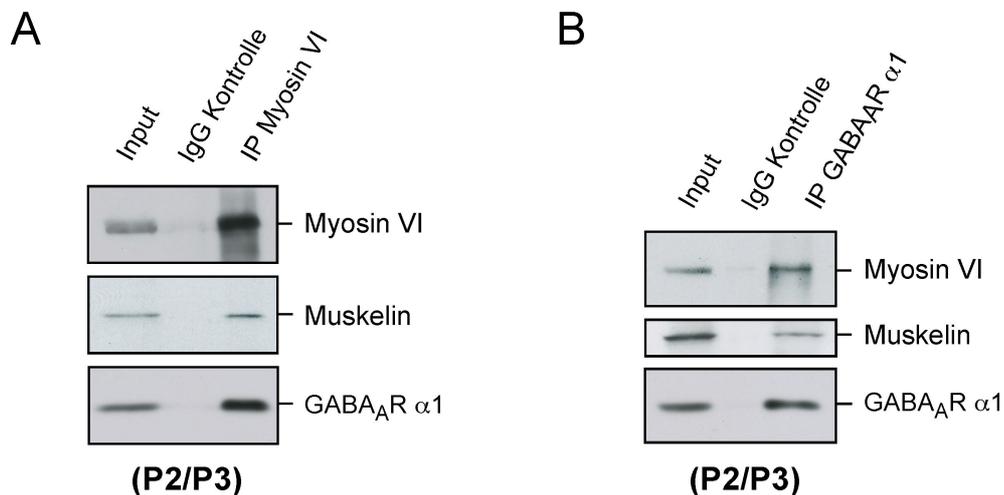


Abb. 3.27: Koimmunpräzipitation von GABA_A-Rezeptor, Muskelin und Myosin VI. Präzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen (A) Myosin VI und (B) GABA_AR α 1 sowie mit unspezifischen Immunglobulinen aus mit Plasmamembran und intrazellulären Vesikeln angereichertem Gehirnextrakt (P2/P3) adulter wildtypischer Mäuse. Immundetektion mit spezifischen Antikörpern für GABA_AR α 1, Muskelin und Myosin VI. Input: P2/P3-Gehirnextrakt, IgG: unspezifische Immunglobuline, IP: Immunpräzipitat.

3.19 Kofraktionierung von GABA_A-Rezeptor und Muskelin mit Myosin VI

Um die Interaktion von Myosin VI mit Muskelin und der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Kapitel 3.18) zu bestätigen, wurden erneut mit intrazellulären Vesikeln angereicherte Gehirnextrakte (P3) aus adulten wildtypischen Mäusen über einen *Sucrose*gradienten mittels Zentrifugation bei 160.000 \times g ihrer Dichte nach aufgetrennt. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem Antikörper spezifisch für Myosin VI detektiert. Drei Myosin VI-*Peaks* ließen sich bei distinkten Molaritäten nachweisen (Abb. 3.28). Der *Peak* bei 0,9 bis 1,2 M entspricht in etwa den *Peaks* der Kofraktionierung von Muskelin und dem GABA_A-Rezeptor (Abb. 3.28, vergleiche mit Abb. 3.13). Bei Zentrifugation in Gegenwart von Triton-X-100 ver-

schob sich der Myosin VI-*Peak* zu geringeren Molaritäten, ähnlich wie die GABA_A-Rezeptor- und Muskelin-*Peaks*. Da Triton-X-100 vesikuläre Membranen solubilisiert, und deshalb Proteine desselben Vesikels die nicht miteinander interagieren, trennt, sollte diese Kofraktionierung ausschließlich auf Protein-Protein-Wechselwirkungen beruhen.

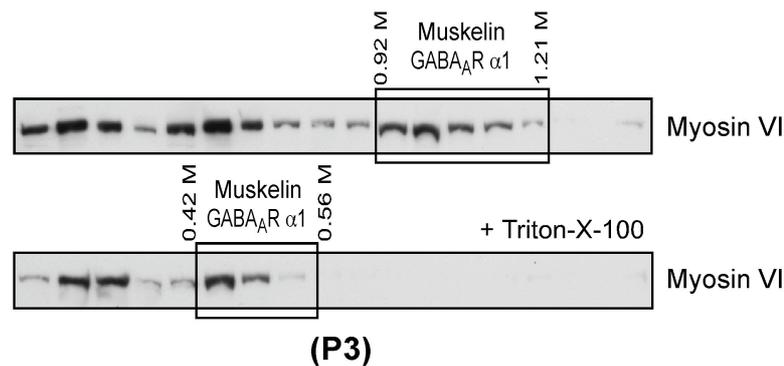


Abb. 3.28: Kofraktionierung von GABA_A-Rezeptor, Muskelin und Myosin VI. Dichtezentrifugation mittels *Sucrose*gradienten von mit Vesikeln angereichertem Gehirnextrakt (P3) und Immundetektion mit Myosin VI spezifischem Antikörper. In Abwesenheit von Detergenz (oben) sedimentiert der rechte Myosin VI-*Peak* bei ähnlichen Molaritäten wie Muskelin und GABA_AR α 1 (0,92 bis 1,21 M, vergleiche mit Abb. 3.13). In der Gegenwart von Detergenz (Triton-X-100) wird der Myosin VI-*Peak* bei geringeren Molaritäten, ähnlich derer von Muskelin und GABA_AR α 1, detektiert (0,42 bis 0,56 M).

3.20 Kolokalisation von GABA_A-Rezeptor und Muskelin mit Myosin VI

Um eine Assoziation des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes mit Myosin VI in einer intrazellulären Umgebung zu untersuchen, wurden kultivierte hippokampale Neurone mit spezifischen Antikörpern für Muskelin, der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1) und Myosin VI immungefärbt. Wenn der GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplex mit Hilfe von Myosin VI transportiert wird, dann sollten in einer Immunfärbung die Signale aller drei Proteine kolokalisieren. Die Färbung zeigte unter anderem gelbe Punkte, die aus einer Überlagerung von roten Muskelin und grünen Myosin VI Signalen resultieren (Abb. 3.29 B, Pfeilspitze). Außerdem wurden weiße Signale, die aus Überlagerung von allen drei Fluoreszenzsignalen entstehen (Pfeile), beobachtet. Der GABA_A-Rezeptor, Muskelin und Myosin VI weisen somit eine Kolokalisation in hippokampalen Neuronen auf.

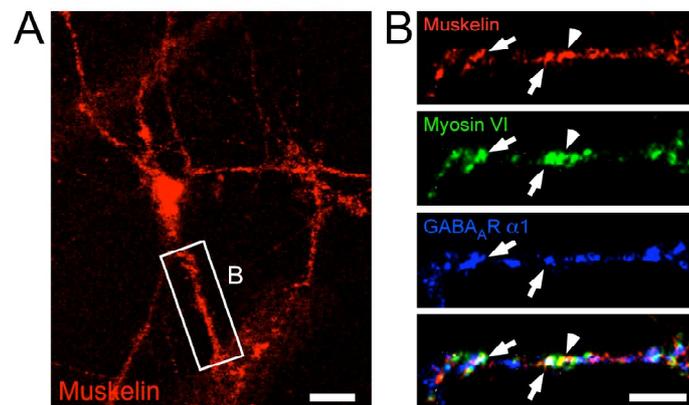


Abb. 3.29: Kolokalisation von GABA_A-Rezeptor und Musclin mit Myosin VI. (A) Immunfärbung von kultivierten hippocampalen Neuronen (DIV 15) mit spezifischen Antikörpern für Musclin (rot), Myosin VI (grün) und der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (blau). Nur rote Fluoreszenzsignale werden gezeigt. (B) Vergrößerung des weißen Rechtecks aus A. Die Pfeilspitze markiert eine gelbe Überlagerung der roten und grünen Signale, die Pfeile markieren weiße Überlagerungen aller drei Signale. Größenbalken: 25 μ m in A, 15 μ m in B.

3.21 Eine stabile Interaktion von GABA_A-Rezeptor mit Myosin VI erfolgt unabhängig von Musclin

Wie unter 3.15 beschrieben wurde eine gestörte Koimmunpräzipitation des GABA_A-Rezeptors mit dem Dyneinmotorkomplex in Abwesenheit von Musclin beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass der GABA_A-Rezeptor über eine Interaktion mit Musclin an Dynein bindet, beziehungsweise dass die Formation dieses Transportkomplexes durch Musclin begünstigt oder stabilisiert wird. Sollte Musclin außerdem für eine Interaktion des GABA_A-Rezeptors mit Myosin VI benötigt werden, so würde man in Abwesenheit von Musclin eine gestörte Koimmunpräzipitation auch dieser beiden Interaktionspartner erwarten. Um dies zu untersuchen, wurde Myosin VI aus Gehirnlisaten von adulten wildtypischen (+/+) sowie homozygoten (-/-) Musclin *Knockout* Mäusen, welche durch Zentrifugation bei 1.000 \times g geklärt wurden (S1), mit einem für die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1) spezifischen Antikörpers immunpräzipitiert. Als Kontrolle diente eine Präzipitation mit unspezifischen Immunglobulinen. Die Präzipitate wurden in Gegenwart von Triton-X-100 gewaschen und nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert. Unabhängig davon, ob Lysate wildtypischer (+/+) oder homozygoter (-/-) Musclin

Knockout Mäusen verwendet wurden, konnten ähnliche Konzentrationen von Myosin VI mit GABA_AR α 1 präzipitiert werden (Abb. 3.30 A, B). In den Kontrollen mit unspezifischen Immunglobulinen konnte Myosin VI nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass eine stabile Interaktion des GABA_A-Rezeptors mit Myosin VI unabhängig von Muskelin stattfindet und Muskelin daher vermutlich eine akzessorische Komponente des Transportkomplexes darstellt.

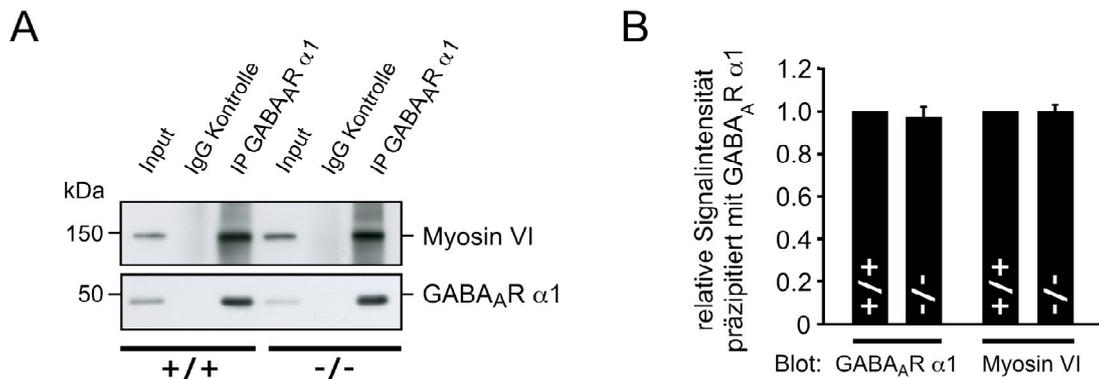


Abb. 3.30: Koimmunpräzipitation von Myosin VI mit dem GABA_A-Rezeptor erfolgt unabhängig von Muskelin. Immunpräzipitation mit Antikörpern spezifisch für GABA_AR α 1 und unspezifischen Immunglobulinen (IgG). Immundetektion von Myosin VI und GABA_AR α 1. (A) GABA_AR α 1 wird aus S1-Gehirn-Lysaten von wildtypischen (+/+) und homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen mit Myosin VI kopräzipitiert. Input: +/+ oder -/- S1-Gehirn-Lysat, kDa: Standard-Molekulargewicht in Kilodalton, IP: Immunpräzipitat. (B) Quantitative Analyse von A (n=4). Die GABA_AR α 1-Signalintensitäten von Lysaten homozygoter (-/-, 0,97 \pm 0,05) und wildtypischer (+/+, gleich 1 gesetzt) Mäuse sind ähnlich. Die Myosin VI-Koimmunpräzipitationen wurden anhand der GABA_AR α 1-Präzipitationen normalisiert. In den Lysaten von homozygoten Mäusen (-/-, 0,99 \pm 0,03) wird, verglichen mit denen von wildtypischen Mäusen (+/+, gleich 1 gesetzt), kein signifikanter Unterschied in der Signalintensität von Myosin VI festgestellt.

3.22 Anreicherung des GABA_A-Rezeptors an der Zelloberfläche nach Depletion von Muskelin

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes mit Dynein beschrieben (siehe Kapitel 3.7-3.9). Eine Inhibition der Dyneinmotor-Funktion sowie die Depletion Muskelins führten zu einer Akkumulation des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln (siehe Kapitel 3.10, 3.16). Eine Anreicherung des GABA_A-Rezeptors an der Zelloberfläche konnte nach Inhibition des Dynein-vermittelten Transportes jedoch nicht beobachtet werden (siehe Kapitel

3.11). Neben der Interaktion mit Dynein wurde zudem die Assoziation von Myosin VI mit dem Muskelin-GABA_A-Rezeptor Komplex gezeigt (siehe Kapitel 3.18-3.20).

Sollte Muskelin auch eine Rolle bei der Myosin VI-vermittelten Endozytose spielen, so würde man in Abwesenheit von Muskelin nicht nur die Anreicherung von GABA_A-Rezeptoren in intrazellulären Kompartimenten, sondern auch an der Zelloberfläche erwarten. Um dieses zu untersuchen, wurden mit Plasmamembran angereicherte Gehirnextrakte (P2) adulter homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse und derer wildtypischen (+/+) Wurfgeschwister mittels differentieller Zentrifugation hergestellt. Diese wurden nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Immobilisierung auf einer PVDF-Membran auf den Gehalt an GABA_A-Rezeptor hin untersucht. Die Membranen wurden mit Antikörpern spezifisch für die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1) und γ -Adaptin als Kontrolle detektiert (Abb 3.31 A, B). Plasmamembran angereicherte Gehirnextrakte homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse wiesen im Vergleich zu denen von wildtypischen (+/+) Mäusen einen signifikanten, in etwa 1,5-fach erhöhten GABA_AR α 1-Gehalt auf (Abb 3.31 A, B).

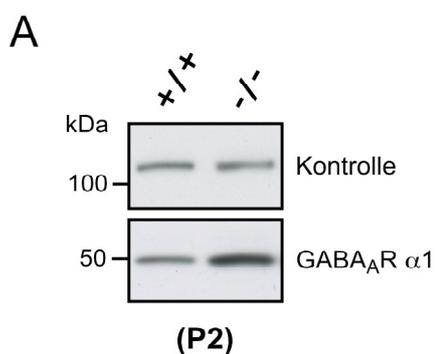
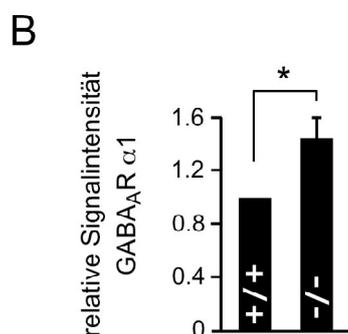


Abb. 3.31: Erhöhte GABA_A-Rezeptor Konzentration in Plasmamembran Fraktionen von Muskelin *Knockout* Mäusen.

Western Blot Analyse von mit Plasmamembran angereicherten Gehirnextrakten (P2) adulter wildtypischer (+/+) sowie homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse. (A) Immundetektion mit spezifischen Antikörpern für GABA_AR α 1 und γ -Adaptin als Ladekontrolle. kDa: Molekulargewicht des Standards in Kilodalton. (B) Darstellung der quantitativen Analyse von A (n=7). Die relative Signalintensität von GABA_AR α 1 ist in P2-Gehirnextrakten homozygoter (-/-, 1,44 \pm 0,15) Muskelin *Knockout* Mäuse, verglichen mit der von wildtypischen (+/+, gleich 1 gesetzt) Mäusen signifikant erhöht. Irrtumswahrscheinlichkeit: * $p < 0,05$.



Dieses Ergebnis lässt auf eine Anreicherung des GABA_A-Rezeptors an der Zelloberfläche nach Muskelin-Depletion schließen. Eine ähnliche Tendenz wurde bereits bei einer biochemischen Rezeptor-Degradations-Studie beobachtet (siehe Kapitel

3.17). Um den Gehalt an GABA_A-Rezeptor an der Zelloberfläche in einem zellulären Kontext zu untersuchen, wurden in einem zweiten, unabhängigen Experiment kultivierte, hippocampale Neurone von homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen und ihren wildtypischen (+/+) Wurfgeschwistern immungefärbt. Um ausschließlich die GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche zu detektieren, wurden lebende Neurone unter nicht permeabilisierenden Bedingungen mit einem Antikörper spezifisch für die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1) inkubiert (grün). In Übereinstimmung mit den biochemischen Analysen wiesen Neurone homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse verglichen mit wildtypischen (+/+) Neuronen signifikant erhöhte GABA_AR α 1 Signale an der Zelloberfläche von Soma und Neuriten auf (Abb. 3.32 A, B).

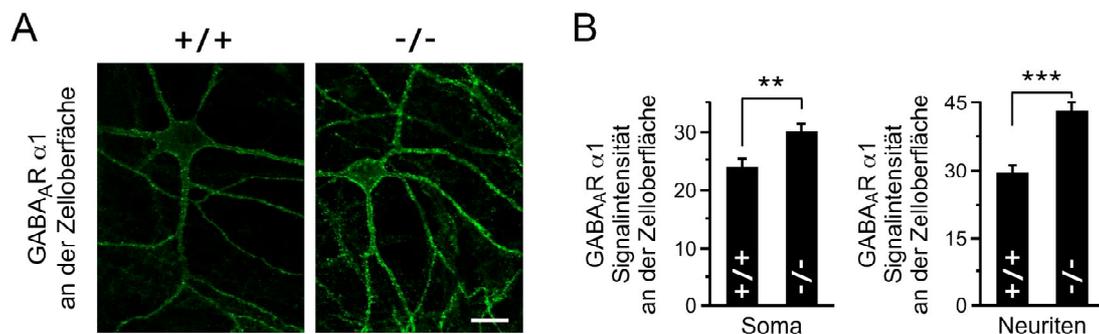


Abb. 3.32: Erhöhte GABA_A-Rezeptor Konzentration an der Zelloberfläche in Muskelin Knockout Mäusen. (A) Immunfärbung kultivierter hippocampaler Neurone (DIV 14) homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse und deren wildtypischen (+/+) Wurfgeschwistern unter nicht permeabilisierenden Bedingungen mit spezifischem Antikörper für die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (grün). (B) Darstellung der quantitativen Analyse von A (n=48). An der Zelloberfläche von Soma sowie Neuriten weisen Neurone homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse (30,00 ± 1,25 und 43,16 ± 1,69) signifikant erhöhte GABA_AR α 1 Signalintensitäten verglichen mit Neuronen aus wildtypischen (+/+) Mäusen (23,97 ± 1,28 und 29,62 ± 1,45) auf. Irrtumswahrscheinlichkeit: ** p < 0,01, *** p < 0,001. Größenbalken: 25 μ m.

Diese Ergebnisse weisen auf eine Akkumulation des GABA_A-Rezeptors an der Zelloberfläche hippocampaler Neurone in Abwesenheit von Muskelin hin. Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, kolokalisieren Muskelin und die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors bereits an den Synapsen hippocampaler Neurone. Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob Muskelin an intrazellulären Strukturen, die auf eine Beteiligung an frühen endozytotischen Prozessen hindeuten würden, nachgewiesen

werden kann. Hierzu wurde die Lokalisation Muskelins auf ultrastruktureller Ebene in hippokampalen Neuronen adulter Mäuse durch Elektronenmikroskopie mit einem für Muskelin spezifischen Antikörper untersucht. Muskelin Signale wurden hierbei an Einstülpungen der Plasmamembran hippokampaler Neurone detektiert (Abb. 3.33). Diese könnten sich abschnürende Vesikel darstellen. Die Beobachtungen lassen auf eine Rolle Muskelins in frühen endozytotischen Transportprozessen nach Internalisierung des GABA_A-Rezeptors von der Plasmamembran zu *sorting* Endosomen schließen.

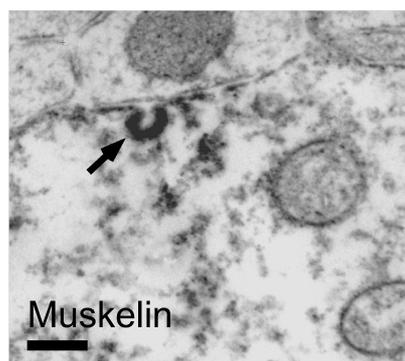


Abb. 3.33: Lokalisation von Muskelin an Einstülpungen der Plasmamembran. Elektronenmikroskopische Aufnahme hippokampaler Neurone von adulten Mäusen unter der Verwendung eines für Muskelin spezifischen Antikörpers. An Einstülpungen der Plasmamembran, welche sich abschnürende Vesikel darstellen könnten, werden Muskelin spezifische Signale nachgewiesen (Pfeil). Der Größenbalken entspricht 0,15 μm .

3.23 Degradation des GABA_A-Rezeptors aufgrund von Aktinfilament-abhängigem Transport

Die vorliegende Arbeit hat die Interaktion des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes mit Dynein sowie mit Myosin VI beschrieben (siehe Kapitel 3.7-3.9 und 3.18-3.20). Die Inhibition des Mikrotubuli-vermittelten Transportes führte zu einer Akkumulation des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln und zu seiner Anreicherung infolge verminderter Degradation (siehe Kapitel 3.10 und 3.14). Sollte die Endozytose des Muskelin-GABA_A-Rezeptor-Komplexes bereits von Aktin-basierten Transport unterhalb der Plasmamembran abhängen, dann müsste die Depolymerisation von Aktinfilamenten ebenfalls zu einer reduzierten Degradation des GABA_A-Rezeptors führen. Um dieses zu untersuchen, wurde erneut der Verlust von GABA_A-Rezeptoren in

Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Dazu wurden die Rezeptoren an der Zelloberfläche von hippocampalen Neuronen adulter wildtypischer Mäuse mit Biotin markiert und entweder sofort (Zeitpunkt 0 min) oder nach einer Inkubationsphase, welche die Internalisierung und Degradation des GABA_A-Rezeptors ermöglicht (Zeitpunkt 720 min), mit Streptavidin immunpräzipitiert. Während dieser Inkubationsphase wurden hippocampale Neurone entweder unbehandelt gelassen oder mit Zytochalasin D zur Depolymerisation von Aktinfilamenten (Shimada *et al.*, 2008) inkubiert. Nach mehrmaligen Waschen mit Triton-X-100 haltigem Puffer wurden die Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit spezifischen

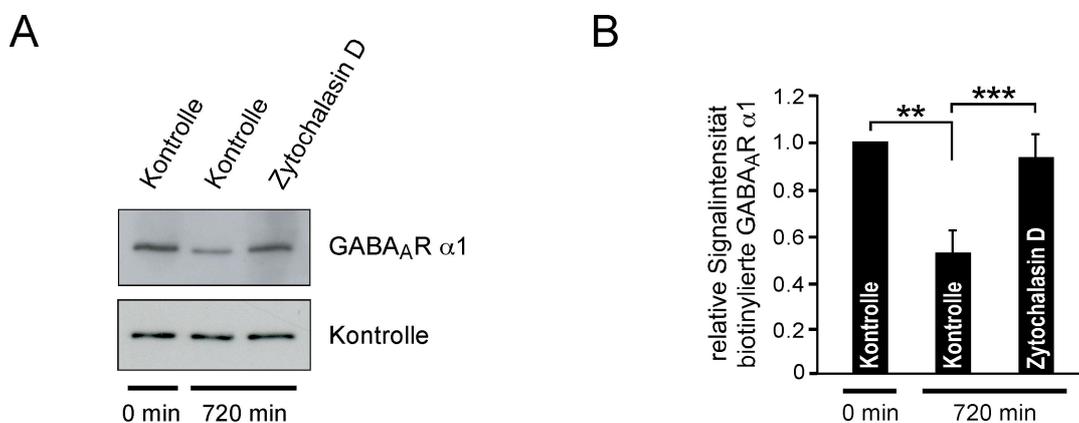


Abb. 3.34: Degradation von GABA_A-Rezeptoren aufgrund von Aktinfilament-abhängigem Transport. (A) Western Blot einer Immunpräzipitation biotinylierter Rezeptoren von hippocampalen Neuronen mit Streptavidin. Immundetektion mit Antikörpern spezifisch für GABA_ARα1 und Aktin als Kontrolle. (B) Quantitative Analyse von A (n=8). Die relative Signalintensität biotinylierter GABA_ARα1 am Zeitpunkt 0 min wurde gleich 1 gesetzt. Nach 720 min Inkubation werden in etwa 50 % der am Zeitpunkt 0 min biotinylierten GABA_ARα1 detektiert (0,52 ±0,09). In Gegenwart von 1μM Zytochalasin D (0,93 ±0,10) werden nach 720 min signifikant höhere Signalintensitäten biotinylierter GABA_ARα1 im Vergleich zur Kontrollbedingung nachgewiesen. Irrtumswahrscheinlichkeit: ***p* < 0,01, ****p* < 0,001.

Antikörpern für Aktin und die α1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_ARα1) detektiert. Zum Zeitpunkt 720 min wurden unter Kontrollbedingungen nur etwa 50 % der zuvor an Zeitpunkt 0 min mit Biotin markierten GABA_ARα1 präzipitiert (Abb. 3.34 A, B). Nach Depolymerisation von Aktinfilamenten mittels Zytochalasin D hingegen wurden ungefähr 90 % und damit signifikant mehr biotinylierte GABA_ARα1 als unter Kontrollbedingungen präzipitiert. Diese Beobachtung lässt auf einen Aktinfilament-

abhängigen Transport des GABA_A-Rezeptors schließen, der wie bereits beschrieben von Myosin VI vermittelt werden könnte (siehe Kapitel 3.18-3.20).

3.24 Reduzierte Internalisierung des GABA_A-Rezeptors nach Depletion von Muskelin

In Abwesenheit von Muskelin wurden erhöhte GABA_A-Rezeptor Konzentrationen an der Zelloberfläche von hippokampalen Neuronen beobachtet (Kapitel 3.22). Diese Anreicherung könnte sowohl auf einen erhöhten Transport zur Zelloberfläche und einen damit verbundenen Anstieg in der Exozytose des GABA_A-Rezeptors als auch auf eine reduzierte Endozytose des GABA_A-Rezeptors zurückzuführen sein. Um dies zu untersuchen, wurde die intrazelluläre Akkumulation derer GABA_A-Rezeptoren, welche sich zuvor an der Zelloberfläche befunden hatten, in Abhängigkeit von der Zeit analysiert. Hierfür wurden GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche von kultivierten hippokampalen Neuronen homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse und deren wildtypischer (+/+) Wurfgeschwister nach 14 bis 18 Tagen in Kultur mit einem Primärantikörper spezifisch für die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR α 1) markiert. Nach Entfernung der überschüssigen Antikörper erfolgte eine zweistündige Inkubationsphase. Diese Zeitspanne ist zu kurz, um die Degradation des GABA_A-Rezeptors (Kittler *et al.*, 2004), aber lang genug, um die Internalisierung zu ermöglichen (Goodkin *et al.*, 2005). An der Zelloberfläche verbliebene, mit Primärantikörper markierte GABA_AR α 1 wurden dann unter nicht permeabilisierenden Bedingungen mit dem ersten von zwei Sekundärantikörpern (grün) nachgewiesen. Nach Permeabilisierung der Zellmembran wurden internalisierte GABA_AR α 1 mit einem zweiten Sekundärantikörper (rot) detektiert. In Neuronen von wildtypischen (+/+) Mäusen konnte innerhalb des Zytoplasmas eine relativ hohe Anzahl internalisierter GABA_AR α 1 beobachtet werden (Abb. 3.35 A). In Neuronen von homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen hingegen wurden weitaus weniger Signale internalisierter GABA_AR α 1 nachgewiesen. Eine quantitative Analyse dieser Beobachtungen zeigte die signifikant erniedrigte intrazelluläre Akkumulationsrate von GABA_AR α 1 in Neuronen homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse verglichen mit wildtypischen (+/+) Neuronen. Dieses konnte sowohl für Soma als auch für Neuriten gezeigt werden (Abb. 3.35 B, C).

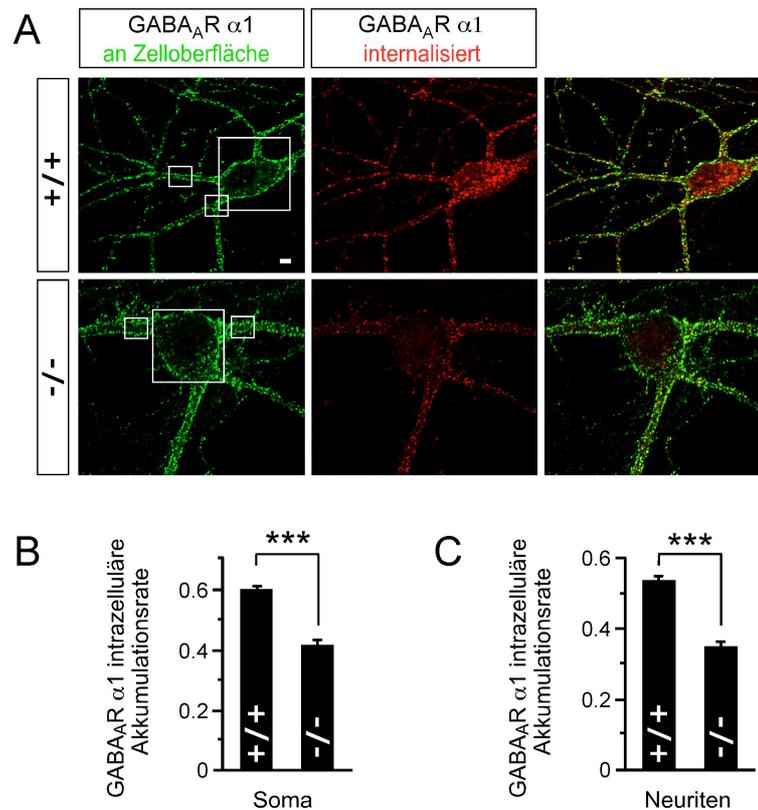


Abb. 3.35: Störung der GABA_A-Rezeptor-Internalisierung nach Depletion von Muskelin I. (A) Kultivierte hippocampale Neurone (DIV 16) wurden mit spezifischem Antikörper für GABA_ARα1 bei 4 °C inkubiert. Eine 2-stündige Internalisierungsphase bei 37 °C erlaubt die Detektion der zuvor markierten, an der Zelloberfläche verbliebenen GABA_ARα1 unter nicht permeabilisierenden, und der internalisierten GABA_ARα1 unter permeabilisierten Bedingungen. Neurone homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse weisen weniger Signale internalisierter GABA_ARα1 (rot) im Vergleich zu wildtypischen Neuronen (+/+) auf. (B, C) Darstellung der quantitativen Analyse von A (n=48). In den Kompartimenten Soma beziehungsweise Neuriten wird in den Neuronen homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse (0,42 ± 0,01 und 0,35 ± 0,01) verglichen mit Neuronen aus wildtypischen (+/+) Mäusen (0,60 ± 0,01 und 0,54 ± 0,01) eine signifikant erniedrigte intrazelluläre Akkumulationsrate von GABA_ARα1 beobachtet. Irrtumswahrscheinlichkeit: ****p* < 0,001. Größenbalken: 6 µm. Weiße Rechtecke: siehe Abb. 3.36.

Eine quantitative Auswertung durchschnittlicher Fluoreszenzintensitäten der Querschnitte (*linescan*) von Soma und Neuriten erbrachte ähnliche Ergebnisse. In wildtypischen (+/+) Neuronen konnten die höchsten Fluoreszenzsignale internalisierter GABA_ARα1 (rot) in der Mitte von Soma und Neuriten nachgewiesen werden, wohingegen Neurone homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse signifikant geringere Fluoreszenzsignale internalisierter GABA_ARα1 in der Mitte dieser Kompartimente

zeigten (Abb. 3.36 B). In den Neuronen homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse konnten zudem erhöhte Signalintensitäten von an der Zelloberfläche verbliebenen GABA_ARα1 (grün) beobachtet werden (vergleiche mit Kapitel 3.22). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die GABA_A-Rezeptor-Akkumulation an der Zelloberfläche in Abwesenheit von Muskelin auf eine gestörte Internalisierung und nicht auf einen erhöhten Transport des GABA_A-Rezeptors zur Zelloberfläche zurückzuführen ist.

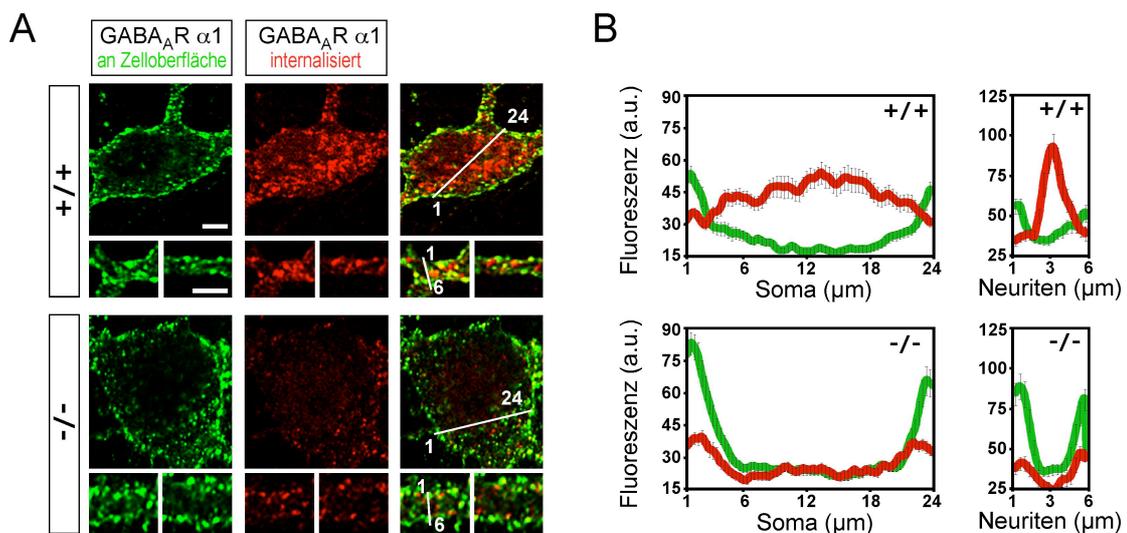


Abb. 3.36: Störung der GABA_A-Rezeptor-Internalisierung nach Depletion von Muskelin II. (A) Vergrößerungen der mit Rechtecken markierten Somata und Neurite hippocampaler Neurone aus Abb. 3.35 A. Neurone homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse weisen geringere Signale internalisierter GABA_ARα1 (rot) in der Mitte von Soma und Neuriten im Vergleich zu wildtypischen (+/+) Neuronen auf. (B) Quantitative Querschnittsanalyse (*linescan*) von Somata und Neuriten (beispielhaft dargestellt als weiße Linien in A, n=48). In Neuronen homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse wird in der Mitte entsprechender Kompartimente eine erniedrigte Fluoreszenz intrazellulärer GABA_ARα1 verglichen mit der von wildtypischen (+/+) Neuronen festgestellt. Der Anstieg der grünen Fluoreszenz an den Rändern von Soma und Neuriten Neuronen homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse spiegelt den erhöhten Gehalt von GABA_ARα1 an der Zelloberfläche wider. A.u.: willkürliche Einheiten, Größenbalken: 6 μm.

4 DISKUSSION

Muskelin wird im Nervensystem von Säugetieren exprimiert und wurde bereits als direkter Interaktionspartner der $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors beschrieben (siehe Kapitel 1.4.1 und 1.4.2). Auf struktureller Ebene verfügt Muskelin über unterschiedliche Interaktionsdomänen, die auf eine physiologische Funktion von Muskelin hindeuten (siehe Kapitel 1.4). Über eine Funktion Muskelins im Nervensystem von Säugetieren ist jedoch bislang nichts bekannt. Das Ziel der Arbeit war es daher, die biologische Funktion von Muskelin im Hinblick auf die beschriebene Interaktion von Muskelin mit dem GABA_A-Rezeptor zu untersuchen. Hierfür konnte erstmals eine Muskelin *Knockout* Mauslinie etabliert werden, bei der die Depletion von Muskelin im Gehirn von *Mus musculus* nachgewiesen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion Muskelins zu einer reduzierten Endozytose und verminderten Degradation von $\alpha 1$ -Untereinheiten enthaltenden GABA_A-Rezeptoren führt. Entsprechend wurde der gemeinsame retrograde Transport von Muskelin und der GABA_A-Rezeptor $\alpha 1$ -Untereinheit beobachtet. Die Assoziation des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes mit Motorproteinen konnte zum einen für das Aktinfilament-abhängige Motorprotein Myosin VI, als auch für das Mikrotubuli-abhängige zytoplasmatische Dynein gezeigt werden. Muskelin könnte daher einerseits an frühen endozytotischen Prozessen des GABA_A-Rezeptors vermittelt durch Myosin VI, aber auch an späten endozytotischen Prozessen vermittelt durch Dynein, beteiligt sein. Somit würde Muskelin ein Protein darstellen, das einen Transport von Neurotransmitterrezeptoren über unabhängige Motorprotein-Systeme entlang unterschiedlicher Zytoskelettelemente beeinflusst.

4.1 *Knockout des Mkl1 Gens in Mus musculus*

Der Mehrzahl der für Muskelin beschriebenen Interaktionspartner wurden Funktionen während der neuronalen Entwicklung beziehungsweise während der Synaptogenese des ZNS zugeschrieben.

So konnte in einer *Knockout* Mauslinie, in der Muskelin Interaktionspartner p39 und sein Homolog p35 ausgeschaltet wurden, eine Unterbrechung der Schichtung von Hippokampus, Kortex und Zerebellum beobachtet werden (Ko *et al.*, 2001). Dementsprechend sind die Mäuse perinatal letal. Für Muskelins Interaktionspartner RanBPM

wurde gezeigt, dass es die Differenzierung neuronaler Stammzellen und die Anzahl primärer dendritischer Fortsätze beeinflusst (Brunkhorst *et al.*, 2005). Muskelin ist zwar kein direkter Interaktionspartner von der extrazellulären-Matrix Komponente TSP1, es scheint aber in Verbindung mit TSP1 die Zelladhäsion durch Signalübertragung von der extrazellulären Matrix zum Zytoskelett zu vermitteln (Adams *et al.*, 1998). Wie andere Interaktionspartner Muskelins ist TSP1 an der neuronalen Entwicklung beteiligt. Es wird nur während embryonaler Entwicklungsstadien exprimiert und fördert die Synaptogenese im ZNS (Christopherson *et al.*, 2005).

Seinen Interaktionspartnern entsprechend, wird Muskelin auch während embryonaler Stadien und hier in großen Teilen des ZNS exprimiert (Tagnaouti *et al.*, 2007). Muskelin könnte daher ebenfalls eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung beziehungsweise Synaptogenese einnehmen. Zudem ist in *Mus musculus* nur ein einziges für Muskelin kodierendes Gen bekannt und es wurden hochkonservierte Orthologe in *Homo Sapiens*, *Rattus norvegicus* und *Drosophila melanogaster* identifiziert (Prag *et al.*, 2004). Muskelin-Orthologe sind darüber hinaus im Reich der vielzelligen Tiere (Metazoa) sowie der Pilze (Fungi) und in Protozoen konserviert.

Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass eine Depletion von Muskelin zur embryonalen Letalität führen könnte. Nach der Depletion von Muskelin wurden jedoch keine augenscheinlichen Unterschiede von wildtypischen (+/+) und homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen beobachtet. Auch die Morphologie des Gehirns nach Depletion von Muskelin war in adulten Mäusen normal. Dabei hatte die Depletion von Muskelin keinen Einfluss auf die Schichtung von Hippokampus und Zerebellum, wohingegen die Depletion von p39 und p35 wie erwähnt zur Abwesenheit dieser Schichtung und der perinatalen Letalität führte. Daher existieren entweder Proteine mit zu Muskelin analogen Funktionen oder Muskelin scheint nicht wesentlich an der neuronalen Entwicklung beteiligt zu sein. Hiermit übereinstimmend wurden Muskelin-Transkripte vermehrt im Gehirn von adulten Mäusen nachgewiesen (Tagnaouti *et al.*, 2007). Hier konnte eine entwicklungsabhängige Expressionsstudie in kultivierten hippocampalen Neuronen Muskelin auch verstärkt in einem Zeitfenster nachweisen, in dem Synapsen gebildet wurden und nunmehr reifen. Eine Funktion von Muskelin könnte daher eher im bereits entwickelten ZNS an etablierten, funktionellen Synapsen zu finden sein.

4.2 Aufhellung der Fellfarbe bei Muskelin *Knockout* Mäusen und Kottransport von Muskelin mit dem GABA_A-Rezeptor

Überraschenderweise wurde bei homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen eine Aufhellung der Fellfarbe beobachtet. Zunächst entwickeln homozygote (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse nach Geburt eine schwarze Fellfarbe, entsprechend wildtypischer (+/+) Wurfgeschwister, jedoch setzt die Aufhellung ihrer Fellfarbe etwa zwei Wochen nach der Geburt ein. Nach sechs weiteren Wochen weisen sie eine deutlich hellere Fellfarbe auf. Dieses lässt vermuten, dass aufgrund einer Depletion von Muskelin entweder die Reifung oder aber die Verteilung von Melanosomen in Pigmentzellen (Melanozyten) der Epidermis gestört ist. Melanosomen sind intrazelluläre Organellen die Melanin-Pigmente synthetisieren und speichern können (Coudrier, 2007, Raposo und Marks, 2007). Sie entstehen aus "undifferenzierten", noch nicht pigmentierten Organellen und reifen zu pigmentierten Organellen, die mit den späten Endosomen und Lysosomen verwandt sind. Dieser Reifungsprozess beinhaltet den sequentiellen Transport von bestimmten Faktoren nach ihrer Endozytose von der Plasmamembran über frühe Endosomen zu sich entwickelnden Melanosomen. Die gereiften Melanosomen werden danach vom Soma in die Aktinfilament-reichen Ausläufer der Melanozyten transportiert und in einem noch nicht bekannten Prozess zu den benachbarten Keratinozyten transferiert (Wu *et al.*, 2002). Beide Prozesse, die Reifung sowie die Translokation von gereiften Melanosomen in die dendritischen Ausläufer der Melanozyten, hängen von bidirektionalem Transport entlang der Mikrotubuli ab und werden von Kinesin- und Dynein-Motorproteinen vermittelt. Zudem sind in den Aktinfilament-reichen Spitzen der dendritischen Ausläufer Myosin-Motorproteine und Proteine der Rab-Familie kleiner GTPasen an einem Transport der Melanosomen entlang von Aktinfilamenten beteiligt (Soldati und Schliwa, 2006, Coudrier, 2007, Raposo und Marks, 2007). In diesem Zusammenhang ist es auch erwähnenswert, dass Tiere die ihre Farbe in Abhängigkeit von externen Stimuli schnell verändern können (wie z.B. Amphibien, Reptilien oder "Fische"), dies durch Regulation der intrazellulären Verteilung von Melanosomen in Melanophoren realisieren (Maniak, 2003, Rodionov *et al.*, 2003). Hieran sind ebenso Kinesin-, Dynein- und Myosin-Motorproteine beteiligt, um Melanosomen durch Transport entlang von Mikrotubuli und Aktinfilamenten im Soma zu akkumulieren oder aber in der Zellperipherie zu verteilen. Aufgrund der beobachteten Aufhellung der Fellfarbe homozygoter (-/-) Muskelin *Knockout* Mäuse

ist es nicht unwahrscheinlich, dass Muskelin in Melanozyten beziehungsweise Melanophoren eine Rolle bei der Reifung oder Verteilung von Melanosomen übernimmt. In Übereinstimmung mit dieser möglichen Funktion Muskelins in nicht-neuronalem Gewebe werden Muskelin-Transkripte in allen Geweben von Säugetieren exprimiert (Prag *et al.*, 2007). Zudem werden konservierte Muskelin-Orthologe wie erwähnt im Reich der vielzelligen Tiere (Metazoa) gefunden, was mit einer möglichen Funktion von Muskelin in Melanophoren der Amphibien, Reptilien beziehungsweise "Fischen" übereinstimmt. Interessanterweise wurden im Reich der Pilze (Fungi), wo Muskelin ebenfalls konservierte Orthologe aufweist, ähnliche Mechanismen der Reifung und Verteilung von Melanosomen beobachtet (Franzen *et al.*, 2008). Muskelin könnte daher bei einem evolutionär konservierten Mechanismus der Melanosomen-Reifung und -Verteilung eine Rolle spielen. Eine detaillierte Untersuchung des Fellfarben-Phänotyps von Muskelin *Knockout* Mäusen könnte wesentlich zum Verständnis der Transportprozesse während der Reifung und Verteilung von Melanosomen in Melanozyten der Säugetiere beitragen.

Die Hypothese, dass Muskelin an Transportprozessen von Melanosomen in Melanozyten beteiligt ist, wird von den beobachteten Bewegungen Muskelins in neuronalem Gewebe unterstützt. Mittels *Time-lapse* Videomikroskopie konnten in kultivierten hippokampalen Neuronen sowohl anterograde als auch retrograde Bewegungen von dem Fusionsprotein mRFP-Muskelin in den Neuriten beobachtet werden. Außerdem wurde Muskelin auf ultrastruktureller Ebene an den Membranen von intrazellulären Vesikeln nachgewiesen. Dieses deutet auf einen Motorprotein-vermittelten Transport Muskelins hin, da viele synaptische Proteine wie zum Beispiel Neurotransmitterrezeptoren in Transportvesikeln entlang der Zytoskelettelemente transportiert werden (Kennedy und Ehlers, 2006). Im Hinblick auf den direkten Interaktionspartner von Muskelin, die $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors, konnten zudem gemeinsame Bewegungen der Fusionsproteine mRFP-Muskelin und GABA_AR $\alpha 1$ -EGFP beobachtet werden. Der Kotransport dieser beiden Proteine konnte nur retrograd in Richtung des Somas von hippokampalen Neuronen nachgewiesen werden. Dieses lässt vermuten, dass eine Funktion Muskelins in einem gemeinsamen Transportkomplex von GABA_A-Rezeptor und Muskelin auf retrograde Bewegungen des GABA_A-Rezeptors beschränkt ist und eventuell dem Transport zu Organellen des Proteinabbaus dient.

Der Abbau von transmembranen Proteinen findet meist in Lysosomen statt, wobei Membran-assoziierte und lösliche Proteine vorwiegend im Proteasom abgebaut werden (Ciechanover, 2006). Beide Systeme sind daher an der dynamischen Regulation des Umsatzes postsynaptischer Proteine beteiligt (Ehlers, 2003, Lee *et al.*, 2004, Kennedy und Ehlers, 2006). Dabei sind Proteasomen und Lysosomen zwar teilweise in den Neuriten lokalisiert, der größte Teil befindet sich jedoch im Zellsoma (Jadot *et al.*, 1999, Adori *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass der GABA_A-Rezeptor nach seiner Endozytose in Lysosomen abgebaut wird (Kittler *et al.*, 2004). Daher könnten die beobachteten retrograden Bewegungen des GABA_A-Rezeptors mit Muskelin einen Transport aus Dendriten zu Lysosomen im Zellsoma darstellen. Aufgrund der Geschwindigkeit der beobachteten Bewegungen konnten passive Diffusionsvorgänge als Ursache der Bewegungen ausgeschlossen werden. Vielmehr entsprechen diese einer Geschwindigkeit aktiver, Motorprotein-vermittelter Transportvorgänge (King und Schroer, 2000, Lardong *et al.*, 2009). Übereinstimmend hiermit wurde bereits berichtet, dass Motorproteine den Transport von Transmembranrezeptoren nach ihrer Endozytose bis zum Zellsoma vermitteln können (Aniento *et al.*, 1993, Burkhardt *et al.*, 1997, Driskell *et al.*, 2007, Traer *et al.*, 2007). Die Aufhellung der Felfarbe von Muskelin *Knockout* Mäusen sowie der beobachtete Kotransport von Muskelin zusammen mit seinem Interaktionspartner dem GABA_A-Rezeptor lassen auf eine Beteiligung Muskelins an vesikulären Transportvorgängen schließen. Muskelin scheint somit an Motorprotein-vermittelten Transportprozessen in neuronalen sowie eventuell nicht-neuronalen Geweben beteiligt zu sein.

4.3 Interaktion des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes mit den Motorproteinen Myosin VI und zytoplasmatischem Dynein

Aufgrund des Phänotyps von Muskelin *Knockout* Mäusen und dem Kotransport von Muskelin mit der GABA_A-Rezeptor α 1-Untereinheit wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die hierfür verantwortlichen molekularen Motorproteine identifiziert. Zunächst konnte eine Interaktion von zytoplasmatischem Dynein mit dem GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplex nachgewiesen werden. Hierfür wurde ein Antikörper spezifisch für die Dynein Intermediäre Kette verwendet, weil diese einen essentiellen Bestandteil des Dyneinmotorkomplexes darstellt (Vallee *et al.*, 2004). Diese Interaktion konnte

mit Hilfe von Koimmunpräzipitation der Dynein Intermediären Kette mit Muskelin und dem GABA_A-Rezeptor gezeigt, und mittels *Sucrosegradienten-Dichtezentrifugation* bestätigt werden. Da für beide Experimente mit intrazellulären Vesikeln angereicherte Gehirnextrakte eingesetzt wurden, lässt sich ableiten, dass die drei Interaktionspartner in einem Proteinkomplex an Transportvesikeln vorliegen. Dieses entspräche einer Motorfunktion von Dynein und der Gegebenheit, dass Neurotransmitterrezeptoren über Transportvesikel bewegt werden (Kennedy und Ehlers, 2006). Immunfärbungen konnten außerdem zeigen, dass die drei Interaktionspartner in einer intrazellulären Umgebung von hippokampalen Neuronen partiell kolokalisieren. Zytoplasmatisches Dynein bewegt sich entlang der Mikrotubuli in Richtung der minus-Enden (Vallee *et al.*, 2004). Da Mikrotubuli im Axon sowie in distalen Dendriten uniform mit ihren minus-Enden in Richtung des Somas ausgerichtet sind, ist Dynein als der verantwortliche Motor für retrograden Langstreckentransport zum Zellsoma beschrieben (Campenot und MacInnis, 2004). Es ist daher wahrscheinlich, dass der Dyneinmotor-komplex für den beobachteten retrograden Transport des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes zuständig ist. Hiermit übereinstimmend konnte ebenfalls der retrograde Kotransport von Muskelin mit dem Dyneinmotorkomplex beobachtet werden (Sven Loebrich, persönliche Kommunikation).

Im Hinblick auf die Interaktion von Muskelin mit dem Dyneinmotorkomplex ist auch die Domänenstruktur von Muskelin interessant: Der N-Terminus Muskelins weist ein Lissencephalie 1-Homologie-Motiv (LisH) und ein C-terminal von LisH-Motiv (CTLH) auf (Prag *et al.*, 2004). Diese beiden Motive wurden ursprünglich in dem Protein Lis1 identifiziert. Lis1 kann über sein LisH-Motiv sowohl an Mikrotubuli als auch an den Dyneinmotorkomplex binden (Sapir *et al.*, 1997, Smith *et al.*, 2000, Vallee *et al.*, 2000). Muskelin scheint *in vitro* allerdings nicht direkt an Mikrotubuli zu binden (Prag *et al.*, 2004) sondern könnte indirekt über die beschriebene Interaktion mit Dynein an Mikrotubuli gebunden werden. Jüngere Studien zeigten, dass Lis1 in einem Komplex mit Dynein und KIF5 vorliegt und eine der Aufgaben darin besteht, den Dyneinmotor-komplex an Mikrotubuli plus-Enden heranzuführen, um den retrograden Transport zu initiieren (Yamada *et al.*, 2008). Ein weiterer Bestandteil dieses Transportkomplexes scheinen die verwandten Proteine NudE sowie NudEL zu sein (Feng *et al.*, 2000, Sasaki *et al.*, 2000). Die beiden Proteine verfügen ebenfalls über das LisH-Motiv und sie können entsprechend direkt mit dem Dyneinmotorkomplex interagieren. NudEL

scheint dabei Lis1 und damit auch den Dyneinmotorkomplex zu Mikrotubuli plus-Enden zu rekrutieren um retrograden Dynein-vermittelten Transport zu gewährleisten (Li *et al.*, 2005). Interessanterweise führte die Depletion von NudEL in kultivierten Neuronen der Hinterwurzelganglien zu einem reduzierten retrograden Transport von Endosomen in Richtung des Zellsomas (Zhang *et al.*, 2009). Dies resultierte in einer verzögerten Fusion von endosomalen und lysosomalen Kompartimenten, was die vorwiegend somatische Akkumulation von Lysosomen verringerte. Übereinstimmend wurden ähnliche Störungen später endozytotischer Prozesse nach direkter Inhibition der Dynein-Motorfunktion beobachtet (Driskell *et al.*, 2007, Traer *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2009).

Die Gegebenheit, dass ein Großteil der Proteine die das LisH-Motiv enthalten, an der Regulation von Mikrotubuli-Dynamik beteiligt sind und entweder direkt oder indirekt an Dynein binden (Emes und Ponting, 2001), stimmt mit den Beobachtungen überein, dass Muskelin mit dem Dyneinmotorkomplex interagiert und dementsprechend retrograd transportiert wird. Inwieweit Muskelin direkt mit Bestandteilen des Dyneinmotorkomplexes interagiert, konnte durch die Interaktionsstudien dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Die zuvor erwähnten Interaktionen LisH-Motiv enthaltender Proteine lassen aber vermuten, dass eine Bindung von Muskelin an Dynein direkt über das LisH-Motiv Muskelins vermittelt werden könnte.

Ein anderes Protein mit LisH-Motiv ist RanBPM, ein weiterer direkter Interaktionspartner von Muskelin (Umeda *et al.*, 2003). RanBPM liegt wie Muskelin im Nukleus sowie im Zytoplasma vor, wo es unter anderem am MTOC akkumuliert (Nakamura *et al.*, 1998, Kobayashi *et al.*, 2007, Tagnaouti *et al.*, 2007). Es wurde berichtet, dass ein Komplex aus Muskelin und RanBPM zytoplasmatische Signale in den Nukleus vermittelt. (Valiyaveetil *et al.*, 2008). Bemerkenswerterweise wurde in dieser Studie beobachtet, dass Muskelins LisH-Motiv für die Lokalisation von Muskelin im Nukleus verantwortlich ist. In Anbetracht der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Interaktion von Muskelin mit dem Dyneinmotorkomplex ist es möglich, dass diese Abhängigkeit der Kernlokalisation Muskelins von seinem LisH-Motiv auf einen gestörten Transport zurückzuführen ist. Wenn Muskelin retrograd in die Richtung des MTOCs über eine Interaktion seines LisH-Motivs mit Dynein transportiert wird, dann sollte nach Störung dieser Bindestelle eine geringere Muskelin Konzentration am MTOC und damit in der Nähe zum Nukleus vorliegen. Ähnliche Systeme wurden beschrieben:

Importine vermitteln einen Import der entsprechenden Fracht in den Nukleus in Abhängigkeit von der kleinen GTPase Ran, einem Interaktionspartner von RanBPM (Umeda *et al.*, 2003, Perry und Fainzilber 2009). Zu importierende Signalmoleküle, die sich in Dendriten oder dem Axon befinden, werden zuvor in Proteinkomplexen mit Importinen durch Dynein aktiv in das Zellsoma transportiert. Eine Störung der Dyneinmotor-Funktion führt daher zu einem verringerten Import der Fracht in den Nukleus (Perry und Fainzilber 2009).

Im Hinblick auf Muskelins Interaktionspartner, den GABA_A-Rezeptor, ist das zuvor beschriebene Protein Lis1, das über sein LisH-Motiv an Dynein bindet, ebenso von Interesse. Mutationen in dem für Lis1 kodierenden Gen sind für eine Ausbildung des Miller-Dieker-Lissencephalie-Syndroms mitverantwortlich (Morris *et al.*, 1998). Bei der Krankheit kommt es unter anderem zum *Status epilepticus* und zum frühzeitigen Tod. Heterozygote (+/-) Lis1 *Knockout* Mäuse weisen Defekte in der synaptischen Transmission des Hippokampus auf, wobei das Gleichgewicht von inhibitorischer zu exzitatorischer Transmission gestört ist, was in erhöhter neuronaler Erregbarkeit und daher in epileptischen Krampfanfällen resultiert (Fleck *et al.*, 2000). Auch GABA_A-Rezeptoren werden wichtige Rollen bei der Epilepsie zugeteilt. In Mausmodellen für *Status epilepticus* sowie bei Patienten konnten Störungen intrazellulärer Transportprozesse des GABA_A-Rezeptors und veränderte Rezeptor-Konzentrationen an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Benarroch, 2007). Mutationen des Lis1 Allels in *C. elegans* (pnm-1) führen ebenfalls zu einer gestörten GABAergen Transmission (Williams *et al.*, 2004). Interessanterweise konnte dieser Effekt durch Inhibition des Dyneinmotorkomplexes nachgeahmt werden, was die Beobachtung unterstützt, dass der GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplex retrograd transportiert wird und mit Dynein interagieren kann. In Muskelins direktem Interaktionspartner, die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors konnten zudem bestimmte Mutationen bei Patienten mit *Status epilepticus* identifiziert werden (Cosette *et al.*, 2002, Maljevic *et al.*, 2006). Obwohl Muskelin *Knockout* Mäuse keine offensichtlichen epileptischen Symptome aufweisen wäre es vorstellbar, dass der Transport des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes auf epileptische Aktivität Einfluss nimmt. Eine genauere Untersuchung dieser Mäuse könnte zum Verständnis der molekularen Prozesse in dem Krankheitsbild beitragen. Mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen wurde die Funktion von Muskelin innerhalb des GABA_A-Rezeptor-Muskelin-Dynein Komplexes untersucht. Eine Möglichkeit wäre,

dass Muskelin ein akzessorisches Protein des Transportkomplexes darstellt, dem die Aufgabe zukommt über andere Proteine den Dyneinmotorkomplex zu rekrutieren um retrograden Transport zu initiieren. Hierbei könnten die zuvor beschriebenen Dynein-Interaktionspartner Lis1, NudE oder NudEL eine Rolle spielen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass Muskelin eine Adapterfunktion innerhalb des Transportkomplexes einnimmt und sozusagen als ein "Brückenprotein" fungiert, welches die Bindung von GABA_A-Rezeptor an Dynein vermittelt. Dementsprechend wurden reduzierte Mengen des GABA_A-Rezeptors mit der Dynein Intermediären Kette koimmunpräzipitiert, wenn Extrakte aus homozygoten (-/-) verglichen mit denen aus wildtypischen (+/+) Muskelin *Knockout* Mäusen verwendet wurden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Muskelin die Interaktion des GABA_A-Rezeptors mit Dynein stabilisiert und somit einen essentiellen Bestandteil des Transportkomplexes darstellen könnte. Indem Muskelin als ein Adapterprotein fungiert, könnte es die Spezifität des GABA_A-Rezeptor Transports gewährleisten und die Fracht zu bestimmten Bestimmungsorten steuern. Ein ähnlicher tripartiter Transportkomplex wurde dabei im Rahmen des Motorprotein-vermittelten Transports der Melanosomen beschrieben. Der Transport von Melanosomen entlang der Aktinfilamente hängt von einem Komplex bestehend aus dem Motorprotein Myosin Va, der kleinen GTPase Rab27a und Melanophilin ab (Wu *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Melanophilin in diesem Komplex die Interaktion des melanosomalen Rezeptorproteins Rab27a mit dem Motorprotein Myosin Va vermittelt und daher als ein Adapterprotein fungiert. Die Wichtigkeit jeder einzelnen Komponente dieses Transportkomplexes zeigt auch die phänotypische Ähnlichkeit von Mäusen, in denen die für Myosin Va, Melanophilin und Rab27a kodierenden Gene Mutationen tragen (Coudrier, 2007, Raposo und Marks, 2007). Bei diesen sogenannten *dilute*-, *leaden*- beziehungsweise *ashen*- Mäusen wird eine Aufhellung der Fellfarbe beobachtet, die auf gestörten Transport der Melanosomen zurückzuführen ist. Wie bereits diskutiert, weisen Muskelin *Knockout* Mäuse auch eine ähnliche Aufhellung der Fellfarbe auf. Dies unterstützt die Hypothese, dass Muskelin bei Motorprotein-vermitteltem Transport als ein Adapter fungieren kann. Zudem wäre es auch denkbar, dass Muskelin eine Interaktion von Melanosomen mit Dynein in Melanozyten vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass unreife Melanosomen über den Transport durch Dynein während ihres Reifeprozesses im Zellsoma akkumulieren (Watabe *et al.*, 2008). Dieser Transport gewährleistet, dass Melanosomen mit

Proteinen ausgestattet werden können, die sie für Reifung und Pigment-Biosynthese benötigen. Eine Unterbrechung dieses Dynein-vermittelten Transports sollte daher zu der beobachteten Aufhellung von Muskelin *Knockout* Mäusen führen. In Übereinstimmung wurde eine Aufhellung der Melanophoren von Fischen nach Inhibition des Dynein-vermittelten Transports beobachtet (Maniak, 2003, Rodionov *et al.*, 2003). Muskelin *Knockout* Mäuse könnten daher ein Mausmodell zur Untersuchung des Dynein-vermittelten Transports von Melanosomen in Säugetieren darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden auch transgene Mäuse, bei denen Dynein-vermittelter Transport gestört ist, untersucht. Da das transgene Konstrukt nur in den Neuronen exprimiert wird, eignen sich diese Tiere nicht für Untersuchungen des Melanosomen-Transports und weisen dementsprechend eine normale Fellfarbe auf.

Neben der Interaktion von Dynein mit dem GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplex konnte die Interaktion mit dem unkonventionellen Myosin VI nachgewiesen werden. Diese Interaktion konnte durch Koimmunpräzipitationen aller drei Proteine gezeigt werden und wurde mittels *Sucrosegradienten-Dichtezentrifugation* bestätigt. Da für beide Experimente mit intrazellulären Vesikeln angereicherte Gehirnextrakte verwendet wurden, scheinen die drei Interaktionspartner in einem Proteinkomplex an Transportvesikeln vorzuliegen. Immunfärbungen konnten zudem zeigen, dass alle drei Interaktionspartner in einer intrazellulären Umgebung von hippokampalen Neuronen partiell kolokalisieren. Die Myosin-Motorproteine bewegen sich entlang von Aktinfilamenten. Da sich Mikrotubuli oft nicht bis unter die Zelloberfläche erstrecken, wird vermutet, dass viele Transmembranproteine über Aktinfilamente zur, sowie von der Plasmamembran weg, transportiert werden (Bridgman, 2004). Aktinfilamente bilden unterhalb der Plasmamembran ein Aktinzytoskelett und in den neuronal funktionell wichtigen Bereichen wie Synapsen weisen sie Polarität auf, indem ihre minus-Enden in Richtung Zytoplasma gerichtet sind (Lewis und Bridgman, 1992, Svitkina *et al.*, 1997). Myosine bewegen sich meist vom minus- zum plus-Ende der Aktinfilamente, nur die Bewegung von Myosin VI erfolgt entgegengesetzt zum minus-Ende und deswegen retrograd in Richtung des Zytoplasmas (Wells *et al.*, 1999). Myosin VI ist an der Formation von Clathrin-umhüllten-Vesikeln (CCV) beteiligt (Biemesderfer *et al.*, 2002) sowie am Transport der Vesikel durch die Diffusionsbarriere des Aktin-reichen zellulären Kortex nach Entfernung der Clathrin-Hülle (Aschenbrenner *et al.*, 2004). So kann Myosin VI endozytotische Vesikel von der Plasmamembran zu frühen bzw.

sorting Endosomen und damit in die Nähe der Mikrotubuli-abhängigen Motorproteine transportieren (Aschenbrenner *et al.*, 2003). Eine Funktion der Bindung des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes an Myosin VI könnte daher in seinem retrograden Transport durch das submembrane Aktinzytoskelett bestehen.

Im Hinblick auf die Interaktion von Muskelin mit Myosin VI sind Muskelins Kelch-Motive interessant. Diese befinden sich am C-Terminus von Muskelin in sechsfacher Wiederholung und falten sich zu einer β -Propeller-Domäne (Prag *et al.*, 2003). Von anderen Mitgliedern der Kelch-Wiederholungen-Superfamilie ist bekannt, dass sie entweder direkte oder indirekte Interaktionen mit Aktinfilamenten vermitteln können (Adams *et al.*, 2000). Muskelin scheint allerdings *in vitro* nicht direkt an Aktin zu binden (Prag *et al.*, 2004), könnte aber indirekt über die beschriebene Interaktion mit Myosin VI mit Aktinfilamenten assoziiert sein. Diese Vermutung unterstützend, wurde von der Kolokalisation Muskelins mit Aktinfilamenten berichtet (Ledee *et al.*, 2005).

Bemerkenswerterweise wurde für Myosin VI wie auch für Muskelin eine Lokalisation im Nukleus nachgewiesen (Vreugde *et al.*, 2006, Valiyaveetil *et al.*, 2008). Beide Proteine scheinen dabei verwandte Funktionen im Nukleus zu erfüllen: Myosin VI scheint hier das migratorische Potential von Krebszellen zu regulieren und Muskelin scheint die Zelladhäsion sowie -morphologie von adhären Muskel- sowie Epithelzellen zu beeinflussen (Vreugde *et al.*, 2006, Valiyaveetil *et al.*, 2008).

Inwieweit Muskelin direkt an die Bestandteile des Myosin VI-Motorkomplexes bindet, konnte durch Interaktionsstudien dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen wurde aber erneut untersucht, ob Muskelin den tripartiten Proteinkomplex, wie für die Interaktion mit Dynein gezeigt, stabilisieren kann. Wenn Muskelin als ein Adapterprotein im GABA_A-Rezeptor-Muskelin-Myosin VI Komplex fungiert, dann sollte die Koimmunpräzipitation vom GABA_A-Rezeptor mit Myosin VI in Abwesenheit von Muskelin gestört sein. Tatsächlich wurden aber ähnliche Mengen des GABA_A-Rezeptors mit Myosin VI koimmunpräzipitiert, wenn Extrakte aus homozygoten (-/-) oder wildtypischen (+/+) Muskelin *Knockout* Mäusen benutzt wurden. Muskelin scheint daher eher eine akzessorische Komponente des GABA_A-Rezeptor-Myosin VI Komplexes zu sein und seine Aufgabe könnte darin bestehen, andere für die Interaktion benötigte Proteine zu rekrutieren oder eine retrograde Bewegung zu initiieren. Kandidaten für diese Rolle könnten die Proteine Dab2 sowie GIPC sein (Dance *et al.*, 2004). Dab2 bindet an Clathrin und scheint Myosin VI zu naszierenden

CCVs zu rekrutieren, wohingegen GIPC Myosin VI zu Vesikeln nach Entfernung ihrer Clathrin-Hülle rekrutiert. Dab 2 scheint hierbei die Funktionen eines Adapterproteins einzunehmen, indem es die Interaktion von Myosin VI mit Clathrin vermittelt. Über diesen tripartiten Transportkomplex wird zum Beispiel die Endozytose des transmembranen Proteins CFTR gewährleistet (Swiatecka-Urban *et al.*, 2004). Es wäre vorstellbar, dass der GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplex über ein ähnliches System endozytiert wird, da sowohl GIPC als auch Dab2 in Neuronen des ZNS exprimiert werden (Huang *et al.*, 2007, Yi *et al.*, 2007).

4.4 Myosin VI und der Einfluss von Muskelin auf die Endozytose des GABA_A-Rezeptors

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Interaktion des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes mit dem Motorprotein Myosin VI beschrieben. Wie zuvor erwähnt bewegt sich Myosin VI entlang der Aktinfilamente des zellulären Kortex in Richtung des Zytoplasmas und vermittelt die Endozytose transmembraner Proteine nach deren Internalisierung (Soldati und Schliwa, 2006). Muskelin könnte daher an der Endozytose des GABA_A-Rezeptors beteiligt sein. In Übereinstimmung mit einer Rolle Muskelins in frühen endozytotischen Prozessen wurden in dieser Arbeit erhöhte Konzentrationen der $\alpha 1$ -Untereinheit enthaltenden GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche in der Abwesenheit von Muskelin nachgewiesen. Diese Anreicherung an der Plasmamembran konnte durch die Analyse von Plasmamembran angereicherten Extrakten gezeigt und durch die Immunfärbung lebender hippocampaler Neurone bestätigt werden. Eine ähnliche Tendenz wurde beobachtet, wenn die GABA_A-Rezeptor-Konzentration an der Zelloberfläche mittels Biotin-Markierung und Koimmunpräzipitation in Abwesenheit Muskelins bestimmt wurde. Diese Beobachtungen lassen auf eine Funktion Muskelins während früher endozytotischer Prozesse des GABA_A-Rezeptors schließen und sie werden zudem durch die subzelluläre Verteilung von Muskelin unterstützt. So konnte unter anderen in hippocampalen Neuronen gezeigt werden, dass Muskelin vermehrt am zellulären Kortex lokalisiert ist (Tagnaouti *et al.*, 2007). Außerdem konnte Muskelin in der vorliegenden Arbeit auf ultrastruktureller Ebene in Assoziation mit Membranen von sich abschnürenden Vesikeln der Plasmamembran nachgewiesen werden. GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche werden kontinuier-

lich durch Clathrin-vermittelte Endozytose ausgetauscht. Währenddessen interagieren bestimmte Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors mit dem Protein AP2, das sie zu Clathrin-ummantelten-Gruben rekrutiert (Kittler *et al.*, 2000). Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose führt daher zur verminderten Internalisierung und Anreicherung des GABA_A-Rezeptors an der Zelloberfläche (Kittler *et al.*, 2000, Herring *et al.*, 2003, van Rijnsoever *et al.*, 2005). Wie bereits erwähnt, kann Myosin VI über das Adapterprotein Dab2 mit Clathrin interagieren (Dance *et al.*, 2004). Dieses könnte einen kollektiven Transport Clathrin-umhüllter-Vesikel unabhängig von den enthaltenen Transmembranproteinen der vesikulären Membran gewährleisten. Nach der Entfernung der Clathrin-Hülle könnte Muskelin dazu beitragen, dass Vesikel die den GABA_A-Rezeptor enthalten, spezifisch über Myosin VI durch den Aktin-reichen zellulären Kortex weitertransportiert werden. Die beobachtete Akkumulation des GABA_A-Rezeptors an der Zelloberfläche nach Depletion von Muskelin ließe sich dann durch einen Rückstau der zu endozytierenden GABA_A-Rezeptoren erklären.

Die Anreicherung des GABA_A-Rezeptors an der Zelloberfläche nach Depletion von Muskelin weist zwar auf die funktionelle Beteiligung von Muskelin an diesen frühen endozytotischen Prozessen des GABA_A-Rezeptors hin, allerdings konnte eine direkte Abhängigkeit dieser Prozesse von Myosin VI nicht gezeigt werden. Dieses sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Eine funktionelle Beteiligung von Myosin VI an der Endozytose des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes ist aber nicht unwahrscheinlich: Erste Untersuchungen zeigten, dass Endozytose von Neurotransmitterrezeptoren durch Myosin VI vermittelt werden kann. So konnte ein Proteinkomplex bestehend aus Myosin VI, dem AMPA-Rezeptor, AP2 und SAP97, einem potenziellen AMPA-Rezeptor-Transportfaktor, nachgewiesen werden (Osterweil *et al.*, 2005). Nach Inhibition des Myosin VI-vermittelten Transports in kultivierten hippocampalen Neuronen wurde eine Unterbrechung der AMPA-Rezeptor-Internalisierung beobachtet. Hierbei wurden Mäuse analysiert, die eine natürliche Mutation in dem für Myosin VI kodierenden Gen tragen. Eine Untersuchung dieser sogenannten *Snell's waltzer*-Mäuse (Avraham *et al.*, 1995) könnte zeigen, inwieweit die Endozytose des GABA_A-Rezeptors von Myosin VI abhängig ist und sollte daher zum Verständnis von endozytotischen Prozessen an inhibitorischen Synapsen beitragen.

Des Weiteren wurde von Interaktionen des AMPA-Rezeptors mit den Motorproteinen Myosin Va und Myosin Vb berichtet, die sich beide in Richtung des plus-Endes der

Aktinfilamente bewegen (Lise *et al.*, 2006, Correia *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2008). Sie sind für den AMPA-Rezeptor Transport in dendritische Dornen sowie für dessen Kurzstreckentransport zur Plasmamembran verantwortlich. Bei exzitatorischen Synapsen scheint daher sowohl der Transport zur Plasmamembran als auch die Endozytose von Aktinfilament-abhängigem Motortransport vermittelt zu werden. Wenig ist darüber bekannt, ob die Exo- beziehungsweise Endozytose von Neurotransmitterrezeptoren der inhibitorischen Synapse auch von Aktinfilamenten abhängt. In einer jüngeren Studie wurde jedoch beschrieben, dass der Transport von GABA_A-Rezeptoren zur Plasmamembran von Aktinfilamenten und Myosin-Motorproteinen abhängen kann (Graziane *et al.*, 2009). Leider konnten die dafür verantwortlichen Myosine nicht identifiziert werden. Um zu untersuchen inwieweit die Endozytose des GABA_A-Rezeptors über Aktinfilamente vermittelt wird, wurden in der vorliegenden Arbeit GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche markiert und ihre Degradation nach der Internalisierung in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Eine Depolymerisation von Aktinfilamenten führte dabei zu der reduzierten Degradation des GABA_A-Rezeptors, was durch eine gestörte Endozytose erklärt werden kann. Zusammen mit der zuvor beschriebenen Studie lassen diese Beobachtungen auf eine von Aktinfilamenten-abhängige Exo- sowie Endozytose des GABA_A-Rezeptors schließen und stimmen mit einer Funktion von Myosin VI während der Endozytose des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes überein.

Somit ist die beobachtete Akkumulation des GABA_A-Rezeptors an der Zelloberfläche wahrscheinlich auf eine gestörte Endozytose nach Depletion von Muskelin zurückzuführen, könnte prinzipiell aber auch mit erhöhtem Transport zu der Plasmamembran und einer damit gesteigerten Exozytose des Rezeptors verbunden sein. Um letzteres auszuschließen, wurden GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche hippokampaler Neurone markiert und ihre intrazelluläre Akkumulation in Abhängigkeit von der Zeit analysiert. In Neuronen von wildtypischen (+/+) Mäusen wurde eine hohe Anzahl von GABA_A-Rezeptoren internalisiert, wohingegen in Neuronen von homozygoten (-/-) Muskelin *Knockout* Mäusen weitaus weniger Rezeptoren im Zytoplasma akkumulierten. Diese Beobachtung zeigt, dass die erhöhte GABA_A-Rezeptor-Konzentration an der Zelloberfläche nach Depletion von Muskelin auf eine gestörte Endozytose und nicht auf einen erhöhten Transport zur Plasmamembran zurückzuführen ist. Zudem lässt es vermuten, dass Muskelin ein für die Endozytose des GABA_A-Rezeptors es-

sentieller Faktor ist. Interessanterweise scheint die Internalisierungsrate des GABA_A-Rezeptors auch von neuronaler Aktivität abzuhängen (Jacob *et al.*, 2008). Die Rate seiner konstitutiven Endozytose wird zum Beispiel während epileptischer Aktivität gesteigert (Goodkin *et al.*, 2005), was in der verringerten GABAergen synaptischen Inhibition resultierte. Dementsprechend wurde reduzierte Endozytose des GABA_A-Rezeptors nach der Inhibition von neuronaler Aktivität beobachtet. In dem Muskelin die Endozytose des GABA_A-Rezeptors beeinflusst, könnte es zur aktivitätsabhängigen Regulation der GABAergen synaptischen Inhibition beitragen.

4.5 Zytoplasmatisches Dynein und der Einfluss von Muskelin auf die Degradation des GABA_A-Rezeptors

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Interaktion von zytoplasmatischem Dynein mit dem GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplex nachgewiesen werden. Hiermit übereinstimmend wurde ebenfalls der retrograde Kotransport von Muskelin mit dem GABA_A-Rezeptor beobachtet. Muskelin scheint dabei als ein Adapterprotein zu fungieren, in dem es den tripartiten GABA_A-Rezeptor-Muskelin-Dynein Komplex stabilisiert.

Als nächstes wurde die Funktion dieses Dynein-vermittelten Transports mit Hinblick auf die α 1-Untereinheit enthaltenden GABA_A-Rezeptoren untersucht. Im vorherigen Kapitel wurde die Hypothese aufgestellt, dass der frühe endozytotische Transport des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes von Myosin VI entlang der Aktinfilamente gewährleistet wird. Wenn dieser Transport wirklich von Myosin VI und nicht von Dynein vermittelt wird, dann würde man nach Inhibition der Dyneinmotor-Funktion auch keine Anreicherung des GABA_A-Rezeptors an der Zelloberfläche erwarten. In Übereinstimmung mit einer Rolle von Dynein in späten endozytotischen Prozessen des GABA_A-Rezeptors wurde nach der Inhibition der Dyneinmotor-Funktion keine Anreicherung an der Zelloberfläche beobachtet. Dieses konnte durch Analyse von Plasmamembran angereicherten Extrakten gezeigt und durch die Bestimmung der GABA_A-Rezeptor-Konzentration an der Zelloberfläche mittels Biotin-Markierung und Koimmunpräzipitation bestätigt werden. Hiermit übereinstimmend wurde von einer unveränderten Akkumulation der GABA_A-Rezeptoren mit α 1-Untereinheiten an der Zelloberfläche nach der Depolymerisation von Mikrotubuli berichtet (Kirsch und Betz, 1995). Dies unterstützt die Hypothese, dass die frühen endozytotischen Prozesse an

GABAergen Synapsen über Aktinfilament-abhängigen Transport vermittelt werden und ist mit einer Funktion von Myosin VI während dieser Prozesse im Einklang. Nach der Inhibition der Dyneinmotor-Funktion wurde hingegen eine Akkumulation von GABA_A-Rezeptoren in mit intrazellulären Vesikeln angereicherten Gehirnextrakten beobachtet. Vermutlich ist diese Akkumulation auf den gestörten Transport des GABA_A-Rezeptors während später endozytotischer Prozesse zu Kompartimenten des Proteinabbaus zurückzuführen. Denn wie bereits erwähnt, ist der Dyneinmotor-komplex für einen Transport von frühen zu späten Endosomen und den Lysosomen verantwortlich (Aniento *et al.*, 1993, Soldati und Schliwa 2006, Driskell *et al.*, 2007, Traer *et al.*, 2007). Dementsprechend wurde nach Störung des Dynein-vermittelten Transports durch Depletion des zuvor beschriebenen Proteins NudEL ein reduzierter Transport von Endosomen und Lysosomen zum Zellsoma beobachtet (Liang *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2009). Auch die Inhibition der Dyneinmotor-Funktion *per se* führte zu geringeren Transportraten von späten Endosomen zum Zellsoma (Zhang *et al.*, 2009). Daneben konnte die Bewegung von späten Endosomen durch Dynein auch in einem *in vitro*-System nachgeahmt werden (Bananis *et al.*, 2004). In einer intrazellulären Umgebung hat die kleine GTPase Rab-7, neben den Proteinen NudEL, NudE und Lis1, ebenfalls wichtige Funktionen bei der Rekrutierung des Dynein-motorkomplexes zu späten Endosomen und Lysosomen (Soldati und Schliwa, 2006). Erst die Aktivierung von Rab-7 sowie eine Bindung seiner Interaktionspartner RILP und ORP1L scheint den Dynein-vermittelten retrograden Transport später Endosomen zum Zellsoma zu ermöglichen (Cantalupo *et al.*, 2001, Jordens *et al.*, 2001, Johansson *et al.*, 2005). Aufgrund der Gegebenheit, dass Rab-7 eine essentielle Komponente später Endosomen zu sein scheint, wird es auch als Proteinmarker eingesetzt (Deinhardt *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, ob die beobachtete Akkumulation des GABA_A-Rezeptors in intrazellulären Vesikeln prinzipiell auf eine Anreicherung in frühen oder späten Endosomen zurückzuführen sein kann, wurden die mit intrazellulären Vesikeln angereicherten Gehirnextrakte mittels *Sucrosegradienten*-Dichte-zentrifugation aufgetrennt. Dabei sedimentierten GABA_A-Rezeptor enthaltende Vesikel bei gleichen Molaritäten wie Muskelin und Rab-7 enthaltende Vesikel. In Übereinstimmung mit einer Lokalisation des GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplexes an späten Endosomen wurde Muskelin zudem auf ultrastruktureller Ebene innerhalb der Lumina von multivesikulären Körpern (MVBs) nachgewiesen. Die MVBs stellen

Kompartimente später endozytotischer Prozesse dar (Gruenberg *et al.*, 2001). In dem das MVB-Lumen durch eine Fusion der MVB-Membran mit der Lysosomen-Membran in das lysosomale Lumen entlassen wird, werden die darin enthaltenen Proteine abgebaut (Katzmann *et al.*, 2002, Babst, 2005). So wird beispielsweise der EGF-Rezeptor zunächst zu *sorting* Endosomen transportiert, welche endosomale Kompartimente darstellen, von denen aus Rezeptoren entweder recycelt oder aber abgebaut werden (Bonifacino und Rojas, 2006). Von hier aus wird der EGF-Rezeptor in späte Endosomen sortiert, die dann Dynein-abhängig zum Zellsoma transportiert werden und durch Invagination von Teilen der vesikulären Membran zu MVBs reifen (Slagsvold *et al.*, 2006, van der Goot und Gruenberg, 2006). Um zu untersuchen ob die Degradation des GABA_A-Rezeptors ebenso durch einen Mikrotubuli-vermittelten Transport gewährleistet wird, wurden GABA_A-Rezeptoren der Zelloberfläche markiert und ihre Degradation nach der Internalisierung in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Eine Depolymerisation von Mikrotubuli führte hierbei zur reduzierten Degradation des GABA_A-Rezeptors, was durch einen gestörten Dynein-vermittelten Transport von Endosomen zu Lysosomen erklärt werden kann. Entsprechend wurde eine ähnlich verminderte GABA_A-Rezeptor Degradation nach Inhibition der lysosomalen Funktion beobachtet. In einer anderen Studie wurde bereits gezeigt, dass die Degradation des GABA_A-Rezeptors von intakten Lysosomen abhängig ist (Kittler *et al.*, 2004). Im Ganzen gesehen, lassen die Beobachtungen auf einen Dynein-vermittelten Transport des GABA_A-Rezeptors zu Lysosomen schließen.

Über die zuvor beschriebene Adapterfunktion von Muskelin, die die Interaktion des GABA_A-Rezeptors mit Dynein vermittelt beziehungsweise stabilisiert, könnte der Abbau des Rezeptors reguliert werden. Übereinstimmend hiermit wurde in Abwesenheit von Muskelin eine Akkumulation des GABA_A-Rezeptors in mit intrazellulären Vesikeln angereicherten Gehirnexttrakten beobachtet, welche der Akkumulation des Rezeptors nach Inhibition der Dyneinmotor-Funktion entsprach. Des Weiteren wurde eine reduzierte Degradation des GABA_A-Rezeptors beobachtet, die ebenso der nach Inhibition der Dyneinmotor-Funktion festgestellten entsprach. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Teile dieser Reduktion auf die im vorherigen Kapitel beschriebene gestörte Internalisierung des Rezeptors nach Muskelin Depletion zurückzuführen sind. Jedoch weist die ähnliche Akkumulation nach Depletion von Muskelin und der Inhibition der Dyneinmotor-Funktion in intrazellulären Vesikel-Fractionen auf eine

zusätzliche Funktion von Muskelin während des Transports zu Lysosomen hin. Die geringere GABA_A-Rezeptor Degradation nach Muskelin Depletion könnte aber auch auf eine Störung der lysosomalen Funktion in Muskelin *Knockout* Mäusen zurückzuführen sein. Während der Reifung von Lysosomen wird beispielsweise die lysosomale Protease Procathepsin L vom ER zu Lysosomen transportiert (Lingeman *et al.*, 1998). Um eine mögliche Störung der lysosomalen Funktion auszuschließen, wurde die Degradation der AMPA-Rezeptor Untereinheit GluR1 in der Abwesenheit von Muskelin verfolgt. Es wurde bereits berichtet, dass AMPA-Rezeptoren im Lysosom abgebaut werden können (Ehlers, 2001). Nach Depletion von Muskelin wurde jedoch eine unveränderte Degradation des AMPA-Rezeptors beobachtet. Dies weist auf eine nicht beeinträchtigte Funktion von Lysosomen in Muskelin *Knockout* Mäusen hin und lässt des Weiteren vermuten, dass Muskelin ein für die Degradation des GABA_A-Rezeptors spezifisches Protein darstellt. Durch seine Adapterfunktion könnte die Spezifität des GABA_A-Rezeptor Transports zu Lysosomen gewährleistet werden. Muskelin könnte somit die GABAerge synaptische Transmission modulieren, in dem es die Degradation des GABA_A-Rezeptors begünstigt. Das Protein HAP1 hingegen wurde als ein Interaktionspartner des GABA_A-Rezeptors beschrieben, der die Degradation des Rezeptors reduziert und sein Recycling zur Zelloberfläche fördert (Kittler *et al.*, 2004). Nachdem der GABA_A-Rezeptor zum *sorting* Endosom transportiert wurde, hängt die Entscheidung, ob er recycelt oder abgebaut wird möglicherweise davon ab, welches der beiden Proteine gerade mit dem GABA_A-Rezeptor interagiert.

4.6 Verknüpfung von Aktinfilament- und Mikrotubuli-abhängigen Motorprotein-vermitteltem Transport

Aktinfilamente bilden am zellulären Kortex ein Aktinzytoskelett, wohingegen sich Mikrotubuli oft nicht bis unter die Zelloberfläche erstrecken (Lewis und Bridgman, 1992, Svitkina *et al.*, 1997). Dementsprechend weist eine steigende Anzahl Studien daraufhin, dass die Exozytose sowie Endozytose von Transmembranproteinen durch Aktinfilament-abhängige Motorproteine der Myosin-Familie vermittelt werden (Soldati und Schliwa, 2006). Hingegen wird der Langstreckentransport von Frachten zu den Bestimmungsorten von Motorproteinen der Kinesin- oder Dynein-Familie entlang von Mikrotubuli vermittelt (Goode *et al.*, 2000, Vale, 2003). Ein Transport entlang unter-

schiedlicher Zytoskelettelemente und Motorprotein-Familien macht eine Kooperation zwischen diesen Systemen nötig. Ein erster Hinweis, dass ein und dasselbe Vesikel zwischen Aktinfilament- und Mikrotubuli-abhängigen Transport umschalten kann, wurde in Axonen der Tintenfische erbracht (Kuznetsov *et al.*, 1992). Die genauen Mechanismen wie die Transportvesikel von Aktinfilament- zu Mikrotubuli-abhängigen Transport wechseln und umgekehrt, sind aber bis heute nicht bekannt.

Es sind verschiedene Möglichkeiten vorstellbar, wie ein Wechsel vollzogen werden könnte: Eine Option könnte die Interaktion zwischen Motorproteinen unterschiedlicher Familien sein. So konnte beispielsweise in Neuronen eine direkte Interaktion von dem Mikrotubuli-assoziierten Motorprotein KIF5 und dem Aktin-assoziierten Motorprotein Myosin Va nachgewiesen werden (Huang *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt wird der AMPA-Rezeptor vom Zellsoma bis zu seiner Exozytose in die Plasmamembran der *spines* über diese zwei Motorproteine transportiert (Setou *et al.*, 2002, Correia *et al.*, 2008). Obwohl beide Motorproteine direkt miteinander interagieren können, scheint der AMPA-Rezeptor jedoch über unterschiedliche Adapterproteine an das jeweilige Motorprotein gekoppelt zu sein. Seine Interaktion mit KIF5 wird von dem Protein GRIP1 vermittelt, wohingegen seine Interaktion mit Myosin Va von der kleinen GTPase Rab-11 vermittelt wird (Setou *et al.*, 2002, Correia *et al.*, 2008). Dies lässt auf einen Mechanismus schließen, bei dem die Motorproteine durch eine direkte Interaktion in räumliche Nähe gebracht werden und den Wechsel der Fracht über die Adapterproteine von einem auf das andere Motorprotein vollziehen. Ein anderes Beispiel sind die Dynein leichten Ketten 1 und 2, die nicht nur Bestandteil des Mikrotubuli-assoziierten Dyneinmotorkomplexes sind, sondern auch mit einem Aktinfilament-assoziierten Motorprotein, dem Myosin V interagieren (Benashski *et al.*, 1997). Aber auch in diesem Fall scheinen Adapterproteine für einen Transport von Neurotransmitterrezeptoren benötigt zu werden. So bindet der NMDA-Rezeptor über PSD95 an GKAP, welches die Interaktionen mit der Dynein leichten Kette 1 und 2 vermittelt (Naisbitt *et al.*, 2000). Über diese bloßen Interaktionen hinaus wurde bislang jedoch kein Nachweis über eine Funktion dieses möglichen Motorprotein-Wechsels erbracht. Diese Studien lassen aber darauf schließen, dass der Wechsel des Motorprotein-Systems über spezifische Adapterproteine vermittelt werden könnte, die an die entsprechende Fracht binden.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass Vesikel mit den Motorproteinen durch für Frachten unspezifische Adapterproteine verbunden werden. Ein Kandidat hierfür wäre beispielsweise das bereits erwähnte Protein Dab2, welches an Clathrin bindet und Myosin VI zu Clathrin-umhüllten-Vesikeln (CCVs) rekrutiert (Dance *et al.*, 2004). Dieses würde den kollektiven Transport von CCVs unabhängig von den enthaltenen Transmembranproteinen erlauben. Sobald die Vesikel zum *sorting* Endosom transportiert wurden, könnte dieses als Schnittstelle zwischen dem Aktinfilament- und Mikrotubuli-assoziierten Transport fungieren (Aschenbrenner *et al.*, 2004, Bonifacio und Rojas, 2006, Soldati und Schliwa, 2006). Von hier aus könnten die erwähnten LisH-Motiv enthaltenden Proteine NudE, NudEL oder Lis1 den kollektiven Transport früher Endosomen entlang von Mikrotubuli zu dem Zellsoma vermitteln (Feng *et al.*, 2000, Sasaki *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2005, Yamada *et al.*, 2008). Ein anderes Protein, das auch an Mikrotubuli plus-Enden akkumuliert, ist CLIP170. Es scheint ähnliche Funktionen zu erfüllen und verbindet endozytotische Vesikel mit zytoplasmatischem Dynein *in vitro* (Rickard *et al.*, 1996). Interessanterweise interagiert das *Drosophila melanogaster*-Ortholog von CLIP170 (DCLIP190) mit Myosin VI, was auf eine direkte Verbindung von Aktinfilament basierten Motorprotein-Systemen mit plus-Enden der Mikrotubuli hindeuten könnte (Lantz *et al.*, 1998). Das Kelch-Motiv-Wiederholungen enthaltende Protein Tea1p interagiert interessanterweise mit CLIP170 und ist auch an Mikrotubuli plus-Enden angereichert. Es wird vermutet, dass es eine Rolle bei Verknüpfung des Aktinfilament- und Mikrotubuli-abhängigen Transports spielt (Xue und Cooley, 1993, Mata und Nurse, 1997, Feierbach *et al.*, 2004). Andere Proteine, die den Mikrotubuli-abhängigen Transport endozytotischer Vesikel unabhängig von den enthaltenen Transmembranproteinen vermitteln könnten, sind die Proteine der Rab-Familie kleiner GTPasen. Dabei scheint das erwähnte Rab-7 eine essentielle Komponente später Endosomen zu sein (Cantalupo *et al.*, 2001, Jordens *et al.*, 2001, Johansson *et al.*, 2005). Aber auch Rab-6 scheint den vesikulären Dynein-vermittelten Transport gewährleisten zu können, indem es direkt mit Komponenten des Dyneinmotorkomplexes interagiert (Short *et al.*, 2002, Wanschers *et al.*, 2008). Im Falle des GABA_A-Rezeptors könnte sein Transport entlang der Aktinfilamente und Mikrotubuli sowie die Verknüpfung dieser Systeme von spezifischer Natur sein. Indem Muskelin direkt mit dem GABA_A-Rezeptor interagiert, könnte es ausschließlich Vesikel, die GABA_A-Rezeptoren enthalten, an Motorproteine binden. Dementsprech-

end scheint die Degradation des AMPA-Rezeptors, der ja ebenfalls über Myosin VI endozytiert wird, nicht von Muskelin abzuhängen. Im Gegensatz zu dem AMPA-Rezeptor, der über unterschiedliche Adapterproteine an die jeweiligen Aktinfilament- oder Mikrotubuli-abhängigen Motorproteine gekoppelt wird, scheint Muskelin sowohl an der Interaktion des GABA_A-Rezeptors mit Aktinfilament- als auch mit Mikrotubuli-assozierten Motorproteinen beteiligt zu sein. Daher könnte Muskelin den spezifischen Transport des GABA_A-Rezeptors über zwei unabhängige Motorprotein-Systeme leiten und sozusagen selbst als Schnittstelle zwischen diesen beiden Systemen fungieren. Dabei könnte Muskelins einzigartige Domänenstruktur entscheidend sein: Als einziges Mitglied der Kelch-Wiederholungen Superfamilie verfügt es zudem über das LisH-Motiv. Wie bereits erwähnt vermitteln die LisH-Motiv enthaltenden Proteine Interaktionen mit Mikrotubuli oder Dynein, wohingegen Proteine mit Kelch-Wiederholungen Interaktionen mit Aktinfilamenten vermitteln können (Adams *et al.*, 2000, Emes und Ponting, 2001, Prag *et al.*, 2004). Die Proteine NudE, NudEL und Lis-1, die mit dem Dyneinmotorkomplex interagieren, befinden sich zwar an der Schnittstelle von Aktinfilament- und Mikrotubuli-assozierten Transport, verfügen aber nur über das LisH-Motiv (Feng *et al.*, 2000, Sasaki *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2005, Yamada *et al.*, 2008). Das Protein Tea1p, welches über CLIP170 mit Myosin VI interagiert, verfügt hingegen über wiederholte Kelch-Motive, es weist aber kein LisH-Motiv auf (Xue und Cooley, 1993, Mata und Nurse, 1997, Feierbach *et al.*, 2004). Da Muskelin über die beiden konservierten Protein-Interaktions-Domänen verfügt, stellt es einen potentiellen Kandidaten dar, der zu dem Wechsel von Aktinfilament- zu Mikrotubuli-assoziertem Transport entscheidend beitragen könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen in Anbetracht zuvor beschriebener Studien zu einem hypothetischen Modell des GABA_A-Rezeptor Transports (Abb. 4.1): Muskelin interagiert bereits an der inhibitorischen Synapse mit dem GABA_A-Rezeptor über eine direkte Interaktion mit der α 1-Untereinheit. Nach lateraler Diffusion zur extrasynaptischen Membran wird der GABA_A-Rezeptor konstitutiv durch Clathrin-vermittelte Endozytose über eine Interaktion mit AP2 internalisiert. Muskelin ist währenddessen an den GABA_A-Rezeptor gebunden und interagiert mit Myosin VI in einem Transportkomplex nach Entfernung der Clathrin-Hülle. Hierbei wird der GABA_A-Rezeptor durch die Diffusionsbarriere des Aktin-reichen zellulären Kortex transportiert und in die Nähe von *sorting* Endosomen beziehungsweise Mikrotubuli plus-Enden gebracht. Von hier

aus wird er nun entweder degradiert oder über die Interaktion mit HAP1 zurück zur Plasmamembran recycelt. Die Degradation wird durch die Interaktion mit Muskelin begünstigt und sie erfolgt durch einen Wechsel des Motorprotein-Systems. Indem Muskelin als ein Adapterprotein fungiert, verbindet es den GABA_A-Rezeptor mit zyttoplasmatischem Dynein. Daraufhin wird der GABA_A-Rezeptor-Muskelin Komplex retrograd entlang der Mikrotubuli in Richtung des Zellsomas transportiert. Nach dem Transport zu späten Endosomen beziehungsweise multivesikulären Körpern erfolgt die Degradation des GABA_A-Rezeptors in Lysosomen.

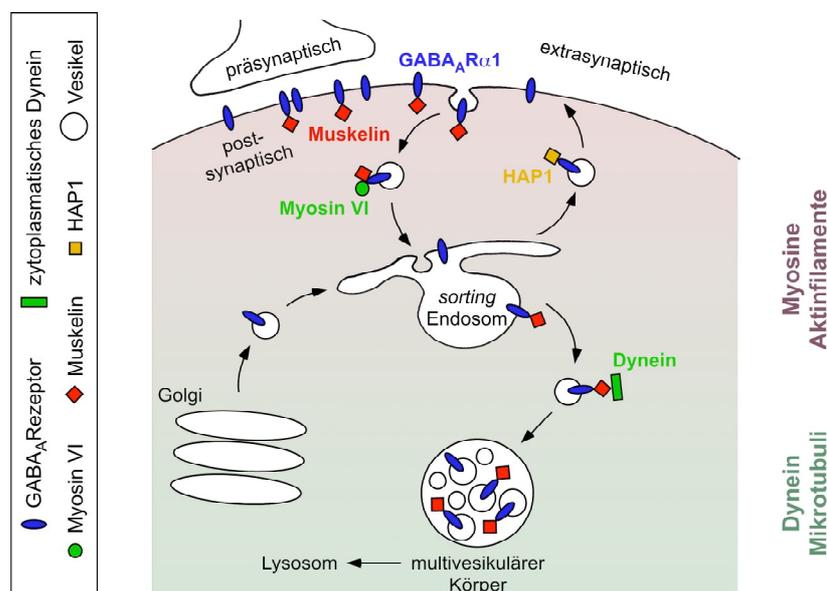


Abb. 4.1: Modell: Verknüpfung von Aktinfilament- und Mikrotubuli-abhängigem Transport des GABA_A-Rezeptors. Muskelin interagiert direkt mit $\alpha 1$ -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors an der Postsynapse. Es bleibt während Clathrin-vermittelter Endozytose an die GABA_A-Rezeptoren gebunden und rekrutiert Myosin VI, um Transport durch den Aktin-reichen zellulären Kortex zu gewährleisten. GABA_A-Rezeptoren werden in die Nähe der Mikrotubuli plus-Enden zu *sorting* Endosomen transportiert und dann über Interaktion mit HAP1 entweder recycelt oder aber abgebaut. Der Abbau erfolgt durch retrograden Langstreckentransport nach Wechsel des Motorprotein-Systems. Muskelin fungiert hierbei als Adapter und vermittelt die Interaktion des GABA_A-Rezeptors mit Dynein. Nach Transport zum Zellsoma wird der GABA_A-Rezeptor über multivesikuläre Körper in Lysosomen abgegeben und degradiert.

4.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebenen Interaktionen Muskelins mit Myosin VI als auch mit Dynein stellen einen Ausgangspunkt für die Erforschung der Verknüpfung von

unterschiedlichen Motorprotein-Systemen dar. Hierbei könnte nicht nur der Transport des GABA_A-Rezeptors in neuronalem Gewebe als ein Modellsystem dienen, sondern auch der Melanosomen-Transport in Melanozyten von Muskelin *Knockout* Mäusen.

Obgleich die Ergebnisse dieser Arbeit einen Myosin VI-abhängigen Transport des GABA_A-Rezeptors nahe legen, sollte dies durch Inhibition des Myosin VI-vermittelten Transports überprüft werden. Es bietet sich an, die GABA_A-Rezeptor-Konzentration an der Zelloberfläche sowie die Internalisierungsrate in sogenannten *Snell's waltzer*-Mäusen, die Myosin VI Null-Allele tragen, zu untersuchen (Avraham *et al.*, 1995). Des Weiteren müsste untersucht werden, ob die Interaktionen von Muskelin mit den Motorprotein-Komplexen von direkter Natur sind. Zunächst müssten die jeweiligen interagierenden Ketten der Motorproteine und dann entsprechende Aminosäuresequenzen identifiziert werden. Hierfür bietet sich die Hefe-2-Hybrid-Technik an. Durch Überexpression dieser Sequenzen in Neuronen könnten entsprechende Bindungen in einem Konkurrenzexperiment spezifisch inhibiert und ihr Einfluss auf beschriebene Transportvorgänge untersucht werden. Durch eine Expression von Muskelin-Deletions- oder Punkt-Mutanten in Neuronen der Muskelin *Knockout* Mäuse könnte der Einfluss des LisH-Motivs, der Kelch-Motive, der Oligomerisierung und der Phosphorylierung Muskelins auf die Verknüpfung von Motorprotein-Systemen hin untersucht werden. Zudem kann versucht werden, durch Immunpräzipitation von Transportvesikeln mit Muskelin-spezifischen Antikörpern und massenspektrometrischer Analyse der Präzipitate, weitere Interaktionspartner der Transportkomplexe zu identifizieren. Um den Einfluss von Muskelin auf Transportprozesse zu untersuchen, bietet sich an, die Kotransportparameter des GABA_A-Rezeptors mit Myosin VI sowie mit Dynein in Muskelin *Knockout* Mäusen zu bestimmen. Aber auch der Melanosomen-Transport nach Depletion von Muskelin sollte von Interesse sein. Um die physiologische Regulation der Transporte zu analysieren, sollten Transportparameter von Muskelin und GABA_A-Rezeptor in Abhängigkeit von der Modulation exzitatorischer und inhibitorischer neuronaler Aktivität bestimmt werden. Elektrophysiologische Messungen sollten zeigen, ob es sich bei der Akkumulation von GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche von Muskelin *Knockout* Mäusen um funktionelle Rezeptoren handelt und ob diese der Verschiebung von inhibitorischer zu exzitatorischer Aktivität nach Induktion von epileptischer Aktivität entgegenwirken können.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, J., Kelso, R., and Cooley, L. (2000). The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol* **10**, 17-24.
- Adams, J.C., Seed, B., and Lawler, J. (1998). Muskelin, a novel intracellular mediator of cell adhesive and cytoskeletal responses to thrombospondin-1. *Embo J* **17**, 4964-4974.
- Adams, J.C., and Zhang, L. (1999). cDNA cloning of human muskelin and localisation of the muskelin (MKLN1) gene to human chromosome 7q32 and mouse chromosome 6 B1/B2 by physical mapping and FISH. *Cytogenet Cell Genet* **87**, 19-21.
- Adkins, C.E., Pillai, G.V., Kerby, J., Bonnert, T.P., Haldon, C., McKernan, R.M., Gonzalez, J.E., Oades, K., Whiting, P.J., and Simpson, P.B. (2001). $\alpha 4\beta 3\delta$ GABA(A) receptors characterized by fluorescence resonance energy transfer-derived measurements of membrane potential. *J Biol Chem* **276**, 38934-38939.
- Adori, C., Kovacs, G.G., Low, P., Molnar, K., Gorbea, C., Fellingner, E., Budka, H., Mayer, R.J., and Laszlo, L. (2005). The ubiquitin-proteasome system in Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer disease: intracellular redistribution of components correlates with neuronal vulnerability. *Neurobiol Dis* **19**, 427-435.
- Amparan, D., Avram, D., Thomas, C.G., Lindahl, M.G., Yang, J., Bajaj, G., and Ishmael, J.E. (2005). Direct interaction of myosin regulatory light chain with the NMDA receptor. *J Neurochem* **92**, 349-361.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G., and Gruenberg, J. (1993). Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol* **123**, 1373-1387.
- Arber, S., and Caroni, P. (1995). Thrombospondin-4, an extracellular matrix protein expressed in the developing and adult nervous system promotes neurite outgrowth. *J Cell Biol* **131**, 1083-1094.
- Aschenbrenner, L., Lee, T., and Hasson, T. (2003). Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries. *Mol Biol Cell* **14**, 2728-2743.
- Aschenbrenner, L., Naccache, S.N., and Hasson, T. (2004). Uncoated endocytic vesicles require the unconventional myosin, Myo6, for rapid transport through actin barriers. *Mol Biol Cell* **15**, 2253-2263.
- Avraham, K.B., Hasson, T., Steel, K.P., Kingsley, D.M., Russell, L.B., Mooseker, M.S., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (1995). The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet* **11**, 369-375.
- Baas, P.W., Deitch, J.S., Black, M.M., and Banker, G.A. (1988). Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8335-8339.
- Babst, M. (2005). A protein's final ESCRT. *Traffic* **6**, 2-9.
- Banaris, E., Nath, S., Gordon, K., Satir, P., Stockert, R.J., Murray, J.W., and Wolkoff, A.W. (2004). Microtubule-dependent movement of late endocytic vesicles in vitro: requirements for Dynein and Kinesin. *Mol Biol Cell* **15**, 3688-3697.

- Bannai, H., Levi, S., Schweizer, C., Inoue, T., Launey, T., Racine, V., Sibarita, J.B., Mikoshiba, K., and Triller, A. (2009). Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. *Neuron* **62**, 670-682.
- Bedford, F.K., Kittler, J.T., Muller, E., Thomas, P., Uren, J.M., Merlo, D., Wisden, W., Triller, A., Smart, T.G., and Moss, S.J. (2001). GABA(A) receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1. *Nat Neurosci* **4**, 908-916.
- Benarroch, E.E. (2007). GABAA receptor heterogeneity, function, and implications for epilepsy. *Neurology* **68**, 612-614.
- Benashski, S.E., Harrison, A., Patel-King, R.S., and King, S.M. (1997). Dimerization of the highly conserved light chain shared by dynein and myosin V. *J Biol Chem* **272**, 20929-20935.
- Biemesderfer, D., Mentone, S.A., Mooseker, M., and Hasson, T. (2002). Expression of myosin VI within the early endocytic pathway in adult and developing proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F785-794.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Boehm, S., Harvey, R.J., von Holst, A., Rohrer, H., and Betz, H. (1997). Glycine receptors in cultured chick sympathetic neurons are excitatory and trigger neurotransmitter release. *J Physiol* **504** (Pt 3), 683-694.
- Bonifacino, J.S., and Rojas, R. (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 568-579.
- Boyer, C., Schikorski, T., and Stevens, C.F. (1998). Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. *J Neurosci* **18**, 5294-5300.
- Brickley, K., Smith, M.J., Beck, M., and Stephenson, F.A. (2005). GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin. *J Biol Chem* **280**, 14723-14732.
- Brickley, S.G., Cull-Candy, S.G., and Farrant, M. (1999). Single-channel properties of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *J Neurosci* **19**, 2960-2973.
- Bridgman, P.C. (2004). Myosin-dependent transport in neurons. *J Neurobiol* **58**, 164-174.
- Brown, S.S. (1999). Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 63-80.
- Brunig, I., Scotti, E., Sidler, C., and Fritschy, J.M. (2002a). Intact sorting, targeting, and clustering of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes in hippocampal neurons in vitro. *J Comp Neurol* **443**, 43-55.
- Brunig, I., Suter, A., Knuesel, I., Luscher, B., and Fritschy, J.M. (2002b). GABAergic terminals are required for postsynaptic clustering of dystrophin but not of GABA(A) receptors and gephyrin. *J Neurosci* **22**, 4805-4813.
- Brunkhorst, A., Karlen, M., Shi, J., Mikolajczyk, M., Nelson, M.A., Metsis, M., and Hermanson, O. (2005). A specific role for the TFIID subunit TAF4 and RanBPM in neural progenitor differentiation. *Mol Cell Neurosci* **29**, 250-258.
- Burkhardt, J.K., Echeverri, C.J., Nilsson, T., and Vallee, R.B. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol* **139**, 469-484.
- Campenot, R.B., and MacInnis, B.L. (2004). Retrograde transport of neurotrophins: fact and function. *J Neurobiol* **58**, 217-229.

- Cantalupo, G., Alifano, P., Roberti, V., Bruni, C.B., and Bucci, C. (2001). Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *Embo J* **20**, 683-693.
- Caviston, J.P., and Holzbaur, E.L. (2006). Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol* **16**, 530-537.
- Charych, E.I., Yu, W., Miralles, C.P., Serwanski, D.R., Li, X., Rubio, M., and De Blas, A.L. (2004). The brefeldin A-inhibited GDP/GTP exchange factor 2, a protein involved in vesicular trafficking, interacts with the beta subunits of the GABA receptors. *J Neurochem* **90**, 173-189.
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C., Mallowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P., and Barres, B.A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* **120**, 421-433.
- Ciechanover, A. (2006). Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 1197-1211.
- Collingridge, G.L., Isaac, J.T., and Wang, Y.T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**, 952-962.
- Correia, S.S., Bassani, S., Brown, T.C., Lise, M.F., Backos, D.S., El-Husseini, A., Passafaro, M., and Esteban, J.A. (2008). Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation. *Nat Neurosci* **11**, 457-466.
- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., Saint-Hilaire, J.M., Carmant, L., Verner, A., Lu, W.Y., et al. (2002). Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* **31**, 184-189.
- Coudrier, E. (2007). Myosins in melanocytes: to move or not to move? *Pigment Cell Res* **20**, 153-160.
- Crestani, F., Keist, R., Fritschy, J.M., Benke, D., Vogt, K., Prut, L., Bluthmann, H., Mohler, H., and Rudolph, U. (2002). Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8980-8985.
- Crouse, G.F., Frischauf, A., and Lehrach, H. (1983). An integrated and simplified approach to cloning into plasmids and single-stranded phages. *Methods Enzymol* **101**, 78-89.
- Dance, A.L., Miller, M., Seragaki, S., Aryal, P., White, B., Aschenbrenner, L., and Hasson, T. (2004). Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments. *Traffic* **5**, 798-813.
- Danglot, L., Triller, A., and Bessis, A. (2003). Association of gephyrin with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors varies during development in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* **23**, 264-278.
- Deinhardt, K., Salinas, S., Verastegui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., Bucci, C., and Schiavo, G. (2006). Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* **52**, 293-305.
- Dillon, C., and Goda, Y. (2005). The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci* **28**, 25-55.
- Driskell, O.J., Mironov, A., Allan, V.J., and Woodman, P.G. (2007). Dynein is required for receptor sorting and the morphogenesis of early endosomes. *Nat Cell Biol* **9**, 113-120.
- Dumoulin, A., Levi, S., Riveau, B., Gasnier, B., and Triller, A. (2000). Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. *Eur J Neurosci* **12**, 3883-3892.

- Ehlers, M.D. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* **28**, 511-525.
- Ehlers, M.D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* **6**, 231-242.
- Emes, R.D., and Ponting, C.P. (2001). A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubule dynamics and cell migration. *Hum Mol Genet* **10**, 2813-2820.
- Erickson, J.W., and Cerione, R.A. (2001). Multiple roles for Cdc42 in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 153-157.
- Essrich, C., Lorez, M., Benson, J.A., Fritschy, J.M., and Luscher, B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* **1**, 563-571.
- Fang, C., Deng, L., Keller, C.A., Fukata, M., Fukata, Y., Chen, G., and Luscher, B. (2006). GODZ-mediated palmitoylation of GABA(A) receptors is required for normal assembly and function of GABAergic inhibitory synapses. *J Neurosci* **26**, 12758-12768.
- Feierbach, B., Verde, F., and Chang, F. (2004). Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *J Cell Biol* **165**, 697-707.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.
- Feng, G., Tintrup, H., Kirsch, J., Nichol, M.C., Kuhse, J., Betz, H., and Sanes, J.R. (1998). Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science* **282**, 1321-1324.
- Feng, Y., Olson, E.C., Stukenberg, P.T., Flanagan, L.A., Kirschner, M.W., and Walsh, C.A. (2000). LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome. *Neuron* **28**, 665-679.
- Fleck, M.W., Hirotsune, S., Gambello, M.J., Phillips-Tansey, E., Soares, G., Mervis, R.F., Wynshaw-Boris, A., and McBain, C.J. (2000). Hippocampal abnormalities and enhanced excitability in a murine model of human lissencephaly. *J Neurosci* **20**, 2439-2450.
- Franzen, A.J., Cunha, M.M., Miranda, K., Hentschel, J., Plattner, H., da Silva, M.B., Salgado, C.G., de Souza, W., and Rozental, S. (2008). Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *J Struct Biol* **162**, 75-84.
- Fritschy, J.M., Johnson, D.K., Mohler, H., and Rudolph, U. (1998a). Independent assembly and subcellular targeting of GABA(A)-receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons in vivo. *Neurosci Lett* **249**, 99-102.
- Fritschy, J.M., and Mohler, H. (1995). GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* **359**, 154-194.
- Fritschy, J.M., Weinmann, O., Wenzel, A., and Benke, D. (1998b). Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol* **390**, 194-210.
- Fuhrmann, J.C., Kins, S., Rostaing, P., El Far, O., Kirsch, J., Sheng, M., Triller, A., Betz, H., and Kneussel, M. (2002). Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes. *J Neurosci* **22**, 5393-5402.

- Garcia, E.P., Mehta, S., Blair, L.A., Wells, D.G., Shang, J., Fukushima, T., Fallon, J.R., Garner, C.C., and Marshall, J. (1998). SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. *Neuron* **21**, 727-739.
- Ghosh, A., and Greenberg, M.E. (1995). Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* **268**, 239-247.
- Goode, B.L., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2000). Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 63-71.
- Goodkin, H.P., Yeh, J.L., and Kapur, J. (2005). Status epilepticus increases the intracellular accumulation of GABAA receptors. *J Neurosci* **25**, 5511-5520.
- Graziane, N.M., Yuen, E.Y., and Yan, Z. (2009). Dopamine D4 Receptors Regulate GABAA Receptor Trafficking via an Actin/Cofilin/Myosin-dependent Mechanism. *J Biol Chem* **284**, 8329-8336.
- Groc, L., and Choquet, D. (2006). AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell Tissue Res* **326**, 423-438.
- Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 721-730.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 317-323.
- Gundelfinger, E.D., and tom Dieck, S. (2000). Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain. *Naturwissenschaften* **87**, 513-523.
- Hasegawa, H., Katoh, H., Fujita, H., Mori, K., and Negishi, M. (2000). Receptor isoform-specific interaction of prostaglandin EP3 receptor with muskelin. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 350-354.
- Herring, D., Huang, R., Singh, M., Robinson, L.C., Dillon, G.H., and Leidenheimer, N.J. (2003). Constitutive GABAA receptor endocytosis is dynamin-mediated and dependent on a dileucine AP2 adaptin-binding motif within the beta 2 subunit of the receptor. *J Biol Chem* **278**, 24046-24052.
- Hevers, W., and Luddens, H. (1998). The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol* **18**, 35-86.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519-526.
- Hirokawa, N. (2006). mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J Neurosci* **26**, 7139-7142.
- Hirokawa, N., and Takemura, R. (2004). Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res* **301**, 50-59.
- Homma, N., Takei, Y., Tanaka, Y., Nakata, T., Terada, S., Kikkawa, M., Noda, Y., and Hirokawa, N. (2003). Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell* **114**, 229-239.
- Hsueh, Y.P., Kim, E., and Sheng, M. (1997). Disulfide-linked head-to-head multimerization in the mechanism of ion channel clustering by PSD-95. *Neuron* **18**, 803-814.
- Huang, C.H., Cheng, J.C., Chen, J.C., and Tseng, C.P. (2007). Evaluation of the role of Disabled-2 in nerve growth factor-mediated neurite outgrowth and cellular signalling. *Cell Signal* **19**, 1339-1347.

- Huang, J.D., Brady, S.T., Richards, B.W., Stenolen, D., Resau, J.H., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (1999). Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* **397**, 267-270.
- Huang, K., and El-Husseini, A. (2005). Modulation of neuronal protein trafficking and function by palmitoylation. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 527-535.
- Huang, Z.J. (2006). GABAB receptor isoforms caught in action at the scene. *Neuron* **50**, 521-524.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T.W., and Sudhof, T.C. (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* **277**, 1511-1515.
- Jacob, T.C., Moss, S.J., and Jurd, R. (2008). GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* **9**, 331-343.
- Jadot, M., Lin, L., Sleat, D.E., Sohar, I., Hsu, M.S., Pintar, J., Dubois, F., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R., and Lobel, P. (1999). Subcellular localization of mannose 6-phosphate glycoproteins in rat brain. *J Biol Chem* **274**, 21104-21113.
- Johansson, M., Lehto, M., Tanhuanpaa, K., Cover, T.L., and Olkkonen, V.M. (2005). The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments. *Mol Biol Cell* **16**, 5480-5492.
- Jones, E.G. (1997). Area and lamina-specific expression of GABAA receptor subunit mRNAs in monkey cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol* **75**, 452-469.
- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., and Neefjes, J. (2001). The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol* **11**, 1680-1685.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2000). Principles of neural science. 4th edition. *Mcgraw-Hill Publ.Comp.*, New York, USA
- Kanematsu, T., Jang, I.S., Yamaguchi, T., Nagahama, H., Yoshimura, K., Hidaka, K., Matsuda, M., Takeuchi, H., Misumi, Y., Nakayama, K., et al. (2002). Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA(A) receptor function. *Embo J* **21**, 1004-1011.
- Karcher, R.L., Deacon, S.W., and Gelfand, V.I. (2002). Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends Cell Biol* **12**, 21-27.
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G., and Emr, S.D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905.
- Keller, C.A., Yuan, X., Panzanelli, P., Martin, M.L., Alldred, M., Sassoe-Pognetto, M., and Luscher, B. (2004). The gamma2 subunit of GABA(A) receptors is a substrate for palmitoylation by GODZ. *J Neurosci* **24**, 5881-5891.
- Kennedy, M.J., and Ehlers, M.D. (2006). Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* **29**, 325-362.
- Kim, E., Naisbitt, S., Hsueh, Y.P., Rao, A., Rothschild, A., Craig, A.M., and Sheng, M. (1997). GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol* **136**, 669-678.
- King, S.J., and Schroer, T.A. (2000). Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol* **2**, 20-24.

- Kins, S., Betz, H., and Kirsch, J. (2000). Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat Neurosci* **3**, 22-29.
- Kirsch, J., and Betz, H. (1995). The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci* **15**, 4148-4156.
- Kirsch, J., Wolters, I., Triller, A., and Betz, H. (1993). Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* **366**, 745-748.
- Kittler, J.T., Chen, G., Honing, S., Bogdanov, Y., McAinsh, K., Arancibia-Carcamo, I.L., Jovanovic, J.N., Pangalos, M.N., Haucke, V., Yan, Z., and Moss, S.J. (2005). Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14871-14876.
- Kittler, J.T., Chen, G., Kukhtina, V., Vahedi-Faridi, A., Gu, Z., Tretter, V., Smith, K.R., McAinsh, K., Arancibia-Carcamo, I.L., Saenger, W., et al. (2008). Regulation of synaptic inhibition by phospho-dependent binding of the AP2 complex to a YECL motif in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3616-3621.
- Kittler, J.T., Delmas, P., Jovanovic, J.N., Brown, D.A., Smart, T.G., and Moss, S.J. (2000). Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. *J Neurosci* **20**, 7972-7977.
- Kittler, J.T., McAinsh, K., and Moss, S.J. (2002). Mechanisms of GABAA receptor assembly and trafficking: implications for the modulation of inhibitory neurotransmission. *Mol Neurobiol* **26**, 251-268.
- Kittler, J.T., Rostaing, P., Schiavo, G., Fritschy, J.M., Olsen, R., Triller, A., and Moss, S.J. (2001). The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Mol Cell Neurosci* **18**, 13-25.
- Kittler, J.T., Thomas, P., Tretter, V., Bogdanov, Y.D., Haucke, V., Smart, T.G., and Moss, S.J. (2004). Huntingtin-associated protein 1 regulates inhibitory synaptic transmission by modulating gamma-aminobutyric acid type A receptor membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12736-12741.
- Klausberger, T., Roberts, J.D., and Somogyi, P. (2002). Cell type- and input-specific differences in the number and subtypes of synaptic GABA(A) receptors in the hippocampus. *J Neurosci* **22**, 2513-2521.
- Kleijnen, M.F., Shih, A.H., Zhou, P., Kumar, S., Soccio, R.E., Kedersha, N.L., Gill, G., and Howley, P.M. (2000). The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol Cell* **6**, 409-419.
- Kneussel, M. (2005). Postsynaptic scaffold proteins at non-synaptic sites. The role of postsynaptic scaffold proteins in motor-protein-receptor complexes. *EMBO Rep* **6**, 22-27.
- Kneussel, M., Brandstatter, J.H., Gasnier, B., Feng, G., Sanes, J.R., and Betz, H. (2001). Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABA(A) receptor subtypes. *Mol Cell Neurosci* **17**, 973-982.
- Kneussel, M., Brandstatter, J.H., Laube, B., Stahl, S., Muller, U., and Betz, H. (1999). Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* **19**, 9289-9297.

- Kneussel, M., Haverkamp, S., Fuhrmann, J.C., Wang, H., Wassle, H., Olsen, R.W., and Betz, H. (2000). The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8594-8599.
- Kneussel, M., and Loeblich, S. (2007). Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors. *Biol Cell* **99**, 297-309.
- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R.T., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., Li, E., and Tsai, L.H. (2001). p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J Neurosci* **21**, 6758-6771.
- Kobayashi, N., Yang, J., Ueda, A., Suzuki, T., Tomaru, K., Takeno, M., Okuda, K., and Ishigatsubo, Y. (2007). RanBPM, Muskelin, p48EMLP, p44CTLH, and the armadillo-repeat proteins ARMC8alpha and ARMC8beta are components of the CTLH complex. *Gene* **396**, 236-247.
- Korkotian, E., Holcman, D., and Segal, M. (2004). Dynamic regulation of spine-dendrite coupling in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* **20**, 2649-2663.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., and Seeburg, P.H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* **269**, 1737-1740.
- Kuznetsov, S.A., Langford, G.M., and Weiss, D.G. (1992). Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* **356**, 722-725.
- Laferrriere, N.B., MacRae, T.H., and Brown, D.L. (1997). Tubulin synthesis and assembly in differentiating neurons. *Biochem Cell Biol* **75**, 103-117.
- Lafont, F., Burkhardt, J.K., and Simons, K. (1994). Involvement of microtubule motors in basolateral and apical transport in kidney cells. *Nature* **372**, 801-803.
- LaMonte, B.H., Wallace, K.E., Holloway, B.A., Shelly, S.S., Ascano, J., Tokito, M., Van Winkle, T., Howland, D.S., and Holzbaur, E.L. (2002). Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* **34**, 715-727.
- Langosch, D., Thomas, L., and Betz, H. (1988). Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7394-7398.
- Lantz, V.A., and Miller, K.G. (1998). A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of Drosophila embryos. *J Cell Biol* **140**, 897-910.
- Lardong, K., Maas, C., and Kneussel, M. (2009). Neuronal depolarization modifies motor protein mobility. *Neuroscience* **160**, 1-5.
- Ledee, D.R., Gao, C.Y., Seth, R., Fariss, R.N., Tripathi, B.K., and Zelenka, P.S. (2005). A specific interaction between muskelin and the cyclin-dependent kinase 5 activator p39 promotes peripheral localization of muskelin. *J Biol Chem* **280**, 21376-21383.
- Lee, S.H., Simonetta, A., and Sheng, M. (2004). Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron* **43**, 221-236.
- Lerma, J. (2003). Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* **4**, 481-495.

- Levi, S., Logan, S.M., Tovar, K.R., and Craig, A.M. (2004). Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *J Neurosci* **24**, 207-217.
- Lewis, A.K., and Bridgman, P.C. (1992). Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol* **119**, 1219-1243.
- Li, J., Lee, W.L., and Cooper, J.A. (2005). NudEL targets dynein to microtubule ends through LIS1. *Nat Cell Biol* **7**, 686-690.
- Liang, Y., Yu, W., Li, Y., Yang, Z., Yan, X., Huang, Q., and Zhu, X. (2004). Nudel functions in membrane traffic mainly through association with Lis1 and cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* **164**, 557-566.
- Lin, Z.S., and Yazulla, S. (1994). Heterogeneity of GABAA receptor in goldfish retina. *J Comp Neurol* **345**, 429-439.
- Lingeman, R.G., Joy, D.S., Sherman, M.A., and Kane, S.E. (1998). Effect of carbohydrate position on lysosomal transport of procathepsin L. *Mol Biol Cell* **9**, 1135-1147.
- Lise, M.F., Wong, T.P., Trinh, A., Hines, R.M., Liu, L., Kang, R., Hines, D.J., Lu, J., Goldenring, J.R., Wang, Y.T., and El-Husseini, A. (2006). Involvement of myosin Vb in glutamate receptor trafficking. *J Biol Chem* **281**, 3669-3678.
- Loebrich, S. (2006). Identifizierung und Charakterisierung unbekannter Bindeproteine des GABAA-Rezeptors von *Rattus norvegicus*. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
- Loebrich, S., Bähring, R., Katsuno, T., Tsukita, S., and Kneussel, M. (2006). Activated radixin is essential for GABAA receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton. *Embo J* **25**, 987-999.
- Lynch, J.W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* **84**, 1051-1095.
- Maas, C., Belgardt, D., Lee, H.K., Heisler, F.F., Lappe-Siefke, C., Magiera, M.M., van Dijk, J., Hausrat, T.J., Janke, C., and Kneussel, M. (2009). Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8731-8736.
- Maas, C., Tagnaouti, N., Loebrich, S., Behrend, B., Lappe-Siefke, C., and Kneussel, M. (2006). Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J Cell Biol* **172**, 441-451.
- Maccaferri, G., Roberts, J.D., Szucs, P., Cottingham, C.A., and Somogyi, P. (2000). Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol* **524** Pt 1, 91-116.
- Malinow, R., and Malenka, R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* **25**, 103-126.
- Maljevic, S., Krampfl, K., Cobilanschi, J., Tilgen, N., Beyer, S., Weber, Y.G., Schlesinger, F., Ursu, D., Melzer, W., Cossette, P., et al. (2006). A mutation in the GABA(A) receptor alpha(1)-subunit is associated with absence epilepsy. *Ann Neurol* **59**, 983-987.
- Mallik, R., and Gross, S.P. (2004). Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol* **14**, R971-982.
- Maniak, M. (2003). Organelle transport: a park-and-ride system for melanosomes. *Curr Biol* **13**, R917-919.
- Mata, J., and Nurse, P. (1997). tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell* **89**, 939-949.

- McGuire, J.R., Rong, J., Li, S.H., and Li, X.J. (2006). Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J Biol Chem* **281**, 3552-3559.
- Megias, M., Emri, Z., Freund, T.F., and Gulyas, A.I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* **102**, 527-540.
- Mercer, J.A., Seperack, P.K., Strobel, M.C., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* **349**, 709-713.
- Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H., and Langosch, D. (1995). Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* **15**, 563-572.
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., and Hirokawa, N. (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7004-7011.
- Mizokami, A., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Yamaguchi, T., Tanida, I., Takenaka, K., Nakayama, K.I., Fukami, K., Takenawa, T., Kominami, E., et al. (2007). Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of gamma2 subunit-containing GABA(A) receptors to the cell surface. *J Neurosci* **27**, 1692-1701.
- Morris, S.M., Albrecht, U., Reiner, O., Eichele, G., and Yu-Lee, L.Y. (1998). The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC. *Curr Biol* **8**, 603-606.
- Moss, J., and Vaughan, M. (1995). Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J Biol Chem* **270**, 12327-12330.
- Moss, S.J., Gorrie, G.H., Amato, A., and Smart, T.G. (1995). Modulation of GABAA receptors by tyrosine phosphorylation. *Nature* **377**, 344-348.
- Moss, S.J., and Smart, T.G. (2001). Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* **2**, 240-250.
- Muresan, V., Stankewich, M.C., Steffen, W., Morrow, J.S., Holzbaur, E.L., and Schnapp, B.J. (2001). Dynactin-dependent, dynein-driven vesicle transport in the absence of membrane proteins: a role for spectrin and acidic phospholipids. *Mol Cell* **7**, 173-183.
- Murphey, R.K., Caruccio, P.C., Getzinger, M., Westgate, P.J., and Phillis, R.W. (1999). Dynein-dynactin function and sensory axon growth during Drosophila metamorphosis: A role for retrograde motors. *Dev Biol* **209**, 86-97.
- Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J.C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R.J., Worley, P.F., and Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* **23**, 569-582.
- Naisbitt, S., Valtschanoff, J., Allison, D.W., Sala, C., Kim, E., Craig, A.M., Weinberg, R.J., and Sheng, M. (2000). Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein. *J Neurosci* **20**, 4524-4534.
- Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M., and Nishimoto, T. (1998). When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol* **143**, 1041-1052.

- Nayeem, N., Green, T.P., Martin, I.L., and Barnard, E.A. (1994). Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* **62**, 815-818.
- Nusser, Z., Sieghart, W., Benke, D., Fritschy, J.M., and Somogyi, P. (1996a). Differential synaptic localization of two major gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha subunits on hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11939-11944.
- Nusser, Z., Sieghart, W., Stephenson, F.A., and Somogyi, P. (1996b). The alpha 6 subunit of the GABAA receptor is concentrated in both inhibitory and excitatory synapses on cerebellar granule cells. *J Neurosci* **16**, 103-114.
- Nymann-Andersen, J., Wang, H., Chen, L., Kittler, J.T., Moss, S.J., and Olsen, R.W. (2002). Subunit specificity and interaction domain between GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) and GABA(A) receptors. *J Neurochem* **80**, 815-823.
- Ohshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veeranna, Pant, H.C., Brady, R.O., Martin, L.J., and Kulkarni, A.B. (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11173-11178.
- Osterweil, E., Wells, D.G., and Mooseker, M.S. (2005). A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J Cell Biol* **168**, 329-338.
- Papadopoulos, T., Korte, M., Eulenburg, V., Kubota, H., Retiounskaia, M., Harvey, R.J., Harvey, K., O'Sullivan, G.A., Laube, B., Hulsmann, S., et al. (2007). Impaired GABAergic transmission and altered hippocampal synaptic plasticity in collybistin-deficient mice. *Embo J* **26**, 3888-3899.
- Pearce, R.A. (1993). Physiological evidence for two distinct GABAA responses in rat hippocampus. *Neuron* **10**, 189-200.
- Peng, J., Kim, M.J., Cheng, D., Duong, D.M., Gygi, S.P., and Sheng, M. (2004). Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J Biol Chem* **279**, 21003-21011.
- Perry, R.B., and Fainzilber, M. (2009). Nuclear transport factors in neuronal function. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 600-606.
- Pfeiffer, F., Graham, D., and Betz, H. (1982). Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* **257**, 9389-9393.
- Prag, S., and Adams, J.C. (2003). Molecular phylogeny of the kelch-repeat superfamily reveals an expansion of BTB/kelch proteins in animals. *BMC Bioinformatics* **4**, 42.
- Prag, S., Collett, G.D., and Adams, J.C. (2004). Molecular analysis of muskelin identifies a conserved discoidin-like domain that contributes to protein self-association. *Biochem J* **381**, 547-559.
- Prag, S., De Arcangelis, A., Georges-Labouesse, E., and Adams, J.C. (2007). Regulation of post-translational modifications of muskelin by protein kinase C. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 366-378.
- Rao, A., Cha, E.M., and Craig, A.M. (2000). Mismatched appositions of presynaptic and postsynaptic components in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci* **20**, 8344-8353.
- Raposo, G., and Marks, M.S. (2007). Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 786-797.
- Rathenberg, J., Kittler, J.T., and Moss, S.J. (2004). Palmitoylation regulates the clustering and cell surface stability of GABAA receptors. *Mol Cell Neurosci* **26**, 251-257.

- Reddy, S., Jin, P., Trimarchi, J., Caruccio, P., Phillis, R., and Murphey, R.K. (1997). Mutant molecular motors disrupt neural circuits in *Drosophila*. *J Neurobiol* **33**, 711-723.
- Reid, T., Bathoorn, A., Ahmadian, M.R., and Collard, J.G. (1999). Identification and characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42. *J Biol Chem* **274**, 33587-33593.
- Rickard, J.E., and Kreis, T.E. (1996). CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol* **6**, 178-183.
- Rodionov, V., Yi, J., Kashina, A., Oladipo, A., and Gross, S.P. (2003). Switching between microtubule- and actin-based transport systems in melanophores is controlled by cAMP levels. *Curr Biol* **13**, 1837-1847.
- Rudolph, U., and Mohler, H. (2004). Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 475-498.
- Saito, N., Okada, Y., Noda, Y., Kinoshita, Y., Kondo, S., and Hirokawa, N. (1997). KIFC2 is a novel neuron-specific C-terminal type kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles. *Neuron* **18**, 425-438.
- Saliba, R.S., Michels, G., Jacob, T.C., Pangalos, M.N., and Moss, S.J. (2007). Activity-dependent ubiquitination of GABA(A) receptors regulates their accumulation at synaptic sites. *J Neurosci* **27**, 13341-13351.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning I/II/III. A Laboratory Manual Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York, USA
- Samson, F., Donoso, J.A., Heller-Bettinger, I., Watson, D., and Himes, R.H. (1979). Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport. *J Pharmacol Exp Ther* **208**, 411-417.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sapir, T., Elbaum, M., and Reiner, O. (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *Embo J* **16**, 6977-6984.
- Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M.J., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2000). A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* **28**, 681-696.
- Sassoe-Pognetto, M., Panzanelli, P., Sieghart, W., and Fritschy, J.M. (2000). Colocalization of multiple GABA(A) receptor subtypes with gephyrin at postsynaptic sites. *J Comp Neurol* **420**, 481-498.
- Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Brecht, D.S., and Nicoll, R.A. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13902-13907.
- Schweizer, C., Balsiger, S., Bluethmann, H., Mansuy, I.M., Fritschy, J.M., Mohler, H., and Luscher, B. (2003). The gamma 2 subunit of GABA(A) receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Mol Cell Neurosci* **24**, 442-450.
- Setou, M., Hayasaka, T., and Yao, I. (2004). Axonal transport versus dendritic transport. *J Neurobiol* **58**, 201-206.
- Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D.H., and Hirokawa, N. (2000). Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* **288**, 1796-1802.

- 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.
- Sheng, M., and Kim, M.J. (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* **298**, 776-780.
- Shimada, T., Toriyama, M., Uemura, K., Kamiguchi, H., Sugiura, T., Watanabe, N., and Inagaki, N. (2008). Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth. *J Cell Biol* **181**, 817-829.
- Shin, H., Wyszynski, M., Huh, K.H., Valtschanoff, J.G., Lee, J.R., Ko, J., Streuli, M., Weinberg, R.J., Sheng, M., and Kim, E. (2003). Association of the kinesin motor KIF1A with the multimodular protein liprin-alpha. *J Biol Chem* **278**, 11393-11401.
- Short, B., Preisinger, C., Schaletzky, J., Kopajtich, R., and Barr, F.A. (2002). The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr Biol* **12**, 1792-1795.
- Sieghart, W., Fuchs, K., Tretter, V., Ebert, V., Jechlinger, M., Hoyer, H., and Adamiker, D. (1999). Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int* **34**, 379-385.
- Slagsvold, T., Pattni, K., Malerod, L., and Stenmark, H. (2006). Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol* **16**, 317-326.
- Smith, D.S., Niethammer, M., Ayala, R., Zhou, Y., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Tsai, L.H. (2000). Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat Cell Biol* **2**, 767-775.
- Smith, M.J., Pozo, K., Brickley, K., and Stephenson, F.A. (2006). Mapping the GRIF-1 binding domain of the kinesin, KIF5C, substantiates a role for GRIF-1 as an adaptor protein in the anterograde trafficking of cargoes. *J Biol Chem* **281**, 27216-27228.
- Sola, M., Bavro, V.N., Timmins, J., Franz, T., Ricard-Blum, S., Schoehn, G., Ruigrok, R.W., Paarmann, I., Saiyed, T., O'Sullivan, G.A., et al. (2004). Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *Embo J* **23**, 2510-2519.
- Soldati, T., and Schliwa, M. (2006). Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 897-908.
- Svitkina, T.M., Verkhovskiy, A.B., McQuade, K.M., and Borisy, G.G. (1997). Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol* **139**, 397-415.
- Swiatecka-Urban, A., Boyd, C., Coutermarsh, B., Karlson, K.H., Barnaby, R., Aschenbrenner, L., Langford, G.M., Hasson, T., and Stanton, B.A. (2004). Myosin VI regulates endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **279**, 38025-38031.
- Tagnaouti, N., Loebrich, S., Heisler, F., Pechmann, Y., Fehr, S., De Arcangelis, A., Georges-Labouesse, E., Adams, J.C., and Kneussel, M. (2007). Neuronal expression of muskellin in the rodent central nervous system. *BMC Neurosci* **8**, 28.
- Thomson, A.M., Bannister, A.P., Hughes, D.I., and Pawelzik, H. (2000). Differential sensitivity to Zolpidem of IPSPs activated by morphologically identified CA1 interneurons in slices of rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **12**, 425-436.
- Traer, C.J., Rutherford, A.C., Palmer, K.J., Wassmer, T., Oakley, J., Attar, N., Carlton, J.G., Kremerskothen, J., Stephens, D.J., and Cullen, P.J. (2007). SNX4 coordinates endosomal sorting of TfnR with dynein-mediated transport into the endocytic recycling compartment. *Nat Cell Biol* **9**, 1370-1380.

- Tu, J.C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M., and Worley, P.F. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* **23**, 583-592.
- Tu, J.C., Xiao, B., Yuan, J.P., Lanahan, A.A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D.J., and Worley, P.F. (1998). Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron* **21**, 717-726.
- Uji, A., Matsuda, M., Kukita, T., Maeda, K., Kanematsu, T., and Hirata, M. (2002). Molecules interacting with PRIP-2, a novel Ins(1,4,5)P3 binding protein type 2: Comparison with PRIP-1. *Life Sci* **72**, 443-453.
- Umeda, M., Nishitani, H., and Nishimoto, T. (2003). A novel nuclear protein, Twa1, and Muskelein comprise a complex with RanBPM. *Gene* **303**, 47-54.
- Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467-480.
- Valiyaveetil, M., Bentley, A.A., Gursahaney, P., Hussien, R., Chakravarti, R., Kureishy, N., Prag, S., and Adams, J.C. (2008). Novel role of the muskelein-RanBP9 complex as a nucleocytoplasmic mediator of cell morphology regulation. *J Cell Biol* **182**, 727-739.
- Vallee, R.B., Faulkner, N.E., and Tai, C.Y. (2000). The role of cytoplasmic dynein in the human brain developmental disease lissencephaly. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 89-98.
- Vallee, R.B., Williams, J.C., Varma, D., and Barnhart, L.E. (2004). Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* **58**, 189-200.
- van der Goot, F.G., and Gruenberg, J. (2006). Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol* **16**, 514-521.
- van Rijnsoever, C., Sidler, C., and Fritschy, J.M. (2005). Internalized GABA-receptor subunits are transferred to an intracellular pool associated with the postsynaptic density. *Eur J Neurosci* **21**, 327-338.
- Vautrin, J., Schaffner, A.E., and Barker, J.L. (1994). Fast presynaptic GABAA receptor-mediated Cl⁻ conductance in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* **479** (Pt 1), 53-63.
- Vreugde, S., Ferrai, C., Miluzio, A., Hauben, E., Marchisio, P.C., Crippa, M.P., Bussi, M., and Biffo, S. (2006). Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* **23**, 749-755.
- Wang, H., Bedford, F.K., Brandon, N.J., Moss, S.J., and Olsen, R.W. (1999). GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* **397**, 69-72.
- Wang, Z., Edwards, J.G., Riley, N., Provance, D.W., Jr., Karcher, R., Li, X.D., Davison, I.G., Ikebe, M., Mercer, J.A., Kauer, J.A., and Ehlers, M.D. (2008). Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* **135**, 535-548.
- Wanschers, B., van de Vorstenbosch, R., Wijers, M., Wieringa, B., King, S.M., and Fransen, J. (2008). Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1. *Cell Motil Cytoskeleton* **65**, 183-196.
- Watabe, H., Valencia, J.C., Le Pape, E., Yamaguchi, Y., Nakamura, M., Rouzaud, F., Hoashi, T., Kawa, Y., Mizoguchi, M., and Hearing, V.J. (2008). Involvement of dynein and spectrin with early melanosome transport and melanosomal protein trafficking. *J Invest Dermatol* **128**, 162-174.

Wells, A.L., Lin, A.W., Chen, L.Q., Safer, D., Cain, S.M., Hasson, T., Carragher, B.O., Milligan, R.A., and Sweeney, H.L. (1999). Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* **401**, 505-508.

Whiting, P.J. (1999). The GABA-A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention. *Neurochem Int* **34**, 387-390.

Williams, S.N., Locke, C.J., Braden, A.L., Caldwell, K.A., and Caldwell, G.A. (2004). Epileptic-like convulsions associated with LIS-1 in the cytoskeletal control of neurotransmitter signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet* **13**, 2043-2059.

Wu, X., Wang, F., Rao, K., Sellers, J.R., and Hammer, J.A., 3rd (2002). Rab27a is an essential component of melanosome receptor for myosin Va. *Mol Biol Cell* **13**, 1735-1749.

Wyszynski, M., Valtschanoff, J.G., Naisbitt, S., Dunah, A.W., Kim, E., Standaert, D.G., Weinberg, R., and Sheng, M. (1999). Association of AMPA receptors with a subset of glutamate receptor-interacting protein in vivo. *J Neurosci* **19**, 6528-6537.

Xue, F., and Cooley, L. (1993). kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell* **72**, 681-693.

Yamada, M., Toba, S., Yoshida, Y., Haratani, K., Mori, D., Yano, Y., Mimori-Kiyosue, Y., Nakamura, T., Itoh, K., Fushiki, S., et al. (2008). LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. *Embo J* **27**, 2471-2483.

Yi, J.J., and Ehlers, M.D. (2007). Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacol Rev* **59**, 14-39.

Yi, Z., Petralia, R.S., Fu, Z., Swanwick, C.C., Wang, Y.X., Prybylowski, K., Sans, N., Vicini, S., and Wenthold, R.J. (2007). The role of the PDZ protein GIPC in regulating NMDA receptor trafficking. *J Neurosci* **27**, 11663-11675.

Zambrowicz, B.P., and Friedrich, G.A. (1998). Comprehensive mammalian genetics: history and future prospects of gene trapping in the mouse. *Int J Dev Biol* **42**, 1025-1036.

Zhang, Q., Wang, F., Cao, J., Shen, Y., Huang, Q., Bao, L., and Zhu, X. (2009). Nudel Promotes Axonal Lysosome Clearance and Endo-lysosome Formation via Dynein-Mediated Transport. *Traffic*. PMID: 19522757

Zhang, S.J., and Jackson, M.B. (1993). GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings. *Science* **259**, 531-534.

Zhao, C., Slevin, J.T., and Whiteheart, S.W. (2007). Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs. *FEBS Lett* **581**, 2140-2149.

A ABILUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung des GABA _A -Rezeptors	10
Abb. 1.2:	Die drei Familien der molekularen Motorproteine	13
Abb. 1.3:	GABA _A -Rezeptor Endozytose und post-endozytotische Sortierung	19
Abb. 1.4:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Muskelin aus <i>Mus musculus</i>	20
Abb. 3.1:	Strategie zur Generierung von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen	55
Abb. 3.2:	PCR-Genotypisierung von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen	56
Abb. 3.3:	Southern Blot Analyse von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen	57
Abb. 3.4:	Depletion von Muskelin in Gehirn-Lysaten von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen	57
Abb. 3.5:	Depletion von Muskelin in Gehirnschnitten von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen	58
Abb. 3.6:	Immunpräzipitation von Muskelin aus Gehirn-Lysaten	59
Abb. 3.7:	Morphologie des Gehirns von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen	60
Abb. 3.8:	Aufhellung der Fellfarbe von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen	61
Abb. 3.9:	Transport von Muskelin in hippokampalen Neuronen	62
Abb. 3.10:	Kolokalisation von Muskelin mit intrazellulären Vesikeln	63
Abb. 3.11:	Kotransport von Muskelin und GABA _A R α 1	64
Abb. 3.12:	Koimmunpräzipitation von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette	65
Abb. 3.13:	Kofraktionierung von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette	66
Abb. 3.14:	Kolokalisation von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit der Dynein Intermediären Kette	67
Abb. 3.15:	Anreicherung des GABA _A -Rezeptors in intrazellulären Vesikeln bei Dynamitin überexprimierenden Mäusen	69
Abb. 3.16:	Unveränderte GABA _A -Rezeptor Konzentration an der Zelloberfläche bei Dynamitin überexprimierenden Mäusen	70
Abb. 3.17:	Überexpression von Dynamitin in HEK293T-Zellen	71
Abb. 3.18:	Kofraktionierung von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit Proteinmarkern endozytotischer Vesikel	72

Abb. 3.19:	Lokalisation von Muskelin innerhalb von multivesikulären Körpern (MVBs)	73
Abb. 3.20:	Lysosomale Degradation von GABA _A -Rezeptoren aufgrund von Mikrotubuli-abhängigem Transport	75
Abb. 3.21:	Reduzierte Koimmunpräzipitation von GABA _A -Rezeptor mit Dynein Intermediärer Kette nach Depletion von Muskelin	77
Abb. 3.22:	Anreicherung des GABA _A -Rezeptors in intrazellulären Vesikeln nach Depletion von Muskelin	78
Abb. 3.23:	Störung der GABA _A -Rezeptor Degradation durch Depletion von Muskelin	79
Abb. 3.24:	Die Degradationsrate des GABA _A -Rezeptors ist von Muskelin Abhängig	80
Abb. 3.25:	Unveränderte Degradation von GluR1 nach Depletion von Muskelin	81
Abb. 3.26:	Koimmunpräzipitation von Myosin VI mit Muskelin	82
Abb. 3.27:	Koimmunpräzipitation von GABA _A -Rezeptor, Muskelin und Myosin VI	83
Abb. 3.28:	Kofraktionierung von GABA _A -Rezeptor, Muskelin und Myosin VI	84
Abb. 3.29:	Kolokalisation von GABA _A -Rezeptor und Muskelin mit Myosin VI	85
Abb. 3.30:	Koimmunpräzipitation von Myosin VI mit dem GABA _A -Rezeptor erfolgt unabhängig von Muskelin	86
Abb. 3.31:	Erhöhte GABA _A -Rezeptor Konzentration in Plasmamembran Fraktionen von Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen	87
Abb. 3.32:	Erhöhte GABA _A -Rezeptor Konzentration an der Zelloberfläche in Muskelin <i>Knockout</i> Mäusen	88
Abb. 3.33:	Lokalisation von Muskelin an Einstülpungen der Plasmamembran	89
Abb. 3.34:	Degradation von GABA _A -Rezeptoren aufgrund von Aktinfilament-abhängigem Transport	90
Abb. 3.35:	Störung der GABA _A -Rezeptor-Internalisierung nach Depletion von Muskelin I	92
Abb. 3.36:	Störung der GABA _A -Rezeptor-Internalisierung nach Depletion von Muskelin II	93
Abb. 4.1:	Modell: Verknüpfung von Aktinfilament- und Mikrotubuli-abhängigem Transport des GABA _A -Rezeptors	115

B TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Verwendete Primärantikörper	30
Tabelle 2:	Verwendete Sekundärantikörper	31
Tabelle 3:	Verwendete Vektoren	32
Tabelle 4:	Verwendete Oligonukleotide	33
Tabelle 5:	Reaktionskomponenten der Muskelin PCR-Genotypisierung	38
Tabelle 6:	Temperaturzyklen der Muskelin PCR-Genotypisierung	39

C ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	CCV	<i>clathrin-coated vesicles</i>
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl- 4-Isoxazol Propionsäure	Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
AP2	Adapterprotein 2	Cdk5	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>
as	<i>antisense</i>	cDNA	komplementäre DNA
ATP	Adenosintriphosphat	CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
α	anti	CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
BIG2	<i>brefeldin-A-inhibited GDP/GTP exchange factor</i>	CLIP170	<i>cytoplasmic linker protein 170</i>
bp	Basenpaare	CoIP	Koimmunpräzipitation
BSA	Bovines Serumalbumin	C-terminal	carboxyterminal
BZ	Benzodiazepam	CTLH	<i>C-terminal to LisH</i>
bzw.	beziehungsweise	CY2	Carbocyanin
CA	Cornu ammonis	CY3	Indocarbocyanin
CaMKII	Ca ²⁺ Calmodulin-abhängige Protein Kinase II	CY5	Indodicarbocyanin
CASK	<i>calcium/calmodulin- dependent serine protein kinase</i>	Dab2	<i>disabled-2</i>
		DCLIP190	<i>Drosophila cytoplasmic linker protein 190</i>
		DHC	Dynein schwere Kette
		DIC	Dynein intermediäre Kette

DILC	Dynein intermediäre leichte Kette	GEF	<i>GDP/GTP exchange factor</i>
DIV	<i>days in vitro</i>	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
DLC	Dynein leichte Kette	GIPC	<i>GAIIP-interacting protein COOH terminus</i>
DMEM	Dulbeccos modifiziertes <i>Eagle</i> Medium	GK	<i>Guanylate kinase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	GKAP	<i>guanylate kinase-associated protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	GluR	Glutamat-Rezeptor-Untereinheit
DNase	Desoxyribonuklease	GlyR	Glyzin-Rezeptor
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat	GODZ	<i>golgi-specific DHHC zink finger protein</i>
DTT	1,4-Dithiotreitol	G-Protein	GTP-bindendes Protein
E	Embryonalstadium	GRIF1	<i>GABA_A-receptor interacting factor 1</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	GRIP1	<i>glutamate receptor interacting protein 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	GST	Glutathion-S-Transferase
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	GTP	Guanosintriphosphat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-amino ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat	HAP1	<i>huntingtin associated protein 1</i>
EM	Elektronenmikroskopie	HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
ER	Endoplasmatisches Reticulum	HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
ERAD	ER-abhängige Degradation	HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
et al.	und andere	HPSF	<i>high purified salt free</i>
EtBr	Ethidiumbromid	HRP	<i>horseradish Peroxidase</i>
FBS	fötales Rinderserum	HS	Pferdeserum
FCS	fötales Kälberserum	5-HTR	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor
<i>g</i>	Erdbeschleunigungs-konstante	ICC	Immunzytochemie
GABA	γ-amino-Buttersäure	IgG	Immunglobulin Klasse G (Gamma)
GABA _A R	GABA _A -Rezeptor	IHC	Immunhistochemie
GABARAP	<i>GABA_A-receptor associated protein</i>	IP	Immunpräzipitation
GAD	<i>glutamic acid decarboxylase</i>	IP-3	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphat-3 receptor</i>
GAIP	<i>G alpha interacting protein</i>		
GDP	Guanosindiphosphat		

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	PB	Phosphatpuffer
JSAP	<i>JNK/SAPK-associated protein-1</i>	PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
kb	Kilobasenpaare	PCR	Polymerasekettenreaktion
KHC	<i>kinesin heavy chain</i>	PDZ	<i>PSD95/ Discs large/ Zonula occludentes-1</i>
KIF5	<i>kinesin superfamily protein 5</i>	pH	-log [H ⁺]
KLC	<i>kinesin light chain</i>	PICK1	<i>protein that interacts with C kinase 1</i>
LB	Luria-Bertani	PKA/C	Proteinkinase A/C
LisH	<i>lissencephaly-1-homology domain</i>	PLIC1/2	<i>protein linking IAP with cytoskeleton</i>
M	Molar	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
MALS	<i>mammalian LIN-7</i>	pmn1	<i>C.elegans Lis1 allele</i>
MAP	<i>microtubule associated protein</i>	PNS	peripheres Nervensystem
mint1	<i>munc-18 interacting protein</i>	PRIP1/2	<i>phospholipase C related inactive protein</i>
mLin	<i>mammalian Lin protein</i>	PSD	Postsynaptische Dichte
mRNA	messenger RNA	PSD-95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i>	PVDF	Polyvinylidendifluorid
MTOC	<i>microtubule organizing center</i>	Rab	<i>Ras-related in brain</i>
MVB	<i>multivesicular body</i>	RanBPM	<i>Ran binding protein in MTOC</i>
NaAc	Natriumazetat	Ras	<i>Rat sarcoma</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat	RILP	<i>Rab interacting lysosomal protein</i>
NR	NMDA-Rezeptor Untereinheit	RLC	regulatorische leichte Kette
NSF	<i>N-ethyl-maleimide-sensitive factor</i>	RNA	Ribonukleinsäure
N-terminal	aminoterminal	RNase	Ribonuklease
NudE	<i>nuclear distribution gene E</i>	ROI	<i>region of interest</i>
NudEL	<i>NudE like</i>	rpm	Umdrehungen pro Minute
OD	Optische Dichte	RT	Raumtemperatur
ORP1L	<i>oxysterol-binding protein-related protein 1L</i>	s	<i>sense</i>
P	Postnataltag	S 1-4	<i>supernatant (Überstand) 1-4</i>
P 1-4	Pellet 1-4	SAP	<i>Synapse-associated protein</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-elektrophorese	SDS	Natriumdodecylsulfat

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
src	<i>sarcoma viral oncogen homolog</i>
SSC	<i>saline-sodium citrate buffer</i>
SH3	<i>Src homolog 3</i>
SV2	<i>synaptic vesicle 2</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit Tween
TE	Tris-EDTA
tea1p	<i>tip end-associated 1 protein</i>
TM	Transmembrandomäne
TRAK	<i>trafficking protein kinesin binding</i>
Tris	Trishydroxymethylamino- methan
TSP1	Thrombospondin-1
U	<i>unit</i>
u.a.	unter anderem
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
VASP	<i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
VGLUT	<i>vesicular glutamate transporter</i>
VIAAT	<i>vesicular inhibitory aminoacid transporter</i>
v/v	Volumenprozent
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w/o	ohne
w/v	Gewichtprozent
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

D EINHEITEN

a.u.	willkürliche Einheiten
bp	Basenpaare
Da	Dalton
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
min	Minute
mol	Mol
s	Sekunde

E PRÄFIXE

SYMBOL	PRÄFIX	ZEHNERPOTENZ
f	Femto	10^{-15}
p	Pico	10^{-12}
n	Nano	10^{-9}
μ	Mikro	10^{-6}
m	Milli	10^{-3}
c	Zenti	10^{-2}
h	Hekto	10^2
k	Kilo	10^3
M	Mega	10^6
G	Giga	10^9

F WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

Grundstudium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität in Würzburg von 2000 bis 2002.

Hauptstudium an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität in Würzburg mit Schwerpunkt Biotechnologie, Biochemie und Genetik von 2002 bis 2005.

Stipendium des Socrates / Erasmus Programms des Deutschen Akademischen Austausch Dienstes (DAAD), Winter 2003 / 2004.

Aufenthalt als Gastforscher im Winter 2003 / 2004 am Department für Molekularbiologie und Biochemie sowie am Department für Mikrobiologie und Genetik an der Universität von Salamanca, Salamanca, Spanien.

Diplomarbeit 2005 am Lehrstuhl für Biotechnologie an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität in Würzburg unter Leitung von Prof. Dr. Ullrich Zimmermann mit dem Thema "Regulation der Plasmalemma- und Tonoplastenleitfähigkeiten der marinen Alge *Valonia utricularis*: Die Rolle von Phospholipasen und Sulfat".

Seit Juli 2006 Doktorand im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Matthias Kneussel.

Stipendium der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft (NWG) für das *6th FENS Forum of European Neuroscience 2008*, Genf, Schweiz.

G PUBLIKATIONEN

ORIGINALVERÖFFENTLICHUNGEN

Maas, C., Belgardt, D., Lee, H.K., Heisler, F., Lappe-Siefke, C., Magiera, M.M., van Dijk, J., Hausrat, T.J., Janke, C., Kneussel, M. (2009). Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 8731-8736.

Tagnaouti, N.[#], Loebrich, S.[#], Heisler, F.[#], Pechmann, Y., Fehr, S., De Arcangelis, A., Georges-Labouesse, E., Adams, J.C., Kneussel, M. (2007). Neuronal expression of muskelin in the rodent central nervous system. *BMC Neurosci* **8**, 28.

Binder, K.A.[#], Heisler, F.[#], Westhoff, M., Wegner, L.H., Zimmermann, U. (2006). Elucidation of the mechanisms underlying hypo-osmotically induced turgor pressure regulation in the marine alga *Valonia utricularis*. *J Membrane Biol* **213**, 47-63

[#] geteilte Erstautorschaft

KONGRESSBEITRÄGE

6th FENS Forum of European Neuroscience 2008, Genf, Schweiz:

F. Heisler, N. Tagnaouti, S. Loebrich, Y. Pechmann, T. Hausrat, C. Lappe-Siefke, I. Schapitz, M. Kneussel. 2008. Subcellular localization and dendritic transport of muskelin in neurons of the rodent central nervous system.

1st Baltic Sea Meeting on Neuronal Protein Turnover 2008, Travemünde:

F. Heisler, N. Tagnaouti, S. Loebrich, Y. Pechmann, T. Hausrat, C. Lappe-Siefke, I. Schapitz, M. Kneussel. 2008. Subcellular localization and dendritic transport of muskelin in neurons of the rodent central nervous system.

H DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Matthias Kneussel für die unermüdliche Betreuung meines Projektes, die umfangreiche Unterstützung meiner Arbeit und den Anregungen, die zu dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Thorsten Burmester für die gute Betreuung am Department Biologie und für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Dissertation.

PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich und Prof. Dr. Konrad Wiese möchte ich für die Begutachtung meiner Disputation danken.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe danke ich für eine hilfreiche gegenseitige Unterstützung und für ein freundschaftliches Arbeitsklima. Besonders Dorthe, Torben und Yvonne danke ich für die Hilfe bei der Entstehung dieser Arbeit. Yvonne danke ich darüber hinaus für einen guten Start und die technische Unterstützung.

Allen Mitgliedern der benachbarten Forschergruppen am ZMNH und den Mitarbeitern der Servicegruppen danke ich für die große Hilfsbereitschaft und die stets freundliche Arbeitsatmosphäre.

Meinen Freunden danke ich für die Abwechslung vom Laboralltag und dafür, dass sie auch in den unmöglichsten Situationen für mich da waren.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mich immer vorbehaltlos unterstützt haben, mir Mut zugesprochen haben und mir mit ihrer Lebenserfahrung zur Seite stehen.

