Untersuchungen zur Rolle von Arc/Arg3.1 in synaptischer Plastizität und endosomaler Sortierung

Dissertation

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

Eingereicht im Fachbereich Biologie,
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften, Der Universität Hamburg

vorgelegt von

Lars Binkle

aus Saarbrücken

Hamburg, 2014

.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Kuhl
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Lohr

Die Arbeit wurde im Zeitraum vom 01. Juni 2010 bis 26 März 2014 im Institut für Molekulare und Zelluläre Kognition unter der Anleitung von Herrn Prof. Kuhl angefertigt.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Lars Binkle

Hamburg den 25.03.2014

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung 7

1.1 Lernen und Gedächtnis 9

1.2 Synaptische Plastizität 11

1.3 Arc/Arg3.1 12

1.4 Rezeptor-Trafficking und endosomale Sortierung 16

1.4.1 Clathrin-abhängige Endozytose

1.4.2 Endosomale Sortierung

1.5 Zielsetzung der Arbeit 23

2. Ergebnisse 25

2.1 Identifizierung neuer Arc/Arg3.1-Interaktionspartner im Hefe-Zwei-Hybrid-System 26

2.2 Arc/Arg3.1 und seine neu identifizierten Interaktionspartner kolokalisieren an Endosomen und der Plasmamembran 29

2.3 Arc/Arg3.1 und seine neu identifizierten Interaktionspartner kolokalisieren in Neuronen 35

2.4 Verifikation der Bindung zwischen Arc/Arg3.1 und den neuen Interaktionspartnern 40

2.5 Arc/Arg3.1 koimmunpräzipitiert mit SNX7 40

2.6 Arc/Arg3.1 bindet direkt an SNX7 41

2.7 Charakterisierung der Arc/Arg3.1-Bindestelle in SNX7 41

2.8 Analyse von SNX7-Substitutionsmutanten via Mammalia-Zwei-Hybrid System 42

2.9 Modellierung der SNX7-BAR-Domäne 43

2.10 Charakterisierung der Arc/Arg3.1 Bindestelle 44

2.11 Arc/Arg3.1 interagiert und kolokalisiert mit dem SNX7-SNX4-Heterodimer 46

2.12 Lokalisation von Arc/Arg3.1 und SNX7 im endosomalen System 51

2.13 Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren mit Komponenten der Endozytose-Maschinerie 56

2.14 SNX7 kopräzipitiert das Candidate Pasticity Gene 2 (CPG2) 65

2.15 Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren mit CPG2 in dendritischen Spines 66

2.16 Generierung einer SNX7-Knock-out-Maus-Linie 67

2.17 SNX7-Promotor getriebene Beta-Galaktosidase-Expression 69

2.18 SNX7-in-situ-Hybridisierung in Hirnschnitten 71

2.19 Analyse der SNX7-KO-Tiere 72

3. Diskussion 75

3.1 Identifizierung neuer Arc/Arg3.1-Bindungspartner 76

3.2 Arc/Arg3.1 kolokalisiert mit SNX7 und AMPH2 an Endosomen, der Plasmamembran und in dendritischen Spines 77

3.3 Arc/Arg3.1 bindet an eine hydrophoben Bereich der SNX7-BAR-Domäne 79

3.4 Arc/Arg3.1 bindet an das SNX4/7-Heterodimer und kolokalisiert mit diesem in dendritischen Spines 80

3.5 Arc/Arg3.1, SNX7 und das SNX4/7-Heterodimer assoziieren mit frühen und Recycling-Edosomen 81

3.6 Arc/Arg3.1 und SNX7 assoziieren mit der Endozytose-Maschinerie 82

3.7 SNX7 ist in weiten Teilen des Gehirns und besonders mit Lernen und Gedächtnis assoziierten Arealen exprimiert 83

3.8 AMPAR-Trafficking und die Arc/Arg3.1-SNX7-Interaktion 85

3.9 Ausblick 90

4. Material & Methoden 93

4.1 Lösungen, Puffer und Medien 94

4.2 Technische Gerätschaften 100

4.3 Molekularbiologie 101

4.3.1 Transformation

4.3.2 DNA-Minipräperation

4.3.3 DNA-Midipräperation
4.3.4 Verdau, Extraktion und Ligation der DNA
4.3.5 Gateway Cloning
4.4 Biochemie 103
4.4.1 Immunpräzipitationen aus immortalisierten Zelllinien
4.4.2 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis)
4.4.3 Western Blot
4.4.4 Rekombinante Expression von GST-Fusionsproteinen in E.coli
4.4.5 GST-pull-down
4.5 Zellkultur 106
4.5.1 Kultivierung von HeLa-Zellen
4.5.2 Transfektion von HeLa-zellen
4.5.3 Primärkultur hippocampaler Neurone
4.5.4 Transfection von primären hippocampalen Neuronen
4.5.5 Produktion von Lentiviren und Transduktion
4.5.6 Immunocytochemie
4.5.7 Transferrin-Internalisierung und Qantifizierung
4.5.8 Das Mammalia-Zwei-Hybrid-System
4.6 Analyse von Hirngwebe 109
4.6.1 Beta-Galactosidase-Färbung
4.6.2 In situ Hybridisierung (ISH)
4.7 Das Hefe-Zwei-Hybid-System 110
4.8 Mäuse 111
4.8.1 Maushirnlysate
4.8.2 Southern Blot

5. Apendix 113

5.1 Literaturverzeichnis 114

5.2 Danksagung 124

Zusammenfassung

Die Konsolidierung des Gedächtnisses hin zu einer langanhaltenden Form, ist von der Induktion aktivitäts-regulierter Gene und deren Einfluss auf neuronale Verbindungen abhängig. Eines dieser Gene ist *das immediate early gene* Arc/Arg3.1, dessen mRNA und Protein in Abhängigkeit von plastizitäts-induzierenden Stimuli in die Dendriten der aktivierten Neurone transportiert wird. Mäuse mit einer genetischen Deletion von Arc/Arg3.1 zeigen schwere Störungen in der Konsolidierung der synaptischen Plastizität und des Langzeitgedächtnisses, während die grundlegende synaptische Transmission und das Kurzzeitgedächtnis intakt sind. Arc/Arg3.1 interagiert mit Komponenten der Clathrin-abhängigen Endozytose-Maschinerie und beeinflusst die Oberflächenexpression von ionotropen Glutamatrezeptoren vom Typ AMPA (α-amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole propionic acid). Die Änderung der Komposition und Menge an synaptischen AMPA-Rezeptoren wird als zentraler Mechanismus der synaptischen Plastizität angesehen. Der Einfluss von Arc/Arg3.1 auf diesen Mechanismus und die zu Grunde liegenden molekularen Wechselwirkungen sind weitgehend unverstanden. Neben einer Verbindung zur Endozytose weist die Interaktion von Arc/Arg3.1 mit der γ-Secretase auf eine Funktion in der endosomalen Sortierung von Membranproteinen hin. Die Prozessierung der Membranproteine APP (Amyloid Precurser Protein) und Notch1 durch die γ-Secretase wird entscheidend durch die aktivitäts-regulierte Expression von Arc/Arg3.1 verändert. Es ist jedoch unverstanden wie Arc/Arg3.1 die endosomale Sortierung der γ-Secretase und möglicherweise auch von AMPA-Rezeptoren beeinflussen kann.

Zur Beantwortung dieser Frage und zum besseren Verständnis der molekularen Funktion von Arc/Arg3.1 haben wir im Hefe-Zwei-Hybrid-System nach neuen Arc/Arg3.1-Bindungspartnern gesucht. Mehrere der neu identifizierten Bindungspartner sind mit dem endosomalen System der Zelle assoziiert. In dieser Arbeit habe ich mehrere dieser Proteine auf ihre Kolokalisation und Bindungseigenschaften mit Arc/Arg3.1 untersucht. Sorting Nexin-7 (SNX7), ein noch nicht charakterisiertes Mitglied der Sorting-Nexin-Familie, hat sich als robuster Bindungspartner von Arc/Arg3.1 erwiesen. Sorting Nexine sind durch ihre Phosphatidyl-Inositolphosphat-bindende PX-Domäne charakterisiert, welche eine Bindung an spezifische Membrankompartimente vermittelt. SNX7 besitzt zudem eine BAR-(Bin-Amphiphysin-Rvs)-Domäne und zählt daher zu der Subfamilie der SNX-BAR-Proteine. SNX-BAR-Proteine sind ein zentraler Bestandteil der endosomalen, tubulären Sortierung-

Maschinerie für Membranproteine. Durch die in silico Modellierung der SNX7-BAR-Domäne und der Analyse von Substitutionsmutanten war es mir möglich, die Bindungsstelle von Arc/Arg3.1 genau zu beschreiben. Die untersuchten Substitutionsmutanten beeinträchtigen nicht die Formierung des SNX7/SNX4-Heterodimer, an welches auch Arc/Arg3.1 bindet und welches als die funktionelle Einheit in der endosomalen, tubulären Sortierung betrachtet wird. Alle drei Proteine kolokalisieren an frühen Endosomen und in dendritischen Spines. Darüber hinaus zeigen meine Analysen, dass SNX7 mit CPG2 (candidate plasticity gene 2) assoziiert ist, welches Teil der endozytischen Zone in Spines und bedeutend für die Endozytose von AMPA-Rezeptoren ist. SNX7 zeigt zudem, neben seiner endosomalen Lokalisation eine Assoziation mit der Clathrin-abhängigen Endozytose-Maschinerie und verstärkt die Internalisierung von Transferrin. Ein weiterer neu identifizierter Bindungspartner von Arc/Arg3.1 ist AMPH2 (Amphiphysin-2), welches ebenfalls Bestandteil der Endozytose-Maschinerie ist. Der kooperative Effekt von AMPH2 auf die Arc/Arg3.1-vermittelte Erhöhung der Internalisierung von Transferrin, zeigt eine funktionelle Verbindung beider Proteine in der Clathrin-abhängigen Endozytose. Meine Untersuchungen der SNX7-Expression im Mausgehirn und die Generierung von KO-Mäusen zeigen zudem, dass SNX7 insbesondere in Arealen, welche mit Lern- und Gedächtnisprozessen in Verbindung gebracht werden, exprimiert wird.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal eine direkte Verbindung von Arc/Arg3.1 mit der endosomalen Sortierung von Membranproteinen. Die Assoziation von Arc/Arg3.1 und SNX7 mit der Endozytose-Maschinerie und Endosomen in Spines weist zudem auf eine enge Kopplung beider Prozesse hin und eröffnet neue Erklärungsansätze für die vielseitige Wirkung von Arc/Arg3.1 in synaptischer Plastizität.

Summary

Consolidation of long-term memories requires activity-dependent gene induction that is important in defining neuronal connectivity in the brain. One of these genes is the immediate early gene Arc/Arg3.1 whose mRNA and protein are rapidly distributed throughout the dendritic arbor of activated neurons. Arc/Arg3.1 KO mice show severe impairments in memory consolidation and synaptic plasticity, while basic synaptic transmission and short-term memory are unaffected. Arc/Arg3.1 binds to proteins involved in clathrin-dependent endocytosis and affects surface expression of AMPA (α-amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole propionic acid) receptors. Changes in synaptic AMPA receptor composition and number are believed to be the basic mechanism of synaptic plasticity. How Arc/Arg3.1 controls this mechanism and the underlying molecular interactions are largely unknown. In addition, Arc/Arg3.1 interacts with Presenilin-1 a component of the γ-Secreatse complex. The processing of γ-Secreatse substrates APP and Notch1 is altered in an Arc/Arg3.1-dependend manner pointing to a function in endosomel sorting. However, it is still elusive how Arc/Arg3.1influences the endosomal sorting of Presenelin-1 and possibly AMPA receptors.

To answer this question and to get deeper insights into the molecular function of Arc/Arg3.1 we searched for new Arc/Arg3.1 binding partners in a Yeast-Two-Hybrid screen. Several of the identified new binding partners are associated with the endosomal system. In this work I investigated the colocalization and binding between Arc/Arg3.1 and three? of the newly identified proteins. I found that Sorting nexin-7 (SNX7) an uncharacterized member of the Sorting nexin family was a robust binding partner of Arc/Arg3.1. Sorting nexins are characterized by their phosphatidylinositol phosphate-binding PX domain that mediates the binding to specific membrane compartments. Additionally, SNX7 belongs to the BAR (Bin-Amphi-physin-Rvs) domain containing subfamily of Sorting nexins. These SNX-BAR proteins are crucial parts of the endosomal tubular machinery that sorts membrane proteins. Based on my in silico modeling of the SNX7 BAR domain and investigation of SNX7 mutants, I identified and characterized the Arc/Arg3.1 binding site. Mutations within this binding site had no effect on the formation of a SNX7/SNX4 heterodimer but prevent binding of Arc/Arg3.1. This heteromer is believed to be the functional entity for endosomal tubular sorting and capable of Arc/Arg3.1 binding. All three proteins colocalize at early endosomes and in dendritic spines of neurons. The distribution indicates that a subpopulation of Arc/

Arg3.1 is associated with SNX7/SNX4 positive endosomes within the spines. Moreover, I found an association between SNX7 and CPG2 (candidate plasticity gene 2), an endocytic zone localized protein important in AMPA receptor endocytosis. SNX7 associates with components of the clathrin-dependent endocytosis machinery and increases the amount of internalized Transferrin. Amphiphysin-2 (APMH2), a known component of the endocytic machinery was also identified as a new Arc/Arg3.1 binding partner. AMPH2 and Arc/Arg3.1 are increasing transferrin internalization cooperatively suggesting a functional connection in Clathrin-dependent endocytosis. Investigating the expression of SNX7 in mouse brains and generating SNX7 KO mice, I found expression of SNX7 particularly in areas associated with learning and memory.

The results of my work show for the first time a physical link between Arc/Arg3.1 and the endosomal machinery that sorts membrane proteins. Additionally, Arc/Arg3.1 and SNX7 are both associated with Clathrin-dependent endocytosis and endosomal sorting in spines, suggesting a tight coupling of the two processes. The results of my studies lead to new insights into the molecular function of Arc/Arg3.1 and open up new explanations for the opposing effects of Arc/Arg3.1 in different forms of synaptic plasticity.

1. EINLEITUNG

1.1 Lernen und Gedächtnis

Die Fähigkeit zu Lernen und die Ausbildung des Gedächtnisses sind grundlegende Funktionen des Gehirns höherer Organismen. Lernen kann als Prozess einer gegenwertigen oder latenten Anpassung des Verhaltens und der zugrunde liegenden neuronalen Antwort beschrieben werden. Diese Anpassung ist spezifisch für den externen Stimulus und den aktuellen Zustand des Organismus. Gedächtnis ist die durch Lernen im laufe der Entwicklungsgeschichte induzierte Veränderung in intrinsischen Mechanismen des Gehirns. Dies führt zur Anpassung der Effektivität nachfolgender Reaktionen, der Reproduktion einer bereits gelernten Reaktion oder der Identifizierung vorheriger Stimuli.

Auf neuronaler Ebene lassen sich zwei Aspekte in Bezug auf Lernen und Gedächtnis unterscheiden: Erstens die interzelluläre Verschaltung der Neurone, also der Beitrag neuronaler Netzwerke und zweitens die intrazelluläre Funktionalität der Neurone, also der Beitrag jedes einzelnen Neurons. Die neuronalen Netzwerke der Hirnareale Neocortex und Hippocampus sind insbesondere für höhere kognitive Fähigkeiten, deren Basis Lernen und Gedächtnis ist, verantwortlich. Die hippocampale Formation wird als zentraler Zugang für Erfahrungen und Informationen im Hinblick auf deren Überführung in das Langzeitgedächtnis betrachtet (Eichenbaum, 2000; van Strien et al., 2009). Anatomisch lässt sie sich in Gyrus dentatue (DG), Cornu Ammonis (CA1-3) und Subiculum (SUB) unterteilen. Die primären afferenten Bahnen entstammen entweder dem entorhinalen Cortex (ENT) und werden als *tractus perforans* bezeichnet oder dem contralateralen Hippocampus und werden als *associational Commissural path* (AC) bezeichnet. Die efferenten Bahnen entspringen primär der CA1-Region und dem Subiculum und projizieren zurück in den entorhinalen Cortex und das Presubiculum (PRE). Ein weiteres, wenn auch weniger gut untersuchtes Areal, das an Lernvorgängen beteiligt ist, ist der retrospleniale Cortex. Er schließt sich anatomisch an die retrohippocampale Region mit den verschiedenen Subiculum-assoziierten Arealen an (Abb. 1) (Neves et al., 2008; Sugar et al., 2011; Vann et al., 2009).

Neuronale Netzwerke sind aus einer Vielzahl verschiedener Subtypen von Neuronen aufgebaut. Primär lassen sich diese in exzitatorische und inhibitorische Neurone unterteilen. Das prototypische exzitatorische Neuron besitzt zwei verschiedene Typen an Fortsätzen, das Axon zum Senden elektrischer Signale und Dendriten zum Empfangen elektrischer Signale. Die Kontaktstellen der Neurone, die Synapsen, bilden sich an kleinen Fortsätzen der Dendriten, die als Spines bezeichnet werden. Die axonale Endigung bildet

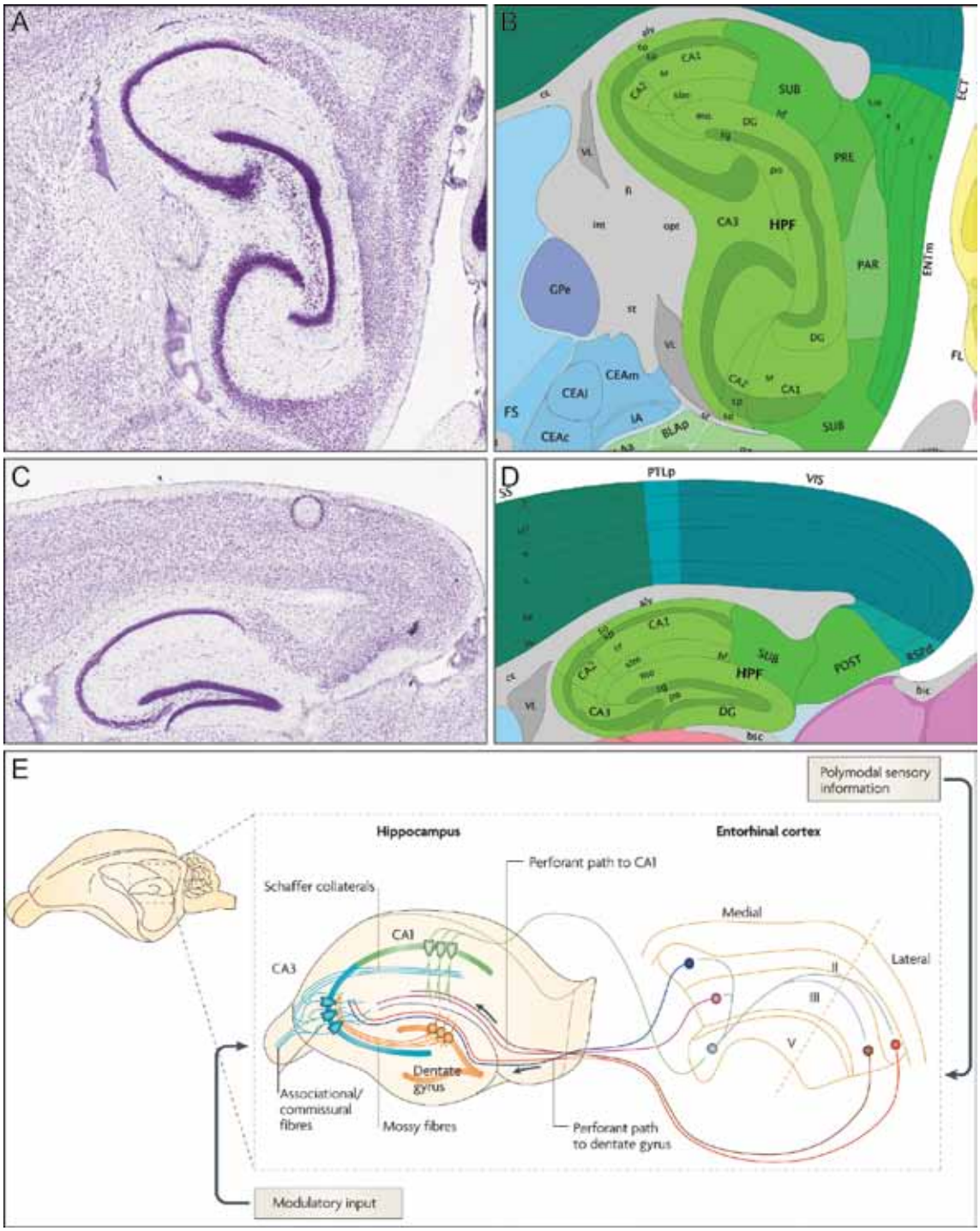

Abbildung 1: Die hippocampale Region und assoziierte Areale.

(A-D) Sagital-lateraler (A-B) und Sagital-medialer Hirnschnitt der Hausmaus im Bereich der hippocampalen Formation. (A,C) Die Nissel-Färbung zeigt die anatomische Struktur. (B,D) Zuordnung der Verschiedenen Areale. (E) Organisation des hippocampalen, neuronalen Netzwerkes. HPF =Hippocampale Formation; CA = Cornu Ammonis; DG = Dentate gyrus; SUB =Subiculum; PRE, PAR, POST = Pre-, Para- und Postsubiculum;ENT = Entorhinal Cortex; RSP = Retrosplenial Cortex; VIS = Visueller Cortex. (A-D, Hirn-Atlas des Allen Institute for Brain Science; (Neves et al., 2008).

die Präsynapse, an welcher synaptische Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren und so ihren Inhalt an Neurotransmittern freisetzen. Die freigesetzten Neurotransmitter binden an Rezeptoren, die in der postsynaptichen Dichte (PSD) des Spines verankert sind. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt wiederum zur Generierung eines elektrischen Signals zur Erregungsleitung. Dieser Typus an neuronalem Kontakt wird als chemische Synapse bezeichnet, da die Übertragung des elektrischen Signals von der Prä- auf die Postsynapse über Neurotransmitter vermittelt wird (Abb. 2). Der häufigste Neurotransmitter chemischer Synapsen von exzitatorischen Neuronen ist die Aminosäure Glutamat. Chemische Synapsen sind hoch spezialisierte Strukturen mit komplexen Protein-Netzwerken mit deren Hilfe die synaptische Übertragung moduliert werden kann. Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts wurde die Synapse als potentieller Ort zur Informationspeicherung in Betracht gezogen (Hebb, 1950). Die Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung in Reaktion auf die neuronale Aktivität erfüllt die Voraussetzung für adaptive Prozesse wie Lernen und Gedächtnis (Hughes, 1958).

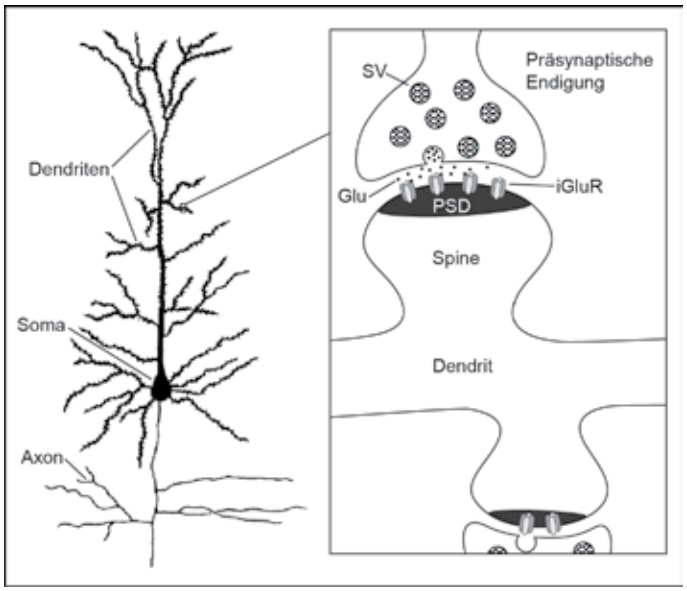

Abbildung 2: Prototypisches exzitatorisches Neuron.
Darstellung der Struktur eines prototypischen, pyramidalen Neurons. Dem Zell-Soma entspringt das Axon, welches sich verzweigt um eine Vielzahl an Kontakten mit weiteren Neuronen einzugehen. Mehrere aus dem Soma hervorgehende, weit verzweigte Dendriten bilden die Basis zur Ausbildung von Kontakten mit den präsynaptischen Endigungen anderer Neurone. Diese interzellulären Kontakte bilden sich an kleinen Fortsätzen der Dendriten, den Spines. Gegenüber der präsynaptischen Endigung an welcher die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat (Glu) stattfindet, befindet sich die postsynaptsiche Dichte (PSD). In ihr sind unter anderem ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluR) verankert welche durch die Neurotransmitter-Freisetzung aktiviert werden und so die Erregungsleitung im postsynaptsichen Neuron fortsetzen. SV = Synaptische Vesikel; PM = Plasmamembran.

1.2 Synaptische Plastizität

Die Fähigkeit von Synapsen die synaptische Übertragung in Abhängigkeit der neuronalen Aktivität zu stärken oder abzuschwächen wird als synaptische Plastizität bezeichnet. Es wird angenommen, dass das enorme Netzwerk miteinander verbundener Synapsen de Ort des Gedächtnisses und die synaptische Plastizität das zelluläre Korrelat des Lernens ist. Zwei Formen der synaptischen Plastizität werden insbesondere mit Lernprozessen in Verbindung gebracht. Erstens, die Langzeit-Potenzierung (LTP), die das Phänomen der langandauernden Verstärkung der synaptischen Übertragung beschreibt. Zweites, die Langzeit-Depression (LTD), die das Phänomen der langandauernden Abschwächung der synaptischen Übertragung beschreibt.

Die Induktion von LTP und LTD ist jeweils von der Stärke und dem Frequenzmuster der präsynaptischen Aktivierung und dem Status der Postsynapse abhängig (Huganir and Nicoll, 2013). Störungen in den Lern- und Gedächtnis-Fähigkeiten sind sehr häufig mit Änderungen in der Ausprägung von LTP und LTD assoziiert. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der exakten Regulierung der synaptischen Plastizität innerhalb physiologischer Grenzen. Der dendritische Spine besitzt in mehrerer Hinsicht die Konfiguration für lang anhaltenden Änderungen und die Regulation der synaptischen Übertragung. Das komplexe Protein-Netzwerk der PSD ermöglicht die präzise Regulation der Art und Menge an ionotropen Glutamatrezeptoren der Postsynapse. Die synaptische Plastizität störende Mutationen sind häufig in dendritischen oder im Spine lokalisierten Proteinen zu finden. Die Integration der synaptischen Aktivität läuft in einem vom Dendriten weitgehend isolierten Raum ab, dessen Größe sich in Abhängigkeit der synaptischen Aktivierung ändern kann. In der Tat ist die Ausprägung der LTP stark mit einer Volumenzunahme des Spines assoziiert (Govindarajan et al., 2011).

Die Generierung des postsynaptsichen Signals und damit die Stärke der synaptischen Übertragung, werden primär von ionotropen Glutamatrezeptoren vermittelt. Diese Rezeptoren bilden Ionenkanäle, welche sich in Abhängigkeit des Liganden Glutamat öffnen und so ein postsynaptsiches elektrisches Potential erzeugen. Glutamatrezeptoren vom Typ AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid) und Kainat sind zahlenmäßig am häufigsten in der PSD vertreten und somit die entscheidende Determinante für die stärke der synaptischen Übertragung. Glutamatrezeptoren von Typ NMDA (N-methyl D-Aspartate) benötigen zusätzlich zur Bindung von Glutamat die Depolarisation der Plasma-

membran. NMDA-Rezeptoren sind im Gegensatz zu den meisten AMPA- und Kainat-Rezeptoren Calzium-permeable. Da der Einstrom des sekundären Botenstoffs Calzium für die Induktion postsynaptischer Plastizität entscheidend ist, ist der NMDA-Rezeptor ein zentraler Regulator. Die pharmakologische Blockierung des NMDA-Rezeptors verhindert daher die Induktion der meisten Formen der synaptischen Plastizität wie LTP und LTD. Neben dem NMDA-Rezeptor existiert eine Vielzahl an spannungsabhängigen Calzium-Kanälen, die ebenfalls zum Einstrom von Calzium beitragen.

Zur Identifizierung von Genen, die für die Ausprägung und Regulation der synaptischen Plastizität von Bedeutung sind, wurde nach Genen gesucht, die durch neuronale Aktivität und Plastizität induziert werden (Altar et al., 2004; Ellis et al., 2012; Lam et al., 2010; Nedivi et al., 1993; Qian et al., 1993; Tzingounis and Nicoll, 2006). Mehrere der identifizierten Gene gehören zur Gruppe der *immediate early genes* (IEG). Diese Gene sind Teil der ersten Ebene der zellulären Antwort auf eine Vielzahl an Stimuli. Die Transkription der IEGs ist unabhängig von der Synthese neuer Proteine, was deren unmittelbare Wirkung ermöglicht. Die meisten der IEGs sind Transkriptionsfaktoren wie Npas4, c-Fos und Zif268 welche die Synthese weiterer Gene der zellulären Antwort kontrollieren. Einige der IEGs sind jedoch Effektor-Proteine, die ihre Wirkung im Interaktom der Zelle entfalten. Eines dieser Proteine ist Arc/Arg3.1 (*Activity-regulated cytoskeleton-associated protein / Activity-regulated gene 3.1*), das ursprünglich in unserem Labor identifiziert wurde (Link et al., 1995).

1.3 Arc/Arg3.1

Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass Arc/Arg3.1 durch synaptische Plastizität wie LTP und durch Wachstumsfaktoren induziert werden kann. Darüber hinaus wird die Arc/Arg3.1-mRNA in Dendriten aktivierter Neurone transportiert, in denen sie spezifisch im Bereich der aktivierten Synapsen akkumuliert (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Steward et al., 1998). Die Störung der aktivitäts-induzierten Expression von Arc/Arg3.1 verhindert die Aufrechterhaltung der Langzeit-Potenzierung sowie die Konsolidierung des Langzeitgedächtnises (Guzowski et al., 2000). Dies konnte im Besonderen in Arc/Arg3.1-KO-Mäusen detailliert beschrieben werden (Plath et al., 2006). Der Verlust von Arc/Arg3.1 führt zu einer verstärkten, frühen Phase von LTP und LTD und dem Verlust der späten, andauernden Potenzierung bzw. Depression der synaptischen Übertragung. Diese elektrophysiologischen Änderungen spiegeln sich auch im Verlust des Langzeitgedächtnisses

wieder. Obgleich die Tiere ein normales Lernverhalten zeigen, fehlt ihnen die Fähigkeit das Gelernte in eine langanhaltende Gedächtnisform zu überführen. Demnach ist Arc/Arg3.1 essenziell für die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses.

Auf molekularer Ebene führt der Knock-out von Arc/Arg3.1 zu einer Zunahme von AMPA-Rezeptoren in der Plasmamembran, wohingegen die Überexpression des Proteins einen entgegengesetzten Effekt zeigt (Shepherd et al., 2006). Dies führt zu einer globalen Veränderung der synaptischen Übertragung, ein Prozess der als homöostatische Plastizität bekannt ist. Homöostatische Plastizität gewährleistet die Erregbarkeit von Neuronen innerhalb ihrer physiologischen Parameter und kompensiert auf globaler Ebene die Änderungen der synaptischen Stärke einzelner Synapsen. In diesem Zusammenhang haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass Arc/Arg3.1 über eine Funktion im Zellkern, die globale Menge an AMPA-Rezeptoren regulieren kann (Korb et al., 2013). Dem gegenüber steht die synaptische Funktion von Arc/Arg3.1. Über die Interaktion mit Dynamin2 (DYN2) und Endophilin2/3 (ENDO2/3), beides Proteine der Endozytose-Maschinerie, kann Arc/Arg3.1 die Menge an synaptischen AMPA-Rezeptoren verringern (Chowdhury et al., 2006). Das von metabotropen Glutamatrezeptoren abhängige LTD (mGluR-LTD) gehört zu den am besten untersuchten Formen der synaptischen Plastizität, in denen Arc/Arg3.1 für die Reduktion der synaptischen AMPA-Rezeptoren verantwortlich ist. Die Aktivierung von mGluRs kann die Translation der dendritischen Arc/Arg3.1-mRNA induzieren. Das darauf hin lokal synthetisierte Arc/Arg3.1-Protein kann dann die Endozytose von AMPA-Rezeptoren verstärken und so das LTD vermitteln (Waung et al., 2008). Darüber hinaus können Neurone der hippocampalen CA1-Region durch die erfahrungsinduziere Arc/Arg3.1-Expression spezifisch für ein nachfolgendes mGluR-LTD empfänglich gemacht werden (Jakkamsetti et al., 2013). Die Komplexität der Beteiligung von Arc/Arg3.1 an verschiedenen Formen der synaptischen Plastizität wie LTP, LTD, mGluR-LTD und homöostatischer Plastizität spiegelt sich auch in der Regulation der Arc/Arg3.1-Expression wieder. Mehrere Signalwege steuern die Arc/Arg3.1-Expression auf allen Ebenen der Proteinbiosynthese, von der Transkription über die Translation, vom Transport der mRNA in Dendriten und der lokalen Translation bis hin zur schnellen Degradation des Proteins (Bramham et al., 2008, 2010; Dynes and Steward, 2007, 2012; Korb and Finkbeiner, 2011; Shepherd and Bear, 2011). Die Lokalisation, die Verteilung und der Transport von AMPA-Rezeptoren (AMPAR), das sogenannte AMPAR-Trafficking, wird als zentrales Stellwerk für synaptische Plastizität betrachtet. Es ist jedoch weitgehend ungeklärt wie Arc/Arg3.1 das AMPAR-Trafficking an der Synapse

reguliert. Zur Ausübung seiner Funktion muss Arc/Arg3.1 in präzisen Zeitfenstern an der Synapse zur Verfügung stehen. Wird die Versorgung mit neuem Arc/Arg3.1-Protein unterbrochen führt dies zum Abbruch der plastischen Änderungen (Messaoudi et al., 2007). Eine zeitlich fein regulierte Arc/Arg3.1-Expression kann auch bei der Induktion von Arc/Arg3.1 durch verschiedene Lernerfahrungen beobachtet werden (Daberkow et al., 2007; Fletcher et al., 2007; Guzowski et al., 2000, 2005; Han et al., 2007; Ivanova et al., 2011; Miyashita et al., 2009; Rudinskiy et al., 2012; Vazdarjanova et al., 2002, 2006). Der jeweilige zeitliche Verlauf der Arc/Arg3.1-Induktion kann sich in Abhängigkeit der Lernerfahrung und dem jeweiligen Hirnareal stark unterscheiden. Es wird angenommen, dass ArcArg3.1 ein präziser Marker für neuronale Netzwerke ist, die durch Lernprozesse aktiviert werden.

In letzter Zeit wurde eine Reihe von Arc/Arg3.1-Interaktionspartnern identifiziert (Abb. 3). Die Interaktion mit DYN2 und ENDO2/3 stellt die bisher direkteste Verbindung zwischen Arc/Arg3.1 und der Regulation des AMPAR-Traffickings dar. Die Deletion der Endophilin-Bindestelle hebt die Wirkung von Arc/Arg3.1 auf das AMPAR-Trafficking auf (Chowdhury et al., 2006). Es ist jedoch unklar welche Funktion ENDO2/3 im AMPAR-Trafficking erfüllt. Da Endophilin und Dynamin wichtige Bestandteile der Endozytose-Maschinerie sind (Ferguson and De Camilli, 2012; Milosevic et al., 2011), wird von einer Funktion bei der Endozytose von AMPA-Rezeptoren ausgegangen. In der Tat führt die mGluR-induzierte Expression von

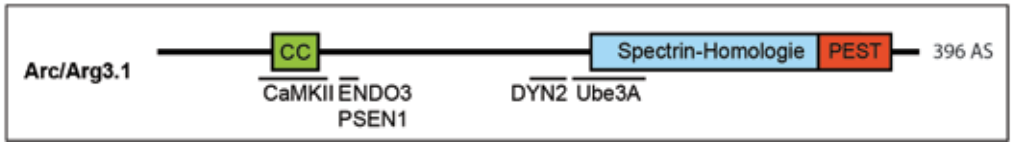

Abbildung 3: Domänen-Struktur des Arc/Arg3.1-Proteins und Bindestellen der Interaktionspartner.

Arc/Arg3.1 ist 396 Aminosäuren (AS) lang und besitzt drei Domänen die durch Sequenz-Homologien definierbar sind. Im Bereich des N-terminus des Proteins liegt die coiled-coil-Domäne (CC). CC-Domänen vermitteln Proteininteraktionen und die Bindung an die Plasmamembran. Ein großer Teil der zweiten Hälfte des Proteins weist eine schwache Homologie zu Spectrin-Wiederholungen auf. Spectrine bilden Proteingerüste und interagieren mit dem Actin-Zytoskelett. Am Ende des Proteins befindet sich eine PEST-Sequenz reich an den AS Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T). PEST-Sequenzen werden mit dem raschen Abbau von Proteinen in Verbindung gebracht. Die Bindungsstellen der Arc/Arg3.1-Interaktionspartner sind mit waagerechten Linien markiert. CaMKII = Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II alpha and beta; ENDO3 = Endophilin-3; PSEN1 = Presenelin-1; DYN2 = Dynamin-2; Ube3A = Ubiquitin-protein ligase E3A.

Arc/Arg3.1 zu einer Erhöhung der Endozytose-Rate von AMPA-Rezeptoren (Waung et al., 2008).

Im Bereich der coiled-coil-Domäne bindet Arc/Arg3.1 an die α- und β-Untereinheit der CaMKII (Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II). CaMKII ist seit langem als wichtiger Regulator der synaptischen Plastizität bekannt. Die Calzium-abhängige Aktivierung von CaMKII ist insbesondere für die Ausbildung der LTP von zentraler Bedeutung. Die Phosphorylierung von AMPARs und weiteren Zielproteinen führt zu einer Anreicherung der Rezeptoren an der Synapse, zu einem veränderten AMPAR-Trafficking und letzten Endes zu einer Potenzierung der synaptischen Übertragung (Lisman et al., 2012). Unter Bedingungen mit hoher Calzium-Konzentration bindet Arc/Arg3.1 bevorzugt an die α-Untereinheiton von CaMKII, mit niedrigen an die β-Untereinheit (Okuno et al., 2012). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Arc/Arg3.1 nach der Induktion durch den Wachstumsfaktor BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) über die Interaktion mit CaMKIIβ in Spines ohne synaptische Aktivität rekrutiert werden kann. Die Zusammensetzung des multi-heteromeren CaMKII-Komlexes scheint insbesondere über die lokale Translation der Untereinheit bestimmt zu werden (Miller et al., 2002).

Mutationen der Ubiquitin-Proteinligase E3A (Ube3A) führen zum Krankheitsbild des Angelman-Syndroms. Das Angelman-Syndrom ist eine neurologische Entwicklungsstörung, welche durch Motor-Dysfunktion, Sprach-Beeinträchtigung, epileptische Anfälle und eine hohe Prävalenz von Autismus charakterisiert ist. Der Knock-down von Ube3A in kultivierten Neuronen führt zu einem höheren Niveau des Arc/Arg3.1-Proteins, was wiederum zur Reduktion von synaptischen GluA1-AMPA-Rezeptoren führt. Dies korreliert mit der Beobachtung einer Beeinträchtigung der LTP in Ube3A-KO-Mäuse (Jiang et al., 1998) Es wird angenommen, dass ein Teil der kognitiven Defizite des Angelman-Syndroms auf die Störung der Arc/Arg3.1 Degradation zurück zu führen ist (Greer et al., 2010). Es steht jedoch zur Diskussion ob das aktivitäts-regulierte Ube3A *in vivo* an Arc/Arg3.1 bindet und dessen Ubiquitin-abhängige Degradation vermittelt (Kühnle et al., 2013).

Presenilin-1 (PSEN1) ist die katalytische Untereinheit der γ-Sectretase, einem Membran-protein-Komplex welcher Zielproteine innerhalb der Plasmamembran schneiden kann (intermembran Protease). Das am besten untersuchte Substrat der γ-Sectretase ist das *amyloid*-β *precursor protein* (APP). Die sequenzielle Spaltung von APP durch β- und γ-Sectretase führt zur Bildung des *amyloid*-β *Peptid* (Aβ), welches stark mit der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung (AD) assoziiert ist. Amyloidogene AD-Modell-Mäuse

weisen eine reduzierte Bildung des Aβ auf, wenn zusätzlich Arc/Arg3.1 abwesend ist. Dies spiegelt sich auch in einer verringerten Ablagerung des Aβ in den für die AD typischen amyloiden Plaques wieder. Die Bindung von Arc/Arg3.1 an PSEN1 könnte für diesen Phänotyp verantwortlich sein. Die Endozytose von APP oder der β-Secretase wird nicht von Arc/Arg3.1 beeinflusst (Wu et al., 2011). Es gibt jedoch Hinweise, dass die Prozessierung von APP durch die γ-Sectrease primär in Endosomen abläuft (Lah and Levey, 2000; Pasternak et al., 2003). Dies wird durch den Umstand unterstützt, dass bestimmte amyloidogene Mutationen in APP zur intraneuronalen Anreicherung des Aβ führen (Rajendran and Annaert, 2012). Ein weiteres Substrat der γ-Sectretase ist Notch1, ein wichtiger Rezeptor der Signalübertragung, der neben seiner Funktion während der Entwicklung auch eine Rolle in der synaptischen Plastizität spielt. Die für die Signalübertragung wichtige Prozessierung von Notch1 ist in Neuronen aktivitäts-reguliert und abhängig von Arc/Arg3.1 (Alberi et al., 2011). Ähnlich der APP-Prozessierung zeigt Arc/Arg3.1 einen positiven Einfluss auf die Prozessierung von Notch1 durch die γ-Secretase. Die endosomale Prozessierung sowie das Rezeptor-Trafficking erweisen sich als wichtige Parameter für die Funktionalität der Notch1-Signalübertragung (McGill et al., 2009; Vaccari et al., 2008).

1.4 Rezeptor-Trafficking und endosomale Sortierung

Die Generierung des postsynaptsichen Signals und damit die Stärke der synaptischen Übertragung, werden primär von ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluRs) vermittelt. Neben iGluRs ist die Lokalisation und Menge vieler weiterer synaptischer Rezeptoren und Adhesions-Proteine für die Regulation der synaptischen Plastizität von großer Bedeutung. Dies sind z.B. metabotope Glutamatrezeptoren (mGluRs) und Adhäsions-Proteinen wie Catherine und Integrine. Die Verteilung und Menge dieser Membranproteine sowie deren Signalübertragung wird über die Regulation des Traffickings und deren endosomaler Sortierung gesteuert. Ein Aspekt des Rezeptor-Traffickings ist die Endozytose, über welche die Menge an Rezeptoren in der Plasmamembran gesteuert werden kann. Die endosomale Sortierung der Rezeptoren entscheidet dann über deren weiteres Schicksal. Vereinfacht dargestellt führt die Sortierung hin zu Lysosomen zum Abbau der Rezeptoren, wohingegen eine Sortierung hin zu Recycling-Endosomen zu deren erneuten Integration in die Plasmamembran führt. Insbesondere das AMPAR-Trafficking und die endosomale Sortierung von AMPAR-Rezeptoren sind Gegenstand intensiver Forschung. Dies ist der deterministi-

schen Bedeutung von AMPA-Rezeptoren bei der Stärke der synaptischen Übertragung geschuldet.

1.4.1 Clathrin-abhängige Endozytose

Es existieren mindestens sechs verschiedene Formen der Endozytose (Doherty and McMahon, 2009). Die wohl am meisten beachtete und am besten untersuchte Form der Endozytose, ist die Clathrin-abhängige Endozytose (CAE). Insbesondere Studien der Präsynapse, in welcher die CAE für die Bildung synaptischer Vesikel verantwortlich ist, haben zum Verständnis beigetragen. Auf postsynaptsicher Seite vermittelt die CAE die Internalisierung von AMPA-Rezeptoren (Man et al., 2000), die konstitutiv internalisiert und zur Plasmamembran zurück recycelt werden, ein Prozess der als AMPAR-Cycling bezeichnet wird. Die finale Abschnürung des endozytischen Vesikels ist dabei von der GTPase Dynamin abhängig. Wird diese blockiert findet keine CAE mehr statt (Carroll et al., 1999). Auch die induzierte Endozytose von AMPA-Rezeptoren, die sich in der Ausbildung eines LTD wieder spiegelt, ist von der CAE abhängig (Beattie et al., 2000; Shepherd and Huganir, 2007).
Die Clathrin-abhängige Endozytose lässt sich in mehrere Schritte unterteilen: (1) Nukleationsfaktoren und Adaptor-Proteine binden an die PI(4.5)P2 (Phosphatidylinositol-

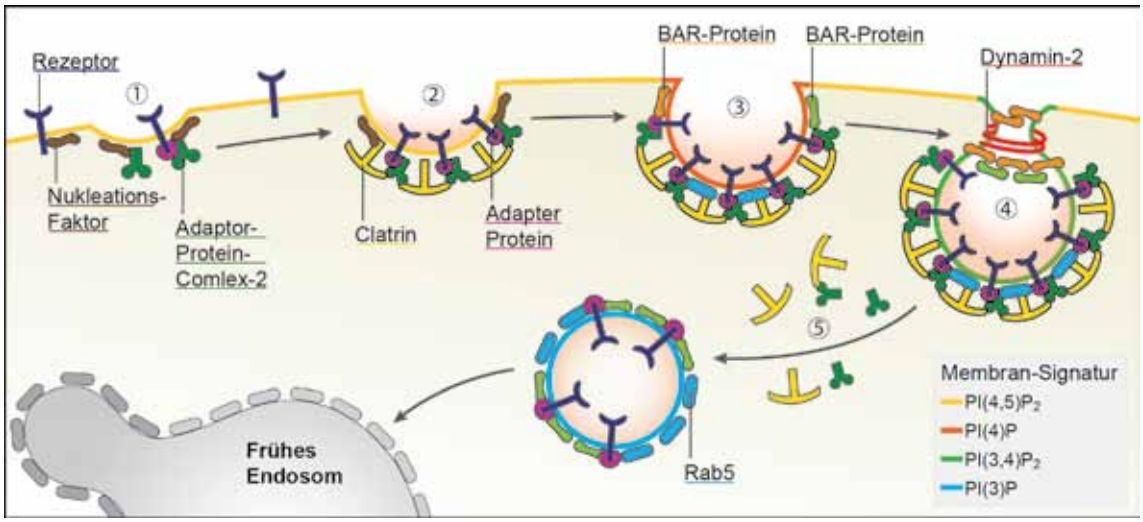

Abbildung 4: Clathrin-abhängige Endozytose und ihre Membran-Signatur.
Darstellung der vier Phasen der Clathrin-abhängigen Endozytose. (1) Nukleation, (2) Clusterung von Adaptor- und Hüllproteinen führen zur Anreicherung von Rezeptoren im clthrin coated pit, (3) Ausbildung des Vesikels und Rekrutierung von weiteren Proteinen wir BAR-proteine (4) Rekrutierung von Dynamin zum Abschnüren des Vesikels (5) Abstoßung der CAE-Hülle. Das vorherrschende Phosphatidyl-Inositol-Phophat (PI(#)P) in der Plasmamembran (Membran-Signatur), im jeweiligen Schritt der Endozytose, ist farblich codiert und in der Legende bezeichnet.

4,5-Bisphosphat) reiche Plasmamembran. (2) Die Clusterung von Adaptor-Proteinen, AP2 (Adaptor-Protein-Komplex-2) und Clathrin führen zur Bildung des Clathrin coated pit in welchem Rezeptor-Proteine angereichert werden. (3) Weitere Faktoren wie BAR-Proteine werden an das sich formende Vesikel rekrutiert und die Membran-Signatur ändert sich hin zu einer Anreicherung von PI(4)P. (4) Ist das Vesikel vollständig ausgebildet ändert sich die Membran-Signatur erneut zu PI(3,4)P2 und Dynamin wird über BAR-Proteine wie AMPH2 und SNX9 zum finalen Abschnüren des Vesikels rekrutiert. (5) Hat das Vesikel die Plasmamembran verlassen wird PI(3,4)P2 zu PI(3)P dephosphoryliert und die Calthrin-Hülle abgestoßen. Das entstandene Vesikel ist reich an der kleinen GTPase Rab5, die für die Identität des Vesikels und dessen Verschmelzung mit frühen Endosomen wichtig ist (Somsel Rodman and Wandinger-Ness, 2000) (Abb. 4).

Es sind nur wenige Faktoren bekann, welche für die Spezifität und Regulierung der CAE von AMPA-Rezeptoren verantwortlich sind. Das HIP1/HIP1R-Heterodimer (Huntingtin-interacting protein 1/HIP1 related Protein) und CPG2 (Candidate Plasticity-related Gene 2), eine hirnspezifische Splicevariante von SYNE-1, sind zwei dieser Faktoren. Es konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung der GluA1-Untereinheit von AMPA-Rezeptoren in HIP1-KO-Mäusen gestört ist. Das HIP1/HIP1R-Heterodimer ist mit der Plasmamembran und Clathrin assoziiert und wird für die Koordination der Actin-Assemblierung während der Endozytose verantwortlich gemacht (Boettner et al., 2011; Engqvist-Goldstein et al., 2001, 2004; Metzler et al., 2001, 2003; Mishra et al., 2001). Das aktivitäts-regulierte CPG2 ist für das konstitutive Recycling und für die induzierte Endozytose von AMPA-Rezeptoren notwendig. Seine Homologie zu Dystrophin und mehrere Spectrin-Wiederholungen sowie *coild coils* weisen auf eine strukturelle Funktion in der Organisation von cortikalen Proteinkomplexen hin (Cottrell et al., 2004; Loebrich et al., 2013). Interessanterweise besitzt Arc/Arg3.1 ebenfalls eine, wenn auch schwache, Homologie zu Spectrin-Wiederholungen (Abb. 3). Die weitaus stärksten Hinweise für eine spezifische Funktion in der Regulation des AMPAR-Trafficking in synaptischer Plastizität existieren jedoch für Arc/Arg3.1.

Die Clathrin-abhängige Endozytose in Spines findet an einem, an die PSD gekoppelten Bereich der Plasmamembran statt. Dieser als endozytische Zone (EZ) bezeichnete Bereich verhindert unter anderem die laterale Diffusion von AMPA-Rezeptoren aus dem Spine. Darüber hinaus wird der lokale Pool für das Recycling von AMPA-Rezeptoren aufrechterhalten. Es ist anzunehmen, dass die EZ, ähnlich der PSD, ein zentraler Bestandteil der Plastizitäts-regulierenden Maschinerie ist. Ein Hinweis hierfür ist die von der korrekten

Lokalisation der endozytischen Zone abhängigen, Glycin-vermittelten synaptischen Potenzierung (Blanpied et al., 2002; Lu et al., 2007; Petrini et al., 2009; Rácz et al., 2004).

1.4.2 Endosomale Sortierung

Im Anschluss an die Endozytose wird im endosomalen System der Zelle über das weitere Schicksal von Membranproteinen entschieden. Das endosomale System besteht aus einer Vielzahl an tubulo-endosomalen Mebran-Kompartimenten, die den Austausch, die Sortierung und den Transport von Membranproteinen steuern. Zentrale Start- und Zielpunkte dieses Systems sind der cis-Golgi, die Plasmamembran und Lysosomen. Die Identität der einzelnen Kompartimente wird primär über zwei Faktoren bestimmt. (1) Die Zusammensetzung an PIPs in der endosomalen Membran, ähnlich der Transition während der CAE (Abb. 4). (2) Die Bindung von peripheren Membranproteinen (Jean and Kiger, 2012). Rab-Proteine (Ras-related proteins) sind kleine GTPasen und zählen zu den wichtigsten peripheren Membranproteinen im endosomalen System. Sie zirkulieren in Abhängigkeit ihrer GTP- bzw. GDP- (Guanosin-Tri/Di-Phosphat) gebundenen Form zwischen Zytoplasma und der endosomalen Membran. Sowohl die Umwandlung von PIPs als auch der kaskadische Austausch der Rab-Proteine führen zum sequenziellen Identitätswechsel der endosomalen Membranen (Pfeffer, 2013). Anhand der dominierenden Rab-GTPasen können Endosomen in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Rab5 wird bereits während der Endozytose rekrutiert und ist zusammen mit Rab4 das vorherrschende Rab in frühen Endosomen. Rab4 charakterisiert Endosomen, die für ein schnelles Recycling von Rezeptoren zurück an die Plasmamembran verantwortlich sind. Darüber hinaus charakterisiert es Recycling-Endosomen, an welche auch Rab11 rekrutiert wird. Rab11 ist das vorherrschende Rab im endozytischen Recycling Kompartiment über welches das langsame Recycling von Rezeptoren abläuft (Sönnichsen et al., 2000). Eine weitere vom frühen Endosom ausgehende Route ist durch den Übergang von Rab5 zu Rab7 charakterisiert. Rab7 ist an späten Endosomen angereichert, welche letzten Endes zur Degradation der Membranproteine mit Lysosomen fusionieren (Abb. 5). Die hier genannten Rab's stellen nur eine Auswahl mit den am besten untersuchten Rab-Proteine der über 60 Mitglieder großen Familie dar (Stenmark and Olkkonen, 2001).

Neben Rab-Proteinen gibt es eine Vielzahl an membranbindenden und akzessorischern Proteinen, welche für die Sortierung der Membranproteine verantwortlich sind. Die Bindung

an die Membran wird in der Regel über spezielle membranbindenden Domänen vermittelt. Eine dieser Domänen ist auch im Arc/Arg3.1-Interaktionspartner Endophilin zu finden. Diese sogenannte BAR-Domäne (Bin–Amphiphysin–Rvs) vermittelt die Bildung von Dimere, die gekrümmte Membranen erkennen und die Krümmung der Membran induzieren können. Diese Eigenschaften sind essenziell für die Ausbildung von tubulären und vesikulären

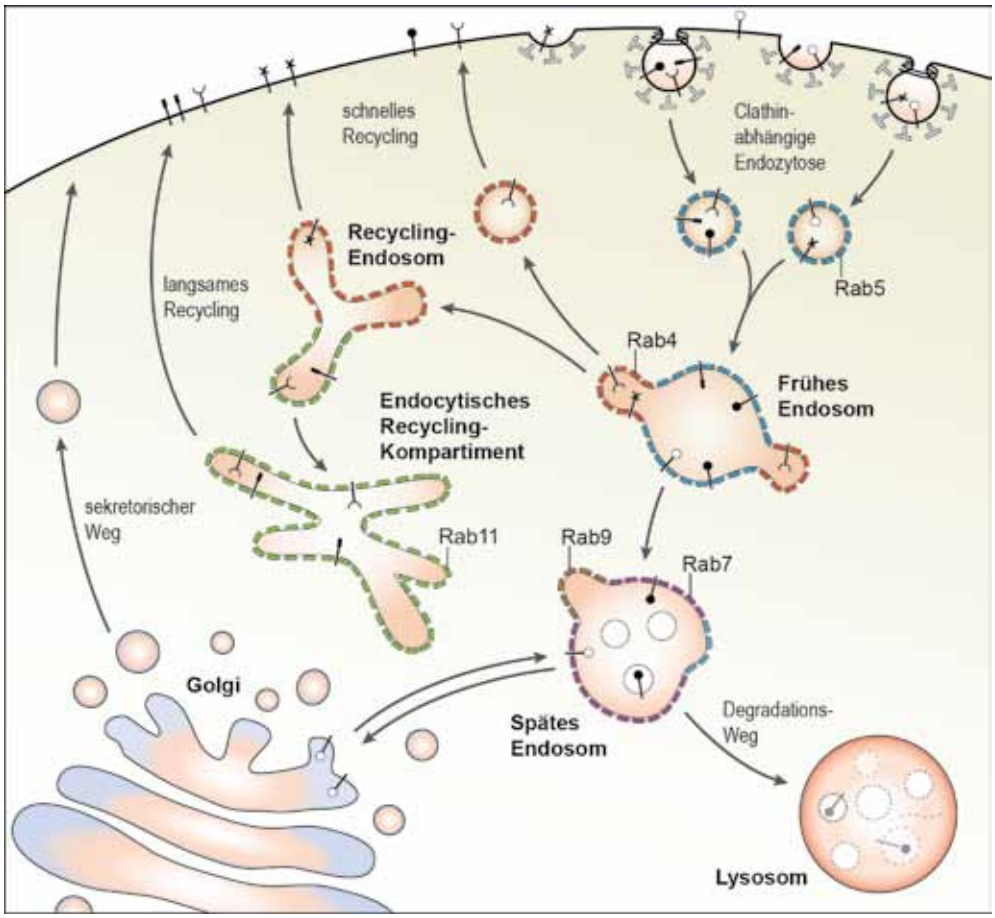

Abbildung 5: Rab-GTPasen und das endosomale System der Zelle.

Darstellung der verschiedenen endosomalen Kompartimente des endosomalen Systems und deren charakteristische Rab-GTPasen. Im Anschluss an die Clathrin-abhängige Endozytose fusionieren die Rab5-positiven endozytotischen Vesikel und bilden Frühe Endosomen. Frühe Endosomen weisen neben Rab5 auch einen hohen Anteil an Rab4 auf. Rab4-positive Endosomen vermitteln das schnelle Recycling von Rezeptoren, entweder direkt von frühen Endosomen, oder über die Bildung von Recycling-Endosomen. Rab11 bindet an Recycling-Endosomen und vermittelt das langsame Recycling von Rezeptoren über das endozytische Recycling-Kompartiment. Beim Übergang von frühen zu späten Endosomen wird Rab5 durch Rab7 ersetzt. Während dieser Phase können Rezeptoren zum TGN (trans-Golgi-Netzwerk) sortiert werden. Hierbei spielt Rab9 eine wichtige Rolle. Letzten Endes fusionieren späte Endosomen und Lysosomen was zur Degradation der Membranproteine führt.In Anlehnung an (Stenmark, 2009).

Subkompartimenten an einem Endosom. Diese Subkompartimente dienen der Aufnahme der sortierten Membranproteine und werden letztendlich vom Endosom getrennt. Welches Membranprotein wohin sortiert wird ist durch die Interaktion mit eben solchen membranbindenden und akzessorischen Proteinen determiniert (Abb. 6).

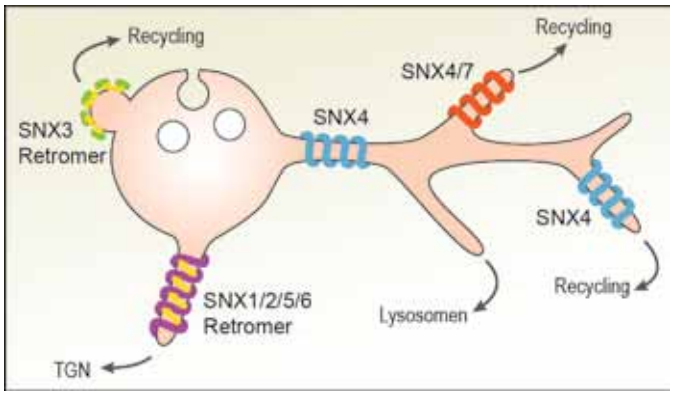

Abbildung 6: Proteinsortierung in tubulär-vesikulären frühen Endosomen. Frühe Endosoemen besitzen eine Reihe von tubulären und vesikulären Subdomänen. Diese Subdomänen werden durch membranbindende und -deformierende Proteine gebildet und stabilisiert. Sorting Nexine (SNXs) und das mit SNXs assoziierte Retromer sind eine wichtige Gruppe dieser Proteine. Die gebildeten Subdomänen dienen der Rezeptor-Sortierung und der anschließenden Ausbildung neuer Endosomen. Rezeptoren können so zu ihrem Bestimmungsort recycelt werden. TGN = Trans-Golgi-Netzwerk; Adaptiert von (Cullen, 2008).

Eine für die endosomale Sortierung wichtige Gruppe der BAR-Domänen-Proteine (BDP) gehört zur Familie der Sorting Nexine (SNXs) (Teasdale et al., 2001). Diese Familie ist durch eine weitere membranbindende Domäne, die PX-Domäne (Phox homology), charakterisiert. PX-Domänen binden spezifisch an bestimmte PIPs die eine entscheidende Rolle für die Membran-Identität spielen. Die Kombination aus PX und BAR-Domäne ermöglicht einerseits die Bindung an Membranen mit einer spezifischen Identität und andererseits die Modellierung dieser Membranen. Die Mitglieder dieser Subfamilie der Sorting Nexine werden als SNX-BAR-Proteine bezeichnet (Abb. 7).

SNX4, ein Mitglied dieser Familie bildet BAR-vermittelte Homodimere oder Heterodimere mit SNX7 und SNX30 (van Weering et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass SNX4 während des Übergangs von Rab4 zu Rab11 positiven Endosomen eine wichtige Rolle bei der tubulären Sortierung des Transferrin-Rezeptors spielt. Diese Sortierung ist Voraussetzung für das korrekte Recycling des Rezeptors (Traer et al., 2007; van Weering et al., 2011), welcher häufig zur Untersuchung des Rezeptor-Recyclings verwendet wird. Heterodimere aus SNX1/2 und SNX5/6 bilden zusammen mit dem Trimer aus VPS26, 29 und 35 einen weiteren Sortierungs-Komplex. Dieser als Retromer bezeichnete Komplex ist am besten für das Recycling des CI-MP-Rezeptors (Cation-independent mannose-6-phos-

phate) beim Übergang von frühen zu späten Endosomen und hin zum cis-Golgi charakterisiert. Zusätzlich ist das Retromer über die Bindung an andere SNXs an weiteren Sortierungsprozessen beteiligt (Harterink et al., 2011). Neben ihrer Rolle bei der endosomalen Sortierung konnte auch eine Assoziation einiger SNX-BARs mit der Plasmamembran und der Clathrin-Endozytose-Maschinerie beschrieben werden (Danson et al., 2013; Prosser et al., 2010; Skånland et al., 2009).

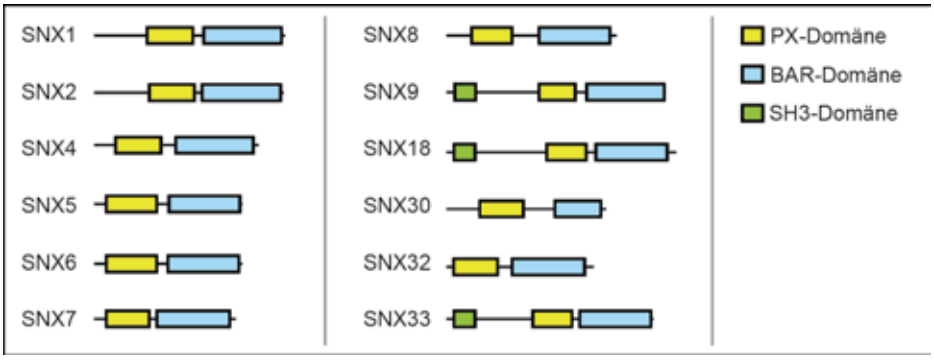

Abbildung 7: Die SNX-BAR Subfamilie der Sorting Nexine.
Mitglieder der SNX-BAR-Subfamilie der Sorting Nexine (SNXs) besitzen neben der für die Familie charakteristischen PX-Domäne eine BAR-domäne. Die PX-Domäne vermittelt die Bindung an spezifische Phosphtidylinsositol-Phosphate (PIPs) der Membran. BAR Domänen vermitteln die Dimerisierung von Proteinen und erkennen und Binden gekrümmte Membranen. Multimere aus BAR-Proteinen können gerüstartige Strukturen zur Stabilisierung von tubulären Membranen ausbilden und einige BAR-Domänen können darüber hinaus die Krümmung der Membran induzieren.

In Bezug auf synaptische Plastizität gibt es klare Hinweise, dass die endosomale Sortierung und das Recycling von AMPA-Rezeptoren von zentraler Bedeutung sind (Ehlers, 2000). In der Tat existieren auch innerhalb von Spines endosomale und tubuläre Strukturen (Cooney et al., 2002). Rab5 ist nicht nur ein zentraler Bestandteil von frühen Endosomen, sondern ist bereits im späten Stadium der Endozytose involviert. Die aktivitäts-induzierte Endozytose von AMPA-Rezeptoren ist von Rab5 abhängig, jedoch nicht das konstitutive Recycling (Brown et al., 2005). Die Versorgung der Synapse mit neuen AMPA-Rezeptoren während der synaptischen Potenzierung ist von AMPA-Rezeptoren in Recycling-Endosomen abhängig (Park et al., 2004). Die Integration der AMPA-Rezeptoren in die Plasmamembran des Spines kann durch die aktivitäts-abhängige Exozytose vermittelt werden (Kennedy et al., 2010). Gemeinsam mit der Endozytose-Maschinerie der endozytischen Zone liegen also alle Komponenten für das Rezeptor-Trafficking und die endosomale Sortierung innerhalb des

abgegrenzten Bereiches eines Spines vor. Recycling Endosomen können darüber hinaus in Abhängigkeit synaptischer Aktivität, aktiv aus dem dendritischen Schaft in Spines transportiert werden (Wang et al., 2008). Die korrekte Sortierung der AMPA-Rezeptoren scheint von der Rab5/4/11-Kaskade abhängig zu sein. Die Störung des Rab4-Effektors GRASP-1 führt zu Veränderungen in der Reifung von Recycling Endosomen und einer verringerten Lokalisation in Spines (Hoogenraad and van der Sluijs, 2010).

Neben den hier genannten Effektor-Proteine konnten weiter identifiziert, die das AMPAR-Trafficking und AMPA-Recycling unter basalen oder aktivitäts-induzierenden Bedingungen auf verschiedenste Weise beeinflussen (Anggono et al., 2011; Lin and Huganir, 2007; Mejias et al., 2011). Die Eigenschaften von AMPA-Rezeptoren und die damit verbundene synaptische Übertragung sind eng mit der Kombination der AMPAR-Untereinheiten verbunden. Die synaptische Integration oder der Ausbau der verschiedenen AMPAR-Subtypen in Abhängigkeit der synaptischen Plastizität lässt auf eine entsprechend komplexe endosomale Sortierung schließen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das aktivitäts-regulierte Arc/Arg3.1 besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die auf eine zentrale Rolle in synaptischer Plastizität hinweisen. Seine Expression ist räumlich und zeitlich stark Reguliert und von plastizitäts-induzierenden Stimuli abhängig. Insbesondere langanhaltende Formen der synaptischen Plastizität und die Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses sind ohne Arc/Arg3.1 stark beeinträchtigt. Auf molekularer Ebene bindet Arc/Arg3.1 an Komponenten der Endozytose-Maschinerie und beeinflusst die Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren. Die Regulation von AMPA-Rezeptoren wird als zentrales Stellwerk der synaptische Plastizität betrachtet. Dem entspricht die Vielzahl an Mechanismen und molekularen Wechselwirkungen zur Kontrolle des AMPAR-Traffickings.

Zielsetzung dieser Arbeit war es neue Arc/Arg3.1-Bindunhspartner zu identifizieren und deren Interaktion mit Arc/Arg3.1 zu Charakterisieren. Die Untersuchung der Lokalisation der Proteine in immortalisierten Zelllinien und Neuronenkulturen sollte Auskunft über eine möglichen gemeinsamen Funktion geben. Auch bereits bekannte Interaktionen mit Komponenten der Endozytose-Maschinerie sollten in diese Untersuchungen mit einfließen. Die genaue Analyse der Bindungstellen von Arc/Arg3.1, die Generierung von bindungsdefizienten Mutanten und von KO-Tieren sollten zudem wertvolle Werkzeuge für zukünftige

Untersuchungen bereitstellen. Insgesamt sollten die Ergebnisse zum besseren Verständnis der molekularen Funktion von Arc/Arg3.1 in synaptischer Plastizität beitragen.

2. ERGEBNISSE

2.1 Identifizierung neuer Arc/Arg3.1-Interaktionspartner im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Eine Möglichkeit die Funktion eines Proteins besser zu verstehen, ist die Identifizierung seiner Interaktionspartner. Das Wissen um die Struktur und Funktionen dieser Interaktionspartner ermöglichen ein besseres Verständnis des molekularen Kontextes in dem das Protein wirkt und somit auch ein besseres Verständnis seiner Funktionalität. Eine häufig verwendete Methode zur Identifizierung neuer Bindungspartner ist das Hefe-Zwei-Hybrid-System. Mit diesem System ist es möglich die Expressionsprodukte großer cDNA-Bibliotheken auf deren Interaktion mit einem spezifischen Protein zu untersuchen.

Voraussetzung für eine solche Untersuchung ist die Abwesenheit von autoaktivierenden Eigenschaften des Proteins. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, besitzt Arc/Arg3.1 genau solche autoaktivierenden Eigenschaften (Arg3.1 volle Länge, AS1-396). Die Expression des Fusionsproteins aus LexA und Arc/Arg3.1 führt bereits zur Expression des Selektionsfaktors IGPD. Eine mögliche Erklärung für die Autoaktivität von Arc/Arg3.1 ist die Bindung an Transkriptionsfaktoren (TF) der Hefe (Abb. 1B2).

Zur Lösung dieses Problems wurde das Arc/Arg3.1-Protein in verschiedene Domänen

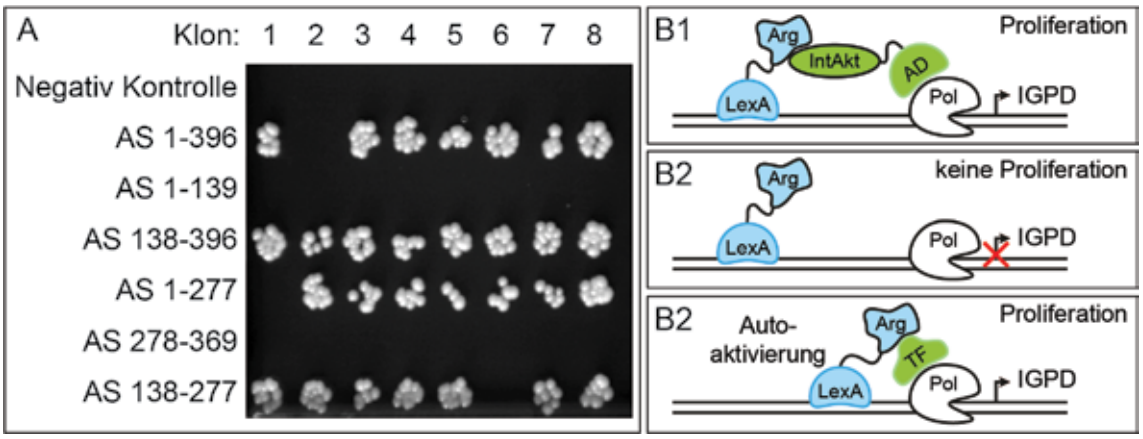

Abbildung 1: Untersuchung zur autoaktivierenden Eigenschaft von Arc/Arg3.1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System.

Die Expression des Arc/Arg3.1-Proteins (AS 1-396) im Hefe-Zwei-Hybrid-System führt zur Autoaktivierung des Systems. Die Expression verschiedener Domänen von Arc/Arg3.1 zeigt, dass der Bereich zwischen AS 138 und 278 für die Autoaktivierung verantwortlich ist (A). Ohne autoaktivierende Eigenschaft des zu untersuchenden Proteins ist die Hefe nur in Anwesenheit eines entsprechenden Interaktionspartners (IntAkt) proliferationsfähig (B1, B2). Mit autoaktivierender Eigenschaft ist die Expression des zu untersuchenden Proteins für die Expression von Überlebensfaktoren ausreichend. Dies kann z.B. über eine Bindung an Transkriptionsfaktoren (TF) der Hefe erfolgen (B3).

unterteilt. Da keine Kristallstruktur des Arc/Arg3.1-Proteins zu Verfügung steht und keine größeren, funktionellen Domänen in Arc/Arg3.1 bekannt sind, wurde das Protein mit Hilfe sequenzbasierter Vorhersage-Algorithmen in silico modelliert (Abb. 2; scratch.proteomics.ics.uci.edu, Li Zhang 2009; zhanglab.ccmb.med.umich.edu/REMO, Cheng et al., 2005). Das Modell zeigt, dass Arc/Arg3.1 voraussichtlich eine N-terminalen und eine C-terminale, globuläre Domäne besitzt. Zusätzlich lässt sich ein zentraler, eher ungeordneter Teil erkennen. Auf Basis dieses 3D-Modells wurde das Protein dementsprechend in eine N-terminale, eine zentrale und eine C-terminale Domäne unterteilt (Abb. 2). Diese Domänen wurden daraufhin auf ihre autoaktivierenden Eigenschaften getestet (Abb. 1A). Der zentrale Teil des Proteins ist ursächlich für die autoaktivierende Wirkung, da der N-terminale Teil (AS1-139) und der C-terminale Teil (AS 278-369) keine Autoaktivierung zeigen.

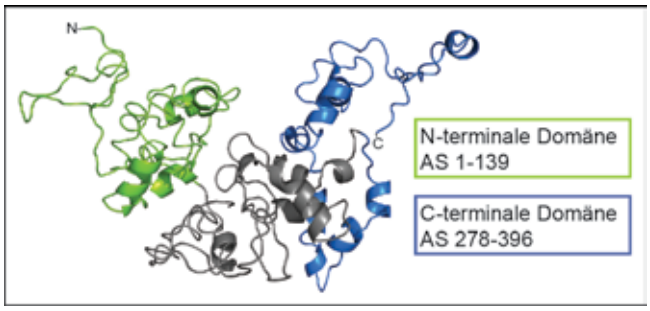

Abbildung 2: *In silico* Struktur des Arc/Arg3.1-Proteins und der Im Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendeten Domänen. Mit Hilfe von sequenzbasierten Algorithmen wurde die 3D-Struktur von Arc/Arg3.1 in silico modelliert. Basierend auf dieser Struktur und der Aminosäure-sequenz wurden Domänen zum Test auf deren autoaktivierenden Eigenschaften ausgewählt und im Hefe-Zwei-Hybrid-System getestet.

Beide Teile des Proteins wurden unter Verwendung einer hippocampalen Ratten-cDNA Bibliothek (Rattus norvegicus) in Korporation mit der Firma Hybrigenics (Hybrigenics, Paris – France) untersucht. Insbesondere mit dem N-terminalen Teil von Arc/Arg3.1 konnte eine Vielzahl von neuen, potentiellen Interaktionspartnern, insgesammt 32, identifiziert werden. Sie wurden wie in Abb. 3 dargestellt entsprechend ihrer wahrscheinlichen Funktion in Gruppen unterteilt. Auffällig ist hierbei die Trafficking-Gruppe auf die 31% der identifizierten Proteine entfallen. Angesichts der Wirkung von Arc/Arg3.1 auf das Rezeptor-Trafficking

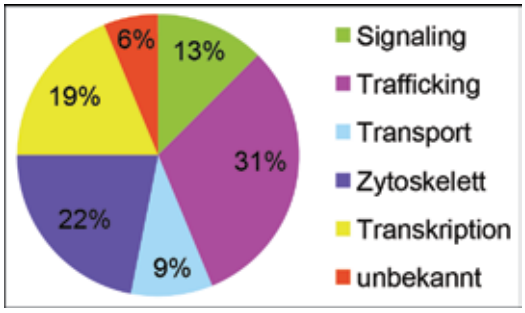

Abbildung 3: Gruppierung der im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierten potentiellen Arc/Arg3.1-Interaktionspartner entsprechend ihrer postulierten molekularen Funktion.

(Shepherd and Bear, 2011) ist diese Gruppe von besonderem Interesse. Auffällig ist, dass die Hälfte der Proteine in dieser Gruppe mit dem endosomalen System der Zelle assoziiert sind (nicht gezeigt). Da die Sortierung von Proteinen im endosomalen System und deren Überführung an ihren Bestimmungsort eine Grundvoraussetzung für adaptive zelluläre Prozesse wie synaptische Plastizität ist, wurden drei dieser Proteine für weitere Untersuchungen ausgewählt:

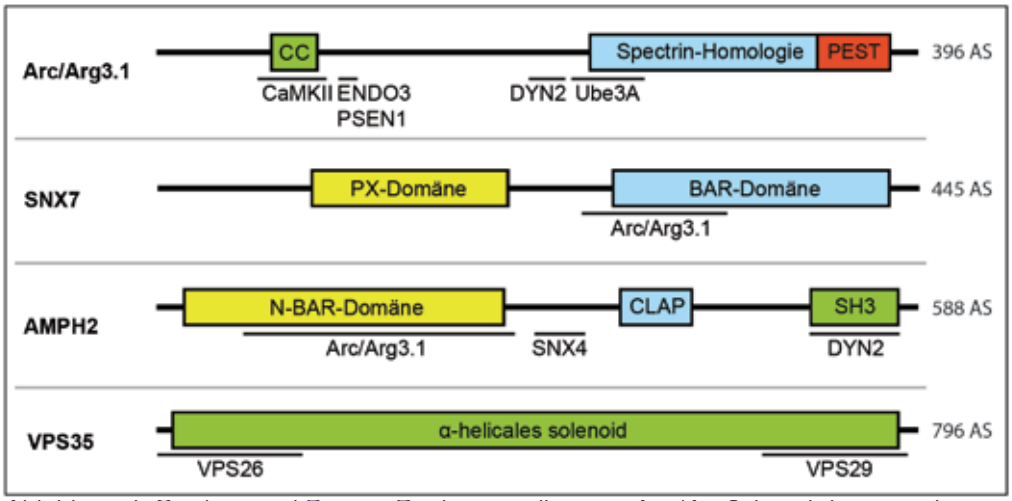

Abbildung 4: Struktur und Protein-Bindungsstellen von Arc/Arg3.1 und den neu identifizierten, potentiellen Interaktionspartnern SNX7, AMPH2 und VPS35.
Domänen und Strukturelemente der Proteine wurden an Hand von Sequenzanalysen und Literaturangaben ermittelt und proportional zur Länge der AS-Sequenz dargestellt. Die Bindungsstellen bekannter Interaktionspartner, sowie die aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System hervorgegangenen Bereiche der Arc/Arg3.1- Bindung, sind durch waagerechte Linien markiert. CC = Coiled coil; PEST = für die Regulation der Proteindegradation verantwortliche Sequenz, reich an den AS Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S), Threonin (T); PX-Domäne = Phox-Homologie Domäne, bindet an Phosphoinositolphosphate in der Membran; BAR-Domäne = Bin–Amphiphysin–Rvs-Domäne, vermittelt die Bindung an gebogene Lipid-Membranen und dient der Dimerisierung; CLAP = Clathrin- und Adapter-Protein-Complex-bindende Domäne; SH3 = SRC-Homologie-Domäne, Proteininteraktions-Domäne welche häufig an Prolin-reiche Sequenzen bindet; α-helicales Selenoid = repetetive α-helicale Domäne; CaMKII = Ca2+/calmodulin- dependent protein kinase II ;ENDO3 = Endophilin-A3; PSEN1 = Presenilin-1; DYN2 = Dynamin-2; UBE3A = Ubiquitin-protein ligase E3A; SNX4 = Sorting Nexin-4; VPS26/29 = Vacuolar protein sorting-associated protein 26 und 29.

1. Sorting Nexin-7 (SNX7) ist ein nicht charakterisiertes Mitglied der Familie der Sorting Nexine, welche durch ihre Phosphoinositolphosphat-bindende Phox-Homologie (PX) Domäne charakterisiert ist (Teasdale et al., 2001). Neben der PX-Domäne besitzt SNX7

eine BAR-Domäne. BAR-Domänen bilden in der Regel Dimere und erkennen gekrümmte Membranen. Darüber hinaus können BAR-Domänen häufig auch eine Krümmung der Membran induzieren (Abb. 4) (Peter et al., 2004).

2. Amphiphysin II (AMPH2) besitz ebenfalls eine BAR-Domäne. Dieser BAR-Domäne geht eine N-terminale alpha-Helix voran, die für die Krümmung von Membranen wichtig ist. Diese Kombination wird als N-BAR-Domäne bezeichnet (Peter et al., 2004). Zusätzlich besitzt AMPH2 in einem zentralen und hoch variablen Teil Bindestellen für den Adaptor-Protein-Complex-2 (AP2) und für Clathrin. Dieser Bereich wird als CLAP-Domäne bezeichnet. Am C-Terminus des Proteins befindet sich eine SH3-Domäne, welche Dynamin an Membranen rekrutieren kann (Abb. 4) (Wigge et al., 1997).

3. Vacuolar protein sorting-associated protein 35 (VPS35) ist ein zentraler Bestandteil des Retromer-Komplexes. Zusammen mit VPS26 und VPS29 bildet VPS35 den Kern des Retromers (Bonifacino and Hurley, 2008). In Verbindung mit Sorting Nexinen ist das Retromer unter anderem für den retrograden Transport von Membranproteinen von Endosomen hin zum cis-Golgi verantwortlich (Abb. 4).

Die Auswahl dieser drei Proteine basiert auf einer sinnvollen Einordnung in das ArcArg3.1-Interaktom (Abb. 5) und der postulierten molekularen Funktion von ArcArg3.1.

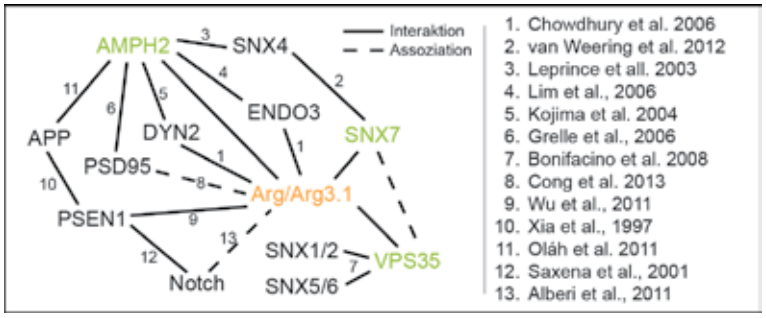

Abbildung 5: Interaktom des Arc/Arg3.1-Protein Gesamtheit der aus der Literatur bekannten Interaktionen und Assoziationen des Arc/Arg3.1-Proteins und Zuordnung der neu identifizierten, potentiellen Interaktionspartner (grün). Durchgehende Linie = direkte Interaktion der Proteine; unterbrochene Linie = Assoziation der Proteine.

2.2 Arc/Arg3.1 und seine neu identifizierten Interaktionspartner kolokalisieren an Endosomen und der Plasmamembran

Die Identifizierung der Arc/Arg3.1-Interaktionspartner mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems legt eine direkte Interaktion der Proteine nahe. Hat diese Interaktion auch in Säugetierzellen bestand, so ist zumindest von einer partiellen Kolokalisation der Proteine auszugehen. Die Verwendung von immortalisierten Zelllinien zur Untersuchung der Koloka-

lisation, bietet dabei mehrere Vorteile. Zum einen sind diese Zellen leicht zu kultivieren und bieten gleichbleibende experimentelle Bedingungen, zum anderen besitzen sie in der Regel eine einfache Morphologie, was die Identifizierung intrazellulärer Strukturen sowie von Organellen erleichtert. Mit geeigneten Expressionsvektoren wurden alle in dieser Arbeit untersuchten Proteine mit N- und C-terminalen Tags versehen und deren Einfluss auf die Expressionseffizienz und das Expressionsmuster verglichen (nicht gezeigt). Die jeweils effizientesten und konsistentesten Varianten wurden für die folgenden Untersuchungen verwendet.

Proteine der PX-BAR Subfamilie der Sorting Nexine, zu denen auch SNX7 zählt, binden an unterschiedliche endosomale Membranen und an die Plasmamembran (Cullen, 2008). Auch SNX7 zeigt solch eine Verteilung in der Zelle (Abb. 6). SNX7 lokalisiert in endosomalen Strukturen und an der Plasmamembran. Arg3.1 folgt diesem Muster und beide Proteine zeigen ein hohes Maß an Kolokalisation, sowohl an Endosomen als auch an der Plasmamembran (Abb. 6).

Ein anderes Bild ergibt sich bei der Expression von AMPH2 und Arc/Arg3.1. AMPH2 ist

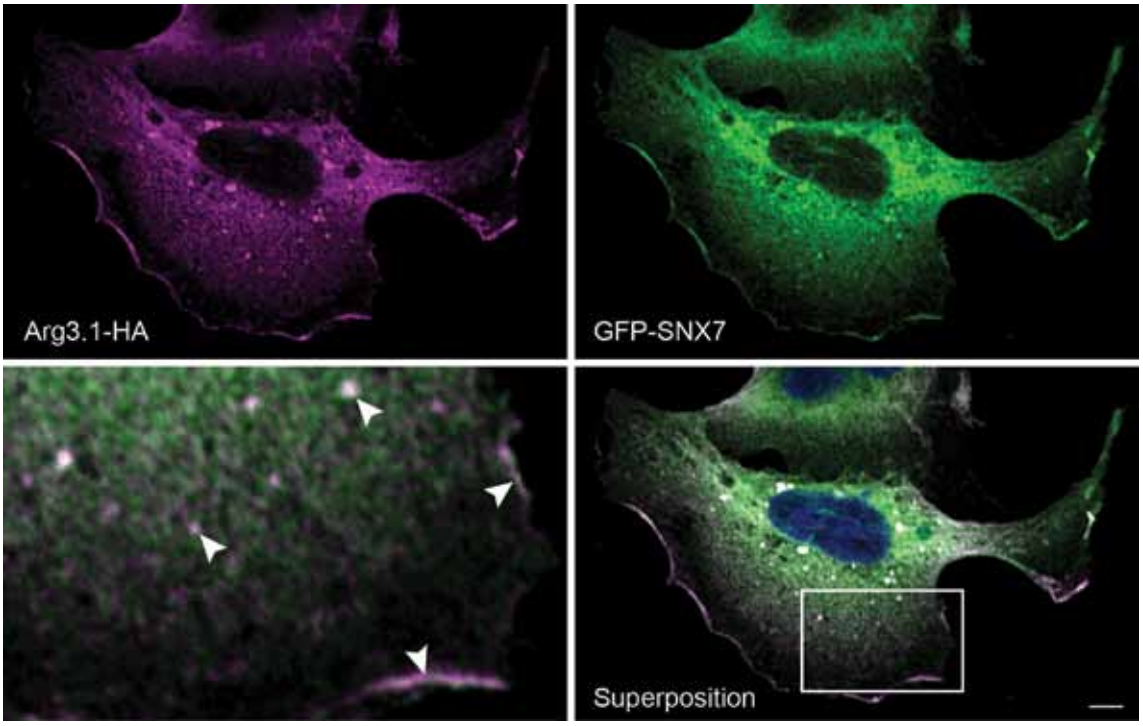

Abbildung 6: Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren an der Plasmamembran und Endosomen in HeLa-Zellen

Die Expression von Arg3.1-HA (magenta) und GFP-SNX7 (grün) in HeLa-Zellen zeigt deren Kolokalisation an der Plasmamembran und endosomalen Strukturen (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

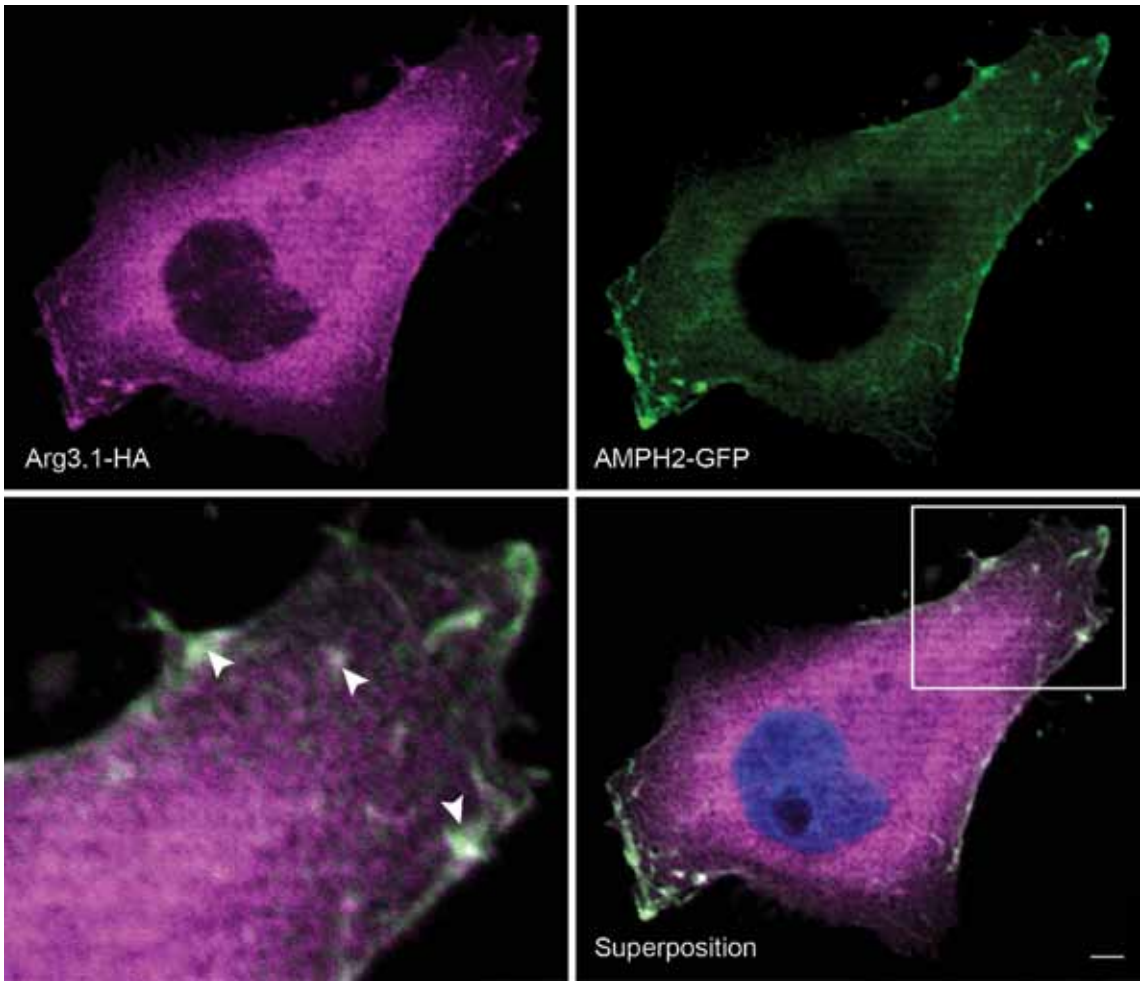

Abbildung 7: Arc/Arg3.1 und AMPH2 kolokalisieren primär an der Plasmamembran in HeLa-Zellen

Die Expression von Arg3.1-HA (magenta) und AMPH2-GFP (grün) in HeLa-Zellen zeigt deren Kolokalisation an der Plasmamembran und zu einem geringeren Anteil auch an tubulären Strukturen (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert, an der es auch stark mit Arc/Arg3.1 kolokalisiert (Abb. 7).

VPS35 und Arc/Arg3.1 zeigen nur geringe Kolokalisation in HeLa-Zellen. Es hat den Anschein, dass beide Proteine sich in verschiedenen Subdomänen des gleichen Endosoms befinden können (Abb. 8).

AMPH2 und SNX7 teilen sich einen gemeinsamen Interaktionspartner, Sorting Nexin-4 (SNX4) (Abb. 4; Leprince et al., 2003; van Weering et al., 2012). Wird SNX4 zusätzlich zu AMPH2 und Arc/Arg3.1 in HeLa-Zellen koexprimiert, führt dies zu einer verstärkten endosomalen Lokalisation von AMPH2. Alle drei Proteine kolonialisieren an endosomalen und tubulären Strukturen (Abb. 9). Wird anstelle von SNX4, SNX7 gemeinsam mit AMPH2

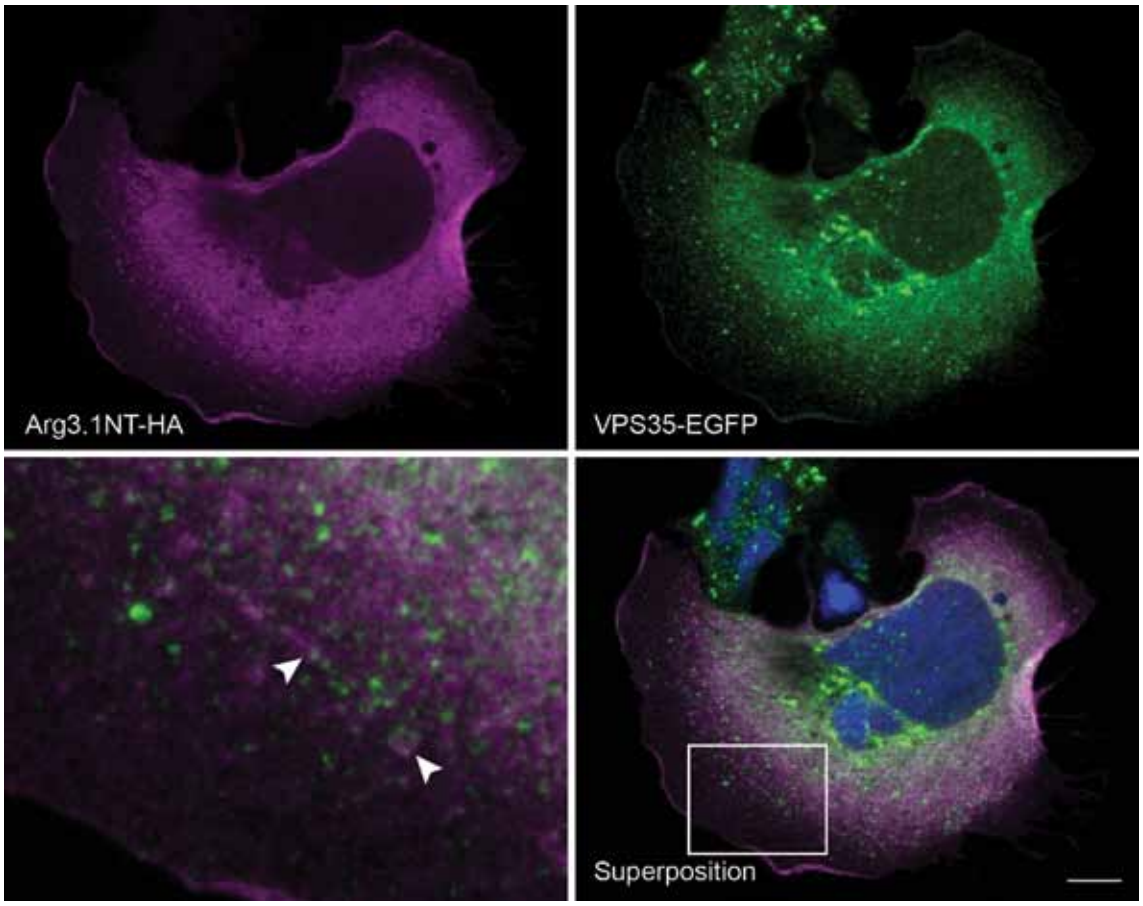

Abbildung 8: Arc/Arg3.1 und VPS35 kolokalisieren nur partiell an endosomalen Strukturen in HeLa-Zellen

Die Expression von Arg3.1-HA (magenta) und VPS35-EGFP (grün) in HeLa-Zellen zeigt deren partiellen Kolokalisation an endosomalen Strukturen (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen. Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

und Arc/Arg3.1 koexprimiert, ist die Kolokalisation aller drei Proteine insbesondere an der Plasmamembran zu beobachten (Abb. 10).

Zusammengefasst ist eine Kolokalisation von Arc/Arg3.1 mit allen drei der neu identifizierten Interaktionspartner in HeLa-Zellen zu beobachten. Insbesondere SNX7 und AMPH2 zeigen ein hohes Maß an Kolokalisation. Arc/Arg3.1, SNX7 und AMPH2 lokalisierten primär an endosomalen und tubulären Strukturen sowie der Plasmamembran. Die Lokalisation in Endosomen oder an der Plasmamembran hängt dabei von der Kombination der Proteine ab. Dies deutet auf einen funktionellen Zusammenhang im Wechselspiel zwischen Plasmamembran, Endozytose und Endosomen hin.

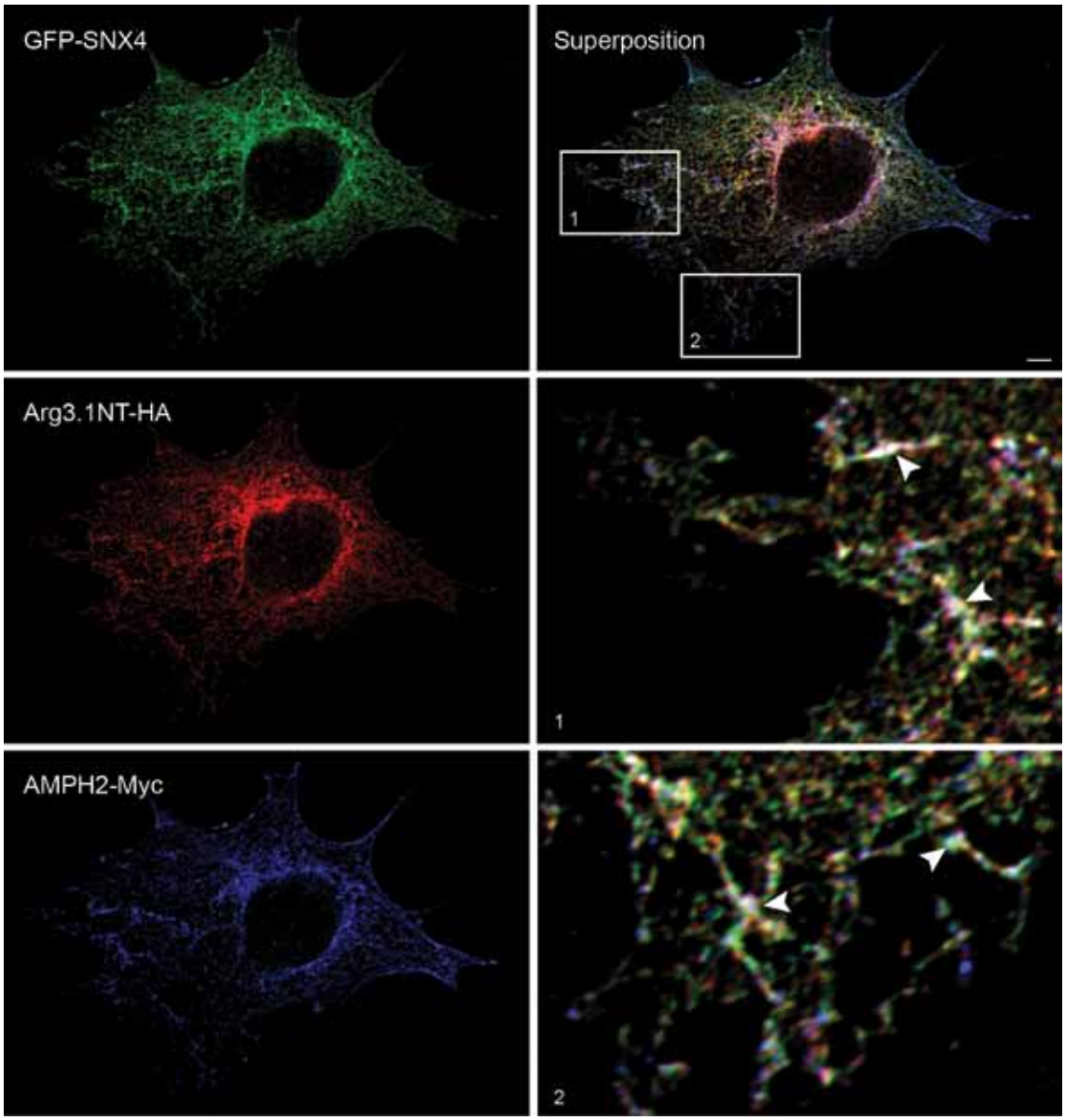

Abbildung 9: Arc/Arg3.1, SNX4 und AMPH2 kolokalisieren an endosomalen, tubulären Strukturen in HeLa-Zellen

Expression von Arg3.1NT-HA (rot), GFP-SNX4 (grün) und AMPH2-Myc (blau) in HeLa-Zellen resultiert in deren Kolokalisation an endosomalen, tubulären Strukturen (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen. Alle Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

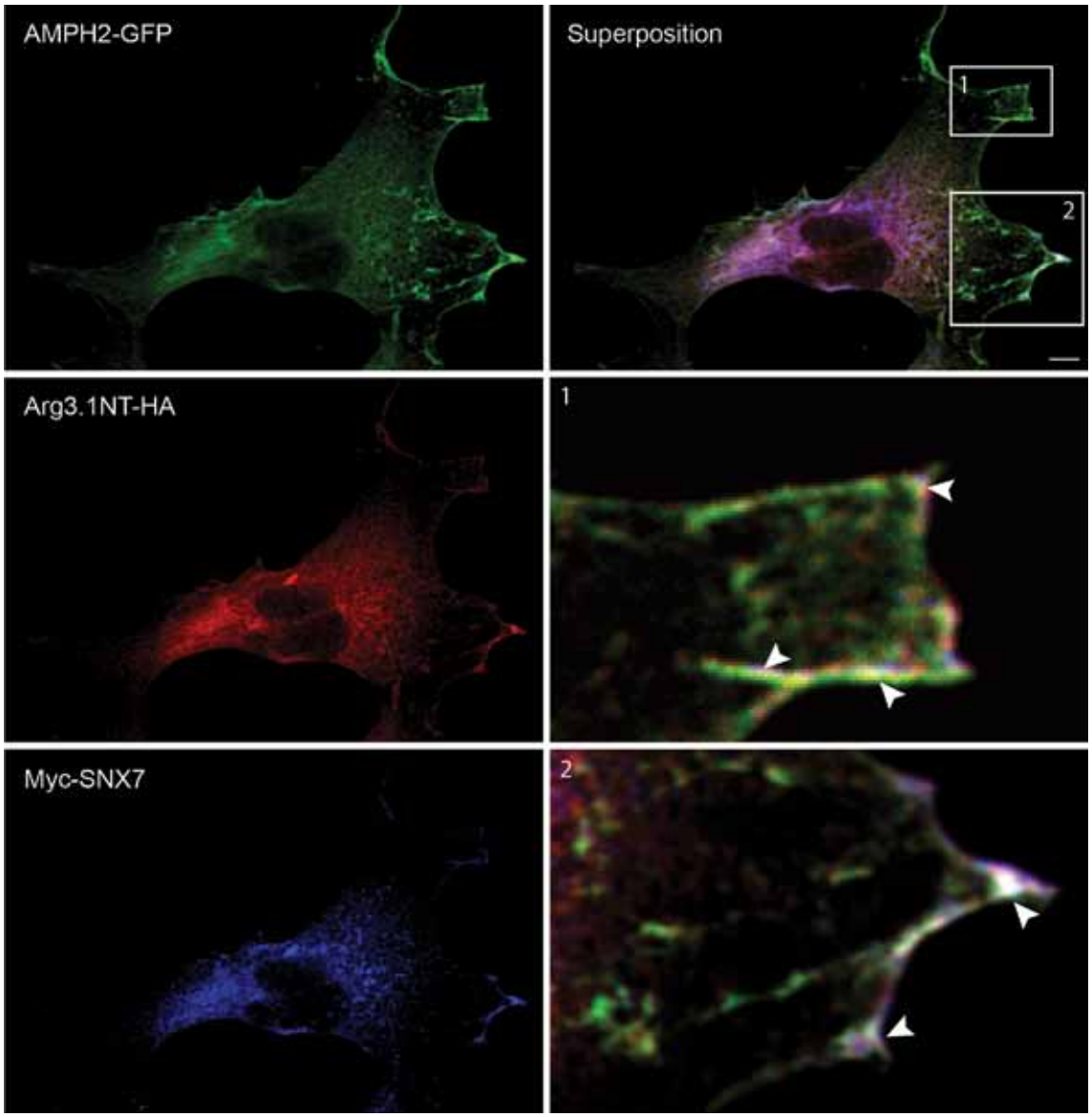

Abbildung 10: Arc/Arg3.1, SNX7 und AMPH2 kolokalisieren an der Plasmamembran in HeLa-Zellen

Expression von Arg3.1NT-HA (rot), AMP2-GFP (grün) und Myc-SNX7 (blau) in HeLa-Zellen resultiert in deren Kolokalisation an der Plasmamembran (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen. Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

2.3 Arc/Arg3.1 und seine neu identifizierten Interaktionspartner kolokalisieren in Neuronen

In exzitatorischen Neuronen ist Arc/Arg3.1 insbesondere in deren Postsynaptsichen Dichten angereichert. Darüber hinaus lokalisiert Arc/Arg3.1 in dendritischen Spines, in Dendriten, Soma und im Nucleus. Die exakte Lokalisation und Menge an Arc/Arg3.1 Protein ist dabei von plastizitäts-induzierenden Stimuli abhängig (Béïque et al., 2011; Chowdhury et al., 2006; Korb et al., 2013; Moga et al., 2004; Steward and Worley, 2001; Wu et al., 2011). Zur Überprüfung der Lokalisation von Arc/Arg3.1 und dessen neuen Interaktionspartnern, wurden diese in Neuronen koexprimiert. Die Lokalisation des verwendeten Arc/Arg3.1-Fusionsproteins (Arg3.1-HA) stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Lokalisation überein (Abb. 11-14).

AMPH2 zeigt in Neuronen eine somatodendritische als auch axonale Verteilung. Die

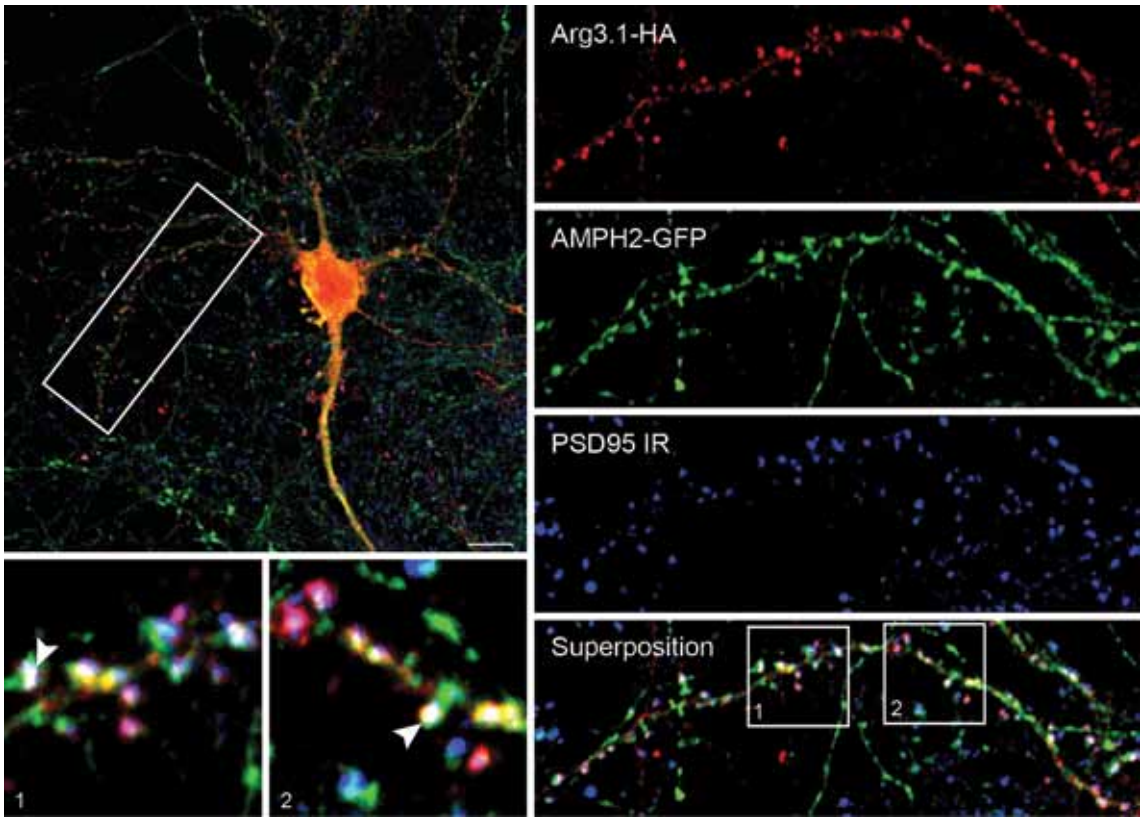

Abbildung 11: Arc/Arg3.1 und AMPH2 kolokalisieren in Dendriten und deren Spines.
Die Expression von Arg3.1-HA (rot) und AMPH2-GFP (grün) in kultivierten hippocampalen Neuronen zeigt deren Kolokalisation in Dendriten und insbesondere in dendritischen Spines. Beide Proteine kolokalisieren zusätzlich mit einem Markerprotein der Postsynaptsichen Dichte, PSD95 (Detail-vergrößerung, Pfeilspitzen). Alle Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. IR = Immunreaktion. Maßstabs-balken = 10 µm.

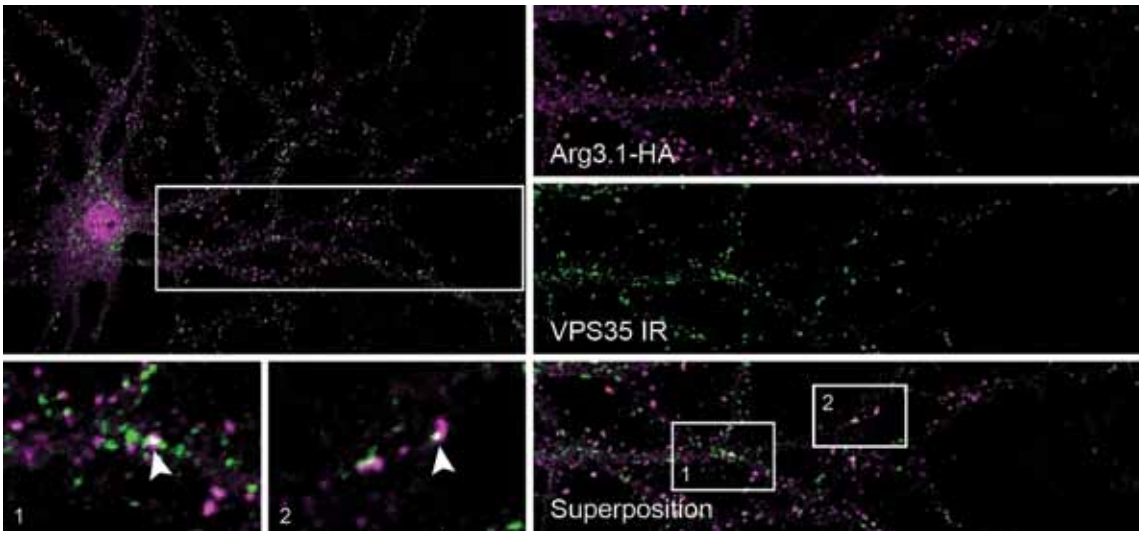

Abbildung 12: Arc/Arg3.1 und VPS35 kolokalisieren nur geringfügig in Dendriten.
Die Expression von Arg3.1-HA (magenta) und VPS35-GFP (grün) in kultivierten hippocampalen Neuronen zeigt deren geringfügige Kolokalisation in Dendriten (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. IR = Immunreaktion. Maßstabsbalken = 10 µm.

Koexpression zeigt, dass Arc/Arg3.1 und AMP2 insbesondere in dendritischen Spines kolokalisieren. Darüber hinaus kolokalisieren beide Proteine mit einem Markerprotein für die Postsynaptsiche Dichte (PSD95) (Abb. 11). Im Gegensatz dazu, zeigen Arc/Arg3.1 und VPS35 nur eine schwache, partielle Kolokalisation, ähnlich der Beobachtung in HeLa-Zellen (Abb. 12).

SNX7 kann entsprechend der cDNA-Datenbanken (Ensembl.org) theoretisch in 4 Splicevarianten (SV) exprimiert werden (Abb. 13). SV-2 ist das Produkt eines alternativen Start-

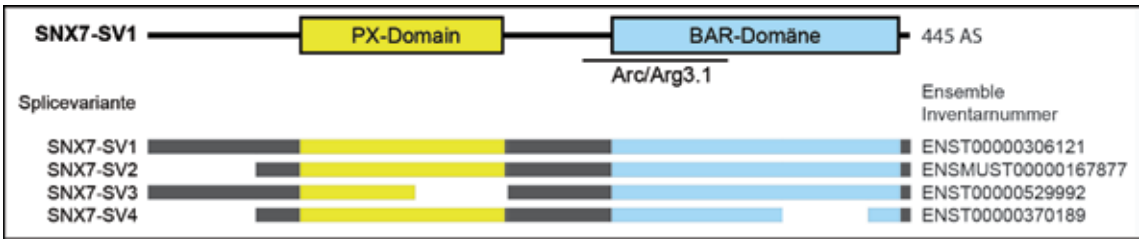

Abbildung 13: Übersicht der SNX7-Domänen-Struktur und der potentiellen SNX7-Splicevarianten.
SNX7 besitz zwei bekannte Domänen, eine PX-Domäne und eine BAR-Domäne die im entsprechenden Verhältnis zur Gesamtlänge des Proteins dargestellt sind. Die im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierte Arc/Arg3.1-Bindestelle ist durch eine waagerechte Linie markiert. Entsprechend der Ensemble-Genomdatenbank existieren vier potentielle SNX7-Splicevarianten (SV1-4). Die Struktur aller vier Splicevarianten ist relativ zur längsten Splicevariante (SV1) dargestellt. SV2 resultiert aus der Verwendung eines alternativen Start-Codons und ist N-terminal verkürzt. SV3 besitzt eine Deletion des zweiten Teils der PX-Domäne. SV4 ist entsprechend SV2 N-terminal verkürzt und besitzt zusätzlich eine Deletion am Ende der BAR-Domäne.

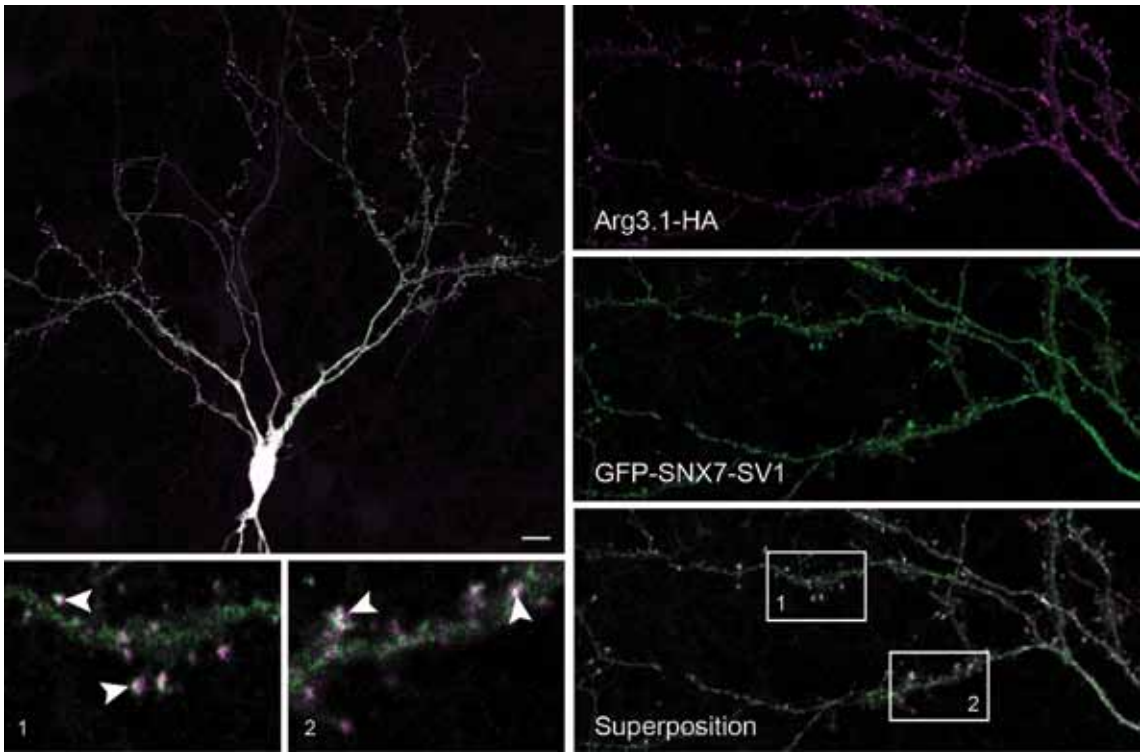

Abbildung 14: Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren primär in dendritischen Spines.

Die Expression von Arg3.1-HA (magenta) und GFP-SNX7-SV1 (grün) in kultivierten hippocampalen Neuronen zeigt deren Kolokalisation in dendritischen Spines (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. SV = Splicevariante. Maßstabsbalken = 10 µm.

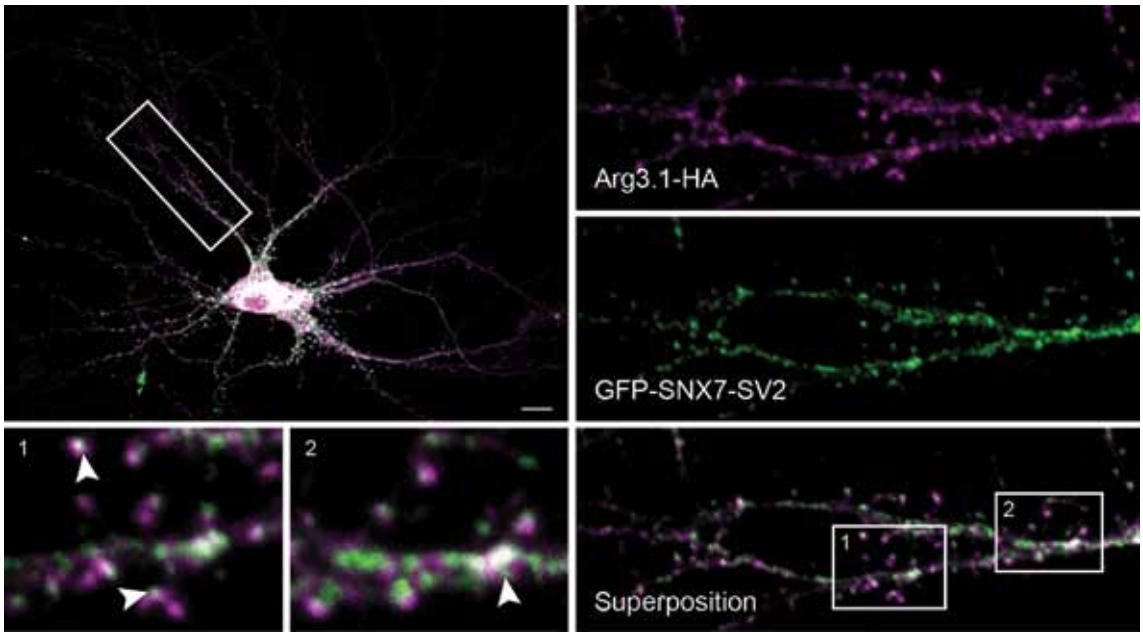

Abbildung 15: Arc/Arg3.1 und Splicevariante-2 von SNX7 kolokalisieren primär in dendritischen Spines.

Die Expression von Arg3.1-HA (magenta) und GFP-SNX7-SV2 (grün) in kultivierten hippocampalen Neuronen zeigt deren Kolokalisation in dendritischen Spines (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. SV = Splicevariante. Maßstabsbalken = 10 µm.

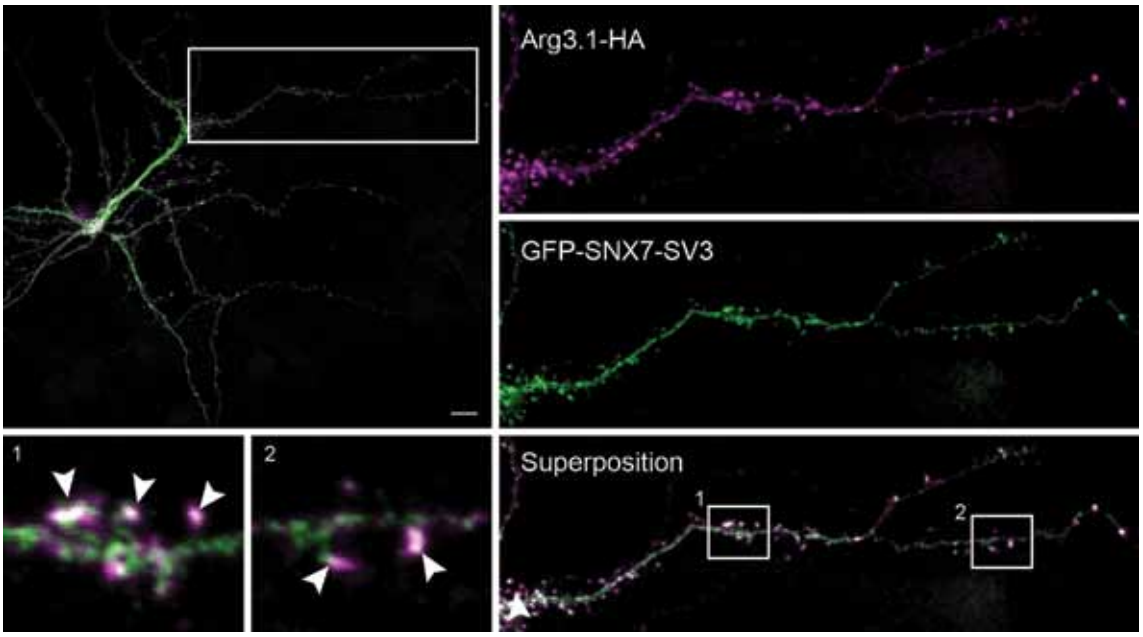

Abbildung 16: Arc/Arg3.1 und Splicevariante-3 von SNX7 kolokalisieren primär in dendritischen Spines.

Die Expression von Arg3.1-HA (magenta) und GFP-SNX7-SV3 (grün) in kultivierten hippocampalen Neuronen zeigt deren Kolokalisation in dendritischen Spines (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. SV = Splicevariante. Maßstabsbalken = 10 µm.

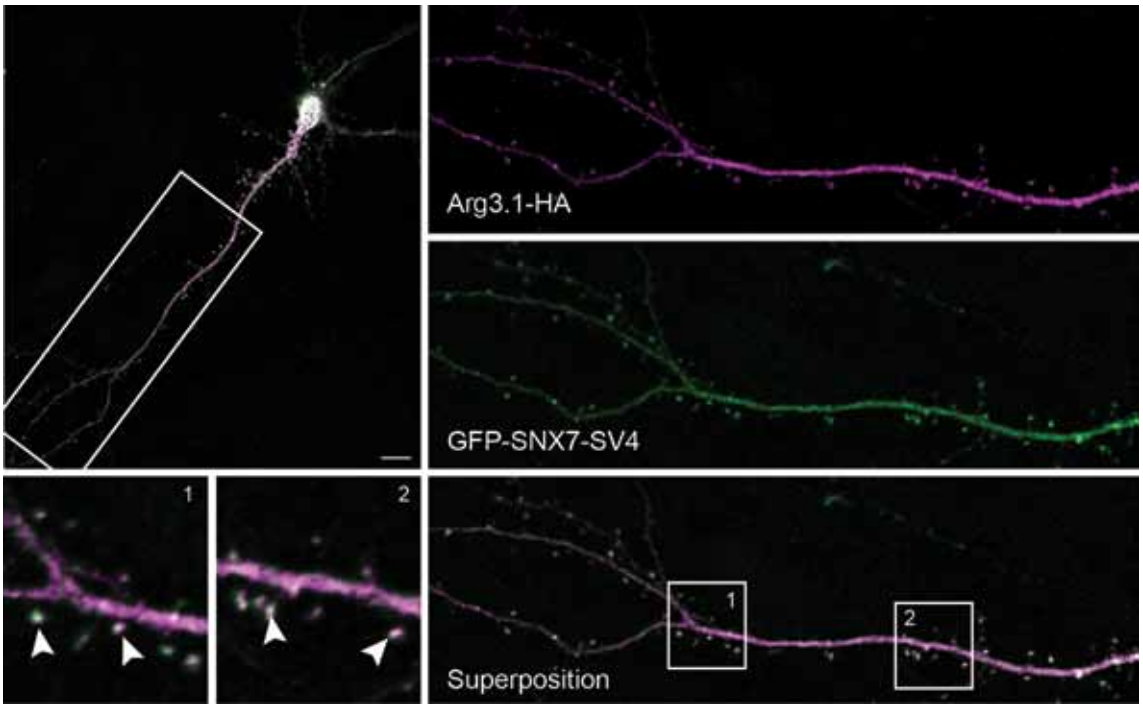

Abbildung 17: Arc/Arg3.1 und Splicevariante-4 von SNX7 kolokalisieren primär in dendritischen Spines.

Die Expression von Arg3.1-HA (magenta) und GFP-SNX7-SV4 (grün) in kultivierten hippocampalen Neuronen zeigt deren Kolokalisation in dendritischen Spines (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. SV = Splicevariante. Maßstabsbalken = 10 µm.

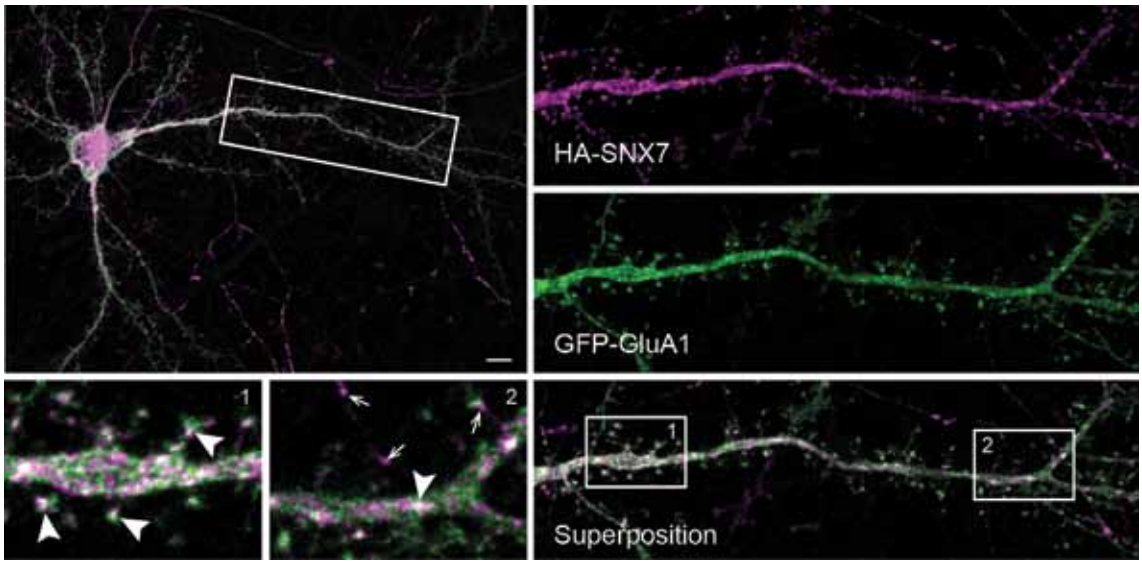

Abbildung 18: SNX7 und GluA1 kolokalisieren in Dendriten und in deren Spines.
Die Expression von HA-SNX7 (magenta) und AMPAR-Untereinheit GFP-GluA1 (grün) in kultivierten hippocampalen Neuronen zeigt deren Kolokalisation in Dendriten und deren Spines (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). SNX7-HA lokalisiert zusätzlich im Axon der Neurone (Detailvergrößerung, Pfeile). Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

Codons und besitzt einen verkürzten N-Terminus. In SV-3 fehlt Exon 4, welches für einen Teil der PX-Domäne codiert. SV-4 besitzt wie SV-2 einen verkürzten N-Terminus und der durch Exon 8 codierte Teil der BAR-Domäne fehlt. Alle vier Splicevarianten kolokalisieren mit Arc/Arg3.1 in dendritischen Spines und teilweise auch im dendritischen Schaft (Abb. 14-17). Demnach ist keine der in den SV fehlenden Sequenzen für die dendritische Lokalisation von SNX7 verantwortlich. Die Koexpression von SNX7 mit der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluA1 zeigt ebenfalls eine Kolokalisation in dendritischen Spines. Darüber hinaus kolokalisieren beide Proteine auch stark im dendritischen Schaft, was auf eine mögliche Assoziation mit den gleichen Endosomen hindeutet. Neben der dendritischen Lokalisation, kann SNX7 auch im Axon der Neurone beobachtet werden (Abb. 18).

2.4 Verifikation der Bindung zwischen Arc/Arg3.1 und den neuen Interaktionspartnern

Zur Bestätigung der Interaktion zwischen Arc/Arg3.1 und der im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierten Proteine wurden die Interaktionen in zwei biochemischen Ansätzen getestet. Erstens wurden die Proteine auf deren Fähigkeit zur Koimmunpräzipitation getestet und zweitens auf Ihre direkte Bindung mit Hilfe von GST-Pull-Down Experimenten. Die Interaktionen zwischen Arc/Arg3.1 und AMPH2 sowie VPS35 konnten mit den gewählten Bedingungen nicht bestätigt werden (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die möglichen Interaktionen zwischen Arc/Arg3.1, AMPH2 und VPS35 im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert.

2.5 Arc/Arg3.1 koimmunpräzipitiert mit SNX7

Arc/Arg3.1-tdTomato und SNX7-GFP wurden in HeLa-Zellen koexprimiert und über den GFP-Tag immunpräzipitiert. Zur Kontrolle der Spezifität wurde Arc/Arg3.1 auch mit GFP koexprimiert. Die anschließende Analyse im Western-Blot zeigt, dass Arc/Arg3.1 über SNX7 koimmunpräzipitiert werden kann. Die Immunpräzipitation von GFP hingegen führt zu keiner Anreicherung von Arc/Arg3.1 (Abb. 19).

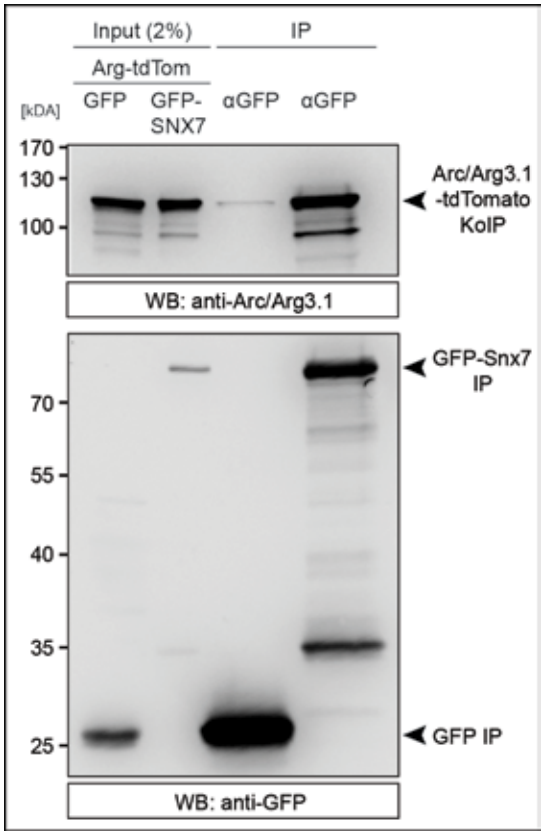

Abbildung 19: Koimmunpräzipitation von Arc/Arg3.1 und SNX7.
Die Fusionsproteine Arc/Arg3.1-tdTomato und GFP-SNX7 wurden in HeLa-Zellen koexprimiert. Zur Kontrolle wurde Arc/Arg3.1-tdTomato zusätzlich mit GFP koexprimiet. Das GFP-SNX7-Fusionsprotein und GFP wurden jeweils aus dem entsprechenden Zell-Lysat (Input) über anti-GFP-Antikörper immunpräzipitiert (IP α-GFP). Die Präzipitate wurden per Western-Blot (WB) analysiert. Die Präzipitation von GFP-SNX7, jedoch nicht von GFP alleine, führt zu einer Koimmunpräzipitation von Arc/Arg3.1 (Arc/Arg3.1-tdTomato KoIP).

2.6 Arc/Arg3.1 bindet direkt an SNX7

Ein Fusionsprotein aus GST (Glutathion-S-Transferase) und SNX7 sowie GST alleine wurden in BL21 E.coli Bakterien exprimiert. Beide Proteine wurden an eine Matrix gekoppelt und mit einem Lysat aus Arc/Arg3.1 Überexprimierenden HeLa-Zellen inkubiert. Die Analyse der über GST-SNX7 und GST aufgereinigten Proteine im Western-Blot zeigt, dass Arc/Arg3.1 an GST-SNX7, jedoch nicht an GST alleine bindet (Abb. 20). Demnach bindet Arc/Arg3.1 direkt an SNX7.

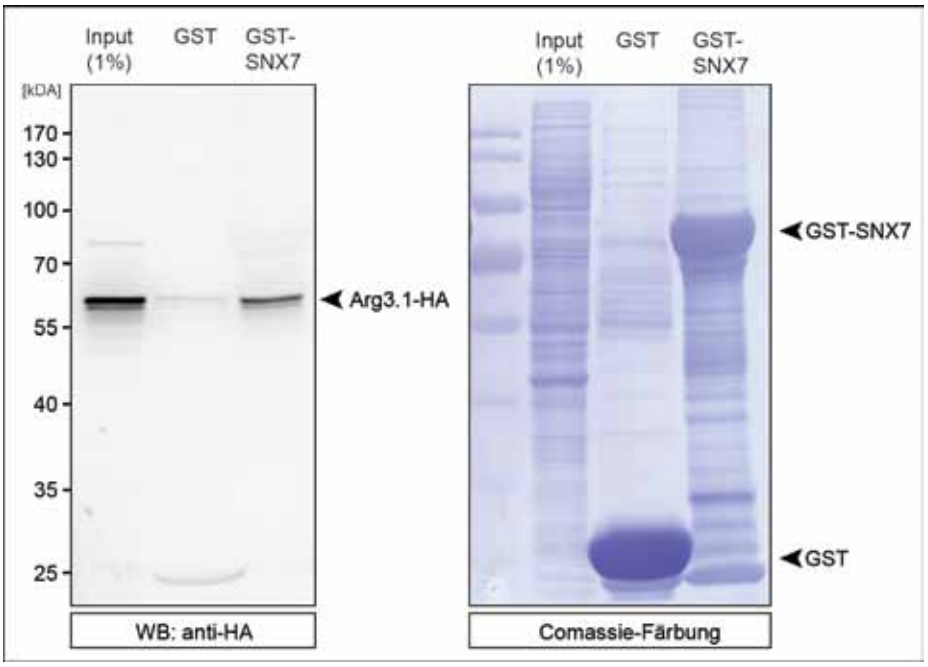

Abbildung 20: Arc/Arg3.1 bindet direkt an SNX7.

Das in Bakterien exprimierte Fusionsprotein GST-SNX7 und GST wurden an eine Matrix gekoppelt und mit einem Lysat aus Arc/Arg3.1-HA exprimierenden HeLa-Zellen (Input) inkubiert. GST-SNX7, GST und gebundene Proteine wurden von der Matrix eluiert und im Western-Blot (WB) analysiert. Arc/Arg3.1 bindet an GST-SNX7, jedoch nicht an GST alleine. Die Coomassie-Färbung der WB-Membran zeigt, dass GST-SNX7 sowie GST in den jeweiligen Ansätzen im Überschuss vorhanden waren.

2.7 Charakterisierung der Arc/Arg3.1-Bindestelle in SNX7

Die im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierte Sequenz von SNX7 codiert für einen zentralen Teil des Proteins im Bereich der BAR-Domäne (AS 252 – AS 346, Abb. 4). Zur genaueren Eingrenzung der Bindungsstelle wurde die Interaktion zwischen Arc/Arg3.1 und SNX7 mit Hilfe des Mammalia-Zwei-Hybrid-System im Detail untersucht. Das Grundprinzip des Mammalia-Zwei-Hybrid-Systems entspricht dem des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems. Der

grundsätzliche Unterschied besteht in der Verwendung von immortalisierten Säugetier-Zelllinien anstelle der Hefe. Des Weiteren codiert das Reportergen für das Enzym Luciferase und exprimiert dieses in Abhängigkeit der Bindung der zu testenden Interaktionspartner. Die Stärke der Reportergen-Aktivierung kann über die Luciferase-katalysierte Chemolumineszenz direkt gemessen werden (Abb. 22B1).

2.8 Analyse von SNX7-Substitutionsmutanten via Mammalia-Zwei-Hybrid System

Zur Identifizierung der für die Bindung von Arc/Arg3.1 an SNX7 kritischen Aminosäuren (AS) wurde zunächst die evolutionäre Konservierung der AS analysiert. Die Alignierung der AS-Sequenzen 8 verschiedener Spezies der Familie der Tetrapoden zeigt ein hohes Maß an Konservierung im Bereich der Bindungsstelle (Abb. 21). Zur genaueren Eingrenzung wurden 6 Paare konservierter AS in SNX7 durch die AS Alanin substituiert. Die Auswahl der AS wurde zudem auf deren Lage in einem in silico Modell der SNXBAR-Domäne getroffen. Jede dieser 6 SNX7-Substitutionsmutanten wurde im Mammalia-Zwei-Hybrid-System auf dessen Bindungsfähigkeiten an Arc/Arg3.1 getestet. Ausschließlich die Substitution der Leucine 325 und 326 (LL2A) führt zu einer drastischen Reduktion der Bindung im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (WT) (Abb. 22). Demnach ist zumindest eines der beiden Leucine essentiell für die Funktionalität der Arc/Arg3.1-Bindestelle.

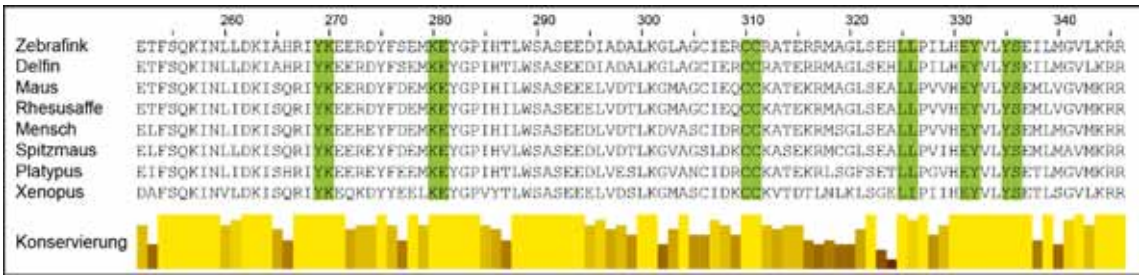

Abbildung 21: Alignierung der Aminosäure-Sequenz der Arc/Arg3.1-Bindestelle in SNX7.
Die SNX7-Aminosäure-Sequenzen verschiedener Spezies der Familie der Tetrapoden wurden aligniert und die Arc/Arg3.1-Bindestelle auf ihre Konservierung hin untersucht. 6 Paare konservierte AS wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt (grün hinterlegt). Jedes Paar wurde durch ein Paar der AS Alanin substituiert und deren Einfluss auf die Arc/Arg3.1-Bindung analysiert (Abb.22). Gelbe Balken symbolisieren den Grad der Konservierung. Je höher und gelber der Balken, desto höher die Konservierung einer AS. Die Nummerierung der AS bezieht sich auf Splicevariante-1 der Maus-Sequenz.

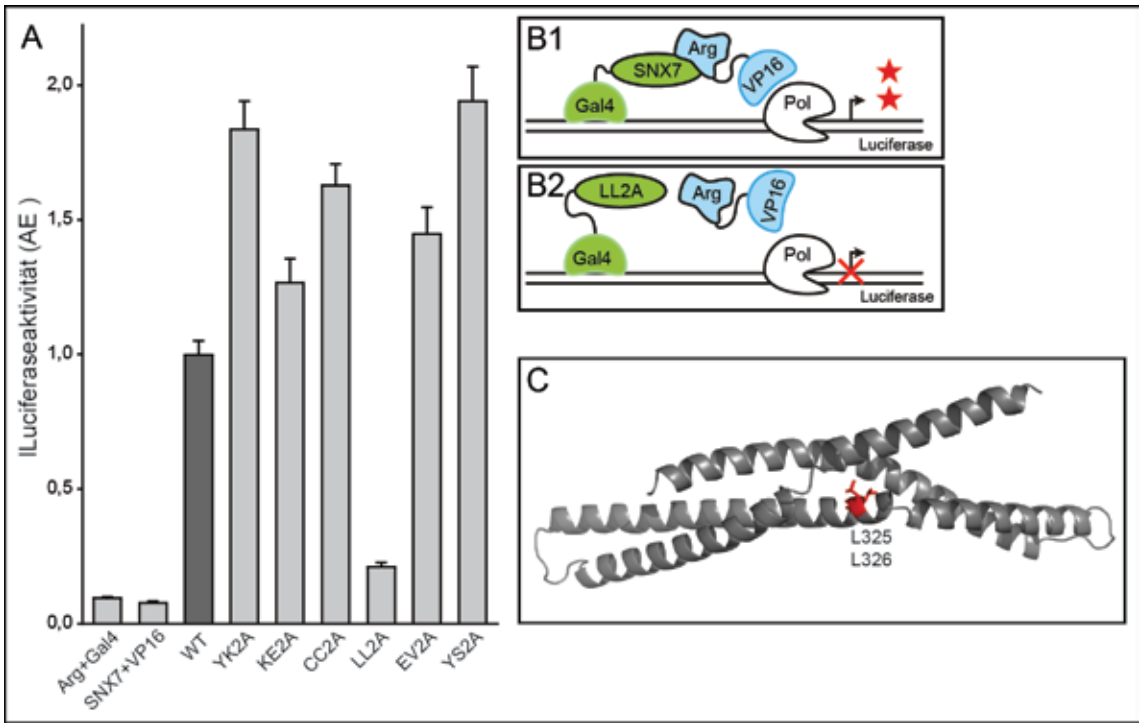

Abbildung 22: Die Leucine 325 und 326 sind für die Bindung von Arc/Arg3.1 an SNX7 notwendig. (A) Analyse von SNX7-Substitutionsmutanten im Mammalia-Zwei-Hybrid-System. Das Gal4-SNX7-Fusionsprotein kann Arc/Arg3.1 an den Promotor des Reportergens rekrutieren und über die VP16-Aktivator-Domäne die Expression der Luciferase aktivieren (A, WT; B1). Ausschließlich die Substitution der AS Leucin 325 und 326 zu Alanin (LL2A) zeigt eine drastische Verringerung der Bindung von Arc/Arg3.1 an SNX7 (A, B2). (B) Schematische Darstellung der Arc/Arg3.1-SNX7-Interaktion im Mammalia-Zwei-Hybrid-System. (C) Lokalisation der AS Leucin 325 (L325) und 326 (L326) in einem Modell der SNX7-BAR-Domäne. AE = Arbiträre Einheit.

2.9 Modellierung der SNX7-BAR-Domäne

Zur genaueren Charakterisierung einer Protein-Bindestelle ist es äußerst hilfreich, die dreidimensionale (3D) Struktur des Proteins zu kennen. Steht keine Struktur zur Verfügung, kann diese auf Grundlage der AS-Sequenz und der Struktur nah verwandter Proteine in silico modelliert werden. Im Fall von SNX7 steht die Struktur der BAR-Domäne des nah verwandten SNX1 zu Verfügung (Abb. 23B, PDB-4FZS) (van Weering et al., 2012). Unter Verwendung dieser Struktur als Matrize wurde die 3D Struktur der SNX7-BAR-Domäne mit Hilfe des SWISS-MODEL-Servers berechnet (Abb. 23A) (Arnold et al., 2006; Kiefer et al., 2009). Das errechnete Modell weist die typische Struktur der SNX-BAR-Domänen auf und ist für weiter strukturelle Analysen geeignet.

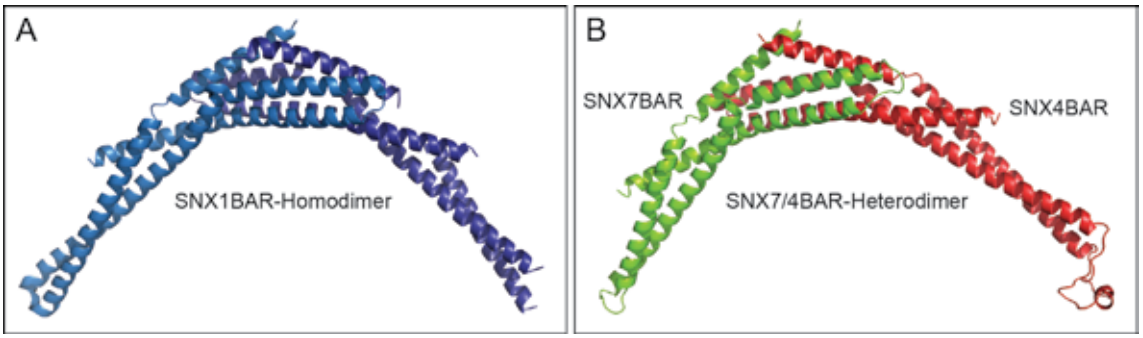

Abbildung 23: Strukturmodel des SNX1BAR-Homodimer und des SNX7/4BAR-Heterodimers. Auf Basis der Kristallstruktur des SNX1BAR-Homodimers wurden die BAR-Domänen von SNX4 und SNX7 in silico modelliert. (A) Kristallstruktur des humanen SNX1-BAR-Domänen-Homodimers (Protein Data Bank Eintrag 4FZS). (B) In silico Model der SNX4- und SNX7-BAR-Domäne und Darstellung des Heterodimers auf Grundlage des SNX1BAR-Dimers.

2.10 Charakterisierung der Arc/Arg3.1 Bindestelle

Basierend auf dem Modell der SNX7-BAR-Domäne wurden neben den bereits als bindungsrelevant identifizierten AS L325 und L326 (Abb. 15C), vier weitere sterisch benachbarte AS ausgewählt (L321, V328, D402 L403) (Abb. 24). Substitutionsmutanten dieser sechs AS wurden unter Verwendung des Mammalia-Zwei-Hybrid-Systems auf ihren Beitrag zur Arc/Arg3.1-Bindung untersucht. Die Substitution der Leucine 321, 325 und 326 durch Alanin verringern die Bindung von Arc/Arg3.1 an SNX7 deutlich. Die Substitution der AS V328 und L403 führen zu keiner signifikanten Änderung der Bindungsaffinität. Die Substitution von D402 führt zu einer signifikanten Verstärkung der Bindung (Abb. 25A). Im Gegensatz zur Bindung von SNX7 an Arc/Arg3.1 haben die Substitutionsmutanten keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung von SNX7 und SNX4 (Abb. 25B). Demnach bleibt die grundlegende funktionelle Struktur des Proteins trotz der Mutationen erhalten. Betrachtet man

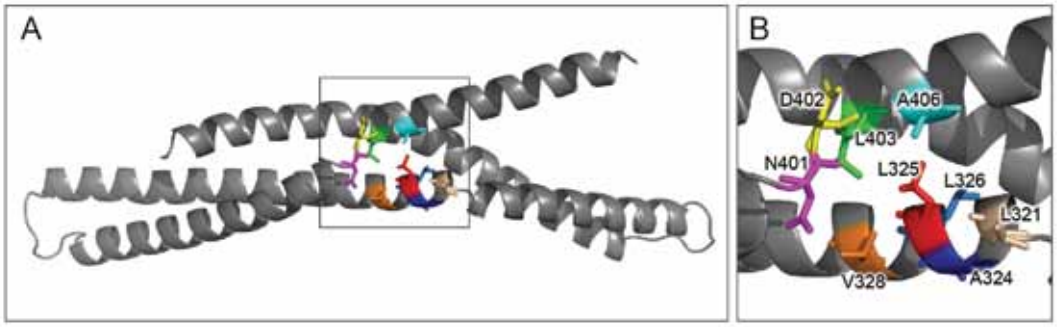

Abbildung 24: Sterische Anordnung der L325, L326 benachbarten Aminosäuren in SNX7. (A) In silico Modell der SNX7-BAR-Domäne. Sterisch benachbarte Aminosäuren der für die Bindung von Arc/Arg3.1 wichtigen Leucin 325 und 326 sind farblich hervorgehoben. (B) Detailansicht des in A markierten Bereiches und Benennung der AS.

die bindungsrelevanten und benachbarten AS, lässt sich eine durch Leucine dominierter, hydrophober Bereich als Arc/Arg3.1-Bindestelle ableiten (Abb. 26).

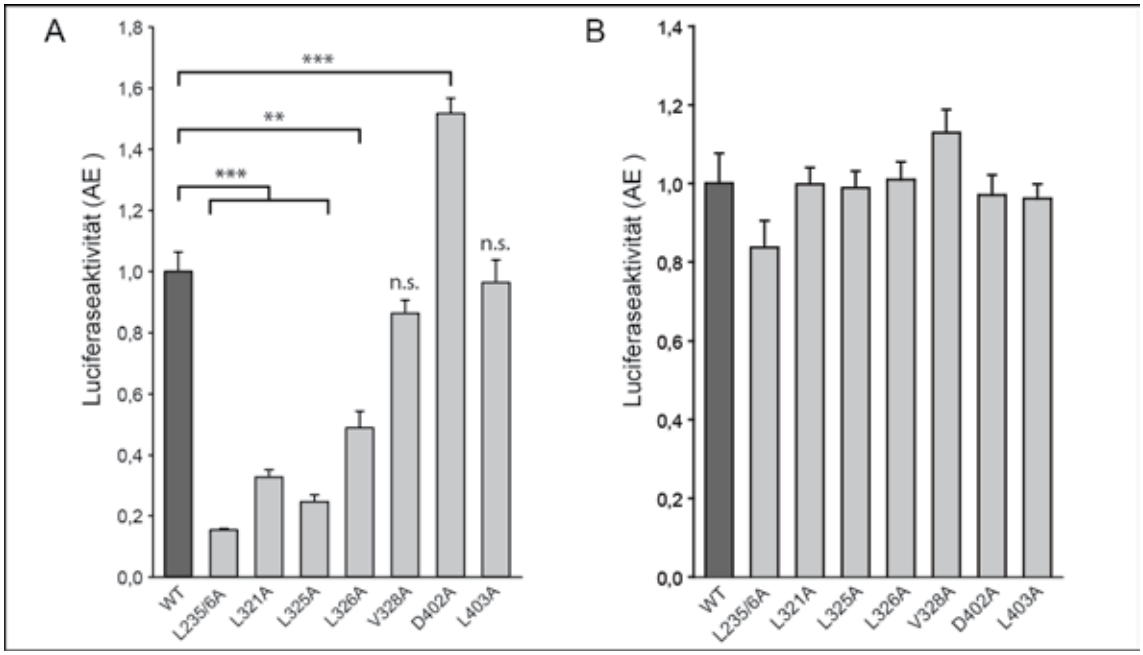

Abbildung 25: Drei Leucine sind an der Bindung von Arc/Arg3.1 an SNX7 beteiligt.

Analyse von SNX7-Substitutionmutanten einzelner Aminosäuren im Mammalia-Zwei-Hybrid-System. (A) Die einzelnen Substitutionen der AS L321, L325 und L326 reduzieren die Bindung von Arc/Arg3.1 an SNX7 drastisch. Die Reduktion der Bindungsaffinität dieser Mutanten entspricht annähernd der Doppel-Substitution von L325 und L236 (L325/6A). Die Substitution von V328 und L403 beeinflussen die Bindung hingegen nicht. Eine Erhöhung der Bindungsaffinität ist durch die Substitution von D402 zu beobachten. (B) Keine der SNX7-Substitutionsmutanten hat einen signifikanten Einfluss auf die Bindung von SNX7 an SNX4. N = 3; 7 Replikate pro Experiment; Die Werte wurden auf die Kontrolle (Gal4-SNX7 + VP16) normalisiert; ** P < 0,01, *** P<0,001, t-Test; AE = Arbiträre Einheit.

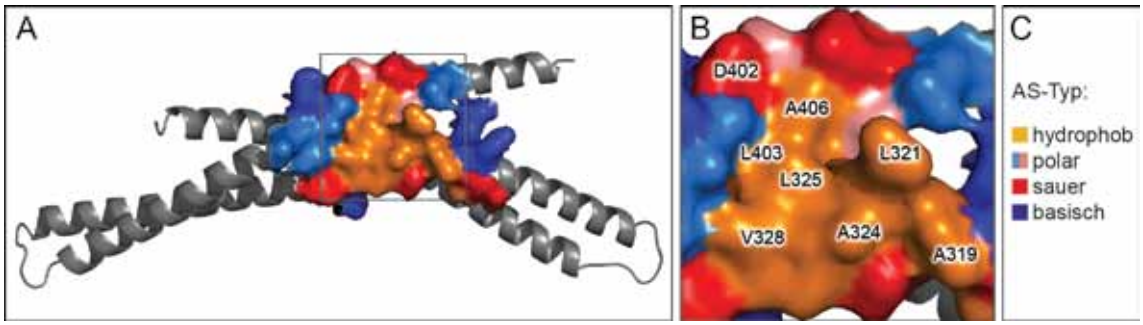

Abbildung 26: Hydrophobizität der Arc/Arg3.1-Bindestelle in SNX7.

Abbildung 8: (A) In silico Modell der SNX7-BAR-Domäne. Die für die Bindung von Arc/Arg3.1 wichtigen AS und benachbarte AS sind als Oberflächenstruktur entsprechend ihrer Hydrophobizität dargestellt. (B) Detailansicht des in (A) markierten Bereiches und Bezeichnung der AS. Arc/Arg3.1 bindet an einen von hydrophoben AS dominierten Bereich der SNX7-BAR-Domäne. (C) Farbcodierung der dargestellten AS entsprechend ihrer Hydrophobizität.

2.11 Arc/Arg3.1 interagiert und kolokalisiert mit dem SNX7-SNX4-Heterodimer

BAR-Proteine im Allgemeinen und die PX-BAR Sorting Nexine im Besonderen bilden bevorzugt BAR-Domänen-vermittelte Dimere. Auch SNX7 bildet ein Dimer mit dem nahe verwandten SNX4 (van Weering et al., 2012). SNX4 ist zugleich der einzige bekannte Interaktionspartner von SNX7 und diese Interaktion konnte in Koimmunpräzipitations-Experimenten bestätigt werden. (Abb. 27). Ein Komplex aus SNX7 und SNX4 ist evolutionär von der Hefe (Snx4p und Snx41p) (Hettema et al., 2003) bis zum Menschen konserviert und wird ähnlich dem Retromer als zentrale Plattform für die endosomale Proteinsortierung betrachtet (van Weering et al., 2012).

Die Analyse des SNX4/7-Dimers und Arc/Arg3.1 im Mammalia-Zwei-Hybrid-System zeigt, dass Arc/Arg3.1 auch in Gegenwart von SNX4 an SNX7 bindet (Abb. 28A, 28B4). Darüber hinaus kann auch eine indirekte Bindung von Arc/Arg3.1 an SNX4 über SNX7 beobachtet werden (Abb. 28A, 28B3). Im Gegensatz dazu, bindet Arc/Arg3.1 nicht direkt an SNX4 (Abb. 28A, 28B2).

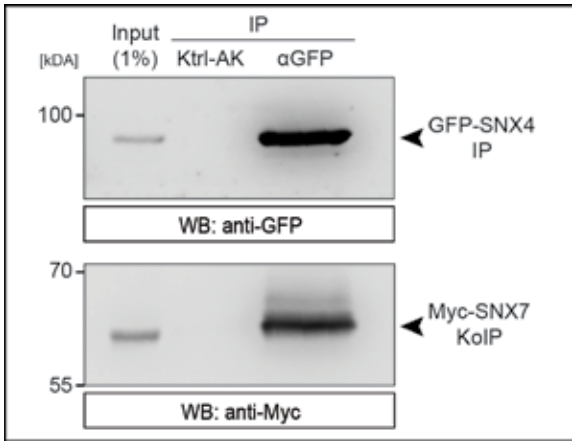

Abbildung 27: SNX7 koimmunpräzipitiert mit SNX4.
Die Fusionsproteine Myc-SNX7 und GFP-SNX4 wurden in HeLa-Zellen koexprimiert. Das gewonnene Zelllysat (Input) wurde entweder mit einem anti-GFP-Antikörper (αGFP) oder mit einem Kontrollantikörper (Ktrl-AK) inkubiert. Die Analyse der Immunpräzipitate im Western-Blot (WB) zeigt, dass die Präzipitation von SNX4 (GFP-SNX4 IP) auch zu einer Anreicherung von SNX7 (Myc-SNX7 KoIP) führt. Die Immunpräzipitation mit dem Kontroll-Antikörper hingegen reichert keines der Proteine an und belegt die Spezifität der Immunpräzipitation

Die Assoziation dieser drei Proteine kann auch in HeLa-Zellen beobachtet werden. Die Koexpression von SNX7, SNX4 und Arc/Arg3.1 zeigt die Kolokalisation aller drei Proteine an Endosomen und von diesen hervorgehenden tubulären Strukturen (Abb. 29, 30). Die Ausprägung der Kolokalisation variiert jedoch in abhängigkeit der Expressionsstärke der einzelnen Proteine (vergleiche Abb. 29 und 30).

Auch in Neuronen kann eine Kolokalisation von Arc/Arg3.1 mit Sorting Nexin-7 und 4 beobachtet werden. Die Kolokalisation findet im dendritischen Schaft und insbesondere in

Spines statt (Abb. 31). Eine genauere Analyse der Spines zeigt, das SNX7 und 4 in ihrer Verteilung fast deckungsgleich sind. Vermutlich liegen beide Proteine primär als Heterodimer vor. Arc/Arg3.1 hingegen weist eine leicht versetzte Verteilung zu SNX7 und 4 auf. In vielen Fällen lässt sich jedoch eine weitere Signalspitze der Arc/Arg3.1-Fluoreszenz im Bereich des stärksten Signals von SNX7 und 4 beobachten. Die Hauptpopulation an Arc/Arg3.1 entspricht wahrscheinlich dem in der PSD angereicherten Arc/Arg3.1. Die zweite

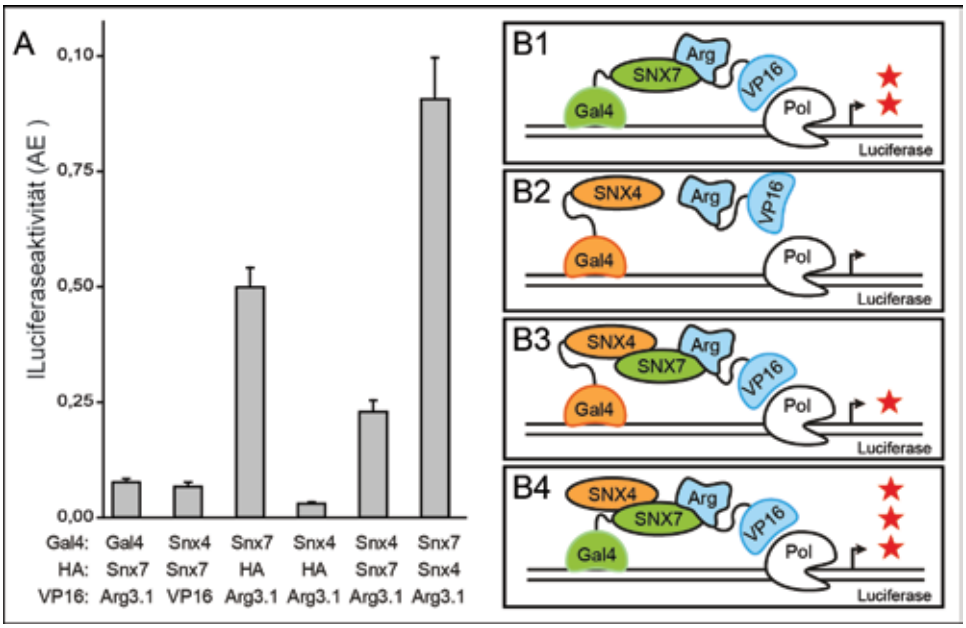

Abbildung 28: Arc/Arg3.1 bindet an das SNX7-SNX4-Heterodimer

(A) Analyse der Arc/Arg3.1-Bindung an das SNX7-SNX4-Heterodimer und SNX4 im Mammalia-Zwei-Hybrid-System. Gal4-SNX7 bindet Arc/Arg3.1-VP16 und aktiviert so die Luciferase-Expression des Reportergens (B1). Die Koexpression von Gal4-SNX4 und Arc/Arg3.1-VP16 hingegen führ zu keiner erhöhten Luciferase-Expression. Demnach bindet Arc/Arg3.1 nicht an SNX4 (B2). Wird SNX7 zusätzlich zu Gal4-SNX4 und Arc/Arg3.1-VP16 exprimiert, kann dieses die Verbindung zwischen SNX4 und Arc/Arg3.1 herstellen (B3). Arc/Arg3.1-VP16 bindet auch in der Gegenwart von SNX4 an Gal4-SNX7. Demnach bindet Arc/Arg3.1 auch an das SNX7-SNX4-Heterodimer (B4). (B) Schematische Darstellung der in (A) gemessenen Interaktionen. AE = Arbiträre Einheit. Die Zellen wurden in jedem Ansatz mit 3 Plasmide transfiziet; Gal4 = Gal4-Fusionsprotein oder Gal4 als Kontrolle; HA = HA-Fusionsprotein oder HA als Kontrolle; VP16 = VP16-Fusionsprotein oder VP16 als Kontrolle.

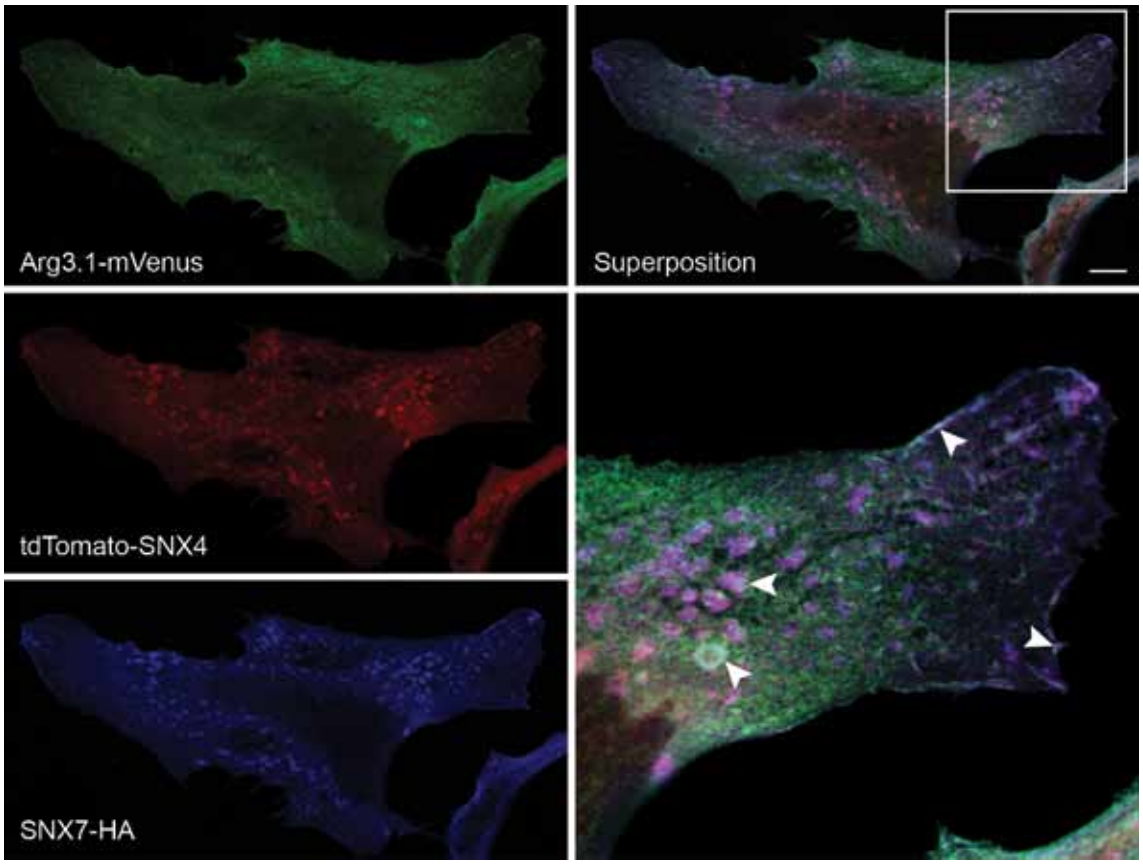

Abbildung 29: Arc/Arg3.1, SNX4 und SNX7 kolokalisieren an Endosomen und der Plasmamembran in HeLa-Zellen.

Die Expression von Arg3.1-mVenus (grün), tdTomato-SNX4 (rot) und SNX7-HA (blau) in HeLa-Zellen zeigt deren Kolokalisation an Endosomen und der Plasmamembran (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). SNX4 und SNX7 kolokalisieren besonders stark an Endosomen. Alle Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

Population könnte dem an SNX7 und 4 positiven endosomalen Strukturen entsprechen (Abb. 32).

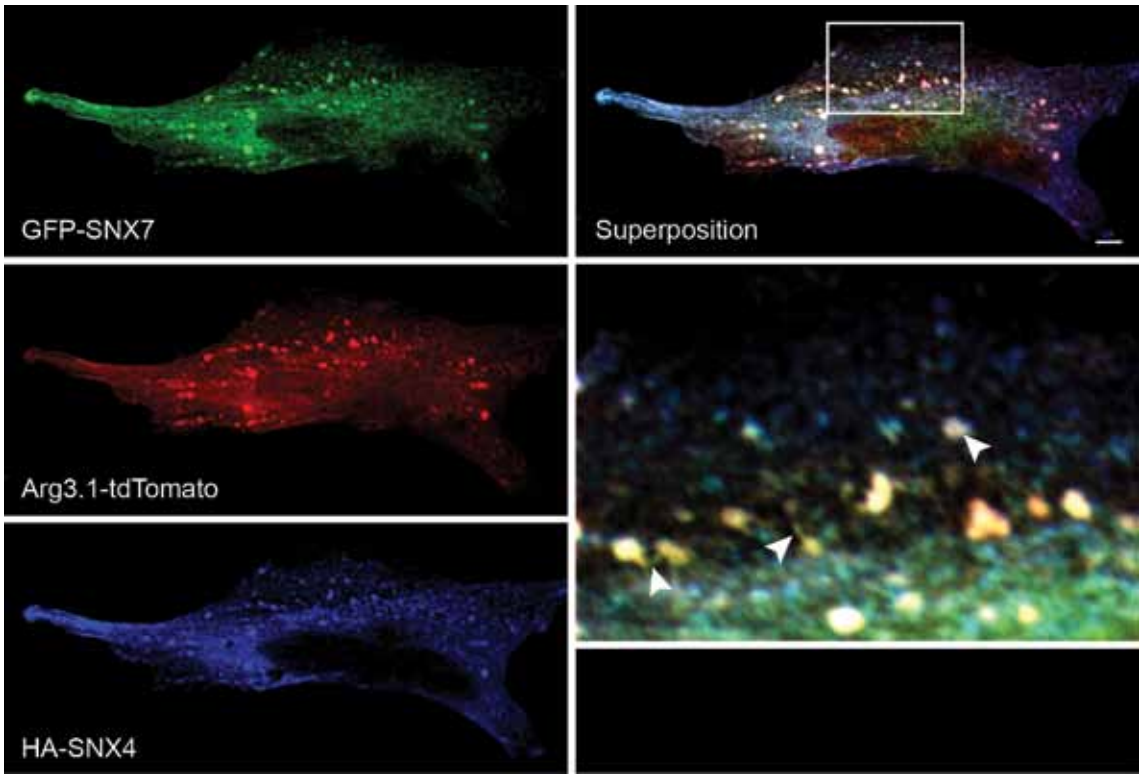

Abbildung 30: Arc/Arg3.1, SNX4 und SNX7 kolokalisieren an Endosomen und von diesen hervorgehenden tubulären Strukturen

Expression von Arg3.1- tdTomato (rot), HA-SNX4 (blau) und GFP-SNX7 (grün) in HeLa-Zellen zeigt deren Kolokalisation an Endosomen und von diesen hervorgehenden tubulären Strukturen (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). Alle drei Proteine zeigen ein sehr einheitliches Expressionsmuster. Alle Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

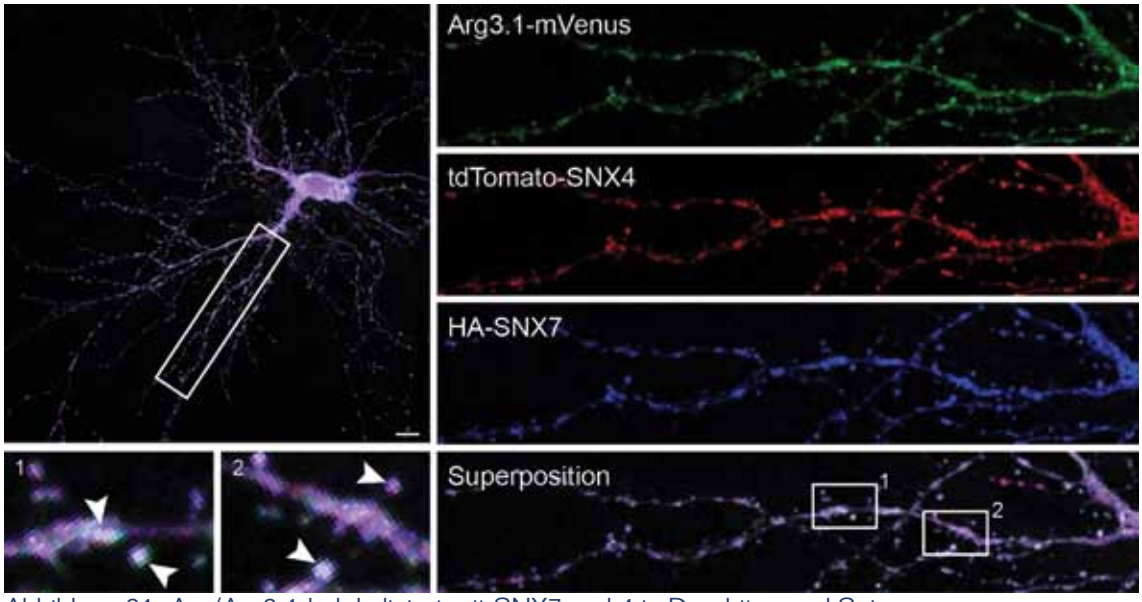

Abbildung 31: Arc/Arg3.1 kolokalisiert mit SNX7 und 4 in Dendriten und Spines.

Die Expression von Arg3.1-mVenus (grün), tdTomato-SNX4 (rot) und HA-SNX7 (blau) in kultivierten hippocampalen Neuronen zeigt deren Kolokalisation in Dendriten und insbesondere in dendritischen Spines (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). Zusätzlich kann eine starke Kolokalisation zwischen SNX7

und 4 im Axon beobachtet werden (Detailvergrößerung, Stern). Alle Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm

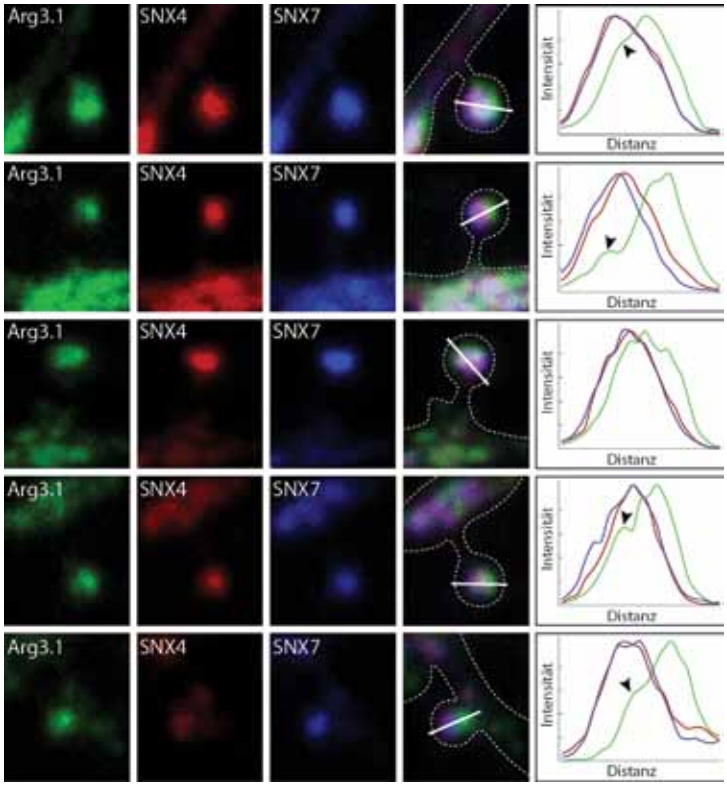

Abbildung 32: Feinanalyse der Kolokalisation von Arc/Arg3.1 und SNX7 und SNX4 in Spines. Die Expression von Arg3.1-mVenus (grün). tdTomato-SNX4 (rot) und HA-SNX7 (blau) in kultivierten hippocampalen Neuronen zeigt deren Kolokalisation in dendritischen Spines. Fünf exemplarische Spines wurden für eine Feinanalyse der Kolokalisation ausgewählt. Die Verteilung der Fluoreszenz wurde mit einem Linien-Plot ermittelt und ist jeweils rechts in den jeweiligen Farben für das Protein dargestellt. Der Linien-Plot wurde jeweils orthogonal zu dem leichtversetzten Signal von Arc/Arg3.1 und den Sorting Nexinen gelegt und die Immunfluoreszenz jedes einzelnen Proteins auf die mittlere Intensität normalisiert. Pfeilköpfe markieren eine zweite Population des Arg/Arg3.1 Protein, welche mit der Signalspitze der Sorting Nexine korreliert. Alle Proteine wurden Immunfluoeszenz-gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm

2.12 Lokalisation von Arc/Arg3.1 und SNX7 im endosomalen System

Das endosomale System der Zelle ist das zentrale Verteil- und Sortiersystem aller Membranproteine zwischen Golgi und Plasmamembran. Auf ihrem Weg vom Ursprungsort hin zu ihrem Bestimmungsort durchwandern Membranproteine verschiedene endosomale Kompartimente. Die Identität dieser Kompartimente wird dabei primär durch den Anteil bestimmter Phosphoinositolphosphate (PdtIns) in der Membran und durch membranassoziierte Proteine bestimmt (Steve Jean and Amy A Kiger; Suzanne R Pfeffer 2013; Harald Stenmark 2009). Rab-GTPasen sind die bedeutendste Gruppe dieser membranassozi-

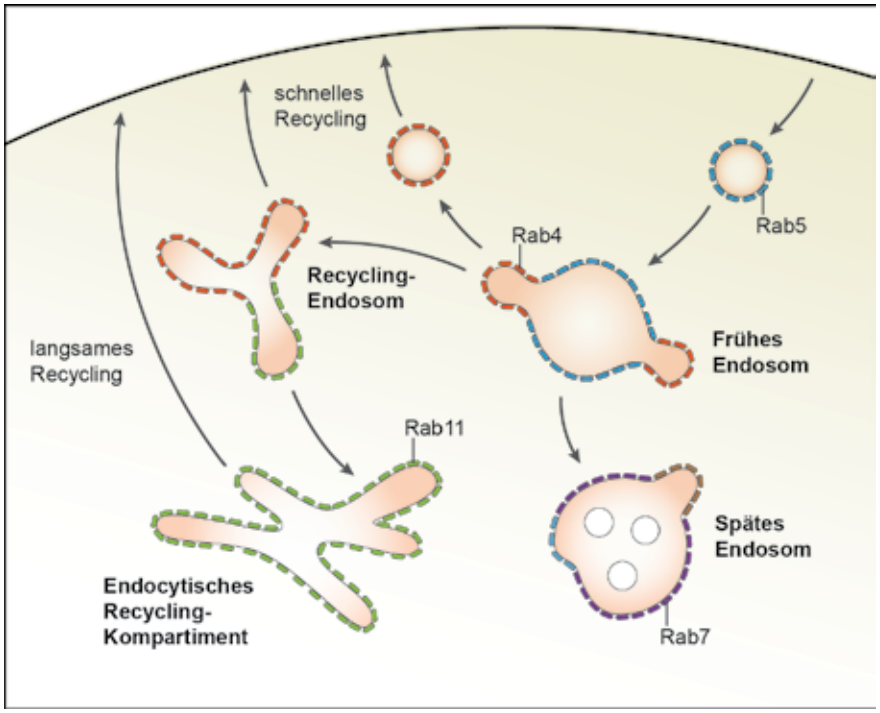

Abbildung 33: Localisation von Rab-GTPasen im endosomalen System der Zelle.

Schematische Darstellung verschiedener endosomaler Strukturen der Zelle und deren Assoziation mit Rab-GTPasen. Rab5 assoziiert am stärksten mit von der Plasmamembran endozytierten Vesikeln und aus diesen hervorgehenden, frühen Endosomen. Neben Rab5 assoziiert auch Rab4 mit frühen Endosomen und ist an schnellen Recycling-Prozessen, zurück zur Plasmamembran beteiligt. Darüberhinaus assoziiert Rab4 mit den aus frühen Endosomen hervorgehenden Recycling-Endosomen. Rab11 assoziiert ebenfall mit Recycling-Endosomen und ist an dem Ausbilden des endozytischen Recycling-Kompatimentes beteiligt. Bei voranschreitender Reifung des frühen Endosoms wird Rab5 durch Rab7 ersetzt und es bildet sich das späte Endosom.

ierten Proteine. Sie binden in ihrer GTP-gebunden Form an die Membran und rekrutieren Effektor-Proteine welche unter anderem die Komposition an PtdIns in der Membran ändern. Vorhandene Rab-GTPasen verlassen die Membran und neue werden rekrutiert. Dies führt

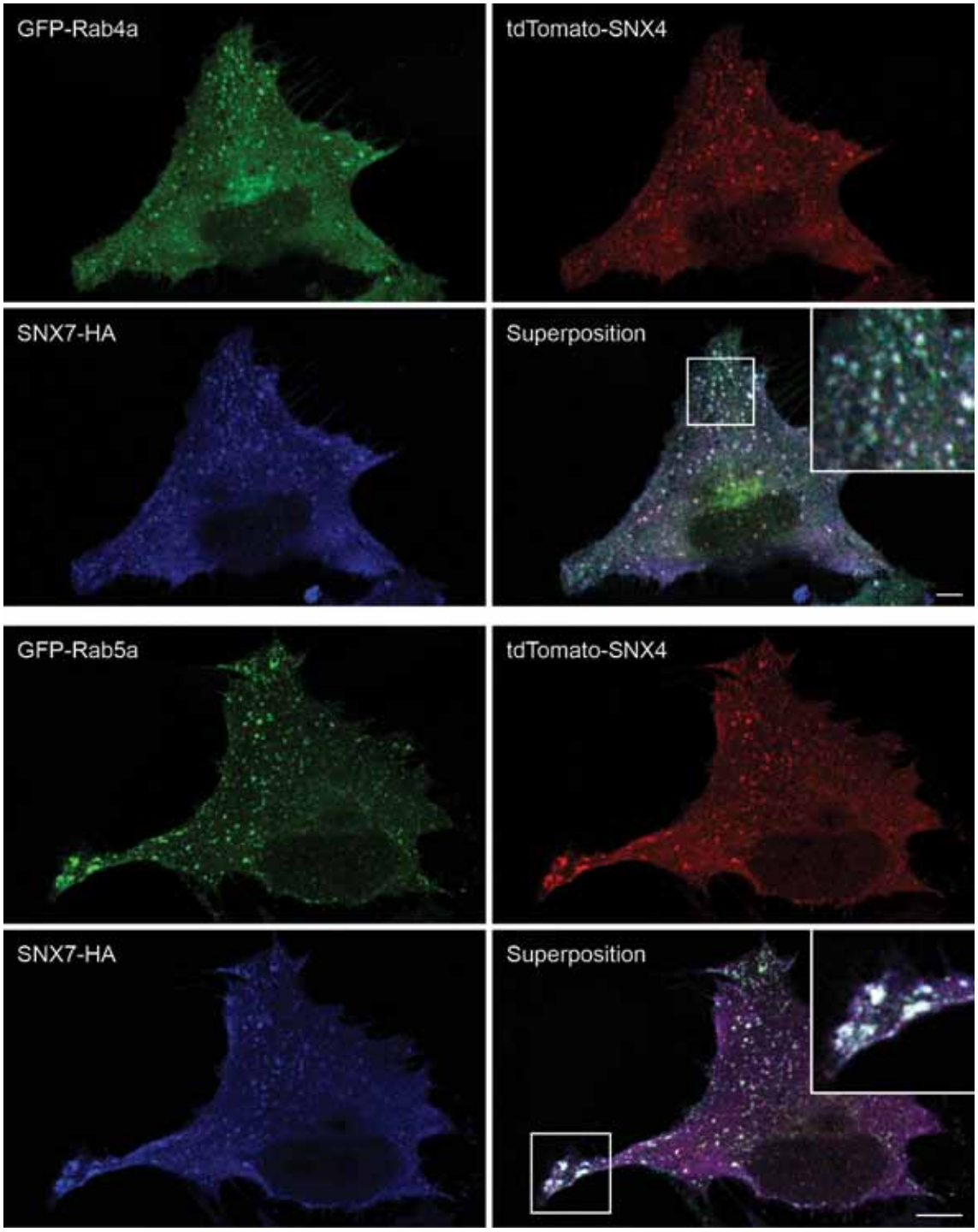

Abbildung 34: SNX7 und SNX4 kolokalisieren mit Rab4a- und Rab5a-positiven Endosomen. Koexpression von SNX7-HA (blau) und tdTomato-SNX4 (rot) mit GFP-Rab5a oder GFP-Rab4a (grün) in HeLa-Zellen. SNX7 und SNX4 kolokalisieren gemeinsam mit den beiden endsosomalen Marker-Proteinen Rab5a und Rab4a. Beide Rab-Proteine lokalisieren an frühen Endosomen. Rab4a bindet zusätzlich an Recycling-Endosomen. Alle Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10µm.

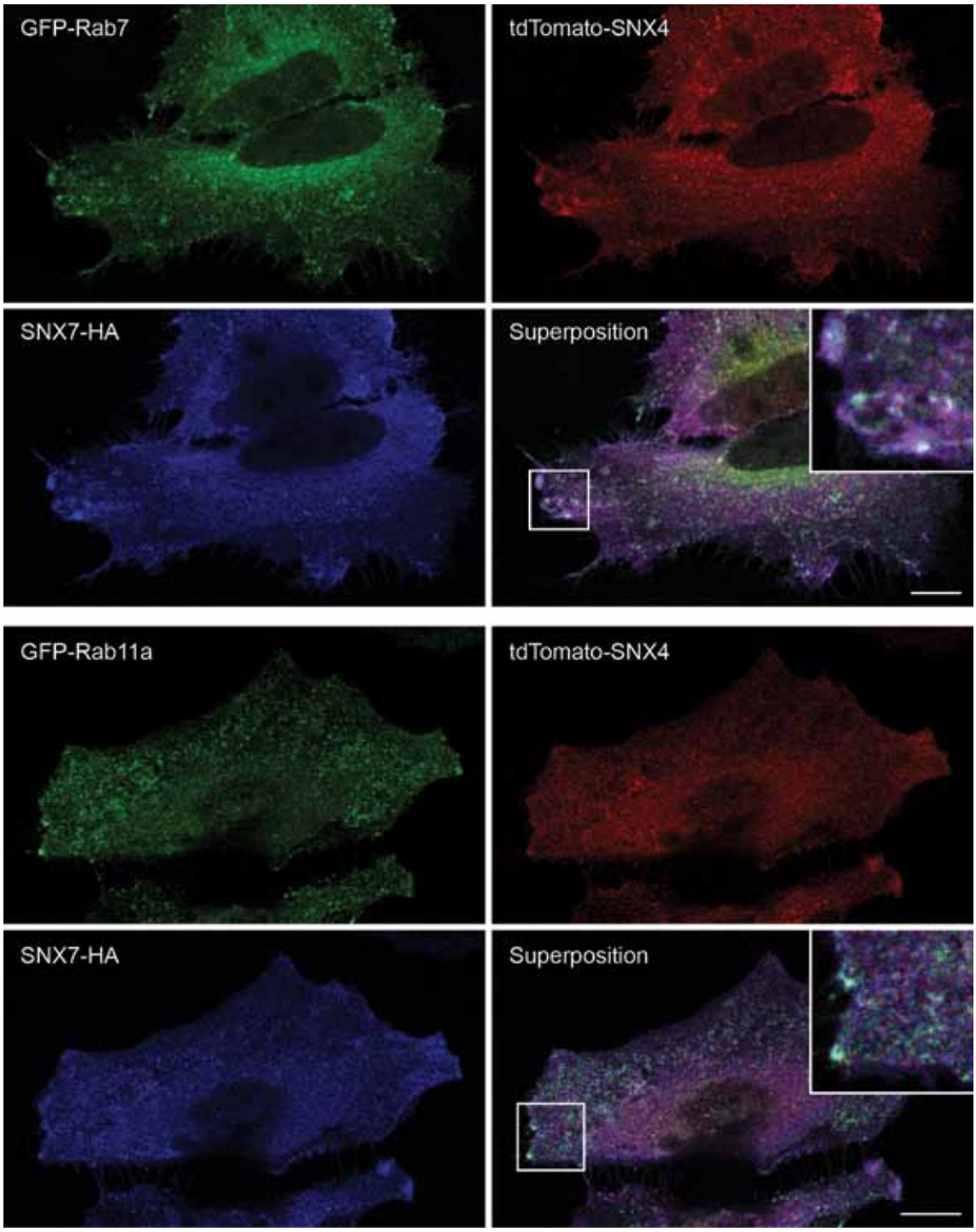

Abbildung 35: SNX7 und SNX4 kolokalisieren kaum mit Rab7- und Rab11-positiven Endosomen. Koexpression von SNX7-HA (blau) und tdTomato-SNX4 (rot) mit GFP-Rab7 oder GFP-Rab11a (grün) in HeLa-Zellen. SNX7 und SNX4 kolokalisieren kaum mit den beiden endsosomalen Marker-Proteinen Rab7 und Rab11a. Nur in Plasmamembran-nahen Bereichen ist eine partielle Kolokalisation zu erkennen (Detailansicht). Rab7 bindet an späte Endosomen, wohingegen Rab11a insbesondere mit dem endozytischen Recycling-Komartiment assoziiert ist. Alle Proteine Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10µm.

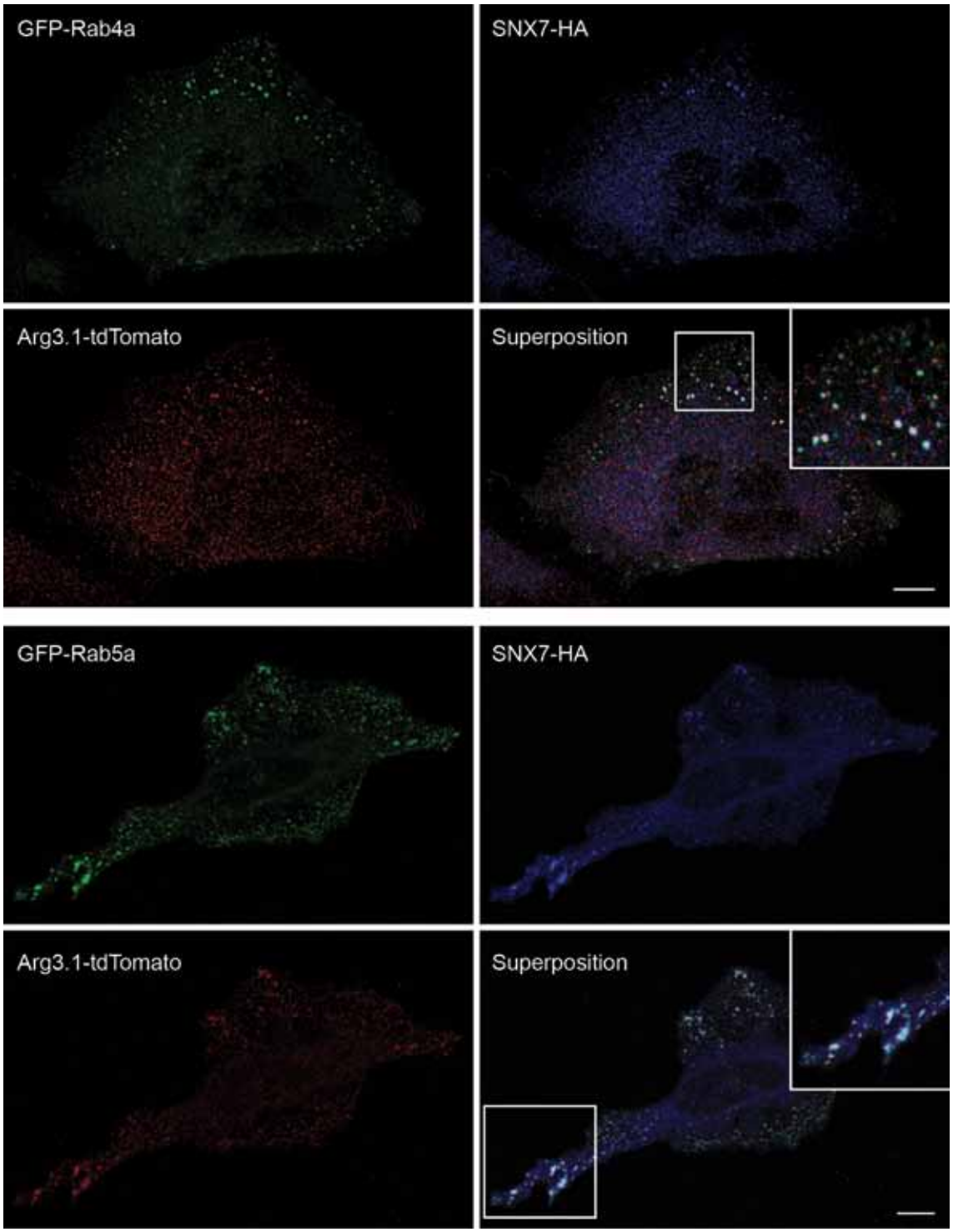

Abbildung 36: Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren mit Rab4a- und Rab5a-positiven Endosomen. Koexpression von SNX7-HA (blau) und Arc7Arg3.1-tdTomato (rot) mit GFP-Rab5a oder GFP-Rab4a (grün) in HeLa-Zellen. SNX7 und Arc/Arg3.1 kolokalisieren gemeinsam mit den beiden endsosomalen Marker-Proteinen Rab5a und Rab4a. Beide Rab-Proteine lokalisieren an frühen Endosomen. Rab4a bindet zusätzlich an Recycling-Endosomen. Alle Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10µm.

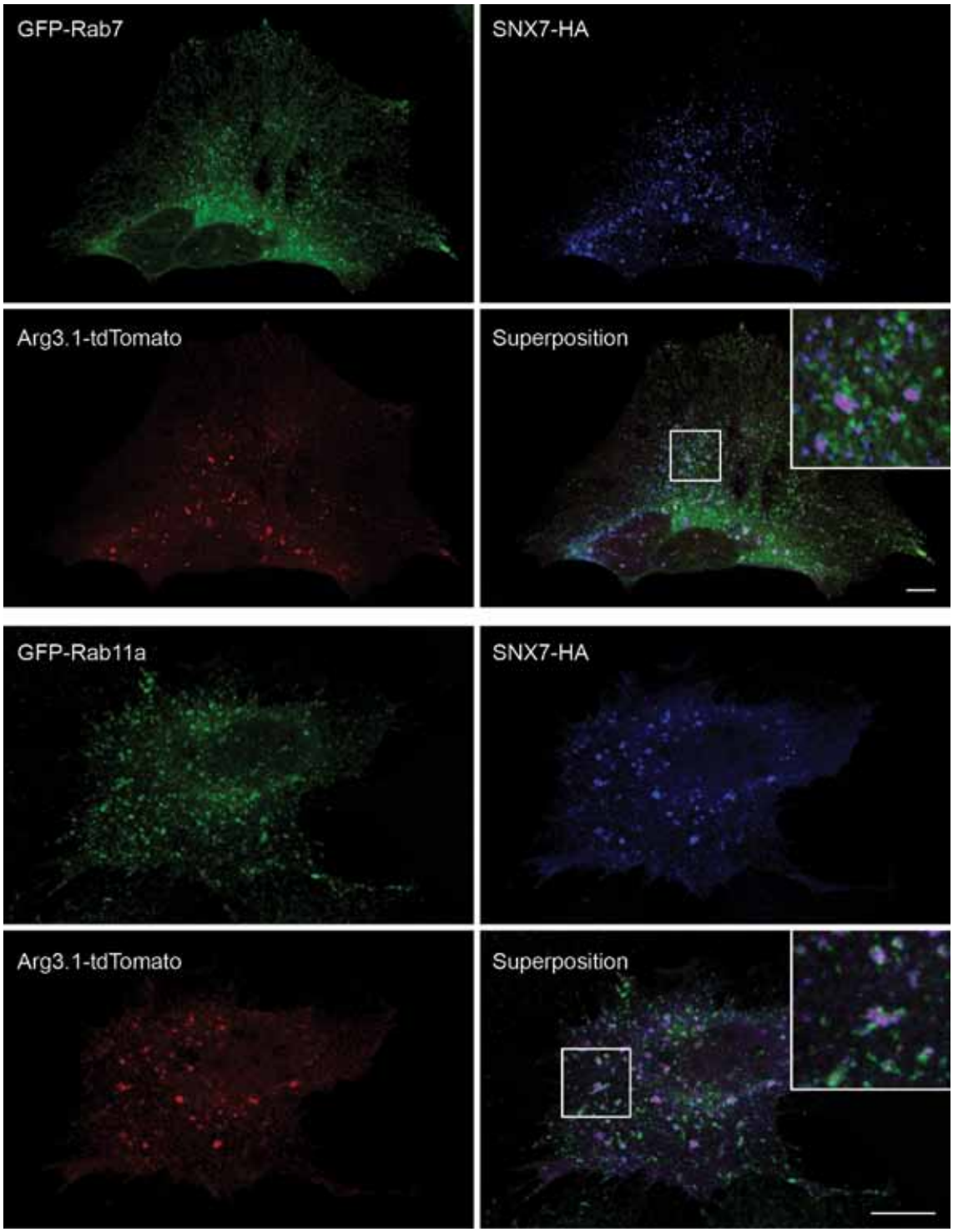

Abbildung 37: Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren nicht mit Rab7- und Rab11-positiven Endosomen.

Koexpression von SNX7-HA (blau) und Arc/Arg3.1-tdTomato (rot) mit GFP-Rab7 oder GFP-Rab11a (grün) in HeLa-Zellen. SNX7 und SNX4 Kolokalisieren nicht mit den beiden endosomalen Marker-Proteinen Rab7 und Rab11a (Detailansicht). Rab7 bindet an späte Endosomen, wohingegen Rab11a insbesondere mit dem endozytischen Recycling-Kompartiment assoziiert ist. Alle Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10µm.

zu einem stetigen Wandel der endosomalen Identität, welche sich letzten Endes aus der Identität der endosomalen Membran-Mikrodomänen ergibt. Aufbauend auf diesen Mikrodomänen können Membranproteine innerhalb eines Endosoms sortiert und durch Membran-Abschnürung von diesem separiert werden. Eine Gruppe von Proteinen, welche für diese Sortierung verantwortlich ist, ist die Familie der Sorting Nexine (van Weering, 2011).

Aufgrund ihrer zentralen Rolle im endosomalen System können Rab-GTPasen zur Charakterisierung von Endosomen verwendet werden. Folgende Rab-GTPasen wurden in den Experimenten verwendet: Rab5a als Marker für frühe Endosomen, Rab4a als Marker für frühe und Recycling-Endosomen, Rab7 für späte Endosomen und Rab11a als Marker für Recyling-Endosomen und das endozytische Recycling-Kompartiment (Abb. 33) (Stenmark and Olkkonen 2001).

Wie zuvor gezeigt, assoziieren Arc/Arg3.1, SNX7 und SNX4 mit Endosomen in HeLa-Zellen (Abb. 30). Zur Beantwortung der Frage mit welchen Endosomen diese Proteine assoziiert sind, wurden sie mit verschiedenen Rab-GTPasen in HeLa-Zellen koexprimiert. Die Koexpression von SNX7 und SNX4 zeigt eine starke Kolokalisation beider Proteine mit Rab4a- und Rab5a-positiven Endosomen. Wohingegen nur eine geringfügige Kolokalisation mit Rab7- und Rab11-positiven Endosomen, in der Nähe der Plasmamembran zu beobachten ist (Abb. 34, 35). Demnach sind SNX7 und SNX4 hauptsächlich, gemeinsam mit frühen und Recycling-Endosomen lokalisiert. Ein ähnliches Bild ergibt sich mit Arc/Arg3.1 und SNX7, beide Proteine kolokalisieren mit Rab4a und Rab5a, jedoch nicht mit Rab7 oder Rab11a (Abb. 36, 37).

2.13 Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren mit Komponenten der Endozytose-Maschinerie

Die Lokalisation von Arc/Arg3.1 und SNX7 an der Plasmamembran (Abb. 6) und der Einfluss von Arc/Arg3.1 auf das AMPA-Rezeptor-Trafficking (Chowdhury et al., 2006) weisen auf eine mögliche Funktion in der Regulation der Endozytose hin. Zudem ist Dynamin-2 (DYN2), ein Interaktionspartner von Arg/Arg3.1, essentiell für Clathrin-abhängige Endozytose (CAE) von AMPA-Rezeptoren (Carroll et al., 1999). DYN2 wird an entstehende endozytotische Vesikel rekrutiert und schnürt diese letztlich von der Plasmamembran ab. Neben DYN2 wurde auch die leichte Kette von Clathrin (ClatrinLC) als Marker für die CAE in den folgenden Experimenten verwendet (Abb. 38).

Die Koexpression von SNX7 oder Arc/Arg3.1 zusammen mit DYN2 zeigt eine partielle

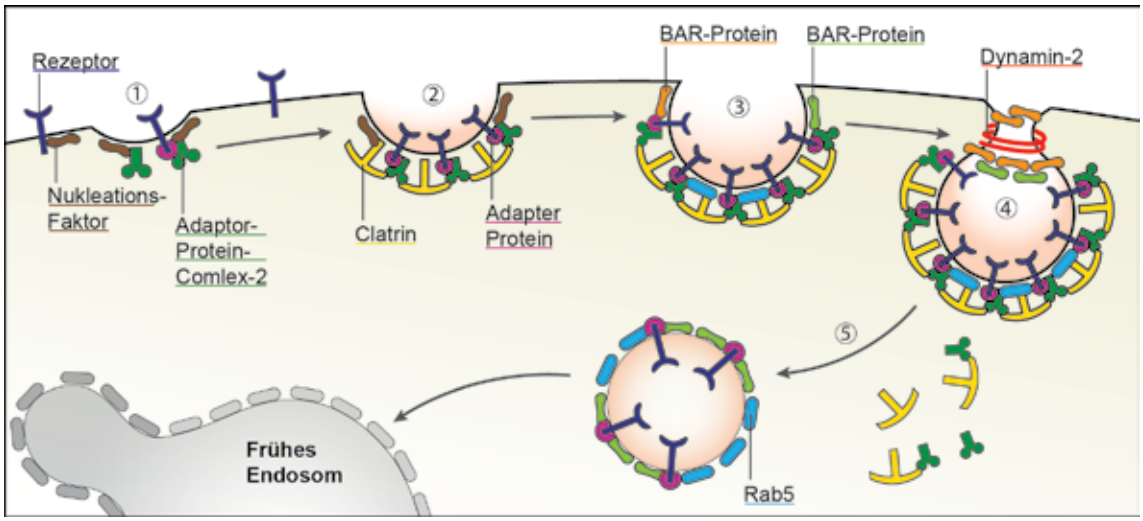

Abbildung 38: Schematische Darstellung der Clathrin-abhängigen Endozytose.

Die Clathrin-abhängige Endozytose dient der spezifischen Internalisierung von Membranproteinen und lässt sich in fünf Schritte unterteilen. 1. Nukleation: Nukleations-Faktoren bilden die Basis für die folgende Assemblierung der Endozytose-Maschinerie. 2. Cargo-Auswahl: Membranproteine wie Rezeptoren werden über Adapterproteine im entstehenden Clathrin coated pit gesammelt. 3: Coat-Assemblierung: Aufbauend auf den Adapterproteinen wird die Clathrin-Hülle assembliert. Zusätzlich werden BAR-Proteine an das entstehende Vehikel rekrutiert. 4. Spaltung: BAR-Proteine rekrutieren die GTPase Dynamin, welche in einem mechanochemischen Prozess das Vesikel von der Plasmamembran abschnürt. 5. Uncoating: Zerlegung der Clathrin-Hülle.

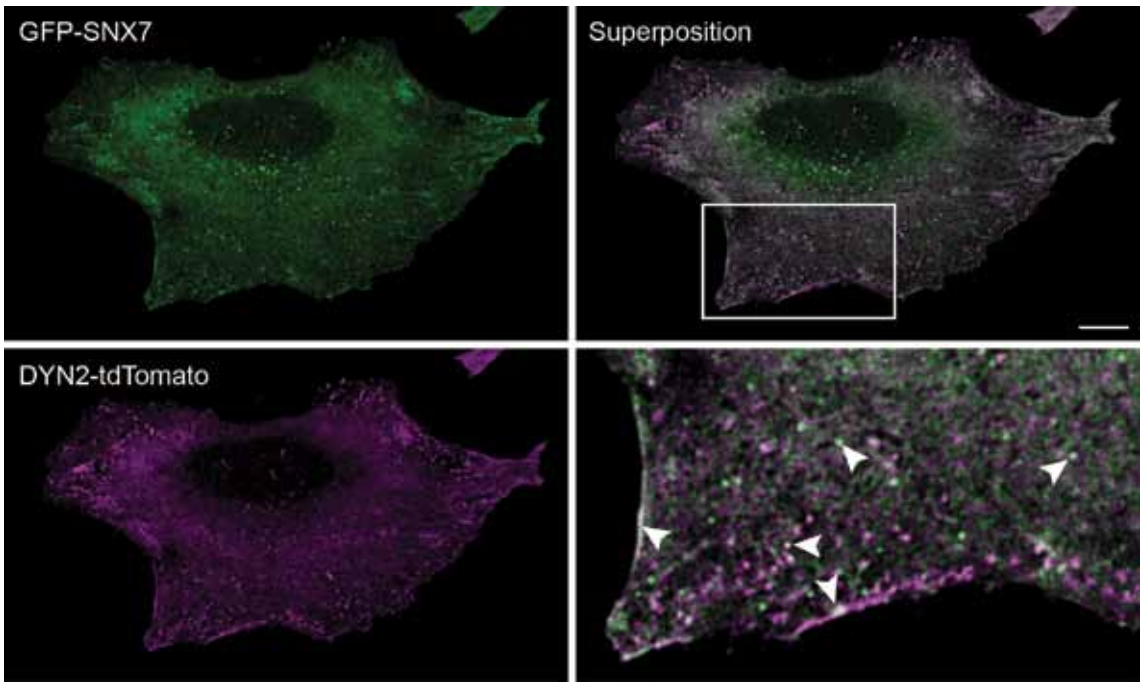

Abbildung 39: Partielle Kolokalisation zwischen SNX7 und Dynamin-2.

Expression von GFP-SNX7 (grün) und DYN2-tdTomato (magenta) in HeLa-Tellen. SNX7 kolokalisiert mit DYN2 in punktuellen Strukturen. Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

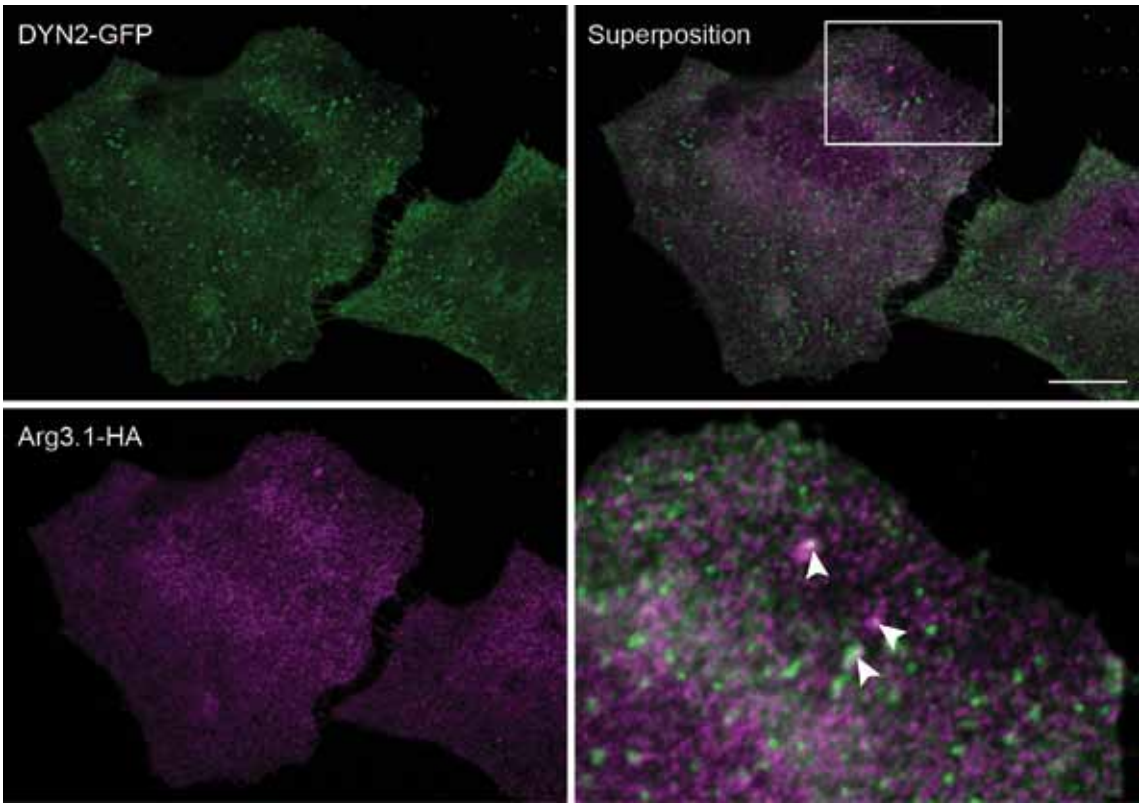

Abbildung 40: Partielle Kolokalisation zwischen Arc/Arg3.1 und Dynamin-2.
Expression von Arc/Arg3.1-HA (magenta) und dominant-negativen Mutante von Dynamin-2 (DYN2-GFP, grün) in HeLa-Zellen. Arc/Arg3.1 kolokalisiert vereinzelt mit DYN2 in punktuellen Strukturen. Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

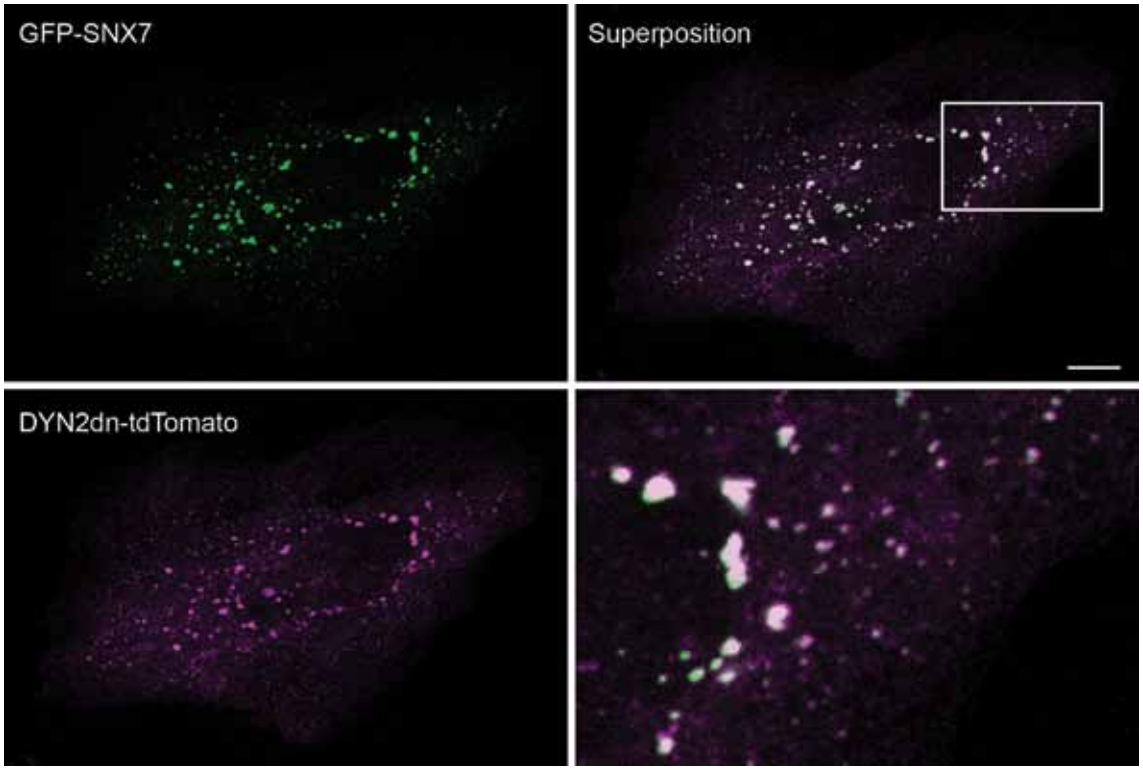

Abbildung 41: Dominant-negatives DYN2 kolokalisiert stark mit SNX7.

Expression von GFP-SNX7 (grün) und der dominant-negativen Mutante von Dynamin-2 (DYN2dn, magenta) in HeLa-Zellen. SNX7 zeigt eine starke Kolokalisation mit DYN2dn. Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm

Kolokalisation der Proteine in punktierten Mustern. Dies entspricht einer transienten Assoziation während der Endozytose (Abb. 39, 40). Die Koexpression von SNX7 und einer dominant-negativen Variante von DYN2 (DYN2dn) zeigt hingegen eine massive Kolokalisation der beiden Proteine (Abb. 41). DYN2dn ist eine GTP-Bindungs-defiziente Mutante, welche die Abschnürung der Endozytose-Vesikel verhindert. DYN2dn akkumuliert an Clathrin-dekorierten Vertiefungen der Plasmamembran. (Damke et al., 1994, 2001) (Abb. 38(4)). Die starke Anreicherung von SNX7 zusammen mit DYN2dn weist auf eine Rekru-

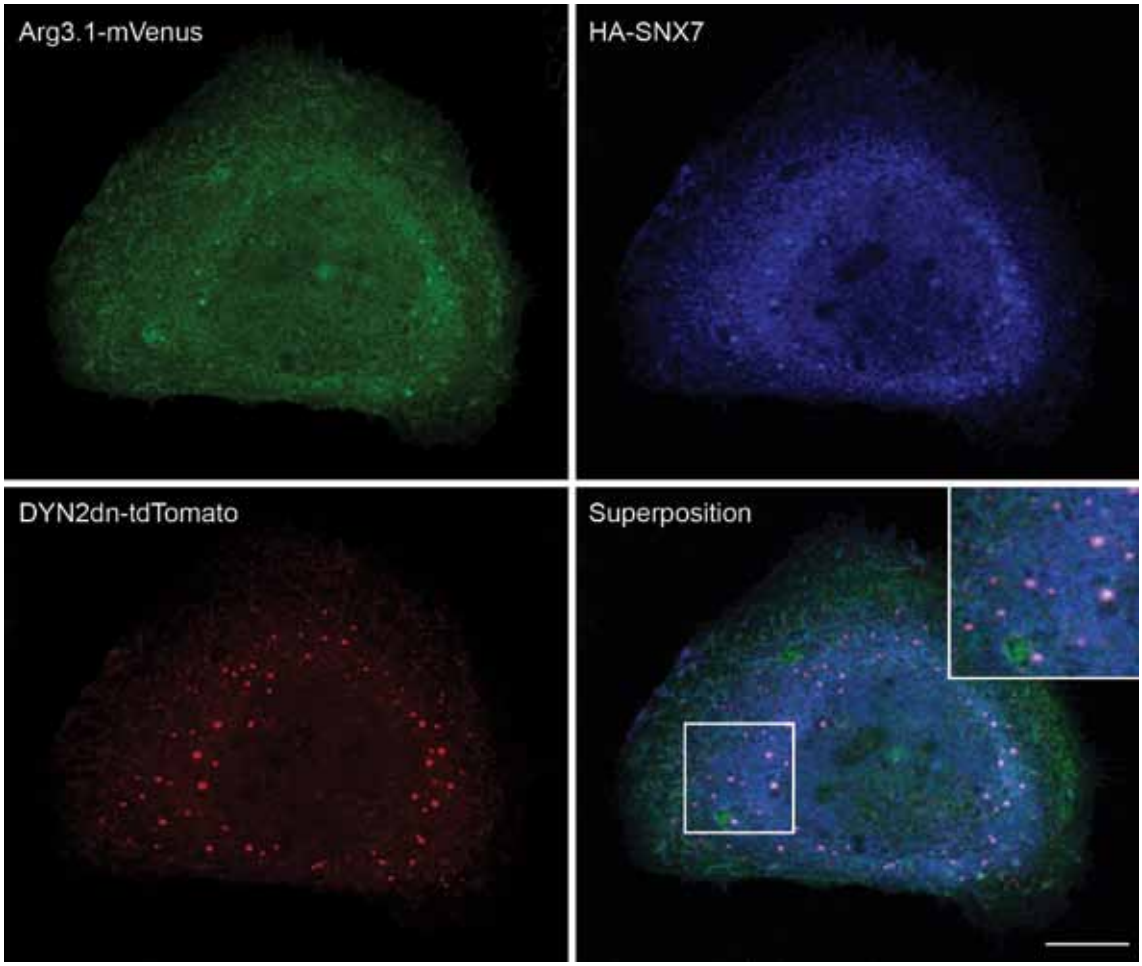

Abbildung 42: Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren mit dominant-negativem Dynamin-2.
Expression von Arc/Arg3.1-mVenus (grün), HA-SNX7 (blau) und dominant-negativem Dynamin-2 (DYN2dn-dtTomato, rot) in HeLa-Zellen. Alle drei Proteine kolokalisieren in punktierten und tubulären Strukturen. Alle Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

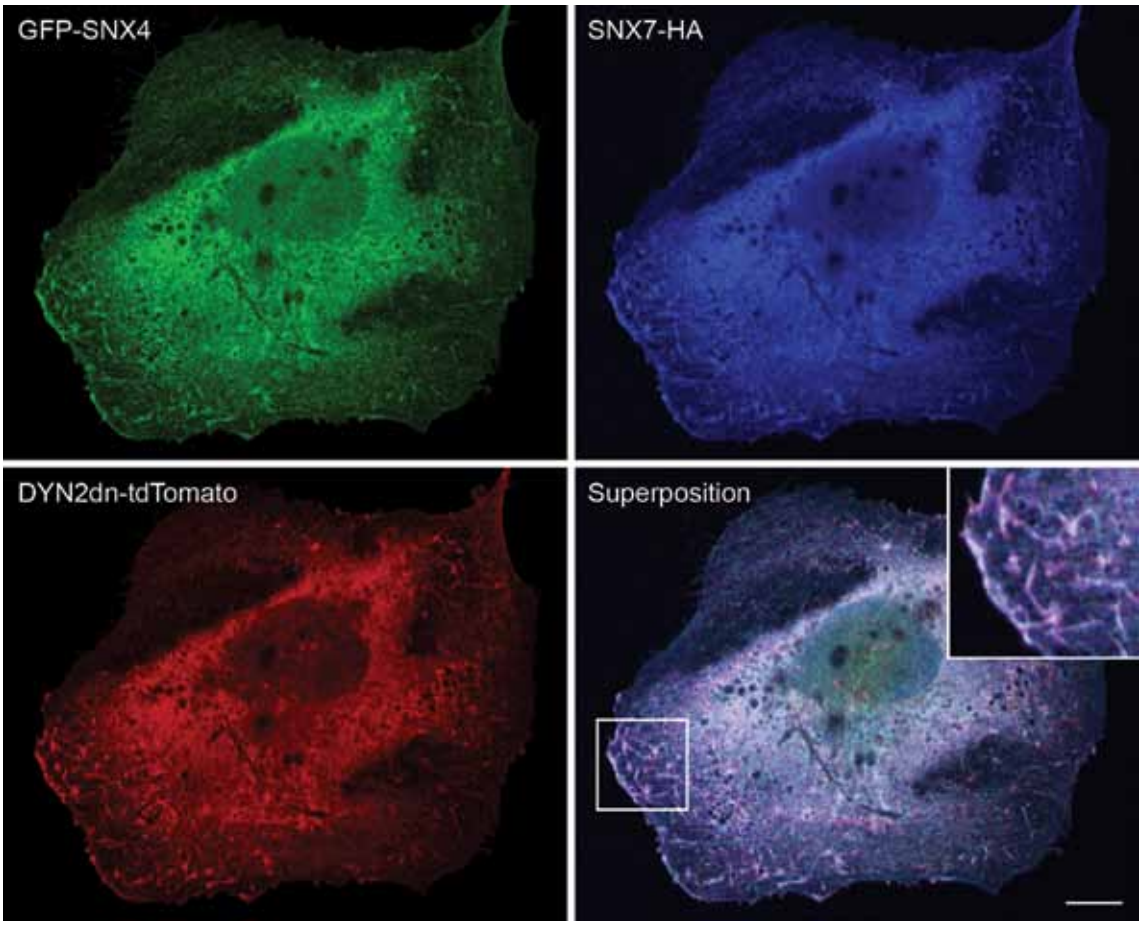

Abbildung 43: Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren mit dominant-negativem Dynamin-2. Expression von GFP-SNX4 (grün), SNX7-HA (blau) und dominant-negativem Dynamin-2 (DYN2dn-dtTomato, rot) in HeLa-Zellen. Alle drei Proteine kolokalisieren an der Plasmamembran und tubulären Strukturen. Alle Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

tierung von SNX7 an enstehende endozytotische Vesikel, vor oder während der Rekrutierung von Dynamin-2 hin. Wird zusätzlich zu SNX7 und DYN2dn auch Arc/Arg3.1 koexpriemiert kann auch hier eine deutliche Kolokalisation aller drei Proteine beobachtet werden (Abb. 42). Ein anderes Bild ergibt sich wenn SNX7 und SNX4 zusammen mit DYN2dn exprimiert werden. SNX4 und SNX7 lokalisieren kaum noch an endosomalen Strukturen sondern, zusammen mit DYN2dn, vermehrt an der Plasmamembran und tubulären Strukturen. (Abb. 43). Die membran-tubulierenden Eigenschaften von SNX4 (van Weering et al., 2012) könnten für diesen Phänotypen verantwortlich sein.

Neben DYN2 zeigt auch Clathrin, ein weiterer Bestandteil der Endozytose-Maschinerie, eine partielle Kolokalisation sowohl mit SNX7 als auch mit Arc/Arg3.1. Die Kolokalisation mit SNX7 weist das für Rezeptor-vermittelte Endozytose typische punktierte Muster auf (Abb. 44). Wohingegen die Koexpression mit Arc/Arg3.1 eine Veränderung der Clathrin-

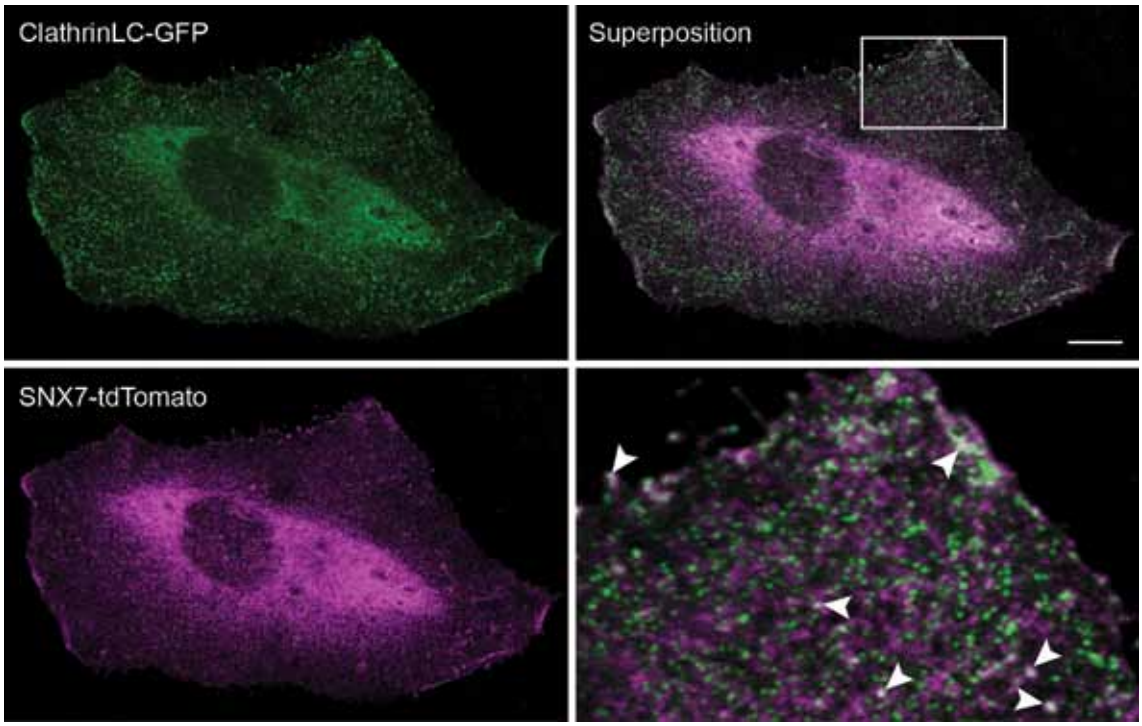

Abbildung 44: SNX7 kolokalisiert mit Clathrin in einem punktierten Muster.

Expression von ClathrinLC-GFP (grün) und SNX7-tdTomato (magenta) in HeLa-Zellen. SNX7 und Clathrin kolokalisieren partiell in einem für Clathrin typischen punktierten Muster. Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

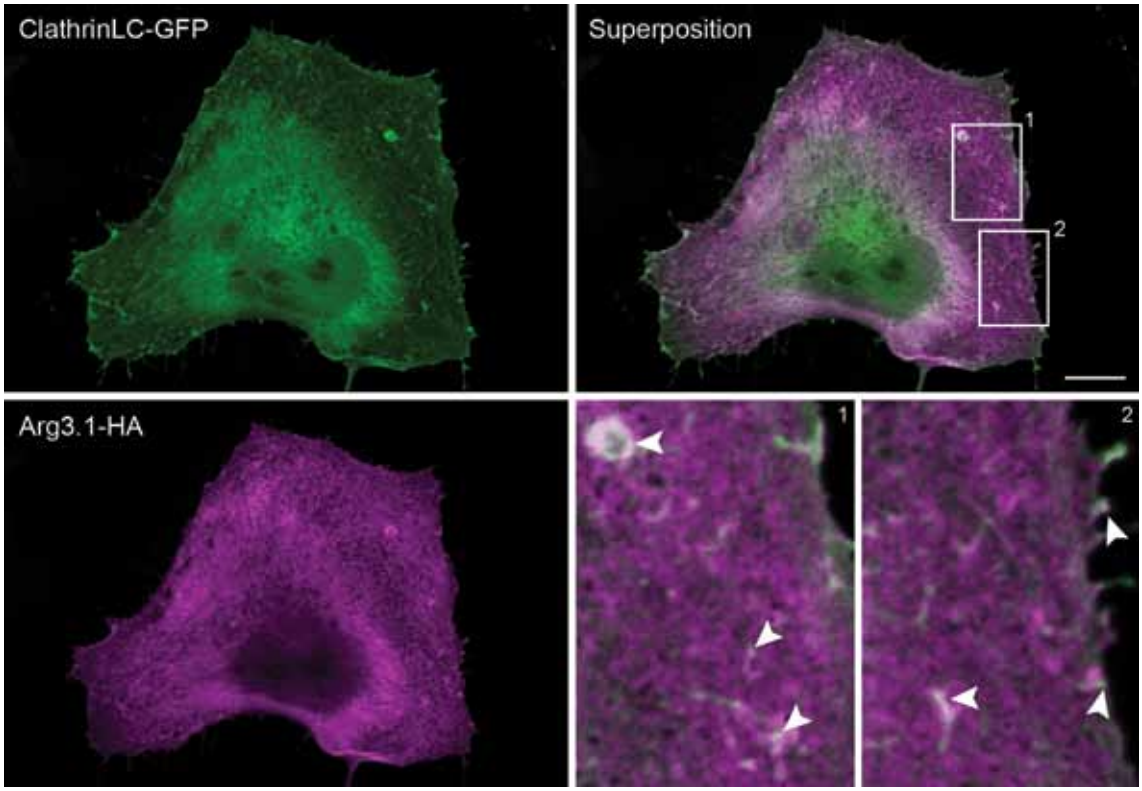

Abbildung 45: Arc/Arg3.1 kolokalisiert partiell mit Clatrin und verändert die Verteilung von Clathrin.

Koexpression von ClathrinLC-GFP (grün) und Arc/Arg3.1-HA (magenta) in HeLa-Zellen. Arc/Arg3.1

kolokalisiert partiell mit Clathrin in tubulären Strukturen und ändert die Verteilung von Clathrin von einem punktierten zu einem diffusen und tubulären Muster. Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm.

Lokalisation hin zu eher tubulären Strukturen bewirken kann (Abb. 45). Der Einfluss von Arc/Arg3.1 auf das Actin-Zytoskelett (Bai et al., 2011) könnte für diesen Effekt verantwortlich sein, da die Polymerisation von Actin zentraler Bestandteil der CAE ist (Kaksonen et al., 2006).

Die Kolokalisation von SNX7 und Arc/Arg3.1 mit Komponenten der Endozytose-Maschinerie legt eine Rekrutierung beider Proteine an die Plasmamembran nahe. Eine Möglichkeit der genaueren Betrachtung von Plasmamembran-assoziierten Proteinen ist die Verwendung der TIRF-Mikroskopie (*Total Internal Reflection*). Bei dieser Art der Mikroskopie werden ausschließlich Plasmamembran-nahe Fluorophore durch ein evaneszentes Feld angeregt. Das Verhalten von fluoreszierenden Fusionsproteinen (z.B. GFP-SNX7) an der Plasma-

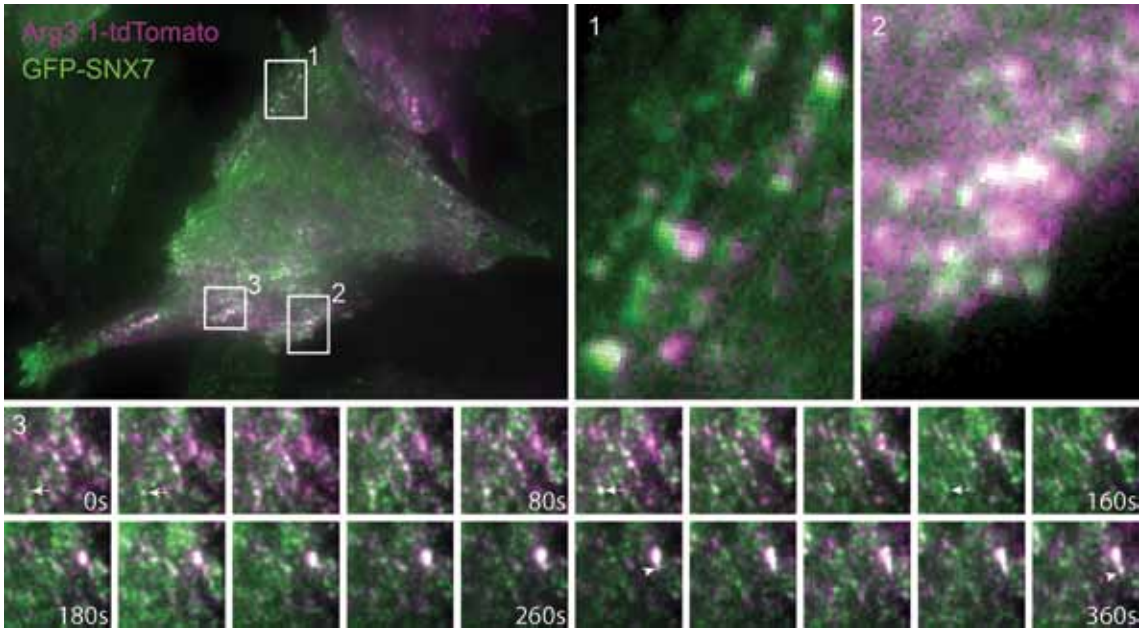

Abbildung 46: TIRF-Mikroskopie zeigt die Kolokalisation von Arc/Argc3.1 und SNX7 in punktierten, dynamischen Strukturen an der Plasmamembran.

TIRF-Mikroskopie von Arc/Arg3.1-tdTomato (magenta) und GFP-SNX7 (grün) in lebenden HeLa-Zellen. Die Anregung der fluoreszierenden Proteine im evaneszenten Feld zeigt die Lokalisation von Arc/Arg3.1 und SNX7 nah an der Plasmamembran. Beide Proteine kolokalisieren in einem punktierten Muster welches teilweise streifig angeordnet ist (Detailansicht 1 und 2). Eine Zeitreihe eines Bereiches der Zelle (Detailansicht 3) zeigt die Dynamik der Proteine innerhalb von 360 s. Beide Proteine zeigen sowohl laterale Bewegung in ebene der Plasmamembran (Pfeil) sowie den Eintritt und das Verlassen des evaneszenten Feldes (Pfeilköpfe).

membran kann so in lebenden Zellen beobachtet werden. Die Beobachtung der Fusionsproteine Arc/Arg3.1-tdTomato und GFP-SNX7 im evaneszenten Feld zeigt, dass beide Proteine in der Tat mit der Plasmamembran assoziiert sind. Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren in HeLa-Zellen in einem punktierten Muster. Zudem können laterale Bewegungen, parallel zur Plasmamembran und vertikale Bewegungen der Proteine beobachtet werden (Abb. 46). Die partielle Anordnung der Proteine in parallelen Streifen (Abb. 46(1)) lässt auf eine Assoziation mit dem cortikalen Actin-Stressfasern vermuten, die von Arc/Arg3.1 induziert werden können (Bai et al., 2011).

Die Kolokalisation von SNX7 und Arc/Arg3.1 mit Komponenten der Endozytose-Maschinerie als auch deren Assoziation mit der Plasmamembran weisen auf eine mögliche Funktion beider Proteine in der Rezeptor-vermittelten Endozytose hin. Ein häufig verwendeter Rezeptor zur Visualisierung der Rezeptor-vermittelten Endozytose ist der Transferrin-Rezeptor. Die Bindung des Liganden Transferrin an den Rezeptor führt zu dessen Clathrin-abhängiger Internalisierung. Nach der Freisetzung des Liganden in frühen Endosomen wird der Rezeptor entweder über eine schnelle, Rab4-assoziierte, oder eine langsame, Rab11-assoziierte Route zur Plasmamembran recycelt (Abb. 33) (van der Sluijs et al., 1992; Zerial and McBride, 2001). Durch die Verwendung von Fluorophor-gekoppeltem Transferrin, kann so die Clathrin-abhängige Internalisierung von Transferrin beobachtet und gemessen werden. Der Einfluss von Arc/Arg3.1, SNX7 und AMPH2 auf die Menge an internalisiertem Transferrin wurde in moderat Überexprimierenden HeLa-Zellen getestet. Die Expression von Arc/Arg3.1 oder SNX7 führt zu einer leichten Erhöhung der Menge an internalisiertem Transferrin. Die Kombination beider Proteine weist einen additiven Effekt auf. AMPH2 als bekannter Bestanteil der CAE-Maschinerie wurde in zwei Varianten getestet. Erstens die längste Splicevariante mit allen Domänen und zweitens eine Splicevariante, in welcher die CLAP-Domäne fehlt (AMPHΔCLAP). Keine der beiden Varianten führt zu einer Veränderung der Transferrin-Internalisierung. Wird jedoch zusätzlich zu AMPH2 auch Arc/Arg3.1 Überexprimiert zeigt sich ein kooperativer Effekt beider Proteine. Die Kombination von AMPH2 und Arc/Arg3.1 erhöht die Internalisierung von Transferrin deutlich stärker als beide Proteine alleine. Dieser Effekt tritt jedoch nur in Kombination mit AMPH2 nicht aber mit AMPHΔCLAP auf (Abb. 47). Demnach ist die Clathrin- und Adapter-Protein-Komplex-bindende Domäne (CLAP) Voraussetzung für den kooperativen Effekt. Die Menge an internalisiertem Transferrin wird primär durch zwei Faktoren beeinflusst: Erstens, durch die Menge an internalisiertem Transferrin-Rezeptor und zweitens, durch die Sortierung

und das Recycling des Rezeptors zurück an die Zelloberfläche. Eine erhöhte Menge an internalisiertem Transferrin durch die Expression von Arc/Arg3.1, SNX7 und AMPH2 zeigt deren Beteiligung an der Clathrin-abhängigen Endozytose oder der Rezeptor-Sortierung und dem -Recycling. Der CLAP-Domänen-abhängige, kooperative Effekt von Arc/Arg3.1 und AMPH2 weist jedoch auf eine Funktion dieser Interaktion während der Endozytose hin. Die dynamische Lokalisation von Arc/Arg3.1 und SNX7 an der Plasmamembran und deren starke Assoziation mit Rab5- und Rab4-positiven Endosomen weist auf einen kombinierten Effekt hin.

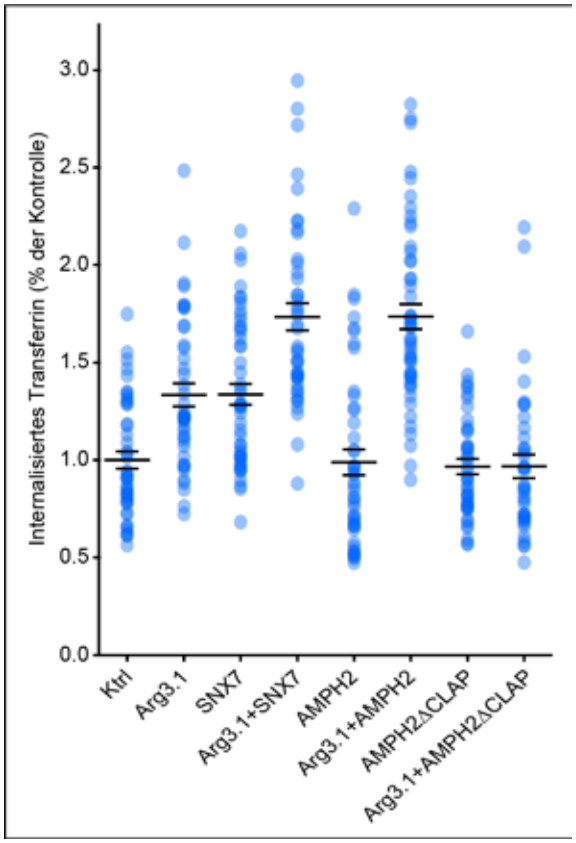

Abbildung 47: Arc/Arg31 erhöht die Internalisierung von Transferrin.
HeLa-zellen wurden mit Arc/Arg3.1-HA, GFP-SNX7 und AMPH2-GFP viral transduziert. 36h nach der Transduktion wurden die Zellen 20 min mit Alexa555 gekoppeltem Transferrin (Tf) inkubiert und anschließend fixiert und Immunfluoreszenz-gefärbt. Der mittlere Grauwert jeder gemessenen Zelle ist als blauer Punkt dargestellt. Mittelwert und Standartfehler sind als waagerechte Balken dargestellt. Die Überexpression von AMPH2 hat keinen Einfluss auf die Internalisierung von Tf. Arc/Arg3.1 und SNX7 führen zu einer leichten Erhöhung des internalisierten Tf. Die Effekte von Snx7 und Arc/Arg3.1 addieren sich wenn beide Proteine koexprimiert werden. Arc/Arg3.1 und AMPH2 zeigen einen kooperativen Effekt in Abhängigkeit der CLAP-Domäne von AMPH2. ΔCLAP = Deletion der Clathrin/Adapter-Proteincomplex-Domäne.

2.14 SNX7 kopräzipitiert das Candidate Pasticity Gene 2 (CPG2)

CPG2 ist eine neuronale Splicevariante des Syne-1-Gens. Es konnte gezeigt werden, das CPG2 für die Regulation der Endozytose von AMPA-Rezeptoren wichtig ist (Loebrich et al., 2013). Darüber hinaus lokalisiert es an der endozytischen Zone in Spines in welcher die Clathrin-abhängige Endozytose von AMPA-Rezeptoren abläuft (Cottrell et al., 2004). CPG2 kann demnach als spezifisches Protein der spezialisierten endozytose-Maschinerie in Spines betrachtet werden. Da SNX7 mit Komponenten der Endozytose-Maschinerie kolokalisiert, könnte eine Assoziation mit CPG2 auf eine Funktion von SNX7 in der EZ hindeuten. In der Tat zeigt die Koexpression von EGFP-SNX7 und HA-CPG2 und anschließender IP, dass GPG2 mit SNX7 kopräzipitiert werden kann (Abb. 48).

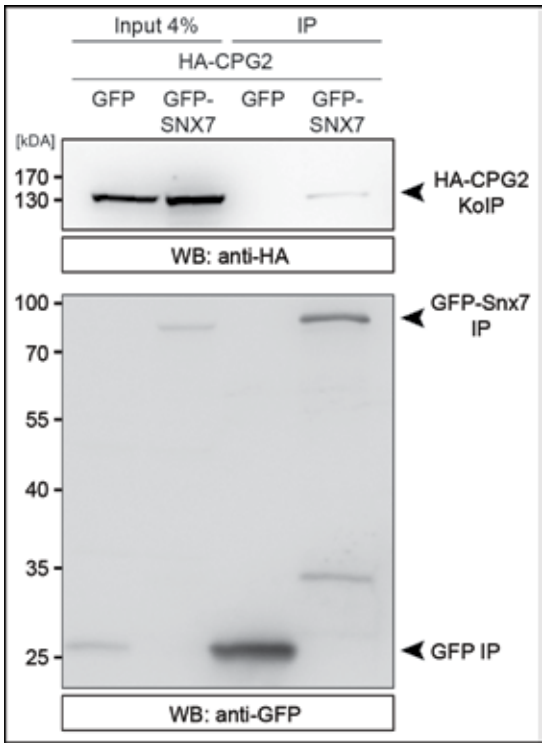

Abbildung 48: Koimmunpräzipitation von SNX7 und CPG2.
Die Fusionsproteine GFP-SNX7 und HA-CPG2 wurden in HeLa-Zellen koexprimiert. Zur Kontrolle wurde HA-CPG2 zusätzlich mit GFP koexprimiert. Das GFP-SNX7-Fusionsprotein und GFP wurden jeweils aus dem entsprechenden Zell-Lysat (Input) über anti-GFP-Antikörper immunpräzipitiert (IP α-GFP). Die Präzipitate wurden per Western-Blot (WB) analysiert. Die Präzipitation von GFP-SNX7, jedoch nicht von GFP alleine, führt zu einer Koimmunpräzipitation von CPG2 (HA-CPG2 KoIP).

2.15 Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren mit CPG2 in dendritischen Spines

Der Effekt von Arc/Arg3.1 auf die Endozytoserate von AMPARs während des mGluR-LTDs und die Koimmunpräzipitation von SNX7 mit CPG2, welches ebenfalls an der Regulation der AMPAR-Endozytose beteiligt ist, weisen auf einen funktionellen Zusammenhang aller drei Proteine hin. In der Tat kolokalisieren alle drei Protein in dendritischen Spines (Abb. 49). Fast jeder Arc/Arg3.1-positive Spine weist auch ein Signal für CPG2 und SNX7 auf. Demnach ist vom Aspekt der Lokalisation die Voraussetzung für eine gemeinsame Funktion im AMPAR-Trafficking gegeben.

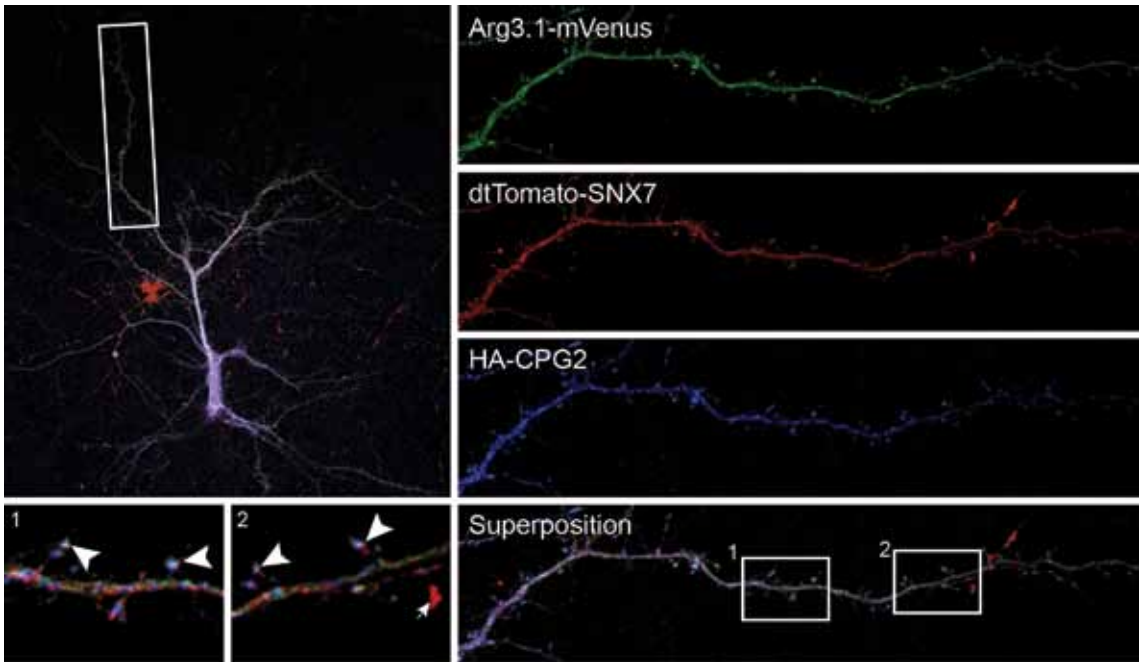

Abbildung 49: Arc/Arg3.1 kolokalisiert mit SNX7 und HA-CPG2 in dendritischen Spines.
Die Expression von Arg3.1-mVenus (grün), tdTomato-SNX7 (rot) und HA-CPG2 (blau) in kultivierten hippocampalen Neuronen zeigt deren Kolokalisation in dendritischen Spines (Detailvergrößerung, Pfeilspitzen). Zusätzlich kann eine starke Lokalisation von SNX7 im Axon beobachtet werden (Detailvergrößerung, Pfeil). Alle Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter Verwendung eines 60x Objektivs wurden konfokale Bilder erstellt. Maßstabsbalken = 10 µm

2.16 Generierung einer SNX7-Knock-out-Maus-Linie

Zur Beantwortung der Frage, ob SNX7 für die zentrale Rolle von Arc/Arg3.1 in synaptischer Plastizität von Bedeutung ist wurde ein Mausmodell etabliert. Dabei konnte auf bereits existierende embryonale Stammzellen (ES-Zellen) des Internationalen Knock-out Maus Konsortiums (Pettitt et al., 2009) zurückgegriffen werden. In diesen knock-in ES-Zellen wurde der SNX7-Locus wie in Abbildung 50 (SNX7KOfirst) dargestellt verändert. Die Art des Knock-in's wird als knock out first (KOfirst) bezeichnet und beschreibt den Umstand, dass die SNX7-mRNA durch die genetische Veränderung des Locus nicht mehr vollständig gebildet werden kann (Skarnes et al., 2011). Anstelle von SNX7 wird die bakterielle beta-Galactosidase, die durch den SNX7-Promotor reguliert wird, exprimiert. Das KOfirst-Allel besitzt zudem Rekombinations-Stellen für die FLP- und Cre-Rekombinase (Abb. 50). Die Verpaarung der KOfirst-Tiere mit FLP-Rekombinase-exprimierenden Tieren führt zu Exzision der beta-Galactosidase-Kassette und der zur Generierung der ES-Zellen verwendeten

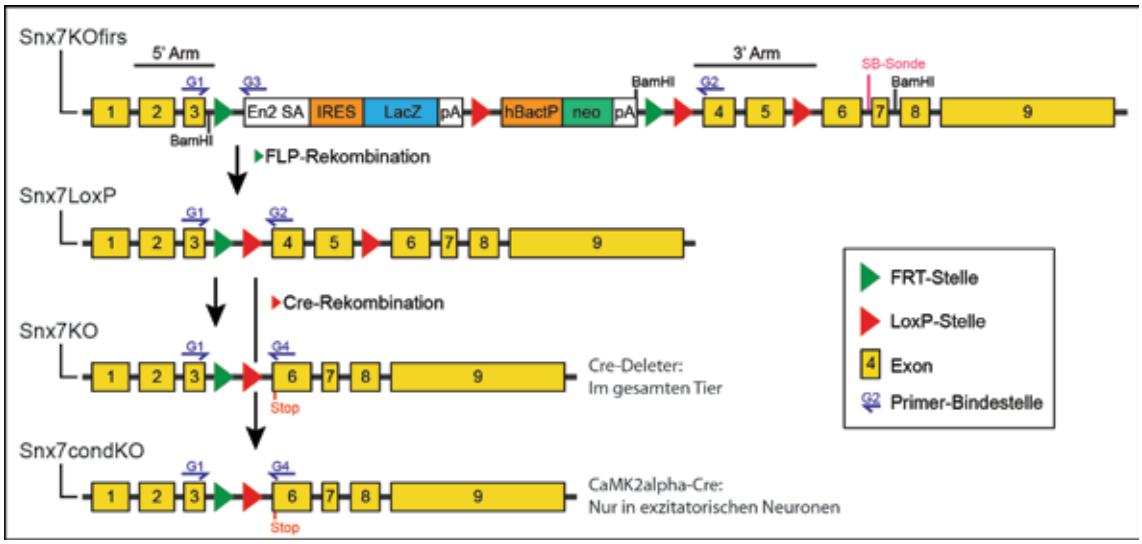

Abbildung 50: Schematische Darstellung der SNX7-Loci der generierten SNX7-Maus-Linien. Ausgehend von der Snx7KOfirst-Line (B6-Snx7tm1aHhtg) wurde über FLP-Rekombination die Snx7LoxP-Linie (B6-Snx7tm1cHhtg) generiert. Zwei weitere Linien wurden über Cre-Rekombinationen generiert. Erstens der Knock-out im gesamten Tier Snx7KO (B6-Snx7tm1d1Hhtg) und zweitens der konditionale Knock-out in exzitatorischen Neuronen, Snx7condKO (B6-Snx7tm1d2Hhtg). 5'/3'-Arm = homologen Arme am 5'- und 3'-Ende des rekombinanten Bereiches zur Generierung der Snx7KOfirst-ES-Zellen; BamHI = BamHI-Schnittstellen im SNX7-Locus; SB-Sonde = Hybridisierungslokus der Southern-Blot-Sonde; G1-G4 = Bindungstellen der Genotypisierungs-Primer; En2 SA = En2 Splice acceptor site; IRES = Internal Ribosomal Entry Site; LacZ = Codierender Bereich der beta-Galactosidase; pA = Poly-Adenylierungs-Signal; Neo = Neomycinresistenz; hBaczP = humaner beta-Actin Promotor; Stop = Position des Stopcodon nach Cre-Recombination.

Neomyzin-Resistenz. Die resultierenden Tiere (SNX7LoxP) besitzen wieder ein funktionelles SNX7-Allel, dessen Exons 4 und 5 von LoxP-Stellen flankiert werden. Dies ermöglicht die Generierung einer KO-Linie sowie die Generierung von konditionalen KO-Linien.

Über die Verpaarung der SNX7LoxP-Tiere mit einer ubiquitären Cre-Deleter-Linie (Schwenk et al., 1995) wurde die SNX7-knock-out-Linie (SNX7KO) generiert, in denen das SNX7-Allel im gesamten Tier inaktiviert ist. Der Verlust von SNX7 wird hierbei über ein vorzeitiges Stopcodon vermittelt, welches durch die Cre-Rekombinantion kurz nach Exon3 im neuen Leseraster entsteht. Zur exakteren Analyse der SNX7-Funktion in exzitatorischen Neuronen wurde zusätzlich eine konditionale Linie generiert (SNX7condKO), in der das SNX7-Allel ausschließlich in exzitatorischen Neuronen inaktiviert wird. Dieser zellspezifische Knock-out basiert auf der Verwendung einer Cre-Linie, in welcher die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CaMK2alpha-Promotors (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha) steht (Casanova 2001). CaMK2 ist im adulten Gehirn ausschließlich in exzitatorischen Neuronen exprimiert. Demnach findet hauptsächlich in diesem Zelltyp die Cre-Rekombinase-vermittelte Inaktivierung des SNX7-Allels statt.

Die einmalige und zielgerichtete Integration des SNX7KOfirst-Allels wurde über den Verdau

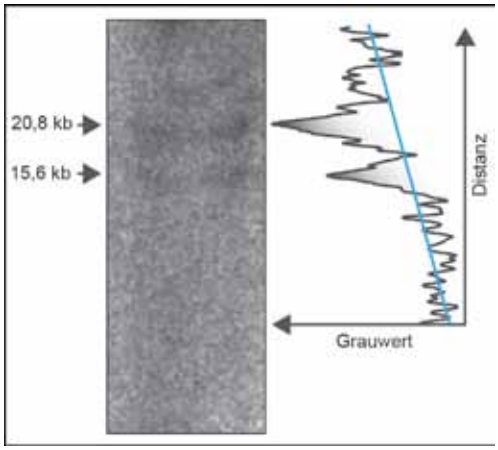

Abbildung 51: Spezifische und einmalige Integration des Snx7KOfirst-Knock-in's.
Southern-Blot der genomischen DNA der Snx7KO-first-ES-Zellen. Genomische DNA der ES-Zellen zur Generierung der Snx7KOfirst-Maus-Line wurde mit der Restriktions-Endonuklease BamHI verdaut und im Southern-Blot mit einer SNX7-Locus-spezifischen Sonde hybridisiert. Zwei DNA-Fragmente mit den erwarteten Größen 20,8 kb (WT-Allel) und 15,6 kb (KOfirst-Allel) wurden identifiziert

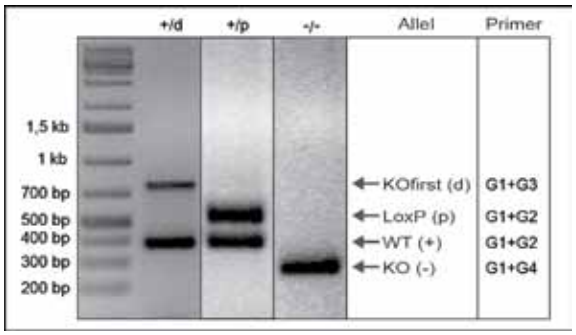

Abbildung 52: Exemplarische Genotypisierungs-PCR's der SNX7-Maus-Linien.
Alle generierten SNX7-Allele konnten mit den dargestellten Primer-Kombinationen (G1-G4) genotypisiert werden. Snx7WT-Allel (Symbol = +), G1+G2, 377 bp; Snx7KOfirst-Allel (Symbol = d), G1+G3, 761 bp; Snx7LoxP-Allel (Symbol = p), G1+G2; 514 bp; Snx7KO-Allel (Symbol = -), G1+G7, 276 bp.

mit dem Restriktionsenzym BamHI und anschließender Analyse der genomischen DNA im Southern-Blot überprüft (Abb. 51). Die erwarteten Fragmente von 20,8 kb für das WT-Allel und 15,6 kb für das KOfirst-Allel konnten über die Hybridisierung der Southern-Blot-Sonde (SB-Sonde), die zwischen Exon 6 und 7 im SNX7-Locus bindet (Abb. 50), verifiziert werden (Abb. 51). Die Genotypen der verschiedenen Tiere und Maus-Linien wurden mittels Genotypisierungs-PCR's bestimmt (Abb. 52). Die Bindungsstellen der Primer im SNX7-Locus sind in Abbildung 50 dargestellt.

2.17 SNX7-Promotor getriebene Beta-Galaktosidase-Expression

Ein Vorteil der Knock-out-first-Methode zur Generierung von KO-Tieren ist die Insertion einer beta-Galactosidase (β-Gal) codierenden Sequenz (Abb. 50). Dies ermöglicht die Bestimmung des Expressionsmusters über eine β-Gal-vermittelte Farbreaktion.

Die entstehenden blauen Farbkristalle lagern sich im perinukleären Bereich der entsprechenden Zellen ab. Die Analyse der β-Gal-Färbung im visuellen Cortex heterozygoter KOfirst-Tiere zeigt, dass SNX7 im Besonderen in der Lamina V exprimiert wird. Auch in Lamina III/VI und VIb ist ein, wenn auch schwächeres Signal zu beobachten (Abb. 53). In der hippocampalen Region des Cortexes ist eine β-Gal-Färbung in der CA3-Region des Hippocampus, der parahippocampalen Retrosplenial-Region und im Postsubiculum zu

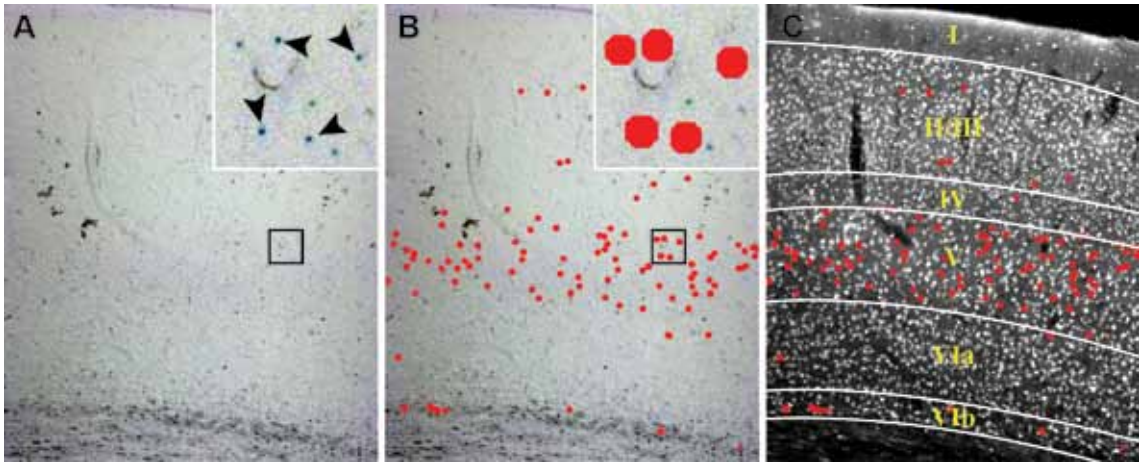

Abbildung 53: : Beta-Galactosidase-Färbung unter Kontrolle des SNX7-Promotors im Visuellen Cortex.

Sagitaler Dünnschnitt des Visuellen Cortexes einer heterozygoten Snx7KOfirst-Maus. (A) Die β-Gal-katalysierte Färbung zeigt kleine, blaue Punkte der Farbkristalle. (B) Zur besseren Visualisierung wurden die stärksten Signale isoliert und durch große, rote Punkte ersetzt. (C) Überlagerung der artifiziellen Signale mit dem Signal der DAPI-Zellkern-Färbung. Die verschiedenen Lamina des Cortexes sind mit römischen Ziffern beschriftet.

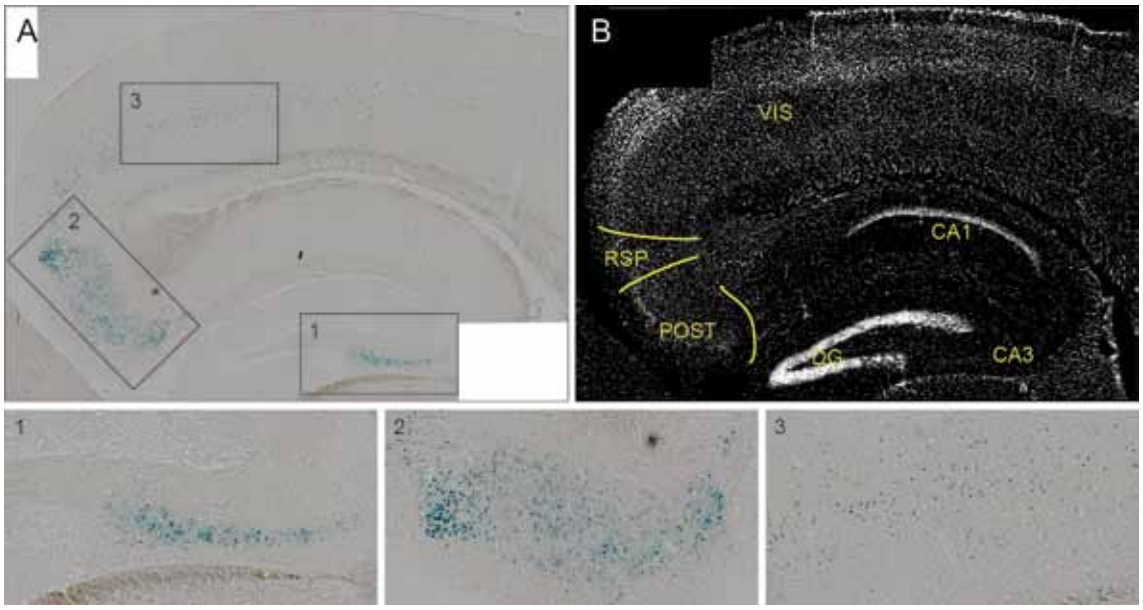

Abbildung 54: Beta-Galactosidase-Färbung unter Kontrolle des SNX7-Promotors im Hippocampus. Sagitaler Dünnschnitt des Hippocampus einer heterozygoten Snx7KOfirst-Maus. (A) Die β-Gal-katalysierte Färbung zeigt die Promotoraktivität des SNX7-Locus im Hippocampus an. (B) Zur besseren Visualisierung der Gewebeorganisation ist die DAPI-Zellkern-Färbung desselben Bereiches in (A) dargestellt. VIS = Visual area of the Cortex; CA = Cornu Ammonis; DG = Dentate gyrus; RSP = Retrosplenial area; POST = Posatsubiculum.

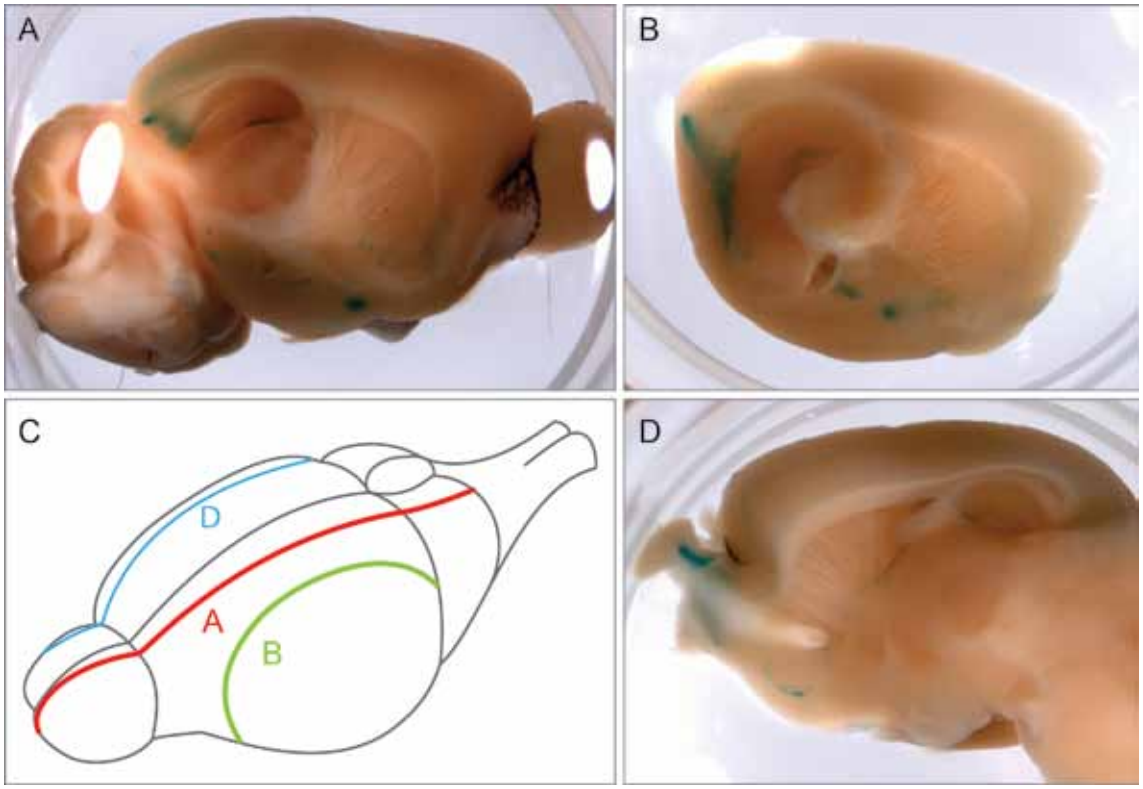

Abbildung 55: Beta-Galactosidase-Färbung einer heterozygoten Snx7KOfirst-Maus.
(A, B, D) β-Gal-katalysierte Färbung (blau) in breiten Hirnschnitten eine heterozygoten Snx7KOfirst-Maus. (C) Schnittebenen der in (A, B, D) gezeigten Färbungen.

erkennen (Abb. 54). Insgesamt ist die β-Gal-Färbung eher schwach. Signale die in der groben Unterteilung des Gehirns noch gut zu erkennen sind (Abb. 55) sind in Dünnschnitten ohne Mikroskop nicht mehr zu erkennen (Abb. 53).

2.18 SNX7-in-situ-Hybridisierung in Hirnschnitten

Da wie zuvor beschrieben, die β-Gal-vermittelte Färbung nur sehr schwach war, wurde eine weitere Methode zur Expressionsanalyse verwendet. Die radioaktive in situ Hybridisierung (ISH) ermöglicht es, die mRNA des endogenen SNX7 zu detektieren. Hierfür wurde eine Sonde verwendet, welche in etwa dem codierenden Bereich nach der PX-Domäne entspricht (NT629-1338). Die ISH zeigt, dass SNX7 in weiten Teilen des Gehirns exprimiert wird. Eine Starke SNX7-Expression zeigt sich im hippocampalen CA3-Areal und im parahippocampalen Bereich. Die genauere Analyse der ISH zeigt eine Expression in weiten Teilen des Cortexes. Neben der hippocampalen CA3-Region ist SNX7, wenn auch schwächer, in der CA1-Region und im Gyrus dentatus exprimiert (Abb. 56, 57). In der parahippocampalen

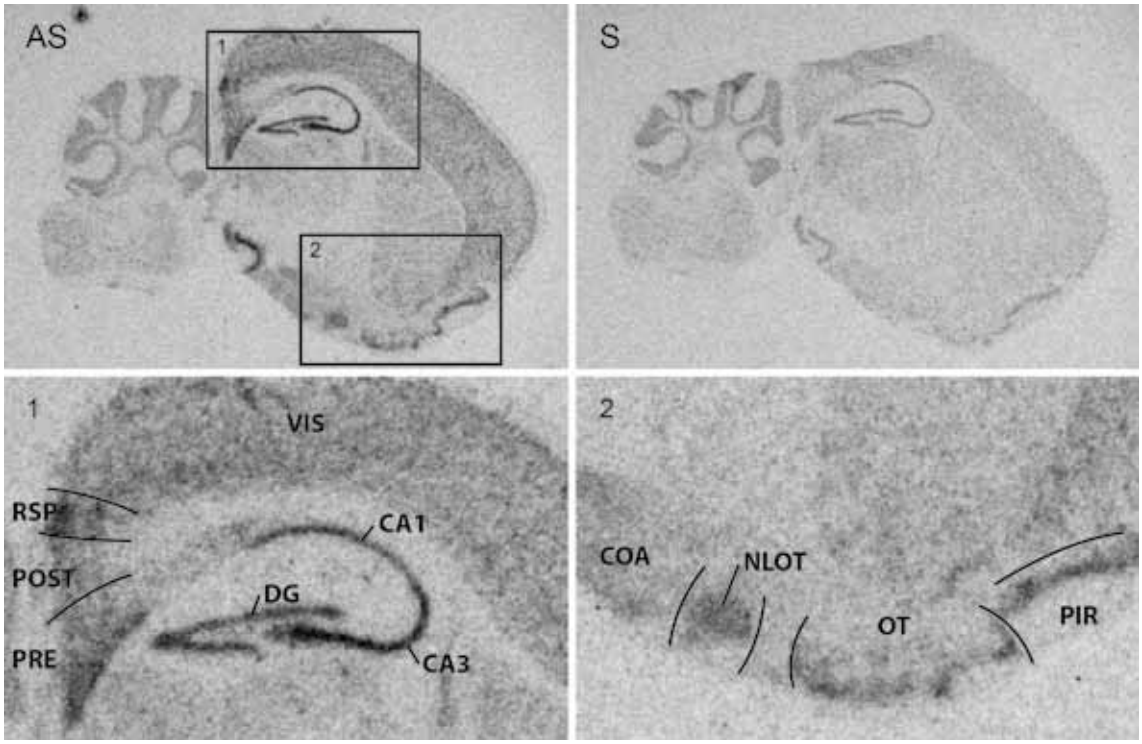

Abbildung 56: Autoradiogramm der SNX7-in-situ-Hybridisierung im sagittalen Hirnschnitt.
Die Schnitte wurden entweder mit einer SNX7-antisense-Sonde (AS) oder zu Kontrolle mit einer sense-Sonde (S) hybridisiert. DG = Dentate gyrus; CA = Cornu Ammonis; VIS = Visual area of the Cortex; RSP = Retrosplenial area; POST = Posatsubiculum; PRE = Presubiculum; COA = Cortical amygdala area; NLOT = Nucleus of the lateral olfactory tract; OT = Olfactory tubercle.

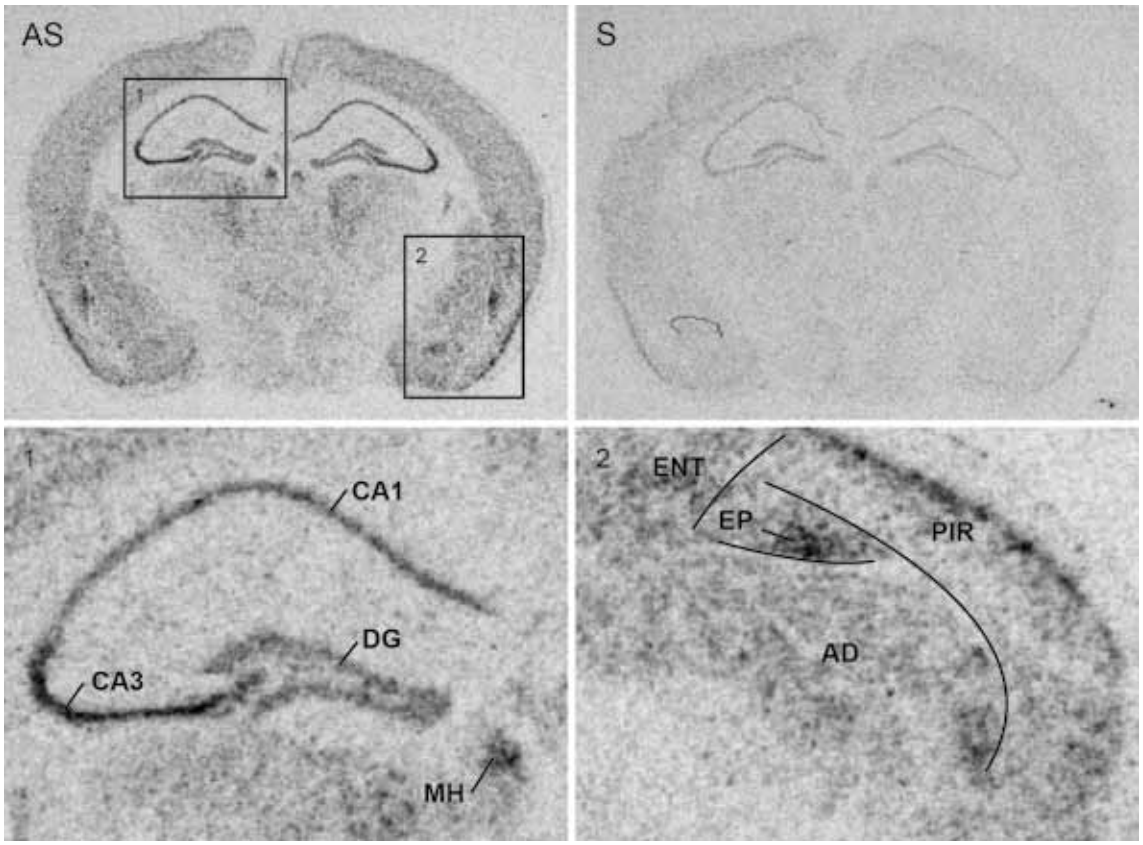

Abbildung 57: Autoradiogramm der SNX7-in-situ-Hybridisierung im coronalen Hirnschnitt.
Die Schnitte wurden entweder mit einer SNX7-antisense-Sonde (AS) oder zu Kontrolle mit einer sense-Sonde (S) hybridisiert. DG = Dentate gyrus; CA = Cornu Ammonis; MH = Medial habenula; ENT = Entorhinal area; EP = Endopiriform nucleus; PIR = Piriform area; AD = Amygdala.

Region zeigen vor allem das Peri- und Postsubiculum sowie das retrospleniale Areal eine starke Expression. Auch die Amygdala und benachbarte Areale wie der piriforme Nucleus, das piriforme und das entorhinale Areal zeigen ein erhöhtes Signal (Abb. 56). Die mit dem olfactorischen System assoziierten Areale NLOT und OT konnten ebenfalls als Expressionsorte identifiziert werden (Abb. 57), was in Einklang mit einer starken Expression im olfactorischen Bulbus (Abb. 55) steht.

2.19 Analyse der SNX7-KO-Tiere

Zur Untersuchung eines potentiellen, durch den Verlust von SNX7 verursachten Phänotypen, wurden homozygote Snx7KOfirst-Tiere (d/d) generiert. Diese homozygoten KOfirst-Tiere sind überlebensfähig und zeigen keine offensichtlichen Auffälligkeiten. Die Anzahl dieser Tier weicht jedoch stark von einer Verteilung nach den Mendelschen Regeln ab. WT (+/+) und heterozygote KOs (+/d) sind mit 63,07 bzw 34,15% repräsentiert, wohingegen

nur 2,78% der Tiere homozygote KOs (d/d) sind.

Durch die Analyse verschiedener Hirnareale im Western-Blot wurde das vollständige Fehlen von SNX7 in homozygoten Snx7KOfirst-Tieren nachgewiesen (Abb. 58). Die Immundetektion des SNX7-Proteins wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Beide Antikörper zeigen den Verlust einer Proteinbande im Bereich von ca. 60 kDa. Der Huhn-anti-SNX7-AK weist eine besonders starke Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen auf, jedoch kaum im Bereich der SNX7 Bande. Der Kaninchen-anti-SNX7-AK zeigt zwar eine geringere, jedoch auch eine Kreuzreaktivität im Bereich der SNX7 Bande. Die theoretische molekulare Masse von SNX7 beträgt ca. 51 kDa. Eine abweichende molekulare Masse im WB ist nicht ungewöhnlich und kann z.B auf posttranslationale Modifikationen des Proteins zurückgeführt werden. Die Stärke der Expression von SNX7 im Cortex und der Amygdala ist in etwa gleich. Im Vergleich dazu fällt die Expression im Hippocampus etwas schwächer aus.

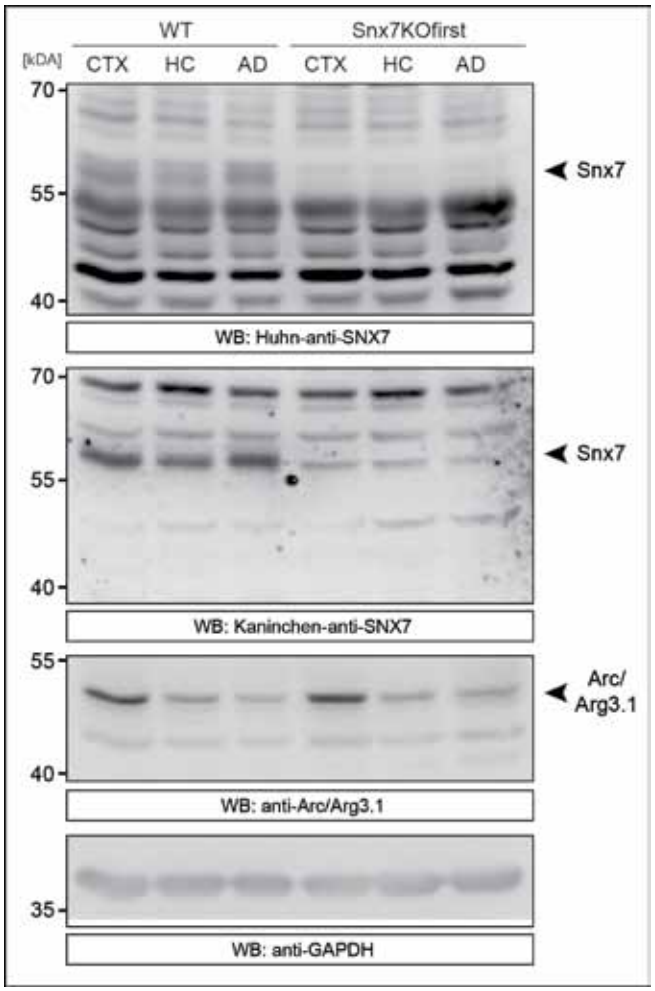

Abbildung 58: Western-Blot des SNX7-Knock-out in corticalen Geweben von Snx7KOfirst-Tieren.
Western-Blot gleicher Mengen an Proteinextrakten (20 µg) dreier verschiedener corticaler Regionen. Vergleich der Immunreaktion von Anti-SNX7- und Anti-Arc/Arg3.1-Antikörpern in Wildtyp- (WT) und homozygoten Snx7KOfirst-Tieren. Die Immundetektion von GAPDH dient der Ladekontrolle. CTX = Cortex; HC = Hippocampus; AD = Amygdala.

3. DISKUSSION

Eine Vielzahl an Proteinen wurde mit synaptischer und erfahrungsabhängiger Plastizität in Verbindung gebracht. Nur wenige von ihnen weisen jedoch das hohe Maß an Regulation und die Spannbreite der funktionellen Bedeutung auf wie dies für Arc/Arg3.1 gezeigt wurde. Ungeachtet dieser hervorgehobenen Stellung sind die molekularen Mechanismen, die der Wirkung von Arc/Arg3.1 zu Grunde liegen, weitgehend unverstanden. Den ersten Hinweis auf die molekulare Funktion von Arc/Arg3.1 lieferte die Identifikation der Bindungspartner Endophilin und Dynamin. Beide Proteine sind Bestandteile der Endozytose-Maschinerie. Weitere Studien haben gezeigt, dass Arg/Arg3.1 das Trafficking von AMPA-Rezeptoren beeinflusst, welche stetig zwischen Plasmamembran und endosomalen Kompartimenten pendeln. Weder Arc/Arg3.1 noch dessen Bindungspartner interagieren direkt mit AMPA-Rezeptoren, noch ist es verstanden wie Arc/Arg3.1 die Funktion der Endozytose-Maschinerie beeinflusst.

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Arc/Arg3.1 Bindungspartner zu identifizieren, zu Charakterisieren und so das Verständnis der molekularen Funktion von Arc/Arg3.1 zu erweitern.

3.1 Identifizierung neuer Arc/Arg3.1-Bindungspartner

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine viel verwendetet Methode zur Identifizierung neuer Bindungspartner. Zwei besonders wichtige Faktoren für eine erfolgreiche Suche sind zum einen die verwendete cDNA-Bibliothek und zum anderen die Eigenschaften des „Köder"-Proteins. Da der Hippocampus eine zentrale Rolle beim Lernen und Gedächtnis spielt wurde eine hippocampale cDNA-Bibliothek verwendet, welche sich auf die im Hippocampus exprimierten Proteine beschränkt. Die auto-aktivierende Eigenschaft von Arc/Arg3.1 im Hefe-Zwei-Hybried-System erforderte eine Unterteilung des Proteins in geeignete Domänen. Dies ist ein kritischer Schnitt, da nur schwierig vorher zu sagen ist, in wie fern die Unterteilung die Bindung an andere Proteine beeinflusst. Auf der Grundlage eines von mir generierten Arc/Arg3.1-Strukturmodells wurden die Grenzen so ausgewählt, dass die potenziellen, globulären Domänen am N- und C-Terminus erhalten bleiben. Insbesondere für die N-terminale Domäne war diese Strategie mit der Identifizierung von 32 Bindungspartnern erfolgreich. Wohingegen für die C-terminale Domäne nur 7 Bindungspartner identifiziert werden konnten.

Nur einer der bereits bekannten Arc/Arg3.1-Bindungspartner wurde mit der N-terminalen Domäne identifiziert. Eine mögliche Ursache ist die Verwendung von Teilbereichen des

Proteins, wohingegen in Untersuchungen anderer Labore das vollständige Protein verwendet wurde (Chowdhury et al., 2006; Peebles et al., 2010). Protein-Bindungsstellen können in Abhängigkeit von allosterischen Konformationsänderungen des Proteins zugänglich werden. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System kommen solche Effekte aufgrund der fehlenden allosterischen Bindungspartner kaum zum Tragen. Die hier verwendeten Domänen von Arc/Arg3.1 könnten also Bindungsstellen exponieren, welche im vollständigen Protein im Hefe-Zwei-Hybrid-System nur schlecht zugänglich sind. Ein Beispiel für solch einen Effekt ist die Bindung zwischen Arc/Arg3.1 und Endophilin, welche durch die Konformation von Endophilin reguliert wird (Chowdhury et al., 2006). Auch die verwendeten cDNA-Bibliotheken können zur Identifizierung unterschiedlicher Proteine beitragen. Die Repräsentation der einzelnen Proteine und die Expression unterschiedlicher Proteinfragmente variieren zwischen den Bibliotheken.

Angesichts der postulierten Funktion von Arc/Arg3.1 im AMPAR-Trafficking stellen die neu identifizierten Bindungspartner mit einer möglichen Funktion im Protein-Traffickingdie für uns interessanteste Gruppe dar. Fünf dieser Proteine sind insbesondre mit dem endosomalen System der Zelle assoziiert. Von diesen weisen AMPH2, VPS35 und SNX7 eine besonders gute Assoziation mit dem bereits bekannten Arc/Arg3.1-Interaktom auf (Abb. 5) und wurden daher für weitere Analysen im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt.

3.2 Arc/Arg3.1 kolokalisiert mit SNX7 und AMPH2 an Endosomen, der Plasmamembran und in dendritischen Spines

Erste Hinweise für den funktionalen Zusammenhang zischen Arc/Arg3.1 und den neu identifizierten Bindungspartner wurden durch Analysen der Kolokalisation gewonnen. In HeLa-Zellen kolokalisieren SNX7 und Arc/Arg3.1 an Endosomen und der Plasmamembran (Abb. 6) Diese Verteilung entspricht den, im Zusammenhang mit Dynamin und Endophilin durchgeführten, Kolokalisations-Analysen (Chowdhury et al., 2006). Die Lokalisation an Endosomen und der Plasmamembran konnte auch für weitere Mitglieder der SNX-BAR-Familie gezeigt werden. SNX1 und 2 lokalisieren als Teil des Retromer-Komplexes an Endosomen. Unabhängig vom Retromer binden sie auch an Kalirin-7, ein Rac1- und RohG-GEF (guanine nucleotide exchange factor) und kolokalisieren mit diesem an der Plasmamembran. Gemeinsam induzieren sie die Remodellierung des Actin-Zytoskeletts und die Ausbildung von Lamellopodien (Prosser et al., 2010). Eine ähnliche Funktion könnten auch Arc/Arg3.1 und SNX7 an der Plasmamembran ausüben, insbesondere da

Arc/Arg3.1 auch mit der Modellierung des Actin-Zytoskeletts in Verbindung gebracht wird (Messaoudi et al., 2007; Peebles et al., 2010).

AMPH2 ist ein Bestandteil der Endozytose-Maschinerie und gemeinsam mit SNX9 und Endophilin für die Rekrutierung und Regulierung von Dynamin verantwortlich (Meinecke et al., 2013). Die Kolokalisation von Arc/Arg3.1 und AMPH2 an der Plasmamembran (Abb. 7) entspricht der Bindung von Arc/Arg3.1 an weitere Bestandteile der Endozytose-Maschinerie wie Endophilin und Dynamin. Eine Kolokalisation in tubulären, endosomalen Strukturen kann ebenfalls beobachtet werden. In der Tat konnte eine Funktion von AMPH2 gemeinsam mit EHD1 (EH domain-containing protein 1) im endosomalen Recycling beschrieben werden (Pant et al., 2009).

AMPH2 und SNX7 teilen sich einen gemeinsamen Bindungspartner, SNX4 (Leprince et al., 2003; van Weering et al., 2012). Interessanterweise führt die Koexpression von AMPH2, Arc/Arg3.1 und SNX4 zu einer verstärkten endosomalen Lokalisation von AMPH2. Alle drei Proteine kolokalisieren an tubulären, endosomalen Strukturen (Abb. 9). Ein anderes Bild ergibt sich, wenn an Stelle von SNX4, SNX7 koexprimiert wird. In dieser Kombination kolokalisieren alle drei Proteine primär an der Plasmamembran (Abb. 10). Eine mögliche Erklärung ist die fehlende Tubulierungseigenschaft von SNX7 (van Weering et al., 2012). Ohne seinen SNX-BAR-Bindungspartner SNX4 kann SNX7 keine tubulären, endosomalen Subdomänen ausbilden, an welche AMPH2 rekrutiert werden kann. SNX4 hingegen bildet Homodimere und besitzt die Fähigkeit Membranen zu tubulieren. Die verringerte membran- und verstärkte endosomale Lokalisation von AMPH2 in Anwesenheit von SNX4 könnte ein Hinweis auf die Kopplung von Endozytose und Rezeptor-Recycling sein. Dem entspricht die beschriebene Funktion von SNX4 im Tf-Rezeptor-Recycling (Traer et al., 2007).

VPS35 ist Teil der Kernkoponenten des Retromers welches insbesondere für seine Funktion in der retrograden Protein-Sortierung von Endosomen hin zu cis-Golgi beschrieben ist (Bonifacino and Hurley, 2008). Die Kolokalisation von VPS35 und Arc/Arg3.1 ist nur sehr schwach ausgeprägt. Es hat den Anschein, dass sich beide Proteine gemeinsam an denselben Endosomen, jedoch an unterschiedlichen Subdomänen aufhalten (Abb. 8). Auch in Neuronen kann nur eine sporadische Kolokalisation beider Proteine im dendritischen Schaft beobachtet werden (Abb. 12). Diese Beobachtungen sprechen gegen einen starken funktionellen Zusammenhang zwischen Arc/Arg3.1 und VPS35, zumindest in den verwendetet Zellsystemen.

Ein anderes Bild ergibt sich, wenn Arc/Arg3.1 und SNX7 in Neuronen koexprimiert

werden. Beide Proteine sind in dendritischen Spines angereichert, in denen sie deutlich kolokalisieren. Diese Kolokalisation kann mit allen potentiellen Splicevarianten von SNX7 beobachtet werden (Abb. 14-17). Da die Bindungstelle von Arc/Arg3.1 im N-terminalen Bereich der BAR-Domäne in allen Splicevarianten vorhanden ist, lässt sich der Einfluss der Bindung auf die Lokalisation nicht ableiten (Abb. 13). Darüber hinaus kolokalisiert SNX7 sowohl im Dendriten als auch in Spines mit der AMPAR-Untereinheit GluA1 (Abb. 18). Dies deutet darauf hin, dass SNX7 mit AMPAR-beinhaltenden Endosomen assoziiert ist. Auch AMPH2 ist erwartungsgemäß in Spines angereichert und kolokalisiert mit Arc/Arg3.1. Es ist anzunehmen, dass die Lokalisation von AMPH2 in Spines stark mit der Ausprägung der EZ assoziiert ist, da in dieser die Komponenten der Endozytose-Maschinerie angereichert sind (Blanpied et al., 2002).

3.3 Arc/Arg3.1 bindet an eine hydrophoben Bereich der SNX7-BAR-Domäne

Die Bindung von Arc/Arg3.1 an SNX7 konnte in KoIP- und Pull-down-Experimenten bestätigt werden (Abb. 19, 20). Wohingegen die Bindung an AMPH2 und VPS35 unter den gewählten Bedingungen nicht verifiziert werden konnte. Insbesondere für AMPH2 ist dieses Ergebnis unerwartet da Arc/Arg3.1 und AMPH2 ebenfalls eine starke Kolokalisation aufweisen. AMPH2 besitzt mindestens 12 Splicevarianten und die Interaktion mit Bindungspartnern wie Dynamin-2 kann durch alternatives Splicing geändert werden (Ellis et al., 2012). Eine ähnliche Regulation könnte auch für Arc/Arg3.1 existieren und die Verifikation der Bindung erschweren. Trotz des mangelnden Nachweises kann eine Bindung von Arc/Arg3.1 und AMPH2 im Rahmen dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden.

Die Bindungsstelle von Arc/Arg3.1 in SNX7 konnte bereits durch das im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierte Fragment auf den N-terminalen Bereich der BAR-Domäne eingeschränkt werden (Abb. 4). Mit Hilfe der Analysen von Substitutionsmutanten im Mammalia-Zwei-Hybrid-System konnte die Bindungsstelle in diesem Bereich genauer charakterisiert werden. Drei Leuzine (L321/325/326), die Teil eines hydrophoben Bereiches der BAR-Domäne sind (Abb. 26), tragen essenziell zur Bindung von Arc/Arg3.1 bei (Abb. 25A). Die Bindung von SNX7 an SNX4 ist jedoch unbeeinträchtigt. Dies lässt auf eine intakte Konformation der einzelnen Mutanten schließen und zeigt die Spezifität der Bindung (Abb. 25B). Interessanter Weise führt die Substitution eines sterisch benachbarten Aspartats (D402) zu einer deutlich Verstärkung der Bindung (Abb. 25A). Die Substi-

tution von Aspartat durch Alanin verringert die Ladung und erhöht die Hydrophobizität in diesem Bereich. Diese unterstützt die Beobachtung, das Arc/Arg3.1 über eine hydrophobe Wechselwirkung an SNX7 bindet.

3.4 Arc/Arg3.1 bindet an das SNX4/7-Heterodimer und kolokalisiert mit diesem in dendritischen Spines

SNX7 bildet ein BAR-Domänen-vermitteltes Heterodimer mit SNX4, eine Homodimerisierung konnte in Pull-down-Experimenten nicht beobachtet werden (van Weering et al., 2012) (Abb. 27). Eine direkte Bindung zwischen Arc/Arg3.1 und SNX4 konnte im Mammalia-Zwei-Hybrid-System nicht gemessen werden. Es ist jedoch möglich eine indirekte Bindung durch die Koexpression von SNX7 zu induzieren (Abb. 28). Dies zeigt, dass Arc/Arg3.1 über SNX7 an das SNX4/7-Heteromer rekrutiert werden kann. Darüber hinaus wird die Bindung zwischen SNX7 und Arc/Arg3.1 durch die Koexpression von SNX4 positiv beeinflusst. Dieser Effekt könnte auf eine Konformationsänderung des heterodimerisierten SNX7 zurück zu führen sein, welche die Bindung von Arc/Arg3.1 fördert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Effekt alleine durch die Stabilisierung von SNX7 im Heterodimer zu Stande kommt (Abb. 28).

Die koexpression in HeLa-Zellen zeigt eine Kolokalisation aller drei Proteine an der Plasmamembran und insbesondre an Endosomen und von dieser hervorgehenden tubulären Strukturen (Abb. 30). Solche tubulär-endosomalen Strukturen sind ohne SNX4 nicht zu beobachten (Abb. 6), was vermutlich auf die fehlende Tubulierungseigenschaft von SNX7 zurück zu führen ist (van Weering et al., 2012). Die Kolokalisation von Arc/Arg3.1 mit dem SNX4/7-Heterodimer variiert in Abhängigkeit der Expressionsstärke der einzelnen Proteine. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, das die Rekrutierung von Arc/Arg3.1 an Endosomen von einem korrekten stöchiometrischen Verhältnis des SNX4/7-Heterodimer abhängt.

In Neuronen kann ebenfalls eine Kolokalisation von Arc/Arg3.1 mit dem SNX4/7-Heterodimer beobachtet werden. Diese Kolokalisation beschränkt sich auf Dendriten und insbesondre auf Spines, wohingegen das SNX4/7-Heterodimer auch im Axon zu finden ist (Abb. 31). Eine genauere Analyse der Verteilung der Proteine in Spines zeigt, das die maximale Konzentration von Arc/Arg3.1 und die der SNXs leicht versetzt ist. Zusätzlich lässt sich in vielen Fällen ein zweites Maximum der Arc/Arg3.1-Immunfluoreszenz beobachten, welches mit dem der SNXs korreliert (Abb. 32). Fraktionierungs-Experimente zeigen, dass

Arc/Arg3.1 stark in der PSD angereichert ist (Delint-Ramirez et al., 2010). Unter dieser Annahme repräsentiert das stärkere Maximum das in der PSD akkumulierte Arc/Arg3.1. Das zweite, mit den SNXs korrelierende Maximum weist auf eine zusätzliche Anreicherung von Arc/Arg3.1, an SNX4/7-positiven Endosomen hin.

3.5 Arc/Arg3.1, SNX7 und das SNX4/7-Heterodimer assoziieren mit frühen und Recycling-Edosomen

Die Koexpression von Arc/Arg3.1 und SNX7 mit den endosomalen Marker-Proteinen Rab4, 5, 11 und 7 ermöglicht eine Zuordnung der Lokalisation im endosomalen System (Abb. 33). Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren gemeinsam an frühen (FE) und Recycling-Endosomen (RE), welche durch Rab5 und 4 charakterisiert sind (Abb. 36). Das durch Rab11 charakterisierte endozytische Recycling-Kompartiment (ERK) und Rab11-positive Recycling-Endosomen weisen hingegen nur eine geringfügige Kolokalisation mit Arc/Arg3.1 und SNX7 auf (Abb. 37). Es konnte keine Kolokalisation mit Rab7-positiven, späten Endosomen beobachtet werden (Abb. 37). Demnach sind Arc/Arg3.1 und SNX7 primär mit frühen Endosomen und Endosomen der schnellen Recycling-Route assoziiert. Ein ganz ähnliches Bild ergibt sich bei der Analyse des SNX4/7-Heterodimers (Abb. 34,35). Die Assoziation von Arc/Arg3.1 mit frühen Endosomen und die Assoziation von SNX4 mit Rab4-positiven Recycling-Endosomen wurden bereits zuvor beschrieben. Für beide Proteine wurde jedoch auch eine Assoziation mit Rab11-positiven Recycling-Endosomen gezeigt (Chowdhury et al., 2006; Harterink et al., 2011; Traer et al., 2007). Eine mögliche Erklärung ist ein Unterscheid zwischen der Lokalisation des SNX4-Homo- und des SNX4/7-Hertordimers. SNX4 ist für die korrekte Sortierung des TfR in frühen Endosomen und dessen Transport zum ERK notwendig. Dies geschieht während des Übergangs von Rab4- zu Rab11-positiven Recycling-Endosomen. Es ist denkbar, dass das SNX4/7-Heterodimer an Sortierungsvorgängen beteiligt ist, welche ausschließlich an Rab4/5-positiven, endosomalen Subdomänen stattfindet. Auch Arc/Arg3.1 könnte durch die Koexpression von SNX7 auf Rab4/5-positive, endosomale Domänen beschränkt werden.

3.6 Arc/Arg3.1 und SNX7 assoziieren mit der Endozytose-Maschinerie

Arc/Arg3.1 und SNX7 kolokalisieren partiell mit DYN2 in einem punktierten Muster (Abb. 39, 40). Dieses Muster entspricht der Verteilung von DYN2 welches an Clathrin-dekorierte Vesikel (CDV) der Plasmamembran rekrutiert wurde (Cao et al., 1998). Die Expression einer dominant-negativen Variante von DYN2 (DYN2dn) führt zur Arrestierung der CDVs und der Akkumulation von DYN2 (Damke et al., 1994, 2001). Diese Bedingungen führen zu einer massiven Kolokalisation von SNX7 und DYN2dn (Abb. 41) und deuten auf eine Rekrutierung von SNX7 an CDVs während oder vor der Rekrutierung von DYN2 hin. Die Akkumulation an arrestierten CDVs kann auch beobachtet werden, wenn zusätzlich Arc/Arg3.1 exprimiert wird (Abb. 42). Neben DYN2 kolokalisieren SNX7 und Arc/Arg3.1 auch partiell mit Clathrin (Abb. 44, 45), was die Annahme unterstützt, dass sowohl Arc/Arg3.1 als auch SNX7 während der CAE rekrutiert werden können. Das durch die Expression von Arc/Arg3.1 veränderte Verteilungsmuster von Clathrin ist möglicherweise auf Actin-modellierenden Eigenschaften von Arc/Arg3.1 zurückzuführen (Bai et al., 2011). Interessanterweise verändert sich das Muster der Kolokalisation zwischen DYN2dn und SNX7, wenn zusätzlich SNX4 exprimiert wird (Abb. 43). Das vesikuläre Muster von DYN2 und SNX7 ändert sich hin zu einem tubulären Muster. Es ist anzunehmen, dass die membran-tubulierenden Eigenschaften von SNX4 (van Weering et al., 2012) für diesen Effekt verantwortlich sind und SNX4 über SNX7 an die Plasmamembran rekrutiert wird.

Die Analyse der Arc/Arg3.1- und SNX7-Expression mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie bestätigt eine Lokalisation beider Proteine an oder in der Nähe der Plasmamembran (Abb. 46). Sie kolokalisieren in einem punktierten Muster, das teils streifig angeordnet ist. Diese Anordnung entspricht einer Assoziation mit cortikalen Actin-Stressfasern, welche durch Arc/Arg3.1 induziert werden können (Bai et al., 2011). Darüber hinaus kann eine laterale und orthogonale Dynamik in Relation zur Plasmamembran beobachtet werden, wie dies auch für endozytotische Vorgänge beschrieben ist (Posor et al., 2013; Yarar et al., 2005).

Eine häufig verwendete Methode zur Analyse der CAE ist die Messung der Transferrin (Tf)-Internalisierung. Dieser Prozess wird durch den Tf-Rezeptor (TfR) und dessen CAE vermittelt. Sowohl Arc/Arg3.1 als auch SNX7 erhöhen die Menge an internalisiertem Tf um ca. 35%. Der Wirkungsmechanismus scheint jedoch unterschiedlich und unabhängig zu sein, da die Kombination beider Proteine nur zu einem additiven Effekt führt (~70%)

(Abb. 47). AMPH2 allein zeigt hingegen keinen Einfluss auf die Menge an internalisiertem Tf. Wird jedoch zusätzlich Arc/Arg3.1 koexprimiert tritt ein kooperativer Effekt auf, welcher die Wirkung von Arc/Arg3.1 übersteigt. Dieser Effekt ist von der Anwesenheit der AMPH2-CLAP-Domäne abhängig, welche die Bindung an AP-2 und Clathrin vermittelt. Interessanter Weise wird auch der positive Effekt von Arc/Arg3.1 durch die Expression der AMPHΔCLAP-Variante blockiert (Abb. 47). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Arc/Arg3.1-induzierte Erhöhung der Menge an internalisiertem Tf über die Kooperation mit AMPH2 vermittelt ist. Darüber hinaus weist die Notwendigkeit der CLAP-Domäne auf einen direkten Einfluss auf die Endozytose-Maschinerie hin. AMPH2 reguliert unter anderem die Assemblierung von Dynamin-2 und damit die Abschnürung des endozytotischen Vesikels. Die Bindung von Arc/Arg3.1 an einen Komplex aus AMPH2, ENDO2/3 und DYN2 könnte diesen Schritt beeinflussen (Meinecke et al., 2013).

Ein möglicher Wirkungsmechanismus von SNX7 könnte das schnelle Recycling des TfR zurück an die Plasmamembran sein. Eine so aufrechterhaltene, hohe Rezeptorkonzentration würde ebenfalls die Menge an internalisiertem Tf erhöhen. Zum klären dieser Fragen sind weitere Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten und mit verschiedenen Mutanten notwendig. SNX7 besitzt jedoch auch Eigenschaften eines Adapterproteins. Neben der hier gezeigten Rekrutierung an Clathrin coated pits, besitzt SNX7 ein Clathrin-Bindemotif (D134-FLWL), welches auch in SNX3 zu finden ist und in diesem die Bindung an Clathrin vermittelt (Skånland et al., 2009). Zusätzlich besitzt SNX7 ein Bindemotif für AP-2 (F167-NDDF) im Bereich der PX-Domäne, welches in keinem anderen SNX-BAR konserviert ist. Die KoIP mit CPG2 (Abb. 48), einem wichtigen Protein des AMPAR-Trafficking, welches an der EZ lokalisiert ist (Cottrell et al., 2004; Loebrich et al., 2013), weist ebenfalls auf einen Funktion von Arc/Arg3.1 in der CAE hin.

3.7 SNX7 ist in weiten Teilen des Gehirns und besonders mit Lernen und Gedächtnis assoziierten Arealen exprimiert

Die Expression von SNX7 im Maushirn wurde mit zwei verschieden Methoden untersucht. Die Verwendung der KOfirst-Strategie zur Generierung der KO-Mäuse ermöglicht die Expression der bakterielle β-Galactosidase (βGal) unter der Kontrolle des SNX7-Promotors. Die β-Gal-vermittelte Färbung zeigt, dass SNX7 insbesondre im olfaktorischen Bulbus, in der CA3-Region des Hippocampus, im Postsubiculum, im retronsplenialen Cortex und in Lamina V des Neocortex exprimiert wird (Abb. 53-55). Insgesamt ist das Signal der

Färbung jedoch eher schwach. Mehrere Faktoren können für die schwache Expression verantwortlich sein. Die Promoter-Aktivität von SNX7 könnte grundsätzlich schwach sein und somit für eine geringe Expression der β-Gal sorgen. Zudem wurden heterozygote Tiere verwendet, in denen die β-Gal nur von einem Allel exprimiert wird. Die artifizielle mRNA des KOfirst-Lokus, welche für ein IRES und die βGal codiert, besitzt zusätzlich die Sequenz der ersten drei Exons des SNX7-Lokus (Abb. 50). Diese könnten zur Destabilisierung und dem raschen Abbau der mRNA führen. Zusätzlich kann die Stabilität der mRNA und der βGal in verschiedenen Arealen des Gehirns variieren. Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass SNX7 auch in weiteren Bereichen exprimiert wird.

Die Methode der radioaktiven ISH bietet den Vorteil, dass diese die endogene SNX7-mRNA detektiert. Eine zelluläre Auflösung wie bei der βGal-Färbung ist jedoch nicht zu erreichen. Zur Kontrolle der Spezifität der SNX7-Sonde wurden zusätzlich Hybridisierungen mit der Antisense-Sonde durchgeführt. Diese Art der Kontrolle ermöglicht eine Abschätzung des Hintergrundsignals, kann aber nicht den Beitrag von Off-Target-Effekten ausschließen. SNX7-KO-Tiere zur Kontrolle der Spezifität standen jedoch noch nicht zur Verfügung. Die zuvor mittels der β-Gal-Färbung identifizierten Areale weisen auch in der ISH die stärkste SNX7-Transkription auf. Es ist ersichtlich, dass SNX7 in weiten Teilen des Gehirns, jedoch in unterschiedlicher Stärke, exprimiert wird. Die Expression im olfaktorischen Bulbus (Abb. 50) und den assoziierten Arealen NLOT und MH (Abb. 57) weisen auf eine Funktion von SNX7 im olfaktorischen System hin. Im Hippocampus kann neben CA3 auch eine, wenn auch schwächere Expression in CA1 und DG beobachtet werden (Abb. 56, 57). Zusammen mit der starken Expression im Bereich des retrosplenialen Cortex, Amygdala und des Pre- und Postsubiculum ergibt sich eine Expression in Arealen, welche insbesondre mit Lernen und Gedächtnis in Verbindung gebracht werden (Gusev and Gubin, 2010; Gusev et al., 2005; Kesner, 2013; Liu et al., 2012; Robinson et al., 2012). Ein Vergleich mit der Expression von Arc/Arg3.1 (Plath et al., 2006) zeigt eine breite Schnittmenge im Expressionsmuster und erfüllt damit die Voraussetzung für eine gemeinsame molekulare Funktion in synaptischer Plastizitä

.

3.8 AMPAR-Trafficking und die Arc/Arg3.1-SNX7-Interaktion

Die meisten Hinweise zur molekularen Funktionsweise von Arc/Arg3.1 stehen im Zusammenhang mit der Kontrolle des LTD. Die Verringerung des Anteils synaptischer AMPARs während des LTD wird durch die CAE vermittelt (Man et al., 2000). Die Abhängigkeit des LTD von Arc/Arg3.1 und dessen Interaktion mit ENDO2/3 und DYN2 lässt eine regulatorische Funktion bei der Endozytose vermuten. Die hier gezeigte Assoziation zwischen Arc/Arg3.1 und AMPH2 und deren kooperativer Effekt auf die CAE von Tf, unterstützen diese Annahme (Abb. 47). Die Rekrutierung und das Zusammenspiel von ENDO2/3, DYN2 und AMPH2 ist ein zentraler Schritt in der Regulation der Endozytose (Meinecke et al., 2013). Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass die vergleichsweise lange Initiationsphase eine sehr flexible Komponente aufweist (Brach et al., 2014). Die späte Phase, in welcher DYN2, ENDO2/3 und AMPH2 rekrutiert werden, stellt eine Art Kontrollpunkt dar. Wird dieser passiert, wird das Vesikel endozytiert. Die Bindung von Arc/Arg3.1 an alle drei Proteine weist daher auf eine regulatorische Funktion in diesem Schritt hin.

Insbesondere Untersuchungen zum mGluR-LTD zeigen eine Arc/Arg3.1-abhängige Erhöhung der Internalisierungsrate von AMPA-Rezeptoren (Waung et al., 2008). Ein positiver Einfluss von Arc/Arg3.1 auf den Kontrollpunkt der Endozytose zu Gunsten der Internalisierung von AMPARs könnte diesen Effekt erklären. Es stellt sich jedoch die Frage, wie die Spezifität für AMPARs im Allgemeinen und AMPAR-Subtypen im Speziellen erreicht werden kann. Die unveränderten synaptischen Grundeigenschaften und die starke Beeinträchtigung der Gedächtniskonsolidierung in Arc/Arc3.1-KO-Mäusen (Plath et al., 2006) weisen zudem auf eine sehr spezifische und vom konstitutiven AMPAR-Trafficking unabhängige Wirkung von Arc/Arg3.1 hin. Es existieren zwei mögliche Erklärungen wie Arc/Arg3.1 die Spezifität vermittelt. Eine Möglichkeit ist die direkte oder indirekte Interaktion von Arc/Arg3.1 mit noch nicht identifizierten AMPAR-Adaptorproteinen. Eine andere Möglichkeit ist die grundsätzliche Erhöhung der Endozytoserate und eine nachfolgende spezifische Sortierung der AMPARs in Endosomen.

Ein Hinweis auf den Mechanismus ergibt sich aus der hier gezeigten Assoziation zwischen SNX7 und CPG2 (Abb. 48) und deren Kolokalisation mit Arc/Arg3.1 in Spines (Abb. 49). Das aktivitäts-regulierte und Neuronen-spezifische CPG2 ist in der EZ lokalisiert und bindet in Abhängigkeit der PKA-vermittelten Phosphorylierung an f-Actin. Der Knock-down von CPG2 führt zur Störung der CAE sowie der konstitutiven und induzierten Internalisierung

von AMPARs (Cottrell et al., 2004; Loebrich et al., 2013). Diese Ergebnisse legen nahe, dass CPG2 ein zentrales Strukturprotein der EZ ist und deren Kapazität an die jeweiligen Anforderungen synaptischer Plastizität anpasst. Im gleichen Maße könnte CPG2 auch die Menge an SNX7 und Arc/Arg3.1 an der EZ regulieren und somit an eine veränderte Kapazität der CAE anpassen. CPG2 bindet an f-Actin und die TIRF-mikroskopische Untersuchung von Arc/Arg3.1 und SNX7 in dieser Arbeit legen eine Assoziation beider Proteine mit cortikalen Actin-Fasern nahe (Abb. 46). Die Regulation der Actin-Dynamik ist ein zentraler Bestandteil der CAE (Collins et al., 2011; Ferguson et al., 2009) und die Assoziation aller drei Proteine mit Actin weist auf deren Funktion in grundlegenden strukturellen Prozessen der CAE hin. Interessanterweise ist die Internalisierungsrate von AMPARs von der synaptischen Aktivität abhängig und kann durch die Aktivierung verschiedener Glutamatrezeptoren induziert werden. Die nachfolgende Sortierung der AMPARs unterscheidet sich jedoch in Abhängigkeit der Stimulation (Ehlers, 2000). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch die Induktion einer LTP zu einer erhöhten CAE führt (Toni et al., 2001). Demnach entspricht eine erhöhte AMPAR-Internalisierung einer allgemeinen Erhöhung der Dynamik des Rezeptor-Cyclings während synaptischer Plastizität. Der Verlust von Arc/Arg3.1 in Knock-out-Tieren zeigt, dass Arc/Arg3.1 insbesondere in den späten Phasen für die Aufrechterhaltung von LTD und LTP verantwortlich ist. Dies deutet darauf hin, dass Arc/Arg3.1 für die Konsolidierung der initialen Veränderungen der AMPAR-Komposition während synaptischer Plastizität verantwortlich ist.

Die Komplexität der Wirkung von Arc/Arg3.1 lässt sich nicht mit einer einfachen Erhöhung der Endozytose von AMPARs erklären. Es stellt sich also die Frage, welche weiterreichenden Folgen einer Rekrutierung von SNX7 und Arc/Arg3.1 an die Maschinerie der CAE haben könnte. Ein Hinweis lässt sich aus der präsynaptischen Funktion von Endophilin-A1 (ENDO1) ableiten. Es konnte gezeigt werden, dass ENDO1 neben seiner gut etablierten Funktion während der CAE auch die Freisetzungs-Wahrscheinlichkeit von synaptischen Vesikeln reguliert (Weston et al., 2011). Zusätzlich ist die Lieferung von ENDO1 an die Plasmamembran von der Exozytose der synaptischen Vesikel abhängig (Bai et al., 2010). Dies zeigt, dass die einzelnen Schritte des Rezeptor-Cyclings nicht als unabhängige Instanzen betrachtet werden können und dass die Kopplung der einzelnen Schritte durch BAR-Proteine wie Endophilin vermittelt werden kann. Es gibt Hinweise, dass auch auf postsynaptsicher Ebene eine Kopplung der Endozytose mit nachfolgenden Schritten im Rezeptor-Cycling existiert (Somsel Rodman and Wandinger-Ness, 2000). So ist die induzierte,

jedoch nicht die konstitutive Endozytose von AMPARs von der GTPase Rab5 abhängig (Brown et al., 2005), welche ebenfalls eine wichtige Rolle in der nachfolgenden endosomalen Sortierung spielt (Stenmark, 2009). Es ist also denkbar, dass SNX7 und Arc/Arg3.1 an die endozytische Zone rekrutiert werden und anschließend gemeinsam mit endozytischen AMPAR-Vesikeln in Frühe Endosomen übergehen. Die endosomale Regulation des AMPAR-Recyclings und Degradation könnten dann für eine spezifische Anpassung der synaptischen AMPAR-Oberflächenexpression sorgen. Tubuläre Endosomen, wie sie durch SNX-Dimere generiert werden (van Weering et al., 2011) sind in Neuronen insbesondre in Spines zu finden (Cooney et al., 2002). Tatsächlich hat sich die Endosomale Sortierung und das Recycling von AMPARs als zentrales Stellwerk das AMPAR-Trafficking in synaptischer Plastizität erwiesen (Anggono and Huganir, 2012). Es konnte gezeigt werde, das AMPARs in Abhängigkeit des Plastizität-induzierenden Stimulus, unterschiedlicher endosomaler Sortierung unterliegen (Ehlers, 2000) und das diese Sortierung von der Zusammensetzung der AMPAR-Untereinheiten abhängig ist (Lee et al., 2004).

Die in dieser Arbeit gezeigte Bindung von Arc/Arg3.1 an SNX7 (Abb. 19, 20, 25) und das SNX7/4-Heterodimer (Abb. 28) zeigt zum ersten Mal eine direkte Verbindung zwischen Arc/Arg3.1 und der endosomalen Sortierungsmaschinerie. Eine Verbindung mit der endosomalen Sortierung von AMPARs ergibt sich aus der Kolokalisation von SNX7 mit GluA1 (Abb. 18) und der Bindung von SNX4 an KIBRA. KIBRA ist mit humanen Gedächtnisfähigkeiten assoziiert (Papassotiropoulos et al., 2006) und der Knock-out in Mäusen führt zu einer Beeinträchtigung von LTP, LTD und der Lernleistung der Tiere. Darüber hinaus konnte auch eine Bindung an das GluA2/3-Adapterprotein PICK1 und die Assoziation mit AMPAR-Komplexen gezeigt werden (Makuch et al., 2011). KIBRA bindet zudem an DLC1 (Dynein light chain 1), über die es den Transport von SNX4-positiven, tubulären Vesikeln von frühen Endosomen zum endozytischen Recycling-Kompartiment vermittelt (Traer et al., 2007). Es ist anzunehmen, dass KIBRA auch am SNX7/4-vermittelter Sortierung und Transport beteiligt ist. Das SNX7/4-Heteromer ist im Gegensatz zu SNX4 nur geringfügig mit Rab11-positiven Endosomen assoziiert (Abb. 35). Dies deutet auf eine distinkte Sortierungsfunktion des SNX7/4-heteromers an Rab4-positiven Endosomen hin. Die Beteiligung von SNX4 lässt dennoch eine Funktion im Rezeptor-Recycling vermuten, die jedoch unabhängig von der SNX4-vermittelten Sortierung des TfR ist. Hinweise auf eine Funktion von Arc/Arg3.1 in der endosomalen Sortierung liefert auch dessen Interaktion mit PSEN1 und dem damit verbundenen, aktivitäts-abhängigen Einfluss auf die Prozessierung von APP

und Notch1 (Alberi et al., 2011; Wu et al., 2011).

Zusammengefasst ergibt sich ein Modell, in welchem Arc/Arg3.1 die Konsolidierung der synaptischen Plastizität über die Kopplung von Endozytose und endosomaler Sortierung reguliert. Die Menge an Arc/Arg3.1 und SNX7 an der EZ könnte durch die Assoziation mit CPG2 und dessen aktivitäts-abhängiger Skalierung der EZ reguliert werden. Die Kontrolle der Endozytose über eine Interaktion mit AMPH2 könnte nicht nur für eine erhöhte Endozytoserate sorgen, sondern auch für einen Kotransport von Arc/Arg3.1, SNX7 und AMPARs zu frühen Endosomen. Die Bindung von Arc/Arg3.1 an das SNX7/4-Heteromer könnte dann die Sortierung dieser AMPARs in Abhängigkeit der synaptischen Plastizität regulieren. In welche Richtung Arc/Arg3.1 die Sortierung beeinflusst könnte von dessen plastizitätsabhängiger, posttranslationaler Modifikation oder der Interaktion mit verschiedenen Untereinheiten der CaMKII abhängig sein (Okuno et al., 2012). Die lokale Translation von Arc/

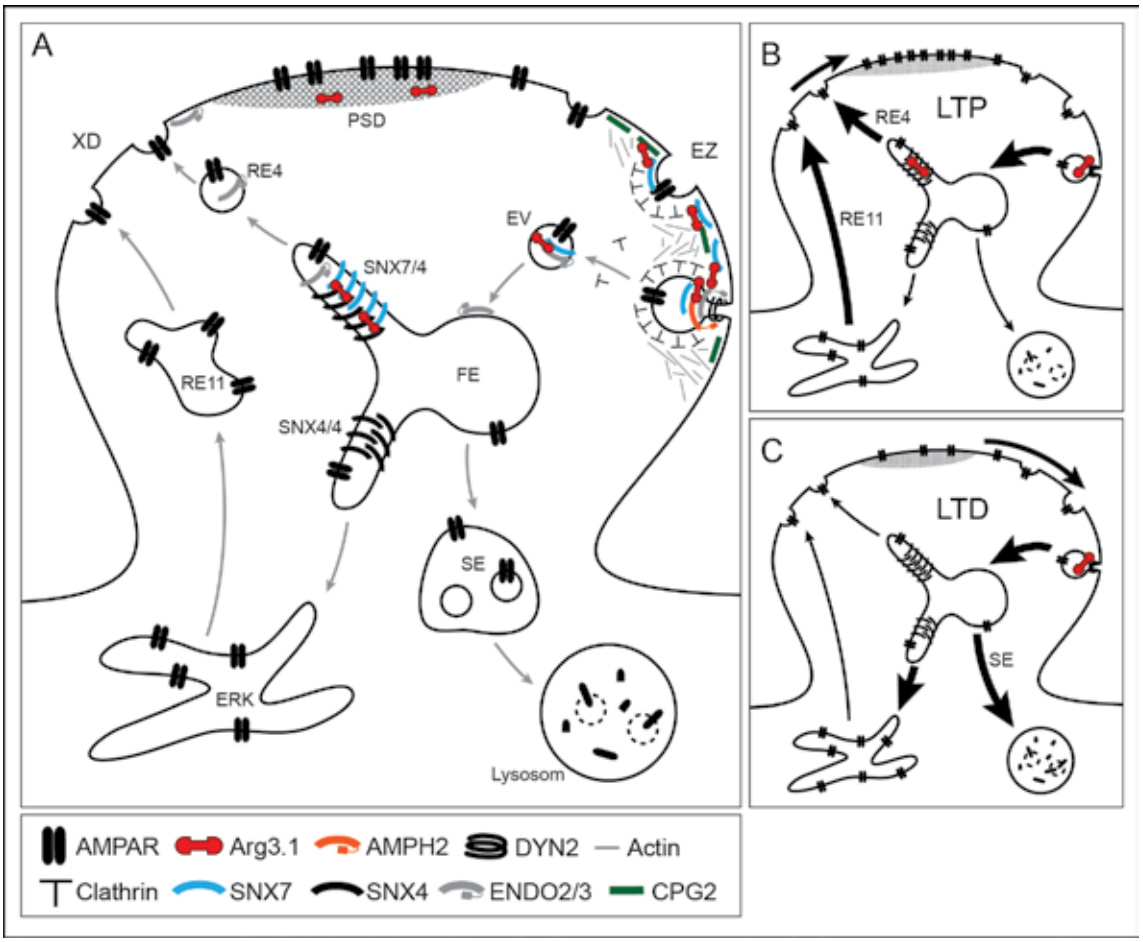

Abbildung 59: Modell der Arc/Arg3.1-SNX7-Interaktion in synaptischer Plastizität.
(A) Lokalisation von SNX7 und Arc/Arg3.1 in dendritischen Spines und dem endosomalen System. Arc/Arg3.1 und SNX7 sind über die Assoziation mit CPG2 an der endozytischen Zone (EZ) lokali-

siert. CPG2 skaliert die allgemeine Endozytose-Maschinerie und assoziierte Proteine wie Arc/Arg3.1 und SNX7 an der EZ in Abhängigkeit der synaptischen Aktivität. Arc/Arg3.1 selbst reguliert über die Bindung an AMPH2 den finalen Schritt der Endozytose und geht gemeinsam mit SNX7 und ENDO2/3 in frühe Endosomen über. An frühen Endosomen reguliert Arc/Arg3.1 über die Bindung an SNX7/4 die plastizitäts-abhängige Sortierung von AMPARs. Damit koppelt Arc/Arg3.1 die Prozesse der Endozytose und der endosomalen Sortierung im AMPAR-Cycling (B) Wird eine LTP induziert, werden neue AMPARs über Rab11-positive Recycling-Endosomen (RE11) an die synaptische Membran geliefert. Die Erhöhung der Endozytoserate verhindert, dass diese AMPARs durch laterale Diffusion den Spine wieder verlassen und so dem lokalen AMPAR-Pool verloren gehen. Die Konsolidierung der LTP wird von Arc/Arg3.1 auf zwei Ebenen reguliert. 1. Arc/Arg3.1 hält die erhöhte Endozytoserate aufrecht. 2. Über die Bindung an das SNX7/4-Heteromer erhöht Arc/Arg3.1 das schnelle Recycling von AMPARs über Rab4-positive Recycling-Endosomen (RE4) zurück in die Synaptische Membran. Die so im lokalen AMPAR-Cycling "gefangenen" Rezeptoren können dann durch die Anpassung der Kapazität in die PSD integriert werden und für eine lang andauernde Potenzierung sorgen. (C) Wird eine LTD induziert erhöht sich ebenfalls die Endozytoserate von AMPARs. Arc/Arg3.1 hält die erhöhte Endozytoserate aufrecht, bindet jedoch nicht an das SNX7/4-Heteromer. Ohne die Erhöhung des schnellen Recyclings der AMPARs zurück in die synaptische Membran, werden diese verstärkt in das ERK oder hin zu Lysosomen sortiert. Der dardurch reduzierte AMPAR-Cycling-Pool im Spine kann dann durch entsprechende Adaption der PSD zu einer lang-anhaltenden Depression führen.
XD = Exozytische Domäne; EZ =Endozytische Zone; PSD = Postsynaptische Dichte; EV = Endozytisches Vesikel; FE = Frühes Endosom; SE = Spätes Endosom; ERK = Endozytisches Recycling-Kompartiment; RE11 = Rab11-Recycling-Endosom; RE4 = Rab4-Recycling-Endosom; SNX7/4 = Sorting Nexin-7/4-Heterodimer; SNX4/4 = Sorting Nexin-4-Homodimer; AMPAR = α-amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole-propionic-acid-Rezeptor; AMPH2 = amphiphysin-2; DYN2 = Dynamin-2; ENDO2/3 = Endophilin-2/3; CPG2 = Candidate plasticity gene 2.

Arg3.1 (Dynes and Steward, 2012; Park et al., 2008; Wallace et al., 1998; Waung et al., 2008) könnte insbesondere in den späten Phasen der plastischen Änderungen für eine synapsenspezifische und andauernde Regulation der endosomalen Sortierung sorgen. In der Frühen Phase einer LTP werden neue AMPARs über Rab11-positive Recycling-Endosomen (RE11) an die synaptische Membran geliefert. Die Erhöhung der Endozytoserate verhindert, dass diese AMPARs durch laterale Diffusion den Spine wieder verlassen und so dem lokalen AMPAR-Cycling-Pool verloren gehen. Arc/Arg3.1 könnte nicht nur die verstärkte Endozytose aufrechterhalten sondern auch über die Bindung an das SNX7/4-Heteromer für ein schnelles Recycling der AMPARs zurück an die synaptische Membran sorgen. Die Konsolidierung der LTP kann dann über eine entsprechende Adaption der

AMPAR-Kapazität der PSD finalisiert werden. Unter den Bedingungen einer LTD würde Arc/Arg3.1 auch für eine Aufrechterhaltung der verstärkten Endozytose sorgen, jedoch nicht an das SNX7/4-Heteromer binden. Ohne die Arc/Arg3.1-vermittelte Erhöhung des Schnellen Recyclings werden AMPARs in den Recycling-Pool des ERK oder hin zu Lysosomen sortiert. Die dadurch andauernde Verringerung des AMPAR-Cycling-Pools führt dann zum Abbau der überschüssigen Kapazitäten der PSD und somit zur Konsolidierung der LTD (Abb. 59).

3.9 Ausblick

Weiterführende Analysen der Funktion von SNX7 in der endosomalen Sortierung und des Einflusses der Bindung von Arc/Arg3.1 sind für ein genaueres Verständnis der funktionellen Zusammenhänge in synaptischer Plastizität notwendig. Die Analyse des Rezeptor-Traffickings in SNX7-Knock-down HeLa-Zellen kann zur Untersuchung des Beitrags von SNX7 in der Sortierung von Membranproteinen verwendet werden. Hierbei sollten insbesondere die Unterschiede zwischen dem SNX4-Homodimer und dem SNX7/4-Heteromer betrachtet werden. Unter Verwendung der Arc/Arg3.1-bindungsdefizienten Mutanten von SNX7 (Abb. 25), kann der Einfluss der Bindung von Arc/Arg3.1 an SNX7 in der endosomal Sortierung untersucht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten SNX7-Knock-out-Mäuse (Abb. 50-53, 58) sind ein hervorragendes Werkzeug, die Funktion von SNX7 in synaptischer Plastizität auf systemischer Ebene zu untersuchen. Primäre hippocampale Neuronenkulturen der KO-Tiere können für Untersuchungen des Rezeptor-Traffickings im Allgemeinen und des AMPAR-Traffikings im Speziellen verwendet werden. Mit Hilfe von Rescue-Experimenten mit SNX7 und dessen Arc/Arg3.1-bindungsdefizienten Mutanten, kann die allgemeinen Funktion von SNX7 und die Funktion der Bindung von Arc/Arg3.1 an SNX7 differenziert werden. Darüber hinaus kann der elektrophysiologische und verhaltensbiologische Vergleich von WT und SNX7-KO-Tieren wertvolle Information über den Beitrag von SNX7 in synaptischer Plastizität und Lernen und Gedächtnis liefern.

4. MATERIAL & METHODEN

4.1 Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 1: PBS 10x (Phosphate buffered Saline)

Reagenz	Endkonzentration	
NaCl	1,73	M
KCl	27,00	mM
Na_2HPO_2(*$2H_2O$)	81,00	mM
KH2PO4	14,70	mM

Tabelle 2: LB-Agar-Platten

Reagenz	Endkonzentration	
LB-Medium (Luria/Miller; Carl Roth)	25	%
Agar, Kobe I (Carl Roth)	15	%
Abtibiotikum	Siehe Tabelle 3	

LB-Medium und Agar werden autoklaviert und auf 55°C abgekühlt bevor das Antibiotikum hinzugefügt wird. Anschließend werden die Platten gegossen.

Tabelle 3: Antibiotika für LB- und DYT-Medien

Reagenz	Endkonzentration	
Kanamycin	50	µg/ml
Ampicillin	100	µg/ml
Tetracyclin	5	µg/ml
Cloramphenicol	34	µg/ml

Tabelle 4: DYT-Medium pH 7.0 (Carl Roth)

Reagenz	Endkonzentration	
Trypton	16	g/l
Hefeextrakt	10	g/l
NaCl	5	g/l

Tabelle 5: SOC-Medium

Reagenz	Endkonzentration	
Trypton	2	%(w/v)
Hefeextrakt	0,5	%(w/v)
NaCl	10	mM
KCl	2,5	mM
$MgCl_2$	10	mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10	mM
Glucose	20	mM

Das Medium wird ohne Mg_2+ hergestellt und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Vor Gebrauch wird dem Nährmedium 20 mM (10 ml/l) einer 2 M Mg^{2+}-Lösung zugegeben, welche aus 1

M $MgCl_2 \bullet 6H_2O$ und 1 M $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ hergestellt wurde. Der pH-Wert beträgt 6,8 bis 7.

Tabelle 6: STET-Lösung

Reagenz	Endkonzentration	
TrisHCl pH 8	50	mM
Sucrose	8	%(w/v)
Triton X-100	0,1	%(v/v)
EDTA pH 8	50	mM

Tabelle 7: Verwendete KITs

KIT	Firma	Produkt#
PCR clean-up and Gel extraction Kit	Macherey-Nagel	740609
NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel	740410
Gateway pENTR/D-TOPO Cloning KIT	Invitrogen	45-0218
Gateway LR Clonase II Plus Enzyme Mix	Invitrogen	12538-120
MegaPrime DNA Labelling System	GE Healthcare	RPN1604
mini Quick Spin DNA Columns	Roche	11814419001
Bright-Glo Luciferase Assay System	Promega	E2620

Tabelle 8: DNA-Ladepuffer 10x

Reagenz	Endkonzentration	
TrisHCl pH 7,6	10	mM
Glycin	50	%
EDTA pH 8.0	60	mM
Bromphenolbau	0,25	%
Xylencyanol	0,25	%

Tabelle 9: SSC 20x (pH 7,0)

Reagenz	Endkonzentration	
NaCl	3	M
Natriumcitrat	0,3	M

Tabelle 10: Proteinproben-Puffer 5x

Reagenz	Endkonzentration	
TrisHCl pH 6,8	250	mM
SDS	20	%(w/v)
Glycerin	50	%(v/v)
Bromphenolblau	0,01	%(w/v)
β-Mercaptoethanol	20	%(v/v)

Tabelle 11: Coomassie-Färbelösung

Reagenz	Endkonzentration	
MeOH	50	%(v/v)
CH_2COOH	10	% (v/v)
Briliant Blau R250	0,1	%(w/v)

Tabelle 12: HANKS-Medium

Reagenz	Endkonzentration	
HANKS' balanced salt10x (Sigma H2387-10X1L)	1	x
$NaHCO_3$	0,035	%(w/v)
HEPES	2	%(w/v)

Der pH wird auf 7,3-7,4 eingestellt und alles steril filtriert.

Tabelle 13: HANKS-Medium + FCS

Reagenz	Endkonzentration	
HANKS-Medium	80	%(v/v)
FCS	20	%(v/v)

Tabelle 14: DNAse-Lösung

Reagenz	Endkonzentration	
DNAse (Sigma D5025)	75	kU/ml
NaCl	150	mM

Tabelle 15: Dissoziations-Medium

Reagenz	Endkonzentration	
HANKS-Medium	1	x
$MgSO_4 \cdot 7xH_2O$	12	mM
DNAse-Lösung	0,02	%(v/v)

Tabelle 16: Verdau-Puffer

Reagenz	Endkonzentration	
DNAse-Lösung	0,02	%
NaCl	137	mM
KCl	5	mM
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	7	mM
HEPES	25	mM
Papain	1	mg/ml

Tabelle 17: Neuronales Wachstums-Medium (NWM)

Reagenz	Volumen	
Lonza PNBM (Clonetics cc-3256)	250	ml
NSF-1 (Clonetics cc-4459HH)	4	ml
L-Glutamine (Clonetics cc-4460HH)	2	ml
GA-1000 Gentamicine sulfate (Clonetics cc-4505HH)	200	µl

Tabelle 18: Primär-Antikörper

Antigen	Host	WB	ICC	Produkt#	Firma
Arc/Arg3.1	Kaninchen	1:10000		156-003	SySy
DsRed	Kaninchen		1:500	632496	Clontech
HA	Maus	1:1000	1:1000	MMS-101R	Covance
Myc	Maus	1:1000		MMS-150P	Covance
PSD95	Maus		1:200	ABR-1204	Dianova
GFP	Huhn	1:10000	1:10000	ab13970	Abcam
SNX7	Huhn	1:1000		ab37691	Abcam
SNX7	Kaninchen	1:1000		PA5-30623	Thermo

Tabelle 19: Sekundär-Antikörper

Antigen	Kunjugat	Host	WB	ICC	Produkt#	Firma
Maus-IgG	HRP	Ziege	1:10000			Vector
Kaninchen-IgG	HRP	Ziege	1:10000			Vector
Huhn-IgY	HRP	Kaninchen	1:10000		G135A	Promega
Maus-IgG	Alexa488	Ziege		1:10000	A-11001	Invitrogen
Maus-IgG	Alexa555	Ziege		1:10000	A21422	Invitrogen
Maus-IgG	DyLight633	Ziege		1:10000	35513	Thermo
Kaninchen-IgG	Alexa488	Ziege		1:10000	A11008	Invitrogen
Kaninchen-IgG	Alexa555	Ziege		1:10000	A21428	Invitrogen
Kaninchen-IgG	DyLight633	Ziege		1:10000	35563	Thermo
Huhn-IgY	Alexa488	Ziege		1:10000	A11039	Invitrogen
Huhn-IgY	Alexa555	Ziege		1:10000	A21437	Invitrogen
Huhn-IgY	Alexa633	Ziege		1:10000	A21103	Invitrogen

Anschrift der Antikörper-Firmen:

Abcam (Abcam plc, 330 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FL, UK); Covance (via HiSS Diagnostics GmbH, Güterhallenstraße 3, 79106 Freiburg i.Br.,Germany)

Dianova (DIANOVA GmbH, Warburgstraße 45, 20354 Hamburg , Germany)

SySy (Synapic Systems, Rudolf-Wissell-Str. 28, 37079 Göttingen, germany)

VECTOR LABORATORIES LTD.(3, Accent Park, Bakewell Road, Orton Southgate, Peterborough, PE2 6XS, United Kingdom)

Thermo Fisher Scientific Inc. (3747 N Meridian Rd, Rockford, IL USA 61101)

Invitrogen (Life Technologies, 3175 Staley Road, Grand Island, NY 14072, USA)

Tabelle 20: *Lysis Buffer* (LB)

Reagenz	Endkonzentration	
NaCl	100	mM
Tris-HCl ph7,5	50	mM
NP40	0,5	%
Proteaseinh. (Roche 11873580001)	1	x
PMSF	1	mM

Tabelle 21: *Dilution Buffer* (DB)

Reagenz	Endkonzentration	
NaCl	100	mM
Tris-HCl ph7,5	50	mM
Triton X 100	0,01	%
Proteaseinh. (Roche 11873580001)	1	x
PMSF	1	mM

Tabelle 22: Sammelgel für SDS-PAGE

Reagenz	Endkonzentration	
Acrylamid:Bisacrylamid (29:1; 30%w/v)	10	%
Tris-HCl pH 8,8	380	mM
SDS	0,1	%(w/v)
APS	0,05	%(w/v)
TEMD	0,05	%(v/v)

Tabelle 23:Trenngel für SDS-PAGE

Reagenz	Endkonzentration	
Acrylamid:Bisacrylamid (29:1; 30%w/v)	4	%
Tris-HCl pH 6,8	125	mM
SDS	0,1	%(w/v)
APS	0,05	%(w/v)
TEMD	0,05	%(v/v)

Tabelle 24: Laufpuffer für SDS-PAGE

Reagenz	Endkonzentration	
Tris-Base	250	mM
Glycin	1,92	M
SDS	1	%

Tabelle 25: *Blotting Buffer* (BB)

Reagenz	Endkonzentration	
Tris-Base	25	mM
Glycin	192	mM
Methanol	10	%

Tabelle 26: *Rinse Buffer* (RB)

Reagenz	Endkonzentration	
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	100	mM
MgCl2	2	mM
NP-40	0,02	%(v/v)

Tabelle 27: β-Gal-Färbelösung

Reagenz	Endkonzentration	
Rinse Buffer	1	x
$K_3[Fe(CN)_6]$	5	mM
$K_4[Fe(CN)_6] \bullet 3H_2O$	5	mM
X-Gal	1	Mg/ml

Tabelle 28: Genotypisierungsprimer

Name	Sequenz	For/Rev	Genotyp
G1	ATTCCCAGCCTGGATTTCTT	for	alle
G2	ATGCTCCTAGGAACCCTGCT	rev	+, p
G3	AATCTTTCTGGCCTCGTTTG	for	d
G4	GTCACTGCAGTTTAAATACAAGACG	rev	-

Tabelle 29: Sonden

Anwendung	Zielsequenz	5‘-Start	3‘Ende	Länge (NT)
ISH	CDS	NT612 TCTTCCTATA…	NT1338 …GAAACTTTAA	711
Southern Blot	Intron6-7	NT1907 GGTTACCAGA…	NT2797 …TCAGGTGACC	890

Tabelle 30: Homogenisierungspuffer

Reagenz	Endkonzentration	
Sucrose	320	mM
HEPES/KOH	4	mM
$MgCl_2$	2	mM
$CaCl_2$	2	mM
DTT	1	mM
PMSF	1	mM
Poteaseinh. (Roche 11873580001)	1	x

Tabelle 31: Exprimierte Proteine

Name	Spezies	Variante	Größe (AS)	Ensembl#
SNX7	Maus	WT	445	ENSMUST00000029639
Arc	Maus	WT	396	ENSMUST00000023268
SNX4	Maus	WT	450	ENSMUST00000023502
AMPH2 ΔCLAP	Maus	WT CLAP	588 410	Basierend auf ENST00000316724 Easierend auf ENST00000348750
DYN2 DYN2dn	Maus	WT K44A	869	ENSMUST00000173397
Clathrin	Maus	Clta (LC)	1710	ENSMUST00000107846

4.2 Technische Gerätschaften

DNA-Analyse und Amplifikation

DNA-Konzentrations-Bestimmung: NanoDrop2000 Spektrometer (thermo Scientific)

Agarose-Gelelextrophorese: PerfectBlue chamber (PaqLab)

PCR: T-Professional Trio Thermocycler (Biometra)

Radioaktive Southern-Blots: FLA-3000 (Fujifilm)

Protein-Analyse

DNA-Konzentrations-Bestimmung: SLT Rainbow Scanner (SLT Labinstruments)

SDS-PAGE: Minigel-Twin chambers (Biometra)

Western-Blot: Trans-cell tank blot chamber (Biorad)

Immundetektion via Chemilumineszenz: ImageQuant LAS4000mini detector (GE Healthcare)

Luciferase-vermittelte Chemilumineszenz: Victor3 Multilabel counter (PerkinElmer)

Hirndünnschnitte

Fixiert: VT 1200 S microtome + VibroCheck (Leica)

Schockgefroren: Hyrax C60 Cryotom (Microm GmbH)

Mikroskope

Olympus Fluoview 1000

Laserlinien: AR (458nm, 476nm, 488nm, 514nm); GreNE (543nm); HeNe (633nm)

Filter: AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter)

Software: Olympus Fluoview

Leica TCS SP5

Laserlinien: Diode 405 nm/ Multi-Ar 458 nm/ 476 nm/ 488 nm/ 514 nm; DSS: 561 nm; HeNe 633 nm

Software: Leica LAS

Zeiss LSM 700 Imeger.M2

Laserlinien: Diode 488/555/639

Software: ZEN

Olympus cell^tool TIRFM System

Laserlinien: Diode 488 nm/ 561 nm

Software: cell excellence RT

Applikationen: Epifluoreszenz, total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM),Lebend-Zell-Mikroskopie in einer Klimakammer mit Temperature, Humiditäts- und CO2-Kontrolle

4.3 Molekularbiologie

4.3.1 Transformation

Chemisch kompetente E.coli-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 50 µl der Suspension mit 10 ng Plasmid-DNA gemischt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien bei 42 °C für 30 sec Hitze-geschockt und anschließend mit 250 µl SOC-Medium (Tabelle 5) für 45 min bei 37°C geschüttelt. 50 und 150 µl der Transformierten Bakterien wurden jeweils auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion (Tabelle 3)

ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert.

4.3.2 DNA-Minipräperation

Einzelkolonien von LB-Platten werden in 3 ml DYT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion bei 37°C über Nacht (ü.N.) im Schüttler kultiviert. 1.5 ml der Kultur werden pelletiert und in 200 µl STET-Puffer (Tabelle 6) mit Lysozym resuspendiert. Nach 2 min bei 95°C werden Zelltrümmer und genomische DNA bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert und das entstehende Pellet wird verworfen. Der Überstand wird mit 10 µl CTAB (5% Cetyltrimethylammoniumbromid, 0,5 M NaCl) versetzt und 5 min bei 13000 rpm zetrifugiert. Das DNA-Pellet wird anschließend in 300 µl NaCl (1,2M) gelöst und mit 750 µl EtOH bei 13000 rpm für 10 min gefällt. Es folgt ein Waschschritt mit 70% EtOH für 5 min bei 13000 rpm. Das DNA-Pellet wird getrocknet bis es eine opale Färbung aufweist und anschließend in 200µl H_2O gelöst.

4.3.3 DNA-Midipräperation

Die DNA-Midipräparation wurde nach den angaben des Herstellers mit dem NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt. Transformierte E.coli-Bakterien wurden ü.N. in 100 ml DYT-Medium bei 37°C unter Agitation kultiviert.

4.3.4 Verdau, Extraktion und Ligation der DNA

Der Verdau von Plasmid- und PCR-DNA wurde nach Herstellerangaben mit den entsprechend Puffern und Temperaturen für die Restriktionsenzyme durchgeführt. 1µg DNA wurde in 20 µl Gesamtvolumen mit 1 µl des Enzyms für 45 min verdaut. Die verdaute DNA wurde mit DNA-Ladepuffer (Tabelle 8) versetzt und elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Nach der Färbung der DNA mit Ethidiumbromid wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und nach den Angaben des Herstellers mit dem *PCR clean-up and Gel extraction Kit* (Macherey-Nagel) extrahiert. Zur Ligation wurden 20 ng des Vektors und die 5-fache molare Menge des Inserts in 10 µl Gesamtvolumen mit der T4-Ligase (Fermentas) im entsprechenden Puffer für 1 h bei Raumteperatur (RT) inkubiert.

4.3.5 Gateway Cloning

Das Gateway-Klonierungssystem (Invitrogen) ermöglicht die Klonierung ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen und mit besseren Selektionsmöglichkeiten. Zunächst wird mit Hilfe des pENTR-D-TOPO Kits (Tabelle 7) ein sog. Entry-Vektor mit einem entsprechenden Insert generiert (siehe TOPO-Reaktion). Unter Verwendung eines Rekombinase Kits (Tabelle 7), kann dass Insert aus dem Entry-Vektor in jeden beliebigen Destination-Vektor überführt werden (siehe LR-Reaktion). Dies ermöglicht eine schnellere und flexiblere Generierung von Expressionsvektoren.

TOPO-Reaktion

Vorraussetzung für TOPO-Reaktion sind zum einen eine PCR-Produkt welches am 5'-Ende mit der Sequenz CACC beginnt. Diese Sequenz gewährleistet die korrekte Orientierung des Inserts. Zum Anderen benötig man den pENTR-D-TOPO-Vektor (Entry-Vektor) welcher linearisiert und mit Topoisomerasen gekoppelt ist welche die Ligation der PCR-Produktes katalysieren. 8 ng des Vektors wurden mit der 2-fachen molaren Menge des PCR-Produktes und 0,5 µl Salzlösung in einem Gesamtvolumen von 3 µl für 15 min bei RT inkubiert.

LR-Reaktion

Durch eine LR-Reaktion wird ein Insert aus einem Entry-Vektor über eine Rekombinase (Clonas) in einen Destination-Vektor übertragen. Gleichzeitig wird ein "Selbstmordgen" aus dem Destination-Vektor entfernt, was eine bessere Selektion ermöglicht. Die Kombination aus drei Selektionsfaktoren ermöglicht eine effiziente Auswahl erfolgreich rekombinierter Vektoren. Nur Vektoren mit Insert besitzen zum einen kein "Selbstmordgen" mehr und zum anderen eine Ampicillin-Resistenz auf welche selektioniert wird. Entry-Vektoren besitzen eine Kanamycin-Resistenz und werden so ausselektioniert. Für eine LR-Reaktion werden 60 ng beider Vektoren mit 0,5 µl Clonase in TE-Puffer pH8 in einem Gesamtvolumen von 4 µl für 1h bei RT inkubiert.

4.4 Biochemie

4.4.1 Immunpräzipitationen aus immortalisierten Zelllinien

Immunpräzipitationen wurden mit der GFP-Trap-Technologie (Chromotek) durchgeführt. Diese Technologie ermöglicht eine effiziente Aufreinigung von GFP und GFP-Fusionsproteinen über Lama-Antikörper welche an magnetische Beads gekoppelt sind. Die Immunpräzipitationen wurden wie folgt durchgeführt: Transfizierte HeLa-Zellen wurden in eiskaltem 1xPBS geerntet und bei 1200 g 2 min abzentrifugiert. Die geernteten Zellen wurden in 200 µl Lysis Buffer (Tabelle 20) auf Eis unter mehrfachem auf- und abpepettieren für 30 min lysiert. Das Lysat wurde im Anschluss 10 min bei 20000 g ,4°C zentrifugiert und der Überstand mit 850 µl DB (Tabelle 21) verdünnt. Das so erhaltene Lysat wurde als Input verwendet und 50 µl als Input-Kontrolle mit 5x Proben-Puffer (Tabelle) versetzt. 10 µl GFP-Trap-Beads wurden mehrfach mit DB gewaschen und anschließend mit dem Input für 1h bei RT im Überkopfschütler inkubiert. Nach 4-maligem waschen mit 400 µl DB wurden die Beads mit 30 µl 2x Probenpuffer versetzt und gemeinsam mit der Input-Kontrolle für 5 min auf 95 °C erhitzt.

4.4.2 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis)

Die Auftrennung von Proteinen wurde in aufrechten Electrophorese-Kammern (siehe 4.2) wie folgt durchgeführt: Diskontinuierliche, 10%ige Acrylamidgele wurden mit einer jeweiligen Polymerisationszeit von 30 min für Sammel- und Trenngel gegossen (Tabelle 23). Das Trenngel wurde währen der Polymerisation mit 0,1%iger SDS-Lösung überschichtet um eine blasenfreie und gerade Kante zu erhalten. Die Gele wurden mit Proteinproben beladen und die Fokussierung der Proben im Sammelgel bei 80 V durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel wurde bei 150 V für ca. 1,5 h durchgeführt. Laufpuffer siehe Tabelle 24.

4.4.3 Western Blot

Die Übertragung der Proteine aus Polyacrylamidgelen auf PVDF-Mebranen wurde wie folgt durchgeführt: Gele wurden 15 min in 4°C kaltem *Bloting Buffer* (BB, Tabelle 25)

unter leichter Agitation equilibriert. PVDF-Mebranen wurden für 20 sec in MeOH aktiviert, 2 min in H2O gewaschen und anschließend für 5 min in BB equilibriert. Die Komponenten des Transfer-"Sandwiches" wurden in folgernder Reihenfolge unter Ausschluss von Luftblasen kombiniert: Schwamm, 2x Wortmann-Papier, PVDF-Mebran, 2xWortmann-Papier, Schwamm. Der Transfer wurde nach Herstellerangaben (siehe) im Tank mit Bloting-Buffer bei 4°C und 100 V für 1,5 h durchgeführt. Im Anschluss wurden die Membranen kurz in 1xPBS gewaschen für 10 sec in MeOH inkubiert und 15 min getrocknet. Nach der Reaktivierung in MeOH (s.o.) wurde die Mebran für 1 h in 5% Magermilch, 1xPBS blockiert. Wenn nötig wurden die Membranen nach dem Blockieren mit einem Skalpell zerteilt und mit den entsprechenden primären Antikörpern (Tabelle 18) ü.N. unter leichter Agitation. bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran 3x für 10 min mit PBST (1xPBS + 0.1% Tween-20) gewaschen und für 1 h mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörpern (Tabelle 19) bei RT unter leichter Agitation inkubiert. Nach dem erneuten Waschen (wie zuvor) wurde die Membran in einer Chemilumineszenzlösung nach hersteller Angaben (SuperSignal West Pico, Thermo Scientific) für 1 min inkubiert und die Lumineszenz anschließend per Kamera detektiert (siehe).

4.4.4 Rekombinante Expression von GST-Fusionsproteinen in E.coli

BL21-E.coli-Bakterien wurden mit den entsprechenden bakteriellen Expressionsvektoren transformiert (siehe) und Einzelkolonien ü.N. in 3 ml DYT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion bei 37°C kultiviert. Am Folgetag wurden 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit der Übernacht-Kultur angeimpft und bis zu einer OD600 von 0,6-0,8 bei 37°C im Schüttler kultiviert. Im Anschluss wurde die Expression der GST-Fusionsproteine mit 1mM IPTG für 3-4 h bei 37°C induziert. Die Bakterien wurden bei 1700 g Pelletiert, in 5 ml 1xPBS resuspendert (50x konzentriert) und in 1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die erfolgreiche Expression der GST-Fusionsproteine wurde über Prä- und Postinduktions-Proben in Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen überprüft.

4.4.5 GST-pull-down

GST-Fusionsproteine wurden in BL21-E.coli-Bakterien exprimiert (siehe 4.3.1) und 1 ml Aliquots der Suspensionen auf Eis aufgetaut. Die Proben wurden mit 1% Triton-X100 15

min bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert und anschließend 2x Sonifiziert (15 Stöße, Output 30%, *Duty cycle* 3).Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 20000 g, 4°C, 10 min eintfernt. 20 µl Glutathion-Sepharose-Beads (Glutathione Sepharose 4B Media, GE Healtcare) wurden in 1xPBS + 1% Triton-X100 equilibriert und für 20 min bei RT im Überkopfschüttler mit dem Bakterien-Lysat inkubiert. Im Anschluss wurden die Beads 5x mit 1 ml 1xPBS + 1% Triton-X100 für jeweils 5 min bei RT im Überkopfschüttler gewaschen. Die GST-Fusionsprotein-gekoppelten Beads wurden mit Lysaten aus transfizierten HeLA-zellen (siehe) für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach 5 Waschschritten mit 1xPBS + 0,1% Triton-X100 wurden die Beads mit 20 µl Protein-Probenpuffer (Tabelle 10) versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Der Pull-down der in den HeLa-Zellen Überex-primierten Proteine wurde anschließend per SDS-PAGE und Western-Blot überprüft. Zur Kontrolle der erfolgreichen Kopplung von GST und GST-Fusionsproteinen an die Beads wurde die PVDF-Membran im Anschluss für 3 min in Coomassie (Tabelle 11) gefärbt.

4.5 Zellkultur

4.5.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden 1951 aus einem Zervixkarzinom einer 30-jährigen afroamerikanischen Frau in der Frauenklinik des Johns Hopkins Hospitals in Baltimor gewonnen und die erste andauernd kultivierte Zelllinie daraus generiert (Grey et al., 1952). Die Zellen wurden in 10 cm Petri-Schalen in DMEM (Dulbecco´s modified eagle Medium) + 10% FCS (Fötales Kälberserum) bei 37°C und 5% CO2 kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden diese mit 1xPBS gewaschen und für wenige Minuten mit Trypsin-Lösung (10mg/ml Trypsin in Ca2+/Mg2+ freiem PBS) inkubiert. Kurz vor der Abläsung der Zellen wurde die Reaktion des Trypsins mit DMEM+FCS gestoppt und die Zellen durch auf- und abpipettieren vereinzelt. 10% der Zellen wurden anschließend für die weitere Kultivierung in eine neue Schale überführt und mit frischem Medium versorgt.

4.5.2 Transfektion von HeLa-zellen

HeLa-zellen wurden bei einer Kunfluenz von ca. 95% mit Lipofectamin (Invitriogen) nach den Angaben des Herstellers transfiziert. Das Medium der Zellen wurden 1h for der Trans-

fektion durch OPTI-MEM-I (Invitrogen) ausgetauscht. Nach 4-6 h Transfection wurde das Medium zurück auf DMEM+FCS gewechselt und die Zellen für weitere 12-18 h kultiviert.

4.5.3 Primärkultur hippocampaler Neurone

Hippocampale Neurone wurde aus 16 Tage (E16) alten Maus-Emryonen gewonnen. Die trächtige Maus wurde mit Isufluran narkotisiert und durch Dekapitation getötet. Die entnommen Uteri wurden in 4°C kaltes HANKS-Medium (Tabelle 12) überführt. Nach Entnahme der Embryonen aus den Uteri wurden deren Köpfe in 2 ml Eppis mit HANKS-Medium auf ein aufbewahrt. Die Gehirne der Embyonen wurden anschließend entnommen und in 2 ml Eppis mit HANKS+FCS (Tabelle 13) überführt. Die Hippocampi wurden unter der Stereolupe entnommen und in 10 ml kaltem HANKS+FCS gesammelt. Nach zweimaligem waschen der Hippocampi mit 10 ml HANKS, wurden diese für 30 in Verdau-Puffer (Tabelle 16) bei 37°C verdaut. Nach zwei weiteren Waschschritten mit HANKS-medium wurden die Hippocampi in 2 ml Dissoziations-medium (Tabelle 15) aufgenommen. Zum Vereinzeln der Zellen wurden diese 25x mit einer Pasteurpipette auf- und abpipettiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal mit einer Pasteurpipette mit verengter Öffnung wiederholt. Nach Zugabe von 10 ml HANKS-Medium + FCS wurden die Zellen bei 1000 g, 5 min abzentrifugiert und in NWM (Tabelle 17) resuspendiert. Es wurden 40000-60000 Zellen pro cm2 auf Poly-L-Lysin beschichteten Coverslips (0,5 mg/ml Poly-L-Lysin in H2O, Sigma P2636-25MG) in NWM ausgesäht. Nach 1 h wurde das NMW-Medium durch frisches im Inkubator equilibriertes Medium ersetzt und die Neuronen bis zu deren Fixierung nach 15-20 Tagen in diesem Medium bei 37°C und 5% CO2 Kultiviert.

4.5.4 Transfection von primären hippocampalen Neuronen

Hippocampale Neuronenkulturen wurden zwischen 3 und 6 Tagen *in vitro* mit Lipofectamin (Fermentas) transfiziert. 12 mm Coverslips (CS) mit Neuronen wurden in 500 µl vorequilibriertes OPTI-MEM-I (Fermentas) überführt und 1 h in diesem inkubiert. Pro CS wurde 1 µl DNA und 1 µl Lipofectamin verwendet. Die Neurone wurden 30 min mit dem Transfektionsmix inkubiert und anschließend zurück in das NW-Medium überführt.

4.5.5 Produktion von Lentiviren und Transduktion

HEK-T-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie HeLa-Zellen kultiviert (siehe 3.5.1). Zur Produktion von Lentivieren wurden HEK-T-Zellen in einer 6 cm Schale wie in 3.5.2 beschrieben mit folgenden Plasmiden transfiziert: Vektor 4 µg, PLP1 2,4 µg, PLP2 1,2 µg, VSVG 0,8 µg (Dittgen et al., 2004). Nach der Transfektion (ca. 6h) wurde das Medium durch 4 ml NWM (Tabelle 17) ersetzt und die Zellen für 24h darin inkubiert. Die Lentiviren werden in dieser Zeit von den Zellen in das Medium abgegeben welches anschließend durch 0.22 µm PES-Filter gepresst und in 100 µl Alequots in flüssigem Stickstoff schock-gefroren wurde. Zur transduktion wurden Alquots im 37°C Wasserbad aufgetaut und Zellen auf 12 mm CS mit 5 bis 30 µl des Viren-Mediums ü.N. inkubiert.

4.5.6 Immunocytochemie

Zellen wurden auf 12 mm CS kultiviert und nach zweimaligem waschen mit kaltem 1xPBS für 15 min bei 4°C mit PFA (4%PFA + 4%Sucrose in 1xPBS) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut mit kaltem 1xPBS gewaschen und anschließend in Färbelösung (1xPBS + 10% FCS + 0,5% Saponin) bei 4°C für 2-12 h inkubiert. Zur Färbung wurden die CS auf Parafilm in einer Feuchtekammer überführt und für 2 h mit 30 µl der entsprechenden Primärantikörperlösung (Färbelösung + Primärantikärper, Tabelle 18) bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 3x mit Waschlösung (1xPBS + 0,5% Saponin) gewaschen und wie zuvor mit 30 µl der entsprechenden Sekundörantikörperlösung (Färbelösung + Sekundärantikärper, Tabelle 19) für 1h bei RT inkubiert. Nach zweimaligem waschen mit Waschlösung und zweimaligem waschen mit H2O wurden die CS auf Objektträgern mit ProLong Gold (Invitrogen) und Immu-Mount (Thermo Scientific) im Verhältnis 1:5 aufgezogen.

4.5.7 Transferrin-Internalisierung und Qantifizierung

HeLa-Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 95 % in 96er Wells mit 15 µl Virus-Medium pro Konstrukt (siehe 3.5.5) in 50 µl NWM (Tabelle 17) ca. 10 h transduziert und anschließend auf 12 mm CSs überführt (siehe 3.5.1). Am Folgetag wurden die Zellen 1h in OPTI-MEM-I (Invitrogen) inkubiert und anschließend auf Parafilm überführt und mit 30 µl kaltem OPTI-MEM-I + 50 µg/ml Transferrin-Alexa555 (Invitrogen) beschichtet. Die CSs wurden für 20

min bei 37°C und 5% CO2 inkubiert und anschließend fixiert und gefärbt (siehe 3.5.6). Zur Quantifizierung des Internalisierten Transferins wurden konfokale Z-Stapel der Zellen unter identischen Bedingungen aufgenommen. Mit Hilfe der Fiji-Software (http://fiji.sc/) wurden Average- Iintensity-Pjrojektionen erstellt und Transduzierte Zellen wurden durch ihre Färbung identifiziert und umrandet. Der mittlere Grau-Wert des Alexa555-Signals dieser Zellen wurde als Maß für die Menge an internalisiertem Transferrin verwendet.

4.5.8 Das Mammalia-Zwei-Hybrid-System

Für das Mammalia-Zwei-Hybrid-System wurden murine N2A-Zellen verwendet. Diese wurden mit den entsprechenden Expressionvektoren und dem Reportervektor mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers transfiziert. Die zu testenden Proteine wurden entweder als Fusionsprotein mit der Reportergen-bindenden Gal4-Dömäne oder der VP16-Transkriptionsaktivierenden-Domöne exprimiert. Das Reportergen wird aktiviert wenn ein Gal4-Fusionsprotein ein VP16-Fusionsprotein an den Promotor des Reportergens rekrutieren, also binden kann. Zur Kontrolle werden die Gal4/VP16-Fusionsproteine jeweils ohne den entsprechenden Bindungspartner exprimiert um eventuelle Aotoaktivierungen zu berücksichtigen. Zur Normalisierung des Luciferase-Signals des Reportervektors wurde zusätzlich ein GFP-exprimierender Vektor transfiziert. Alle Transfectionen wurden als 7-fache Replicate in 96-Well-Platten durchgeführt. Zur Messung der Reportergenaktivierung wurde die Luciferaseaktivität unter Verwendung eines Chemilumineszenz-Substrates (Bright-Glo Luciferase Assay System, Promega) sichtbar gemacht. Die verwendete Luciferase besitzt eine verringerte Halbwertszeit und entstammt dem Vektor pGL4.12 (Promega). Alle Vektoren des Mammalia-Zwei-Hybrid-Systems stammen ursprünglich aus dem MammalianTwo-Hybrid System von Promega und wurden den Anforderungen entsprechend modifiziert.

4.6 Analyse von Hirngwebe

4.6.1 Beta-Galactosidase-Färbung

Eine Maus wurde mit Isufluran narkotisiert und durch Dekapitation getötet. Das Gehirn wurde entnommen und in 1xPBS, 4°C überführt. Anschließend wurde das Gehirn mit einem Skalpel sagital in 4-5 etwa gleich breite Stücke zerteilt und für 1h bei 4°C und ständiger Agitation in PFA (2% PFA + 2 mM $MgCl_2$) fixiert. Die Stücke wurden im Anschluss 3x mit RB (Tabelle 26) für 40 min unter Agitation bei 4°C gespült und anschließend ü.N bei RT in der β-Gal-Färbelösung (Tabelle 27) gefärbt. Nach der Färbung wurden im Vibratom 100 µm dicke Schnitte hergestellt und diese auf Objektträgern aufgezogen, getrocknet und mit DPX (Fluka) eingedeckelt.

4.6.2 In situ Hybridisierung (ISH)

Die radioaktiv markierten RNA-Sonden wurde durch *in vitro*-Transkription hergestellt. Dazu wurden für eine sense- und antisense-Sonde je 1 µg linearisierte Plasmid-DNA in Gegenwart von 10 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM GTP, 1 mM CTP und 8 µl α[35S]UTP (10 µCi/µl) für 2 h bei 37°C durch T7-, bzw. T3-Polymerase (Promega) transkribiert. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden durch Zentrifugation über eine Sephadex G50-Säule (Tabelle 7) abgetrennt, und die Sonde aus dem Eluat durch Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2, 10 µl Hefe t-RNA (10 mg/ml), 100 mM DTT ad 100 µl und 200 µl Ethanol und anschließende Zentrifugation gefällt. Die getrocknete Sonde wurde in 40 µl 1 M DTT aufgenommen, 20 min. bei RT inkubiert und mit 100 µl Hybridisierungslösung versetzt. Ein µl der Sonde wurde im Szintillationszähler (Beckmann LS6000SC) gemessen und die Sondenlösung mit Hybridisierungslösung auf 5000 cpm/µl eingestellt. Die getrockneten Objektträger wurden mit je 100 µl Sondenlösung beschichtet, mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt und mit DPX mounting solution (Fluka) Luftblasenfrei versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte ü/N bei 55°C.Nach dem Abkühlen der Objektträger wurde zunächst das DPX mit einer Pinzette entfernt und die Objektträger für 20 min. bei RT in 4x SSC geschüttelt. Bei diesem Schritt lösen sich gleichzeitig die Deckgläschen ab. Anschließend wurde erneut für 2x 10 min. in 4x SSC gewaschen, bevor die Objektträger zum Abbau nicht hybridisierter, einzelsträn-

giger RNA für 30 min. bei 37°C in RNAse-Puffer inkubiert wurden. Nach drei 15-minütigen Waschschritten in 2x SSC, 1x SSC und 0,5x SSC bei RT, einem 30-minütigem Waschschritt in 0,1x SSC bei 55°C und einem letzten Waschschritt in 0,1x SSC bei RT wurden die Objektträger in 70% Ethanol und anschließend 100% Ethanol dehydratisiert und luftgetrocknet. Die Signale wurden mit Biomax MR-Filmen (Kodak) detektiert.

4.7 Das Hefe-Zwei-Hybid-System

Die Untersuchungen im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden in Kooperation mit der Firma Hybrigenics (Paris) durchgeführt.

Parameter des Systems:

Referenz-Bait-Fragment: Rattus norvegicus - Arg3.1 (1-139)

Prey-Bibliothek: Ratten Hippocampus_RP1 (cDNA), Gal4AD-Fusion

Vektor: pB27 (N-LexA-bait-C Fusion)

Processierte Clone 107 (pB27)

Analysierte Interaktionen 45.1 Millionen (pB27)

3AT Konzentration 2.0 mM (pB27)

Für die Suche nach neuen Bindungspartnern von Arc/Arg3.1 im Hefe-Zwei-Hybried-System wurde die N-terminale Domäne (AA 1-139) von Arc/Arg3.1 mit der DNA-bindenden Domäne LexA Fusioniert. Die Untersuchte cDNA-Bibliothek führt zur Expression von Fusionsproeinen mit der Gal4-Activator-Domäne (Gal4AD). Das IGPD (Imidazoleglycerol-phosphate-dehydratase)-Reporter-Gen ist teil des Histedin-Stoffwechsels der Hefe für welches der verwendete Stamm defizient ist. Zur Selektion wurden die Hefen in Histedin-freiem medium Kultiviert was die Proliferation der Zellen von der Aktivierung des Reportergens abhängig macht. Die Aktivierung des Reportergens erfolgt durch die Bindung des LexA-Arg3.1-Fusionsproteins an den Promoter des Gens und die Arc/Arg3.1-abhängige Rekrutierung von Gal4AD-Fusionsproteinen der cDNA-Bibliothek. Proliferationsfähige cDNA-Clone wurden anschließend durch Sequenzierung der 5'- und 3'-Ende der cDNA Inserts identifiziert.

4.8 Mäuse

Zucht, Handhabung und durchgeführte Experimente wurden in Vereinbarung mit dem Tierschutzgesetz §6 TierSchG Zulassung „ORG 443“ für Organentnahmen, und „A6/499 für Perfusionen (unter der Aufsicht von PD Dr. Guido Hermey) durchgeführt.

Die Zucht der Mauskolonien wurde mit der TBase-Software verwaltet.

Alle Experiment im Umgang mit ES-zellen und deren Injektion wurden von PD Dr. I. Hermans-Borgmeyer durchgeführt.

Für biochemische Experimente wurden die Tiere durch cervicale dislokation getötet.

4.8.1 Maushirnlysate

Die entsprechenden Areale des Maushirns wurden sofort nach Tötung des Tieres präpariert und in Homogenisierungspuffer (Tabelle 30) in Teflonhomegenisierern bei 900 rpm, 4°C und 10 Stößen homogenisiert. Im Anschluss an eine Zentrifugation bei 900 g wurde der Überstand auf 2,5% SDS eingestellt und im Überkopfschüttler für 2h bei 4°C zur extraktion der Proteine inkubiert. Die Proteinkonzentration des durch einen weiteren Zentrifugations-schritt bei 20000 g, 4°C geklärte Überstand wurde mit Hilfe des BCA-Kits bestimmt und mit Proteinprobenpuffer (Tabelle 10) versetzt und bei 95°C für 5 min erhitzt.

4.8.2 Southern Blot

20 µl genomische DNA wurde mit 2µl BamHI ü.N.verdaut und am Folgetag per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Färbung mit Ethidiumbromid wurde Verteilung der DNA gemeinsam mit einem Lineal und Größenstandart zur späteren Zuordnung dokumentiert. Im Anschluss wurde das gel mit 0,25 M HCl inkubiert bis sich das Bromphe-nolblau des Größenstandarts gelb verfärbt mit einer folgenden Inkubation für 15 min in 0,4 M NaOH. Die DNA wurde ü.N. mittels Kapillar-Blot auf eine Hybond XL Membran übertragen. Die Membran wurde mit 2xSSC (Tabelle 9) gewaschen, getrocknet und 2 h bei 80 °C gebacken. Die Sonde (Tabelle 29) zur Detektion des SNX7-Lokus wurde nach Hersteller-Angaben mit dem Megaprime DNA Labeling System Kit (GE Healthcare) radio-

aktiv markiert. Für die Hybridisierung wurde die Membran in 2xSSC equilibriert und für 2 h bei 65 °C in Speed HybII Mix + Lachs-Sperma vor inkubiert. Die Sonde (500 cpm/µl) wurde mit Lachs-Sperma auf 95°C erhitzt, im Speed HybII Mix verdünnt und die Membran ü.N. bei 65°C darin inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit 2xSSC + 0,1% SDS wurde die Radioaktivität durch eine Phosphorimager-Platte detektiert und im FLA-3000 (Fujifilm) ausgelesen.

5. APENDIX

5.1 Literaturverzeichnis

Alberi, L., Liu, S., Wang, Y., Badie, R., Smith-Hicks, C., Wu, J., Pierfelice, T.J., Abazyan, B., Mattson, M.P., Kuhl, D., et al. **(2011)**. Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks. Neuron 69, 437–444.

Altar, C.A., Laeng, P., Jurata, L.W., Brockman, J.A., Lemire, A., Bullard, J., Bukhman, Y. V, Young, T.A., Charles, V., and Palfreyman, M.G. **(2004)**. Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways. J. Neurosci. 24, 2667–2677.

Anggono, V., and Huganir, R.L. **(2012)**. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. Curr. Opin. Neurobiol. 22, 461–469.

Anggono, V., Clem, R.L., and Huganir, R.L. **(2011)**. PICK1 loss of function occludes homeostatic synaptic scaling. J. Neurosci. 31, 2188–2196.

Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. **(2006)**. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics 22, 195–201.

Bai, J., Hu, Z., Dittman, J.S., Pym, E.C.G., and Kaplan, J.M. **(2010)**. Endophilin functions as a membrane-bending molecule and is delivered to endocytic zones by exocytosis. Cell 143, 430–441.

Bai, S.W., Herrera-Abreu, M.T., Rohn, J.L., Racine, V., Tajadura, V., Suryavanshi, N., Bechtel, S., Wiemann, S., Baum, B., and Ridley, A.J. **(2011)**. Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. BMC Biol. 9, 54.

Beattie, E.C., Carroll, R.C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M., and Malenka, R.C. **(2000)**. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. Nat. Neurosci. 3, 1291–1300.

Béïque, J.-C., Na, Y., Kuhl, D., Worley, P.F., and Huganir, R.L. **(2011)**. Arc-dependent synapse-specific homeostatic plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 816–821.

Blanpied, T.A., Scott, D.B., and Ehlers, M.D. **(2002)**. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. Neuron 36, 435–449.

Boettner, D.R., Friesen, H., Andrews, B., and Lemmon, S.K. **(2011)**. Clathrin light chain directs endocytosis by influencing the binding of the yeast Hip1R homologue, Sla2, to F-actin. Mol. Biol. Cell 22, 3699–3714.

Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H. **(2008)**. Retromer. Curr. Opin. Cell Biol. 20, 427–436.

Brach, T., Godlee, C., Moeller-Hansen, I., Boeke, D., and Kaksonen, M. **(2014)**. The Initiation of Clathrin-Mediated Endocytosis Is Mechanistically Highly Flexible. Curr. Biol.

Bramham, C.R., Worley, P.F., Moore, M.J., and Guzowski, J.F. **(2008)**. The immediate early gene arc/arg3.1: regulation, mechanisms, and function. J. Neurosci. 28, 11760–11767.

Bramham, C.R., Alme, M.N., Bittins, M., Kuipers, S.D., Nair, R.R., Pai, B., Panja, D., Schubert, M.,

Soule, J., Tiron, A., et al. **(2010)**. The Arc of synaptic memory. Exp Brain Res 200, 125–140.

Brown, T.C., Tran, I.C., Backos, D.S., and Esteban, J.A. **(2005)**. NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD. Neuron 45, 81–94.

Cao, H., Garcia, F., and McNiven, M.A. **(1998)**. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. Mol. Biol. Cell 9, 2595–2609.

Carroll, R.C., Beattie, E.C., Xia, H., Lüscher, C., Altschuler, Y., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., and von Zastrow, M. **(1999)**. Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 14112–14117.

Chowdhury, S., Shepherd, J.D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R.S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R.L., and Worley, P.F. **(2006)**. Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. Neuron 52, 445–459.

Collins, A., Warrington, A., Taylor, K.A., and Svitkina, T. **(2011)**. Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis. Curr. Biol. 21, 1167–1175.

Cooney, J.R.J.R., Hurlburt, J.L.J.L., Selig, D.K.D.K., Harris, K.M.K.M., and Fiala, J.C.J.C. **(2002)**. Endosomal Compartments Serve Multiple Hippocampal Dendritic Spines from a Widespread Rather Than a Local Store of Recycling Membrane. CORD Conf. Proc. 22, 2215–2224.

Cottrell, J.R., Borok, E., Horvath, T.L., and Nedivi, E. **(2004)**. CPG2: A brain- and synapse-specific protein that regulates the endocytosis of glutamate receptors. Neuron 44, 677–690.

Cullen, P.J. **(2008)**. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 574–582.

Daberkow, D.P., Riedy, M.D., Kesner, R.P., and Keefe, K.A. **(2007)**. Arc mRNA induction in striatal efferent neurons associated with response learning. Eur. J. Neurosci. 26, 228–241.

Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E., and Schmid, S.L. **(1994)**. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. J. Cell Biol. 127, 915–934.

Damke, H., Binns, D.D., Ueda, H., Schmid, S.L., and Baba, T. **(2001)**. Dynamin GTPase domain mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages. Mol. Biol. Cell 12, 2578–2589.

Danson, C., Brown, E., Hemmings, O.J., McGough, I.J., Yarwood, S., Heesom, K.J., Carlton, J.G., Martin-Serrano, J., May, M.T., Verkade, P., et al. **(2013)**. SNX15 links clathrin endocytosis to the PtdIns(3)P early endosome independent of the APPL1 endosome. J. Cell. Sci. 126, 4885–4899.

Delint-Ramirez, I., Fernández, E., Bayés, A., Kicsi, E., Komiyama, N.H., and Grant, S.G.N. **(2010)**. In vivo composition of NMDA receptor signaling complexes differs between membrane subdomains and is modulated by PSD-95 and PSD-93. J. Neurosci. 30, 8162–8170.

Doherty, G.J., and McMahon, H.T. **(2009)**. Mechanisms of endocytosis. Annu. Rev. Biochem. 78, 857–902.

Dynes, J.L., and Steward, O. **(2007)**. Dynamics of bidirectional transport of Arc mRNA in neuronal dendrites. J. Comp. Neurol. 500, 433–447.

Dynes, J.L., and Steward, O. **(2012)**. Arc mRNA docks precisely at the base of individual dendritic spines indicating the existence of a specialized microdomain for synapse-specific mRNA translation. J. Comp. Neurol. 520, 3105–3119.

Ehlers, M.D. **(2000)**. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. Neuron 28, 511–525.

Eichenbaum, H. **(2000)**. A cortical-hippocampal system for declarative memory. Nat. Rev. Neurosci. 1, 41–50.

Ellis, J.D., Barrios-Rodiles, M., Çolak, R., Irimia, M., Kim, T., Calarco, J.A., Wang, X., Pan, Q., O'Hanlon, D., Kim, P.M., et al. **(2012)**. Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks. Mol. Cell 46, 884–892.

Engqvist-Goldstein, A.E., Warren, R.A., Kessels, M.M., Keen, J.H., Heuser, J., and Drubin, D.G. **(2001)**. The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly in vitro. J. Cell Biol. 154, 1209–1223.

Engqvist-Goldstein, A.E.Y., Zhang, C.X., Carreno, S., Barroso, C., Heuser, J.E., and Drubin, D.G. **(2004)**. RNAi-mediated Hip1R silencing results in stable association between the endocytic machinery and the actin assembly machinery. Mol. Biol. Cell 15, 1666–1679.

Ferguson, S.M., and De Camilli, P. **(2012)**. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. Nat. Publ. Gr. 13, 75–88.

Ferguson, S.M., Ferguson, S., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., Destaing, O., Ko, G., Takasaki, J., et al. **(2009)**. Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. Dev. Cell 17, 811–822.

Fletcher, B.R., Baxter, M.G., Guzowski, J.F., Shapiro, M.L., and Rapp, P.R. **(2007)**. Selective cholinergic depletion of the hippocampus spares both behaviorally induced Arc transcription and spatial learning and memory. Hippocampus 17, 227–234.

Govindarajan, A., Israely, I., Huang, S.-Y., and Tonegawa, S. **(2011)**. The dendritic branch is the preferred integrative unit for protein synthesis-dependent LTP. Neuron 69, 132–146.

Greer, P.L., Hanayama, R., Bloodgood, B.L., Mardinly, A.R., Lipton, D.M., Flavell, S.W., Kim, T.-K., Griffith, E.C., Waldon, Z., Maehr, R., et al. **(2010)**. The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. Cell 140, 704–716.

Gusev, P.A., and Gubin, A.N. **(2010)**. Arc/Arg3.1 mRNA global expression patterns elicited by memory recall in cerebral cortex differ for remote versus recent spatial memories. Front Integr Neurosci 4, 15.

Gusev, P.A., Cui, C., Alkon, D.L., and Gubin, A.N. **(2005)**. Topography of Arc/Arg3.1 mRNA expression in the dorsal and ventral hippocampus induced by recent and remote spatial memory recall: dissociation of CA3 and CA1 activation. J. Neurosci. 25, 9384–9397.

Guzowski, J.F., Lyford, G.L., Stevenson, G.D., Houston, F.P., McGaugh, J.L., Worley, P.F., and Barnes, C.A. **(2000)**. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. J. Neurosci. 20, 3993–4001.

Guzowski, J.F., Timlin, J.A., Roysam, B., McNaughton, B.L., Worley, P.F., and Barnes, C.A. **(2005)**. Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. Curr. Opin. Neurobiol. 15, 599–606.

Han, J.-H., Kushner, S.A., Yiu, A.P., Cole, C.J., Matynia, A., Brown, R.A., Neve, R.L., Guzowski, J.F., Silva, A.J., and Josselyn, S.A. **(2007)**. Neuronal competition and selection during memory formation. Science (80-.). 316, 457–460.

Harterink, M., Port, F., Lorenowicz, M.J., McGough, I.J., Silhankova, M., Betist, M.C., van Weering, J.R.T., van Heesbeen, R.G.H.P., Middelkoop, T.C., Basler, K., et al. **(2011)**. A SNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion. Nat. Cell Biol. 13, 914–923.

Hebb, D.O. **(1950)**. The organization of behavior: A neuropsychological theory. Sci. Educ. 34, 336–337.

Hoogenraad, C.C., and van der Sluijs, P. **(2010)**. GRASP-1 regulates endocytic receptor recycling and synaptic plasticity. Cib 3, 433–435.

Huganir, R.L., and Nicoll, R.A. **(2013)**. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. Neuron 80, 704–717.

Hughes, J.R. **(1958)**. Post-Tetanic Potentiation. Physiol Rev 38, 91–113.

Ivanova, T.N., Matthews, A., Gross, C., Mappus, R.C., Gollnick, C., Swanson, A., Bassell, G.J., and Liu, R.C. **(2011)**. Arc/Arg3.1 mRNA expression reveals a subcellular trace of prior sound exposure in adult primary auditory cortex. Neuroscience 181, 117–126.

Jakkamsetti, V., Tsai, N.-P., Gross, C., Molinaro, G., Collins, K.A., Nicoletti, F., Wang, K.H., Osten, P., Bassell, G.J., Gibson, J.R., et al. **(2013)**. Experience-induced Arc/Arg3.1 primes CA1 pyramidal neurons for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term synaptic depression. Neuron 80, 72–79.

Jean, S., and Kiger, A.A. **(2012)**. Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions. Nat. Publ. Gr. 13, 463–470.

Jiang, Y.H., Armstrong, D., Albrecht, U., Atkins, C.M., Noebels, J.L., Eichele, G., Sweatt, J.D., and Beaudet, A.L. **(1998)**. Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. Neuron 21, 799–811.

Kaksonen, M., Toret, C.P., and Drubin, D.G. **(2006)**. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 404–414.

Kennedy, M.J., Davison, I.G., Robinson, C.G., and Ehlers, M.D. **(2010)**. Syntaxin-4 defines a domain for activity-dependent exocytosis in dendritic spines. Cell 141, 524–535.

Kesner, R.P. **(2013)**. A process analysis of the CA3 subregion of the hippocampus. Front Cell Neurosci 7, 78.

Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., and Schwede, T. **(2009)**. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. Nucleic Acids Res. 37, D387–92.

Korb, E., and Finkbeiner, S. **(2011)**. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. Trends Neurosci. 34, 591–598.

Korb, E., Wilkinson, C.L., Delgado, R.N., Lovero, K.L., and Finkbeiner, S. **(2013)**. Arc in the nucleus regulates PML-dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity. Nat. Publ. Gr. 16, 874–883.

Kühnle, S., Mothes, B., Matentzoglu, K., and Scheffner, M. **(2013)**. Role of the ubiquitin ligase E6AP/UBE3A in controlling levels of the synaptic protein Arc. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 8888–8893.

Lah, J.J., and Levey, A.I. **(2000)**. Endogenous presenilin-1 targets to endocytic rather than biosynthetic compartments. Mol. Cell. Neurosci. 16, 111–126.

Lam, B.Y.H., Zhang, W., Ng, D.C.-H., Maruthappu, M., Roderick, H.L., and Chawla, S. **(2010)**. CREB-dependent Nur77 induction following depolarization in PC12 cells and neurons is modulated by MEF2 transcription factors. J. Neurochem. 112, 1065–1073.

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.

Leprince, C., Le Scolan, E., Meunier, B., Fraisier, V., Brandon, N., De Gunzburg, J., and Camonis, J. **(2003)**. Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking. J. Cell. Sci. 116, 1937–1948.

Lin, D.-T., and Huganir, R.L. **(2007)**. PICK1 and phosphorylation of the glutamate receptor 2 (GluR2) AMPA receptor subunit regulates GluR2 recycling after NMDA receptor-induced internalization. J. Neurosci. 27, 13903–13908.

Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., and Kuhl, D. **(1995)**. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 5734–5738.

Lisman, J., Yasuda, R., and Raghavachari, S. **(2012)**. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. Nat Rev Neurosci 13, 169–182.

Liu, X., Ramirez, S., Pang, P.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., and Tonegawa, S. **(2012)**. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. Nature 484, 381–385.

Loebrich, S., Djukic, B., Tong, Z.J., Cottrell, J.R., Turrigiano, G.G., and Nedivi, E. **(2013)**. Regulation of glutamate receptor internalization by the spine cytoskeleton is mediated by its PKA-dependent association with CPG2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, E4548–E4556.

Lu, J., Helton, T.D., Blanpied, T.A., Rácz, B., Newpher, T.M., Weinberg, R.J., and Ehlers, M.D. **(2007)**. Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling

of dynamin-3 to Homer. Neuron 55, 874–889.

Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A., and Worley, P.F. **(1995)**. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. Neuron 14, 433–445.

Makuch, L., Volk, L., Anggono, V., Johnson, R.C., Yu, Y., Duning, K., Kremerskothen, J., Xia, J., Takamiya, K., and Huganir, R.L. **(2011)**. Regulation of AMPA receptor function by the human memory-associated gene KIBRA. Neuron 71, 1022–1029.

Man, H.Y., Lin, J.W., Ju, W.H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L.E., Sheng, M., and Wang, Y.T. **(2000)**. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. Neuron 25, 649–662.

McGill, M.A., Dho, S.E., Weinmaster, G., and McGlade, C.J. **(2009)**. Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. J. Biol. Chem. 284, 26427–26438.

Meinecke, M., Boucrot, E., Çamdere, G., Hon, W.-C., Mittal, R., and McMahon, H.T. **(2013)**. Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. J. Biol. Chem. 288, 6651–6661.

Mejias, R., Adamczyk, A., Anggono, V., Niranjan, T., Thomas, G.M., Sharma, K., Skinner, C., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E., Fallin, M.D., et al. **(2011)**. Gain-of-function glutamate receptor interacting protein 1 variants alter GluA2 recycling and surface distribution in patients with autism. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 4920–4925.

Messaoudi, E., Kanhema, T., Soule, J., Tiron, A., Dagyte, G., da Silva, B., and Bramham, C.R. **(2007)**. Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. J. Neurosci. 27, 10445–10455.

Metzler, M., Legendre-Guillemin, V., Gan, L., Chopra, V., Kwok, A., McPherson, P.S., and Hayden, M.R. **(2001)**. HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. J. Biol. Chem. 276, 39271–39276.

Metzler, M., Li, B., Gan, L., Georgiou, J., Gutekunst, C.-A., Wang, Y., Torre, E., Devon, R.S., Oh, R., Legendre-Guillemin, V., et al. **(2003)**. Disruption of the endocytic protein HIP1 results in neurological deficits and decreased AMPA receptor trafficking. EMBO J. 22, 3254–3266.

Miller, S., Yasuda, M., Coats, J.K., Jones, Y., Martone, M.E., and Mayford, M. **(2002)**. Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. Neuron 36, 507–519.

Milosevic, I., Giovedi, S., Lou, X., Raimondi, A., Collesi, C., Shen, H., Paradise, S., O'Toole, E., Ferguson, S., Cremona, O., et al. **(2011)**. Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. Neuron 72, 587–601.

Mishra, S.K., Agostinelli, N.R., Brett, T.J., Mizukami, I., Ross, T.S., and Traub, L.M. **(2001)**. Clathrin- and AP-2-binding sites in HIP1 uncover a general assembly role for endocytic accessory proteins. J. Biol. Chem. 276, 46230–46236.

Miyashita, T., Kubik, S., Haghighi, N., Steward, O., and Guzowski, J.F. **(2009)**. Rapid activation of plasticity-associated gene transcription in hippocampal neurons provides a mechanism for encoding of one-trial experience. J. Neurosci. 29, 898–906.

Moga, D.E., Calhoun, M.E., Chowdhury, A., Worley, P., Morrison, J.H., and Shapiro, M.L. **(2004)**. Activity-regulated cytoskeletal-associated protein is localized to recently activated excitatory synapses. Neuroscience 125, 7–11.

Nedivi, E., Hevroni, D., Naot, D., Israeli, D., and Citri, Y. **(1993)**. Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. Nature 363, 718–722.

Neves, G., Cooke, S.F., and Bliss, T.V.P. **(2008)**. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. Nat Rev Neurosci 9, 65–75.

Okuno, H., Akashi, K., Ishii, Y., Yagishita-Kyo, N., Suzuki, K., Nonaka, M., Kawashima, T., Fujii, H., Takemoto-Kimura, S., Abe, M., et al. **(2012)**. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKIIβ. Cell 149, 886–898.

Pant, S., Sharma, M., Patel, K., Caplan, S., Carr, C.M., and Grant, B.D. **(2009)**. AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. Nat. Cell Biol. 11, 1399–1410.

Papassotiropoulos, A., Stephan, D.A., Huentelman, M.J., Hoerndli, F.J., Craig, D.W., Pearson, J. V, Huynh, K.-D., Brunner, F., Corneveaux, J., Osborne, D., et al. **(2006)**. Common Kibra alleles are associated with human memory performance. Science 314, 475–478.

Park, M., Penick, E.C., Edwards, J.G., Kauer, J.A., and Ehlers, M.D. **(2004)**. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. Science (80-.). 305, 1972–1975.

Park, S., Park, J.M., Kim, S., Kim, J.-A., Shepherd, J.D., Smith-Hicks, C.L., Chowdhury, S., Kaufmann, W., Kuhl, D., Ryazanov, A.G., et al. **(2008)**. Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. Neuron 59, 70–83.

Pasternak, S.H., Bagshaw, R.D., Guiral, M., Zhang, S., Ackerley, C.A., Pak, B.J., Callahan, J.W., and Mahuran, D.J. **(2003)**. Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and γ-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. J. Biol. Chem. 278, 26687–26694.

Peebles, C.L., Yoo, J., Thwin, M.T., Palop, J.J., Noebels, J.L., and Finkbeiner, S. **(2010)**. Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 18173–18178.

Petrini, E.M., Lu, J., Cognet, L., Lounis, B., Ehlers, M.D., and Choquet, D. **(2009)**. Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation. Neuron 63, 92–105.

Pettitt, S.J., Liang, Q., Rairdan, X.Y., Moran, J.L., Prosser, H.M., Beier, D.R., Lloyd, K.C., Bradley, A., and Skarnes, W.C. **(2009)**. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. Nat Meth 6, 493–495.

Pfeffer, S.R. **(2013)**. Rab GTPase regulation of membrane identity. Curr. Opin. Cell Biol. 25,

414–419.

Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., et al. **(2006)**. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. Neuron 52, 437–444.

Posor, Y., Eichhorn-Gruenig, M., Puchkov, D., Schöneberg, J., Ullrich, A., Lampe, A., Müller, R., Zarbakhsh, S., Gulluni, F., Hirsch, E., et al. **(2013)**. Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. Nature 499, 233–237.

Prosser, D.C., Tran, D., Schooley, A., Wendland, B., and Ngsee, J.K. **(2010)**. A novel, retromer-independent role for sorting nexins 1 and 2 in RhoG-dependent membrane remodeling. Traffic 11, 1347–1362.

Qian, Z., Gilbert, M.E., Colicos, M.A., Kandel, E.R., and Kuhl, D. **(1993)**. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. Nature 361, 453–457.

Rácz, B., Blanpied, T.A., Ehlers, M.D., and Weinberg, R.J. **(2004)**. Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines. Nat. Neurosci. 7, 917–918.

Rajendran, L., and Annaert, W. **(2012)**. Membrane trafficking pathways in Alzheimer's disease. Traffic 13, 759–770.

Robinson, S., Poorman, C.E., Marder, T.J., and Bucci, D.J. **(2012)**. Identification of functional circuitry between retrosplenial and postrhinal cortices during fear conditioning. J. Neurosci. 32, 12076–12086.

Rudinskiy, N., Hawkes, J.M., Betensky, R.A., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Spires-Jones, T.L., and Hyman, B.T. **(2012)**. Orchestrated experience-driven Arc responses are disrupted in a mouse model of Alzheimer's disease. Nat. Neurosci. 15, 1422–1429.

Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. **(1995)**. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. Nucleic Acids Res. 23, 5080–5081.

Shepherd, J.D., and Bear, M.F. **(2011)**. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. Nat. Publ. Gr. 14, 279–284.

Shepherd, J.D., and Huganir, R.L. **(2007)**. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 23, 613–643.

Shepherd, J.D., Rumbaugh, G., Wu, J., Chowdhury, S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R.L., and Worley, P.F. **(2006)**. Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. Neuron 52, 475–484.

Skånland, S.S., Wälchli, S., Brech, A., and Sandvig, K. **(2009)**. SNX4 in complex with clathrin and dynein: implications for endosome movement. PLoS One 4, e5935.

Skarnes, W.C., Rosen, B., West, A.P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A.O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., et al. **(2011)**. A conditional knockout resource for the genome-wide study of

mouse gene function. Nature 474, 337–342.

Van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Mâle, P., Goud, B., and Mellman, I. **(1992)**. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. Cell 70, 729–740.

Somsel Rodman, J., and Wandinger-Ness, A. **(2000)**. Rab GTPases coordinate endocytosis. J. Cell. Sci. 113 Pt 2, 183–192.

Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M. **(2000)**. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. J. Cell Biol. 149, 901–914.

Stenmark, H. **(2009)**. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat. Publ. Gr. 10, 513–525.

Stenmark, H., and Olkkonen, V.M. **(2001)**. The Rab GTPase family. Genome Biol. 2, REVIEWS3007.

Steward, O., and Worley, P.F. **(2001)**. A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 7062–7068.

Steward, O., Wallace, C.S., Lyford, G.L., and Worley, P.F. **(1998)**. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. Neuron 21, 741–751.

Van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M., and Witter, M.P. **(2009)**. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. Nat Rev Neurosci 10, 272–282.

Sugar, J., Witter, M.P., van Strien, N.M., and Cappaert, N.L.M. **(2011)**. The retrosplenial cortex: intrinsic connectivity and connections with the (para)hippocampal region in the rat. An interactive connectome. Front Neuroinform 5, 7.

Teasdale, R.D., Loci, D., Houghton, F., Karlsson, L., and Gleeson, P.A. **(2001)**. A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1. Biochem. J. 358, 7–16.

Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Povilaitite, P., Parisi, L., and Muller, D. **(2001)**. Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. J. Neurosci. 21, 6245–6251.

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.

Tzingounis, A. V, and Nicoll, R.A. **(2006)**. Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. Neuron 52, 403–407.

Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M.E., and Bilder, D. **(2008)**. Endosomal entry regulates Notch receptor activation in Drosophila melanogaster. J. Cell Biol. 180, 755–762.

Vann, S.D., Aggleton, J.P., and Maguire, E.A. **(2009)**. What does the retrosplenial cortex do? Nat Rev Neurosci 10, 792–802.

Vazdarjanova, A., McNaughton, B.L., Barnes, C.A., Worley, P.F., and Guzowski, J.F. **(2002)**. Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and Homer

1a in hippocampal and neocortical neuronal networks. J. Neurosci. 22, 10067–10071.

Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Insel, N., Plummer, T.K., Rosi, S., Chowdhury, S., Mikhael, D., Worley, P.F., Guzowski, J.F., and Barnes, C.A. **(2006)**. Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. J. Comp. Neurol. 498, 317–329.