

**Identifizierung und Charakterisierung unbekannter Bindeproteine
des GABA_A-Rezeptors von *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)**

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg**

**vorgelegt von
Sven Löbrich
aus Ostheim bei Butzbach**

**Hamburg
Juli 2005**

Für meine Patentöchter

Hanna, Paula und Verena

Die vorliegende Arbeit wurde im April 2002 am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Matthias Kneussel begonnen, seit Oktober 2002 am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg in seiner Arbeitsgruppe weitergeführt und dort im April 2005 fertiggestellt.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft durch Mittel an Dr. Kneussel unterstützt (KN556/1-1 und KN556/1-2).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	7
Zusammenfassung	8
1. Einleitung	10
1.1 Das Gehirn der Säugetiere	10
1.2 Neuronen	12
1.2.1 Exzitatorische Synapsen	14
1.2.2 Inhibitorische Synapsen	18
1.3 Lernen und Gedächtnis: Synaptische Plastizität	21
1.4 Die spezielle Rolle der $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA _A -Rezeptors	26
1.5 Konsequenzen der Inaktivierung von postsynaptischem Gephyrin	28
1.6 Zielsetzung	30
2. Material und Methoden	32
2.1 Chemikalien und Enzyme	32
2.2 Lösungen und Medien	32
2.3 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme	35
2.4 Antikörper	36
2.5 Vektoren und ihre Verwendung	37
2.6 Molekularbiologische Techniken	38
2.7 Isolierung von Plasmid-DNA	38
2.8 Restriktionsverdau	39
2.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
2.10 Ligation	39
2.11 Transformation von <i>E. coli</i>	39
2.12 PCR-Analyse von Bakterienkolonien	40
2.13 Amplifikation von PCR-Produkten zur Klonierung	41
2.14 PCR-basierte Mutagenese	41
2.15 Sequenzanalysen von Plasmid-DNA	41
2.16 Das Hefe-2-Hybrid-System	42
2.17 Kultur von Hefen	42
2.18 Transformation von Hefen im kleinen Maßstab	43
2.19 Transformation von Hefen im großen Maßstab	43
2.20 Reportergen-, „Assays“	44
2.21 Plasmidpräparation aus Hefe	45
2.22 Herstellung von Proteinextrakten aus Hirn	45
2.23 Herstellung von Proteinextrakten aus transfizierten HEK293 Zellen	46
2.24 Proteinexpression in Bakterien	46
2.25 GST-, „Pull-down“ Experimente	47
2.26 Koimmunpräzipitation	48

2.27	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
2.28	Western Blot	49
2.29	Immundetektion	49
2.30	Kultur von HEK293 Zellen	49
2.31	Hippokampale Primärkulturen	50
2.32	Transfektion von kultivierten Zellen	51
2.33	Mikroinjektion	51
2.34	Immunzytochemie	52
2.35	Quantitative Analyse und Statistik	52
3.	Ergebnisse	54
3.1	Identifizierung von GABA _A R-Interaktoren mittels Hefe-2-Hybrid Technik	54
3.1.1	„Screening“ einer cDNA Bibliothek aus Gehirn	56
3.1.2	Analyse positiver Klone	57
3.2	Interaktion von Muskelin mit der α 1-Untereinheit des GABA _A -Rezeptors	59
3.2.1	Eingrenzung der Bindestelle in Hefe	59
3.2.2	Biochemische Analyse durch „Pulldown“-Experimente	61
3.2.3	Lokalisation von Muskelin in Neuronen	62
3.2.4	Kolokalisation von GABA _A R- α 1 mit Muskelin in Neuronen	63
3.3	Interaktion von Radixin mit der α 5-Untereinheit des GABA _A -Rezeptors	65
3.3.1	Eingrenzung der Bindestelle in Hefe	65
3.3.2	Koimmunpräzipitation von Radixin mit GABA _A R- α 5	67
3.3.3	Einfluss der molekularen Aktivierung von Radixin auf die Bindung an GABA _A R- α 5	67
3.3.4	Untersuchung von Ezrin und Moesin im „Pulldown“-Experiment	70
3.4	Lokalisation verschiedener Radixin-Mutanten in HEK293 Zellen	71
3.4.1	Lokalisation an der Plasmamembran	71
3.4.2	Lokalisation in F-Aktin-reichen Kompartimenten	73
3.5	Lokalisation von ERM-Proteinen in Neuronen	75
3.5.1	Kolokalisation von Radixin und GABA _A R- α 5 in Neuronen	75
3.5.2	Untersuchung der ERM-Proteine auf Kolokalisation mit GABA _A R- α 5	76
3.5.3	Synaptische Lokalisation von Radixin	78
3.5.4	Synaptische Lokalisation verschiedener Radixin-Mutanten	79
3.5.5	Synaptische Verteilung von Radixin und GABA _A R- α 5	81
3.5.6	Assoziation von Radixin mit F-Aktin in Neuronen	83
3.5.7	Kolokalisation von GABA _A R- α 5 mit Radixin und Gephyrin	84
3.6	Funktionelle Analyse der Radixin/GABA _A R- α 5-Interaktion	85
3.6.1	Applikation von <i>antisense</i> -Oligonukleotiden	85
3.6.2	Expression eines Radixin-Konstrukts mit dominant-negativer Wirkung	88
3.6.3	Expression mutanter GABA _A -Rezeptoren, die Radixin nicht binden	89
3.7	Einfluss der Aktivität von GTPasen der Rho-Familie	92
3.7.1	Einfluss auf die synaptische Lokalisation von Radixin	93
3.7.2	Einfluss auf die synaptische Lokalisation von GABA _A R- α 5	94

4.	Diskussion	96
4.1	Identifikation neuer Bindepartner des GABA _A -Rezeptors	96
4.1.1	Interaktionspartner von GABA _A R- α 1	97
4.1.2	Interaktionspartner von GABA _A R- α 5	98
4.2	Bindung von Muskelein an GABA _A R- α 1	98
4.3	Bindung von Radixin an GABA _A R- α 5	101
4.4	Funktion der Radixin/GABA _A R- α 5-Bindung	105
4.5	Einfluss von GTPasen der Rho-Familie	108
4.6	Modell der synaptischen Aktivierung	112
5.	Anhang	115
5.1	Abkürzungen	115
5.2	verwendete Oligonukleotide	116
5.3	verwendete Plasmide	117
	Literaturverzeichnis	118
	Danksagung	132

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer chemischen Synapse.	13
Abbildung 3.1: Bindung von Muskelin an GABA _A R- α 1 im Hefe-2-Hybrid-System.	60
Abbildung 3.2: Biochemische Analyse im Pulldown-Experiment.	61
Abbildung 3.3: Synaptische Lokalisation von Muskelin in Neuronen.	62
Abbildung 3.4: Kolokalisation von Muskelin und GABA _A R- α 1 in Neuronen.	64
Abbildung 3.5: Bindung von Radixin an GABA _A R- α 5 im Hefe-2-Hybrid-System.	66
Abbildung 3.6: Biochemische Analyse der Interaktion zwischen Radixin und GABA _A R- α 5.	67
Abbildung 3.7: Die Interaktion von Radixin mit GABA _A R- α 5 ist vom Aktivierungszustand von Radixin abhängig.	69
Abbildung 3.8: Vergleichende Pulldown-Experimente mit myc-markierten ERM-Proteinen.	70
Abbildung 3.9: Charakterisierung verschiedener Radixin-Mutanten in HEK293-Zellen.	72
Abbildung 3.10: Charakterisierung der Aktinbindung verschiedener Radixin-Mutanten in HEK293-Zellen.	74
Abbildung 3.11: Kolokalisation von GABA _A R- α 5 und Radixin in Neuronen.	76
Abbildung 3.12: Kolokalisation von GABA _A R- α 5 und ERM-Proteinen in Neuronen.	77
Abbildung 3.13: Untersuchung der synaptischen Lokalisation von Radixin-GFP in Neuronen.	78
Abbildung 3.14: Lokalisation verschiedener Radixin-Mutanten an inhibitorischen Synapsen.	80
Abbildung 3.15: Synaptische Verteilung von Radixin und GABA _A R- α 5.	82
Abbildung 3.16: Aktin-Assoziation von Radixin-GFP in Neuronen.	83
Abbildung 3.17: Lokalisation von GABA _A R- α 5 mit Gephyrin und Radixin.	84
Abbildung 3.18: Mikroinjektion von <i>antisense</i> -Oligonukleotiden.	86
Abbildung 3.19: Mikroinjektion von <i>sense</i> -Oligonukleotiden.	87
Abbildung 3.20: Überexpression von dominant-negativem Radixin.	88
Abbildung 3.21: Charakterisierung einer Gruppenmutante in GABA _A R- α 5, die nicht an Radixin binden kann.	90
Abbildung 3.22: Einfluss von GTPasen der Rho-Familie auf die synaptische Lokalisation von Radixin-GFP.	94
Abbildung 3.23: Einfluss von GTPasen der Rho-Familie auf die synaptische Lokalisation von GABA _A R- α 5.	95
Abbildung 4.1: Modell der synaptischen Aktivierung.	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper	36
Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper	37
Tabelle 3: Übersicht über die beiden Hefe-2-Hybrid-Versuche	56
Tabelle 4: Identität der gefundenen Interaktoren	58

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten bislang unbekannte Interaktionspartner des GABA_A-Rezeptors identifiziert werden. Die gefundenen Interaktionen sollten molekularbiologisch charakterisiert und funktionell analysiert werden.

Im Gehirn der Säugetiere wird die schnelle synaptische Inhibition durch den Neurotransmitter GABA vermittelt. In der postsynaptischen Membran sind ligandengesteuerte Ionenkanäle lokalisiert, die GABA binden und in Folge dessen die Permeabilität der Membran für Chloridionen erhöhen. GABA_A-Rezeptoren sind pentamere Proteinkomplexe aus verschiedenen Untereinheiten, die im Gehirn zeitlich und örtlich unterschiedlich exprimiert werden.

Das lösliche Gerüstprotein Gephyrin ist ein wesentlicher Bestandteil inhibitorischer Postsynapsen. Es ist im Rückenmark und Gehirn an glyzinerger, sowie an GABAergen Synapsen lokalisiert. Gephyrin kann durch Selbstassoziation ein hexagonales Gitter ausbilden und bindet mit hoher Affinität an den Glyzin-Rezeptor, was zu dessen Bündelung und Konzentrierung („Clustering“) an inhibitorischen Synapsen führt. Die Inaktivierung von Gephyrin führt zum kompletten Verlust der sogenannten Glyzin-Rezeptor-„Cluster“.

In Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung sind auch GABA_A-Rezeptoren in ihrer Bündelung beim Verlust von Gephyrin beeinträchtigt. Während die punktförmige Immunreaktivität für Rezeptoren, die eine $\alpha 2$ -Untereinheit tragen, fast vollständig verlorengelassen, zeigen $\alpha 1$ - und $\alpha 5$ -enthaltende Rezeptoren ein vollkommen unbeeinträchtigtes „Clustering“.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Hefe-2-Hybrid-Technik systematisch nach Interaktionspartnern für die großen intrazellulären Schleifen der $\alpha 1$ - und $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors gesucht.

Das „Screening“-Verfahren identifizierte das Protein Muskelin als Interaktionspartner für die $\alpha 1$ -Untereinheit. Es konnte gezeigt werden, dass Muskelin *in vitro* an die zytoplasmatische Schleife des Rezeptors bindet. Die Bindestelle wurde auf wenige Aminosäuren eingegrenzt.

Ferner wurde beobachtet, dass Muskelin teilweise an Synapsen vorkommt und mit GABA_AR- α 1 in Neuronen kolokalisiert.

Die Suche nach Interaktionspartnern für die α 5-Untereinheit identifizierte Radixin als Bindeprotein. Radixin gehört zur Familie der ERM-Proteine, deren Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett durch Membranbindung und Phosphorylierung reguliert ist. Die Bindestelle für Radixin wurde auf der Rezeptorschleife eingegrenzt. Eine physiologische Relevanz der Interaktion wurde durch Koimmunpräzipitation von Radixin mit GABA_AR- α 5 aus Rattengehirn bestätigt. Verschiedene Ansätze zur Störung der gefundenen Wechselwirkung identifizierten Radixin als den ersten direkt bindenden „Clustering“-Faktor für GABA_A-Rezeptoren. Durch Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass die Bindung an den Rezeptor reguliert ist und dass die synaptische Lokalisation des Radixins von dem Zustand seiner Aktivierung abhängt. Schließlich wurde gezeigt, dass die Manipulation der Radixin-Aktivierung durch die Expression konstitutiv-aktiver, beziehungsweise dominant-negativer GTPasen der Rho-Familie zu einer Verschiebung sowohl von Radixin, als auch des α 5-enthaltenden Rezeptors an die Synapse führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Radixin ein vom Gephyrin-System unabhängiges „Clustering“ von GABA_A-Rezeptoren gewährleistet. Überdies deutet die synaptische-extrasynaptische Rekrutierung des Rezeptors auf ein Modell hin, in dem neben der lateralen Diffusion in der Membran und endo- oder exozytotischen Prozessen auch bereits gebündelte, extrasynaptische Rezeptoren durch laterale Verschiebung an der schnellen, synaptischen Inhibition beteiligt sein können und erweitert auf diese Weise das gegenwärtige Verständnis von synaptischer Plastizität.

1. Einleitung

1.1 Das Gehirn der Säugetiere

Das Nervensystem der Säugetiere lässt sich nach verschiedenen Gesichtspunkten unterteilen. Die anatomische Einteilung unterscheidet das periphere vom zentralen Nervensystem. Das periphere Nervensystem besteht aus den Ganglien und den Nerven, während dem zentralen Nervensystem das Gehirn und das Rückenmark zugeordnet werden. Mit Ausnahme der Reflexe, die ausschließlich im Rückenmark verarbeitet werden, bewerkstelligt das Gehirn die Verarbeitung sämtlicher Erregungen, die ihm über die sensorischen Nerven nach Reizung der Sinnesorgane zugeleitet werden. Außerdem steuert das Gehirn den Bewegungsapparat, wirkt über neuroendokrine Aktivität auf das Hormonsystem ein und beeinflusst die Tätigkeit der inneren Organe über sympathische und parasympathische Bahnen. Neben der Informationsverarbeitung und der motorischen Steuerung erfüllt das Gehirn auch die höheren Funktionen wie die Ausbildung eines Bewusstseins, das Lernverhalten und Erinnerungsvermögen.

Die anatomische Einteilung unterscheidet im Gehirn der Säugetiere fünf große Bereiche (Hirnstamm, Hinterhirn, Mittelhirn, Zwischenhirn und Großhirn), denen unterschiedliche Aufgaben zukommen. Der Hirnstamm bildet durch das verlängerte Mark (Medulla oblongata) die Verbindung zwischen dem Gehirn und dem Rückenmark. Das Hinterhirn wird von dem Kleinhirn (Cerebellum) und der Brücke (Pons) gebildet. Die Aufgabe des Hinterhirns ist es, das gesamte sensomotorische System zu kontrollieren. Es verfügt, ähnlich wie das Großhirn, über eine stark gewundene Rinde.

Das Tectum und das Tegmentum bilden gemeinsam das Mittelhirn. Während das Tectum dorsal liegt und auf einer Platte, der Lamina tecti, vier Hügel besitzt (je zwei Colliculi superiores und inferiores), stellt das Tegmentum den größeren Teil des Mittelhirns dar und enthält unter anderem den Nucleus ruber, der als wichtiger Schaltkern für das extrapyramidalmotorische System dient.

Das Zwischenhirn besteht aus dem Thalamus und dem Hypothalamus, der seinerseits viele verschiedene Kerne umfasst und über Kommunikation mit der Hirnanhangdrüse (Hypophyse) steuernd auf das Hormonsystem einwirkt. Er ist außerdem mit dem limbischen System (Archikortex) verknüpft, das sich unter anderem aus dem Hippokampus und der Amygdala zusammensetzt. Während in der Amygdala Prozesse ablaufen, die für die emotionale Färbung von Informationen wichtig sind (zum Beispiel Angstverhalten), wird der Hippokampus mit Vorgängen von Lernen und Gedächtnis in Verbindung gebracht. Patienten, denen der Hippokampus entfernt wurde, leiden am Verlust ihres Kurzzeitgedächtnisses und können nur mühsam neue Zusammenhänge erlernen. Die Beleuchtung der neuronalen Konnektivität im Hippokampus hat erstmals zu einem gut beschriebenen Modell für die Informationsverarbeitung und -weiterleitung zwischen verschiedenen sensorischen Systemen und der Großhirnrinde (Neokortex) geführt. Der Neokortex ist Teil des Großhirns (Cerebrum) und wölbt sich über die beiden vielfach gefurchten Hemisphären, die über den Balken (Corpus callosum) miteinander verbunden sind. Das Großhirn beinhaltet unter anderem das Seh- und Hörzentrum, die Bewusstseins- und Körperfühlfelder und stellt den phylogenetisch jüngsten Teil des Wirbeltiergehirns dar.

Aufgrund der außerordentlichen Komplexität des Gehirns und der weit verzweigten Zellfortsätze, hat sich erst relativ spät die Ansicht durchgesetzt, dass das Gehirn aus zellulären Grundeinheiten, den Neuronen, aufgebaut ist und nicht, wie bis dahin von Camillo Golgi postuliert, aus einem zusammenhängenden Membranretikulum. Am Ende des 19. Jahrhunderts gelang es Santiago Ramón y Cajal zum ersten Mal, einzelne Neuronen anzufärben. Basierend auf seinen anatomischen und histologischen Betrachtungen stellte er die Theorie der funktionellen Polarität auf, auf deren Grundlage viele Erkenntnisse der modernen Neuroanatomie und -biochemie beruhen.

1.2 Neuronen

Die funktionellen Grundeinheiten des Nervensystems, die Neuronen, sind elektrisch erregbare, hochgradig polarisierte Zellen. Funktionell gliedern sie sich in ein oft weitverzweigtes Geäst aus Fortsätzen (Neuriten) und einen Zellkörper (Soma). Außer den Dendriten, die Informationen von anderen Nervenzellen erhalten, entspringt dem Soma ein zum Teil sehr langer Zellfortsatz, der die Erregung an andere Zellen weiterleitet (Axon). Neben den Neuronen machen Gliazellen ungefähr 50% der Zellmasse im Gehirn aus. Den Gliazellen werden Aufgaben in der Ernährung und elektrischen Isolierung der Neuronen zugeschrieben. Neuere Erkenntnisse lassen darüberhinaus auf komplexe Zusammenhänge schließen, bei denen Gliazellen zum Beispiel bei der Modulierung neuronaler Aktivität (Kang und Gabriel, 1998) und bei der neuronalen Wanderung während der Hirnentwicklung beteiligt sind.

Die Position der Neuronen im Gehirn ist das Ergebnis eines Entwicklungsprozesses, der größtenteils nach festgelegten Mustern erfolgt. Die Musterbildung („patterning“) ist am besten in der Entwicklung des Neokortex untersucht, der aus sechs verschiedenen Schichten besteht, deren Aufbau in seiner räumlichen und zeitlichen Organisation streng reguliert ist (zur Übersicht siehe Rakic, 2002). Nachdem bildgebende Verfahren in der Magnetresonanztomographie Hinweise darauf gegeben haben, dass bestimmte Hirnfunktionen auf bestimmten Arealen lokalisiert werden können, setzt sich nun die Annahme durch, dass das Gehirn eine funktionelle Karte darstellt, die in manchen Modellsystemen bis hin zur Ebene einzelner Zellen bestimmt werden kann.

Die elektrische Erregbarkeit der Neuronen beruht auf dem Vorhandensein verschiedener Transmembranproteine, die als spannungsabhängige oder ligandengesteuerte Ionenkanäle fungieren können und entweder auf eine Verschiebung des elektrischen Potentials über der Membran oder durch Bindung eines spezifischen chemischen Botenstoffes die Leitfähigkeit der neuronalen Plasmamembran für bestimmte Ionen selektiv erhöhen können. Dadurch wird die Membran lokal depolarisiert und in benachbarten Bereichen werden ebenfalls spannungsabhängige Ionenkanäle geöffnet, sofern ein bestimmter Schwellenwert für das

Membranpotential unterschritten wird. Auf diese Weise wandert die elektrische Erregung nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip in Form eines Aktionspotentials entlang eines Neuriten.

Neuronen haben unterschiedliche Möglichkeiten, um miteinander zu kommunizieren. Kontaktstellen, an denen die Informationsübertragung von einem Neuron zum anderen stattfindet, werden nach dem griechischen Wort *sunaptein* (zusammenschließen) als Synapsen bezeichnet. Man unterscheidet nach ihrer Natur elektrische von chemischen Synapsen. Elektrische Synapsen (auch „gap junctions“) sind direkte Kontaktstellen des Zytoplasmas zweier benachbarter Zellen. Sie sind in Epithelzellen und im Herzmuskelgewebe weit verbreitet und dienen der schnellen Gleichschaltung verschiedener Parameter wie elektrischer Erregbarkeit, Metabolitenspiegel oder Ionengleichgewicht in einem funktionellen Zellverband. Die physikalische Verbindung zweier Zellen wird durch spezialisierte Proteinporen (Connexone) hergestellt, deren Öffnungszustand durch den sekundären Botenstoff Kalzium reguliert ist (Thimm et al., 2005). Elektrische Synapsen dienen beispielsweise der Synchronisation von Aktivität in Nervenzellverbänden.

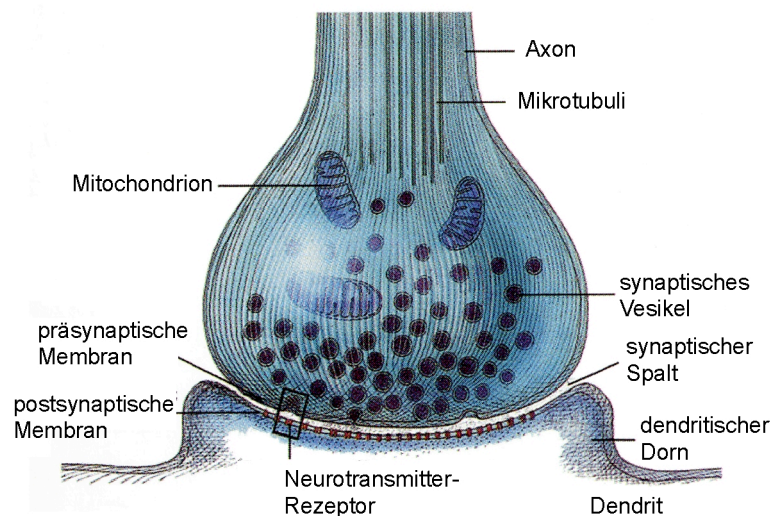


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer chemischen Synapse.

Die präsynaptische Endigung beherbergt eine Vielzahl von synaptischen Vesikeln, die mit dem Neurotransmitter gefüllt sind. In der postsynaptischen Membran sind Neurotransmitter-Rezeptoren lokalisiert. Prä- und postsynaptische Zelle sind durch den synaptischen Spalt voneinander getrennt (Heinrich Betz, MPG).

Chemische Synapsen hingegen sind spezialisierte Kontaktbereiche, bei denen die betreffenden Zellen durch einen etwa 30-50 nm breiten Spalt voneinander getrennt bleiben und somit eine prä- und eine postsynaptische Spezialisierung ausbilden (siehe Abbildung 1.1).

Die Informationsübertragung geschieht durch kleine Moleküle (Transmitter), die von der präsynaptischen Zelle aus spezialisierten Vesikeln ausgeschüttet und von der postsynaptischen Zelle durch spezifische Rezeptoren erkannt werden. Erreicht ein Aktionspotential die präsynaptische Endigung einer Nervenzelle, so werden dort spannungsabhängige Ionenkanäle geöffnet, die für Ca^{2+} -Ionen permeabel sind. Dieser Ca^{2+} -Einstrom führt zur Fusion der synaptischen Vesikel, die den Neurotransmitter enthalten, mit der Plasmamembran. Die Botenstoffe diffundieren durch den synaptischen Spalt und binden an die postsynaptischen Rezeptoren, die ihrerseits durch konformationelle Änderungen die Permeabilität der postsynaptischen Plasmamembran für bestimmte Ionen kurzfristig heraufsetzen. Dies führt – je nach Ladung des Ions und der Stromrichtung – zu einer Depolarisation oder Hyperpolarisation der nachgeschalteten Nervenzelle und damit entweder zu ihrer Erregung (exzitatorische Synapsen) oder ihrer Hemmung (inhibitorische Synapsen).

1.2.1 Exzitatorische Synapsen

Exzitatorische oder auch erregende Synapsen zeichnen sich durch eine Reihe von morphologischen Charakteristika aus. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist die Präsynapse an der Vielzahl ihrer synaptischen Vesikel zu erkennen. Die postsynaptische Seite hingegen ist durch eine elektronendichte Struktur gekennzeichnet, die aufgrund ihrer Auffälligkeit auch die postsynaptische Dichte (PSD, „*postsynaptic density*“) genannt wird. Ihrem besonderen morphologischen Erscheinungsbild verdankt die exzitatorische Synapse auch die Bezeichnung asymmetrische Synapse. In vielen Fällen ruht die Präsynapse auf einer besonderen, dornenförmigen Struktur, eine Spezialisierung des postsynaptischen Dendriten. Diese dendritischen Dornen („*dendritic spines*“) wurden zuerst von Ramón y Cajal im Jahr

1888 beschrieben und sind im zentralen Nervensystem weit verbreitet. Während der Synaptogenese bilden sich vorübergehend viele, zunächst filopodienartige Dornen aus, von denen einige durch den Kontakt mit präsynaptischen Endigungen und durch Aktivität stabilisiert werden. Sie verändern daraufhin ihre Form zu einer knollenartigen Erscheinung und enden schließlich in einer etablierten und funktionellen Synapse als reife, pilzförmige dendritische Dornen. Exzitatorische Synapsen werden aber auch auf dem dendritischen Schaft gebildet und in manchen Hirnregionen sind überhaupt keine Dornen beschrieben worden.

Der häufigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn ist die Aminosäure Glutamat, aber auch Aspartat und die biogenen Amine Noradrenalin, Dopamin und Serotonin können erregende Signale vermitteln. Biochemisch sind glutamaterge Synapsen durch verschiedene Charakteristika gekennzeichnet. Auf der präsynaptischen Seite können die transmembranen Proteine VGLUT1 und VGLUT2 nachgewiesen werden, deren Aufgabe darin besteht, die synaptischen Vesikel mit Glutamat zu befüllen (Takamori et al., 2000; Fremeau et al., 2001). Auf der postsynaptischen Seite befinden sich Glutamatrezeptoren in der postsynaptischen Membran. Die zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle zählenden Rezeptoren werden nach ihren spezifischen Agonisten in die drei Klassen der Kainat-Rezeptoren, AMPA (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure)-Rezeptoren und NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren eingeteilt.

Die Rolle der Kainat-Rezeptoren ist am wenigsten gut verstanden. Bis heute sind fünf verschiedene Untereinheiten beschrieben worden. Hinweise darauf, dass die Kainat-Rezeptoren ausschließlich als Tetramere vorkommen, werden noch kontrovers diskutiert (Ferrer-Montiel und Montal, 1996).

Es sind vier Untereinheiten für den AMPA-Rezeptor beschrieben worden (GluR1-4), die sich zu heterotetrameren oder heteropentameren Rezeptoren zusammenlagern können (Ayalon und Stern-Bach, 2001). Außerdem können durch alternatives Spleissen und RNA-Editierung der verschiedenen Untereinheiten viele Varianten hervorgebracht werden. So wird beispielsweise die Kalziumpermeabilität des Rezeptors durch das sogenannte Q/R-Editieren in der GluR2 Untereinheit reguliert (Dabiri et al., 1996). In Neuronen kommt hauptsächlich die Kalzium-impermeable Variante vor, weswegen der Rezeptor nur Kalium- und Natriumströme

vermittelt. Der rasche Einstrom von Natriumionen hat eine lokale Depolarisierung der postsynaptischen Membran zur Folge und führt zur Ausbildung eines Aktionspotentials, wenn der Schwellenwert unterschritten wird. AMPA-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Modulation synaptischer Stärke und tragen entscheidend zum Entstehen von Langzeitpotenzierung und Langzeitdeprimierung bei (siehe Abschnitt 1.2). Es konnte gezeigt werden, dass die Insertion von AMPA-Rezeptoren in die beziehungsweise die Depletion aus der Plasmamembran durch exo- und endozytotische Prozesse direkten Einfluss auf die Effizienz der synaptischen Übertragung hat.

NMDA-Rezeptoren kommen oft gemeinsam mit AMPA-Rezeptoren an der postsynaptischen Spezialisierung vor (Huntley et al., 1994). Sie stellen tetramere Assemblierungen aus den Untereinheiten NR1 und NR2 dar, die für Natrium-, Kalium- und in hohem Maße für Kalziumionen permeabel sind. Zu den Besonderheiten des NMDA-Rezeptors gehört, dass ein Magnesium-Ion die Kanalpore blockiert und erst nach erfolgter Depolarisierung der postsynaptischen Membran abdifferenzieren kann. Ein Kalziumeinstrom kann also erst stattfinden, wenn Glutamat ausgeschüttet wird, obschon die postsynaptische Zelle bereits erregt ist. Diese Besonderheit stellt sicher, dass der NMDA-Rezeptor nur aktiviert werden kann, wenn in seiner unmittelbaren Umgebung bereits AMPA-Rezeptoren geöffnet worden sind. Er fungiert daher als ein Gleichzeitigkeits-Detektor. Desweiteren wirkt Glyzin am NMDA-Rezeptor als Koagonist und ist für seine vollständige Aktivierung unerlässlich (Kleckner und Dingledine, 1988).

Der Einstrom von Kalzium-Ionen, die im Zellinneren als sekundärer Botenstoff fungieren, führt durch kalziumbindende Proteine zur Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden, die weitreichende Effekte auf verschiedene subzelluläre Steuerungsmechanismen ausüben. Unter anderem sind direkte Einflüsse auf die Genexpression im Zellkern durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren beschrieben worden (Ghosh und Greenberg, 1995).

Die Lokalisation des Rezeptors ist von entscheidender Bedeutung für die Auswirkungen seiner Aktivierung. Während NMDA-rezeptorvermittelte Signale, die an synaptischen Kontakten übertragen werden, neuroprotektive Wirkung entfalten, führt die NMDA-Rezeptor Aktivierung an extrasynaptischen Stellen über Signalwege, die den Transkriptionsfaktor

CREB („*cAMP response element binding protein*“) steuern, zum Zelltod (Hardingham et al., 2002). Es wird spekuliert, dass die Aktivierung von extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren einen wichtigen Mechanismus beim Phänomen der Exzitotoxizität von Glutamat darstellt.

Die Bündelung der Glutamat-Rezeptoren und ihre Verankerung am Zytoskelett wird von Bestandteilen der postsynaptischen Dichte geleistet. Dieses feste Geflecht aus über hundert verschiedenen Komponenten erhielt seinen Namen, weil es mit Detergenzien quasi nicht in Lösung gebracht werden kann. Die molekulare Untersuchung der postsynaptischen Dichte hat das Verständnis von den Vorgängen unter der postsynaptischen Membran bedeutsam beeinflusst. Die NR2 Untereinheit bindet das Protein PSD95, ein Strukturprotein, das aus drei PDZ-Domänen (von *postsynaptic density*, *discs large*, *zonula occludens*), einer SH3-Domäne (*sarc homology*) und einer katalytisch nicht aktiven Guanylatkinase-Domäne aufgebaut ist (Kornau et al., 1995) und im N-Terminus myristoyliert werden kann. PSD95 verbindet den Rezeptor mit dem Protein GKAP, das seinerseits an das Gerüstprotein Shank koppelt (Naisbitt et al., 1999). Shank fungiert als ein multivalentes Kopplungsmodul, das wesentliche Teile der postsynaptischen Dichte miteinander vernetzt. Des Weiteren verbindet PSD95 den NMDA-Rezeptor mit anderen Transmembranproteinen wie Neuroligin 1, einem für exzitatorische Synapsen spezifischen Zell-Adhäsionsmolekül (Song et al., 1999), dem initiale Beteiligung am Aufbau von synaptischen Kontakten zugeschrieben werden (Chih et al., 2005). Der NMDA-Rezeptor bindet außerdem die Proteine α -Actinin und Spektrin, die beide an F-Aktin binden und den Rezeptor so mit dem Zytoskelett verankern. Umgekehrt wirkt die Aktivierung des NMDA-Rezeptors über die proteolytische Prozessierung von Spektrin auf die Modulierung des Aktin-Zytoskeletts ein (Rajgopal und Vemuri, 2002). Diese Verbindung wird als eine Möglichkeit für aktivitätsabhängige Strukturveränderungen an Synapsen gesehen. Ferner bindet die NR1 Untereinheit an das Protein Yotiao, das den Rezeptor mit Signalmolekülen wie Proteinkinase A oder Proteinphosphatase I koppelt, die seine Aktivität regulieren können (Lin et al., 1998).

Auch AMPA-Rezeptoren interagieren mit verschiedenen PDZ-Proteinen. So bindet die GluR1 Untereinheit an SAP97, ein zu PSD95 homologes Protein (Sans et al., 2001). Die stark miteinander verwandten Untereinheiten GluR2/3 binden an GRIP1 (*glutamate receptor*

interacting protein), GRIP2 und PICK (*protein interacting with activated C-kinase*) (Hirbec et al., 2002). GRIP1 besteht aus sieben unterschiedlichen PDZ-Domänen und es sind verschiedene Spleissvarianten des Proteins beschrieben worden. Eine Form, die nur die PDZ-Domänen 4-7 besitzt, lokalisiert vorwiegend synaptisch (Charych et al., 2004). Eine andere Spleissform, GRIP1b, wurde als Interaktionspartner des Homöobox-Transkriptionsfaktors DLX2 identifiziert (Yu et al., 2001). Mausmodelle der genetischen Inaktivierung haben gezeigt, dass GRIP1 ein essentielles Protein ist. Noch ist seine Rolle in Bezug auf den AMPA-Rezeptor allerdings nicht hinreichend beleuchtet. Neben einer möglichen Funktion in der Bündelung und Verankerung des Rezeptors („Clustering“) wurde, wie auch für PICK, eine Beteiligung im Endozytosevorgang berichtet, die auf wichtige Funktionen in der Regulierung der synaptischen Stärke hindeuten. Ferner wurde gezeigt, dass GRIP1 an GABARAP (*GABA_A receptor associated protein*) binden kann (Kittler et al., 2004) und möglicherweise indirekt Einfluss auf die Funktion von GABA_A-Rezeptoren nehmen kann.

1.2.2 Inhibitorische Synapsen

Im Vergleich mit den exzitatorischen Synapsen lassen sich inhibitorische Synapsen in elektronenmikroskopischen Bildern an weniger stark hervortretenden Strukturmerkmalen erkennen. Die präsynaptische Endigung verfügt über unregelmäßig geformte Vesikel, der synaptische Spalt ist schmaler und die postsynaptische Dichte weniger deutlich ausgeprägt als bei der erregenden Synapse. Morphologische Studien haben gezeigt, dass inhibitorische Synapsen hauptsächlich auf dem Schaft des Dendriten liegen und selten auf dendritischen Dornen. Eine große Zahl inhibitorischer Synapsen findet sich auch direkt auf dem Soma der Nervenzellen.

Die Präsynapse kann immunzytochemisch durch das Protein GAD (*glutamic acid decarboxylase*) identifiziert werden, das durch Decarboxylierung von Glutamat den Neurotransmitter GABA (γ -amino-Buttersäure) herstellt. Ferner dient das transmembrane Protein VIAAT (*vesicular inhibitory amino acid transporter*) als Marker für inhibitorische

Präsynapsen, weil es in der Membran der synaptischen Vesikel lokalisiert ist und für die Anreicherung von Glyzin oder GABA im Lumen des Vesikels verantwortlich ist (McIntire et al., 1997).

Glyzin und GABA stellen die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter dar. Während Glyzin vorwiegend im Rückenmark und im Hirnstamm vorkommt, ist GABA der vorherrschende Transmitter im größten Teil des Gehirns. Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren sind strukturell miteinander verwandt. Wie der ionotrope Serotoninrezeptor 5-HT₃ und der nikotinische Acetylcholinrezeptor gehören sie zur Familie der pentameren, ligandengesteuerten Ionenkanäle. Für den Glyzin-Rezeptor sind eine α - und vier β -Untereinheiten beschrieben worden, die wahrscheinlich im Verhältnis 3 β 2 α einen pentameren Komplex bilden. Jede Untereinheit besitzt eine relativ große, extrazelluläre N-terminale Domäne, vier Transmembrandomänen, die eine kleine und eine große intrazelluläre Schleife einschließen und schließlich einen sehr kurzen C-Terminus, der wie der N-Terminus extrazellulär lokalisiert ist. Als Agonisten wirken α -Alanin und Taurin; Zink-Ionen modulieren die Aktivität des Rezeptors negativ (Laube et al., 1995). Das pflanzliche Alkaloid Strychnin kompetiert mit Glyzin um die Ligandenbindestelle und kann den Rezeptor hochaffin hemmen. Der GABA_A-Rezeptor verfügt über die gleiche Membrantopologie wie der Glyzin-Rezeptor, seine Assemblierung ist jedoch aufgrund der Vielfalt an Untereinheiten erheblich komplexer. Man unterscheidet sieben Klassen von Untereinheiten mit jeweils einer oder mehreren Isoformen: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , ζ und θ . Manche dieser Isoformen sind nur in einigen Teilbereichen des Gehirns oder zu bestimmten Zeiten der Entwicklung exprimiert, während andere auf subzellulärer Ebene in distinkten Kompartimenten lokalisiert sind. So kommt die α 6 Untereinheit fast ausschließlich im Cerebellum vor (Wisden et al., 1992), während die α 2 Untereinheit in GABA_A-Rezeptoren gefunden wurde, die sich hauptsächlich auf dem initialen Axonsegment befinden (Nusser et al., 1996). Die enorme Vielzahl von theoretischen Kombinationsmöglichkeiten wird in der Natur aber nicht voll ausgenutzt. Zwar sind verschiedene Zusammensetzungen mit unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften beschrieben worden, die Hauptform des GABA_A-Rezeptors wird aber durch die Kombination 2 α 2 β 1 γ dargestellt (McKernan und Whiting, 1996). Die GABA-Bindestelle kann nicht einer

einzelnen Untereinheit zugeschrieben werden, sondern wird gemeinsam von der α - und der β -Untereinheit gebildet. Benzodiazepine wirken als Agonisten und auch ihre Bindestelle entsteht durch die Zusammenlagerung zweier Untereinheiten, nämlich der α - und einer β -Untereinheit (Gunther et al., 1995). Weitere Modulationen werden von allosterischen Effektoren wie Ethanol, Barbituraten und Steroiden ausgeübt. Bicuculline wirkt als kompetitiver Inhibitor an der GABA-Bindestelle, Muscimol als Agonist, während Picrotoxinin das Durchtreten der Ionen durch den Kanal verhindert.

Die postsynaptische Dichte der inhibitorischen Synapse ist weniger gut charakterisiert als die der exzitatorischen. Das Vernetzungsprinzip durch Proteine, die PDZ-Domänen enthalten und ein komplexes, strukturelles Netzwerk ausbilden, ist an der hemmenden Synapse nicht realisiert. Allerdings sind diverse molekulare Komponenten der inhibitorischen Postsynapse identifiziert worden. Die α -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors bindet mit großer Affinität an das submembranäre Gerüstprotein Gephyrin (Prior et al., 1992). Gephyrin ist ein 93 kD schweres, lösliches Protein, das gleichzeitig über verschiedene Motive in seiner Aminosäuresequenz dimerisieren und trimerisieren kann und auf diese Weise ein hexagonales Gitter formt (Sola et al., 2004). Die Inaktivierung von Gephyrin zieht den Verlust der Konzentrierung von Glyzinrezeptoren in der postsynaptischen Membran nach sich (Kirsch et al., 1993). Eine direkte Interaktion von Gephyrin mit einer der Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden. Das Protein GABARAP (*GABA receptor associated protein*) ist bislang das einzige Protein, das sowohl Gephyrin (Kneussel et al., 2000) als auch die β -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors binden kann (Nymann-Andersen et al., 2002), ein trimere Komplex ist aber bislang nicht beschrieben worden. Da GABARAP in Neuronen vornehmlich mit dem Golgi-Apparat assoziiert, aber nicht synaptisch lokalisiert ist, erscheint es unwahrscheinlich, dass es eine solche Verankerungsfunktion an der inhibitorischen Synapse ausübt. Neben GABARAP binden auch das Aktinbindepotein Profilin I und Collybistin, ein Rho-GEF (*GTP/GDP exchange factor*), an Gephyrin (Giesemann et al., 2003). Collybistin reguliert den Aggregationszustand von Gephyrin über bislang unbekannte Mechanismen.

Durch Immunpräzipitation aus Rinderhirn sind eine Reihe von Bindeproteinen für den GABA_A-Rezeptor identifiziert worden, die spezifisch mit α 1-enthaltenden Rezeptoren assoziiert sind (Kannenberg et al., 1997), deren genaue Funktion allerdings in den meisten Fällen unzureichend charakterisiert ist. Neben anderen wurden die Zytoskelett-Komponenten Aktin und Tubulin gefunden, was Anlass zur Spekulation gab, dass der Rezeptor womöglich sowohl über Mikrotubuli als auch über Mikrofilamente verankert wird (Giesemann et al., 2003).

Das Ubiquitin-ähnliche Protein Plic1 bindet unter anderem an die α 1-Untereinheit und scheint die Insertion des Rezeptors in die Plasmamembran zu fördern und seine Verweildauer in einem vesikulären Reservepool unter der Zelloberfläche zu verlängern (Bedford et al., 2001). GRIF-1 (*GABA receptor interacting factor*), das in zwei verschiedenen Spleissformen beschrieben wurde, bindet spezifisch an die α 2-Untereinheit. Ihm wird wegen seiner intrazellulären Lokalisation bei Überexpression in heterologen Zellsystemen eine Funktion im Transport des GABA_A-Rezeptors zugeschrieben (Beck et al., 2002). Die generellen Mechanismen, mit Hilfe derer GABA_A-Rezeptoren an inhibitorischen Synapsen gebündelt und mit dem Zytoskelett verankert werden, sind ungeklärt.

Durch die Identifikation der beschriebenen Komponenten und die Charakterisierung ihrer Funktionen wurden die Grundzüge der synaptischen Übertragung erkennbar. Die Veränderlichkeit der synaptischen Stärke ist von großer Bedeutung, weil sie die molekulare Grundlage für die Ausbildung eines Gedächtnisses darstellt.

1.3 Lernen und Gedächtnis: Synaptische Plastizität

Zu den höheren Hirnfunktionen gehören unter anderem das räumliche Lernen und die Ausbildung eines Erinnerungsvermögens. Die enorme Komplexität des Gehirns hat die Beleuchtung der Vorgänge zum Beispiel beim Lernen erheblich erschwert. Die geschätzte Zahl von einigen Milliarden Neuronen und bis zu 10.000 synaptischen Kontakten pro Neuron macht deutlich, dass eine Beschreibung der Gesamtkonnektivität nicht möglich ist. Durch die Beschränkung auf einige wenige, gut untersuchte Modellsysteme ist es aber gelungen,

prinzipielle Mechanismen zu beschreiben, durch die das Gehirn Informationen zeitlich konservieren kann.

Die synaptische Verknüpfung der Neuronen untereinander ist nicht starr, sondern kann in verschiedener Weise modifiziert werden. So wird die Stärke einer Synapse ständig moduliert und manche synaptischen Kontakte werden aufgegeben, während sich an anderer Stelle neue Verknüpfungen bilden. Diese Vorgänge werden unter dem Begriff der „synaptischen Plastizität“ zusammengefasst. Elektrophysiologische Ableitungen haben in Hippokampus-Schnitten Vorgänge identifiziert, die heute als zelluläre Korrelate von Kurz- beziehungsweise Langzeitgedächtnis angesehen werden. Bei der post-tetanischen Potenzierung, die durch hochfrequente synaptische Reize ausgelöst wird, zieht ein einzelnes Aktionspotential auf dem postsynaptischen Neuron eine stärkere Antwort nach sich als vor der Reizung. Der Effekt ebbt in der Regel allerdings nach einigen Minuten ab und wird daher mit einem möglichen Mechanismus für ein Kurzzeitgedächtnis in Verbindung gebracht.

Neben Kurzzeit-Effekten sind auch langanhaltende Veränderungen beschrieben worden, zu deren Ausbildung Proteinbiosynthese nötig ist. Diese Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP), die selbst nach Wochen noch nachgewiesen werden kann und daher als Äquivalent zu einem Vorgang im Langzeitgedächtnis angesehen wird, kann durch wiederholte post-tetanische Potenzierung oder durch besonders starke tetanische Reizung ausgelöst werden. Umgekehrt kann die Stärke einer Synapse auch durch niederfrequente Stimulation herabgesetzt werden (*long term depression*, LTD, Langzeitdepression) (Yang et al., 1994). Beide Effekte werden durch den Einfluss von Kalziumionen in die postsynaptische Spezialisierung gesteuert und können durch pharmakologische Blockade des NMDA-Rezeptors verhindert werden (Thiels et al., 1994). Im Fall von LTP werden durch die lange Stimulierung NMDA-Rezeptoren aktiviert, was zur Aktivierung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) führt. Eine niederfrequente Reizung führt hingegen zu einem geringen, aber dauerhaften Anstieg des Kalziumspiegels und löst über die Aktivierung von Proteinphosphatasen LTD aus. Neben der Möglichkeit, dass Phosphorylierungskaskaden Signale bis zum Zellkern bringen und eine Veränderung der Transkription auslösen, wurden vor allem die Auswirkungen dieser Signalwege an den Synapsen selbst untersucht. Zu den

Zielproteinen der Phosphoregulierung gehört unter anderem der AMPA-Rezeptor. Sowohl pharmakologische Rezeptoreigenschaften, als auch seine Präsenz in der postsynaptischen Membran werden durch Phosphorylierung gesteuert (Esteban et al., 2003). Neben dem Befund, dass der Phosphorylierungsstatus des Rezeptors während LTD und LTP unterschiedlich ist, konnte durch einen genetischen Ansatz gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an zwei bestimmten Serinresten (S831 und S845) in der GluR1 Untereinheit eine Voraussetzung für das Erinnern an neu erlernte, räumliche Umgebung ist, aber nicht für das Erlernen selbst (Lee et al., 2003). Die Induktion von LTP geht mit morphologischen Veränderungen der betroffenen Dendritenabschnitte einher. So konnte gezeigt werden, dass sich nach elektrophysiologisch induzierter LTP lokal neue Dornen ausbilden, während andere, nicht betroffene Bereiche des Dendriten keine Änderung der Dornenzahl zeigten (Engert und Bonhoeffer, 1999).

Die Rolle des NMDA-Rezeptors in synaptischer Plastizität wurde durch Studien beleuchtet, in denen das Verbrückungsprotein PSD95 als Fusion mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) in Neuronen exprimiert wurde. Zeitrafferaufnahmen zeigten, dass ein beständiger Protein-Umsatz die Struktur der Synapse in einem veränderlichen Fließgleichgewicht hält und dass die mittlere Verweildauer einzelner Moleküle nicht länger als 24 Stunden beträgt (Okabe et al., 1999). Genetische Manipulation, die zur Expression eines verkürzten PSD95 führt, das zwar noch an den NMDA-Rezeptor binden kann, aber nur noch aus den ersten beiden PDZ-Domänen besteht, hat nicht den Verlust von NMDA-Rezeptoren an der Synapse, sondern eine verstärkte LTP und eingeschränktes Lernen zur Folge (Migaud et al., 1998). Dieser Befund weist auf eine Funktion von PSD95 in der Signaltransduktion hin und hat zu der Spekulation geführt, dass ein retrogrades Signal an die Präsynapse eine Voraussetzung für Lernen und Erinnerung sein könnte und womöglich durch die Interaktion von PSD95 mit dem transsynaptischen NeuroliginI/Neurexin-Komplex vermittelt wird.

An der inhibitorischen Synapse sind plastische Vorgänge weniger gut untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in organotypischen Hippokampus-Schnittkulturen die Dichte an inhibitorischen Synapsen von der elektrischen Aktivität im Gewebe abhängt (Marty et al., 2000). Gemeinsam mit dem Befund, dass in Dunkelheit aufgezogene Ratten veränderte

Muster der GABA_A-Rezeptor-Immunreaktivität im visuellen Kortex zeigen (Morales et al., 2002), deuten diese Ergebnisse auf eine maßgebliche Beteiligung der elektrischen Netzwerk-Aktivität an der Reifung inhibitorischer Synapsen und der Regulation ihrer Stärke hin.

In verschiedenen Systemen wurden auf zellulärer Ebene LTP- und LTD-Phänomene beobachtet. In der Plastizität GABAerger Synapsen in neugeborenen Ratten spielt der intrazelluläre Kalziumspiegel eine entscheidende Rolle, wenngleich die zugrundeliegenden Mechanismen der Kalziumausschüttung in verschiedenen Strukturen unterschiedlich sind (zur Übersicht siehe Gaiarsa et al., 2002). Zu diesem Zeitpunkt in der Entwicklung im Hippokampus sind die Chloridionen noch mit hoher intrazellulärer und niedriger extrazellulärer Konzentration über der Plasmamembran verteilt, so dass beim Öffnen des GABA_A-Rezeptors ein auswärtsgerichteter Strom entsteht, der die Zelle depolarisiert. Der Anstieg an intrazellulärem Kalzium erfolgt durch die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle (Caillard et al., 1999) und führt zu LTP. Wenn gleichzeitig Glutamat ausgeschüttet wird, erfolgt zusätzlich ein Kalziumeinstrom durch NMDA-Rezeptoren, die aufgrund der Depolarisation durch die GABAerge Transmission das blockierende Magnesiumion verloren haben. Interessanterweise führt dieses Szenario zum Ausbilden von LTD.

Auch in adulten Ratten, wo GABA inhibitorische Wirkung entfaltet, wurde der Beitrag der hemmenden Synapsen zum Entstehen von LTP untersucht. Die Modulierung der Gesamterregbarkeit von Nervenzellen spielt bei der Ausbildung von Langzeitphänomenen eine entscheidende Rolle. Zum Generieren von LTP tragen zwei Komponenten unabhängig voneinander bei: Erstens stellt der Anstieg des erregenden postsynaptischen Potentials (EPSP) eine Voraussetzung für die erhöhte Erregbarkeit der postsynaptischen Zelle dar, zweitens wird die Wahrscheinlichkeit, dass es zur Ausbildung eines Aktionspotentials kommt, maßgeblich vom Zustand der Inhibition der betreffenden Zelle beeinflusst (Lu et al., 2000). Die Abschwächung der Inhibition erhöht die Wahrscheinlichkeit eines Aktionspotentials zusätzlich, wenn gleichzeitig das erregende postsynaptische Potential vergrößert ist. Dieses Phänomen nennt man E-S-Kopplung (*EPSP-spike-coupling*). Erste Arbeiten haben gezeigt, dass die Phosphatase Calcineurin entscheidend an der Ausbildung der E-S-Kopplung beteiligt

ist, indem sie eine langanhaltende Depression der inhibitorischen Synapsen vermittelt (Lu et al., 2000). Später konnte demonstriert werden, dass diese Effekte auf einer direkten Interaktion von Calcineurin mit der β -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors beruhen und ihre molekulare Ursache in der von Calcineurin vermittelten Dephosphorylierung des Rezeptors haben (Wang et al., 2003).

Der Etablierung und Aufrechterhaltung funktioneller inhibitorischer Synapsen während der Synaptogenese liegen die gleichen zellulären Mechanismen zugrunde. So wurde gezeigt, dass Neurotrophine wie das sekretierte Protein BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) die Reifung inhibitorischer Synapsen beschleunigen können (Vicario-Abejon et al., 1998) und gleichzeitig der Reduktion an hemmenden Synapsen bei Unterdrückung elektrischer Netzwerkaktivität entgegenwirken (Marty et al., 2000). BDNF aktiviert den transmembranen Trk-Rezeptor, der seinerseits die Aktivität von intrazellulär assoziierten Tyrosinkinasen heraufsetzt. Die genauen Mechanismen der Phosphorylierungskaskade sind nicht bekannt.

Die Stärke inhibitorischer Synapsen wird zusätzlich über die Verfügbarkeit des Rezeptors an der Oberfläche reguliert. GABA_A-Rezeptoren werden durch kontinuierliche Endozytose aus der Plasmamembran entfernt und an anderer Stelle wieder an die Oberfläche gebracht (zur Übersicht siehe Kittler und Moss, 2003). Dieses Fließgleichgewicht wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. So führt zum Beispiel die chronische Applikation von GABA, aber auch der agonistisch wirkenden Benzodiazepine zu verstärkter Rezeptor-Endozytose (Tehrani und Barnes, 1991). Die Endozytose von GABA_A-Rezeptoren geschieht in Clathrin-umhüllten Vesikeln (Tehrani und Barnes, 1993) und kann durch Bedingungen unterbunden werden, unter denen die Clathrin-basierte Endozytose blockiert ist. Es wurde ferner gezeigt, dass der Rezeptor direkt mit der Endozytosemaschinerie in Verbindung steht, weil α - und β -Untereinheiten an das Adapterprotein AP2 binden, das Transmembranproteine mit dem Clathrin-Käfig verbindet (Kittler et al., 2000). Die synaptische Stärke wird zusätzlich durch Phosphorylierung einzelner Untereinheiten des Rezeptors beeinflusst. Die großen intrazellulären Schleifen der α -Untereinheiten und der β -Untereinheit können von Serin/Threonin- beziehungsweise Tyrosinkinasen phosphoryliert werden. In heterologen

Systemen wurde gezeigt, dass die Proteinkinasen A (PKA), PKC, PKG und CaMKII den Rezeptor phosphorylieren können (zur Übersicht siehe Brandon et al., 2002). Eine funktionelle Analyse *in vivo* ist allerdings nur für wenige Beispiele gelungen. So führt die Phosphorylierung der $\alpha 3$ -Untereinheit durch PKA an Serin408/Serin409 zu einer Potenzierung der GABA-Antwort (McDonald et al., 1998) und wird durch die Aktivität von Proteinphosphatase-1c wieder aufgehoben (Terunuma et al., 2004). Die Phosphorylierung an Serin409 der $\alpha 1$ -Untereinheit hat interessanterweise eine Verminderung der GABA-Antwort zur Folge. Für die $\alpha 2$ -Untereinheit wurden sowohl Phosphorylierungen an Serin- als auch an Tyrosinresten beschrieben (Moss et al., 1995; Brandon et al., 2001), aber die Einflüsse auf die Rezeptorfunktion *in vivo* konnten noch nicht hinreichend geklärt werden.

Neben den Hinweisen darauf, dass GABA_A-Rezeptoren bei der Ausbildung eines Gedächtnisses und beim Lernverhalten eine entscheidende Rolle spielen, mehren sich die Erkenntnisse darüber, dass die verschiedenen Untereinheiten unterschiedliche Funktionen bei der Inhibition übernehmen. Die Zusammensetzung des Pentamers entscheidet nicht nur über seine pharmakologischen Eigenschaften, sondern zum Beispiel auch über die Lokalisation des Rezeptors.

1.4 Die spezielle Rolle der $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors

Obgleich eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten bei der Assemblierung von GABA_A-Rezeptoren denkbar ist, zeigen die meisten untersuchten Pentamere eine Zusammensetzung aus zwei $\alpha 1$ -, zwei $\alpha 2$ - und einer $\alpha 5$ -Untereinheit (McKernan und Whiting, 1996). Die $\alpha 5$ -Untereinheit wird vornehmlich in Verbindung mit $\alpha 3$ - und $\alpha 2/3$ -Untereinheiten gefunden. *In situ*-Hybridisationen haben gezeigt, dass die Boten-RNA der $\alpha 5$ -Untereinheit fast ausschließlich im Bulbus olfactorius und im Hippokampus hergestellt wird (Wisden et al., 1992), wo 20% aller GABA_A-Rezeptoren mindestens eine $\alpha 5$ -Untereinheit tragen (Sur et al., 1998). Im Hippokampus wird die $\alpha 5$ -Untereinheit besonders stark in pyramidalen Zellen exprimiert. Im Gegensatz zu $\alpha 1$ -enthaltenden Rezeptoren, die hauptsächlich an GABAergen

Synapsen gefunden worden sind, lokalisieren $\alpha 5$ -Untereinheiten vorwiegend extrasynaptisch (Mohler et al., 1995). Extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren sind ebenfalls bei der Immunfärbung von lebenden hippocampalen Neuronen beobachtet worden (Kannenberget al., 1999) und es wurde spekuliert, dass GABAerge Innervation einen Einfluss auf die synaptische, beziehungsweise extrasynaptische Lokalisation von GABA_A-Rezeptoren haben könnte (Christie et al., 2002). Kürzlich konnte für die extrasynaptische $\alpha 6$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors eine distinkte Funktion beim Ausbilden von motorischem Fehlverhalten unter Alkohol-Einfluss gezeigt werden (Hanchar et al., 2005); ein weiterer Hinweis darauf, dass die extrasynaptische Lokalisation von Rezeptoren für das Erfüllen bestimmter Funktionen notwendig ist.

Auch der $\alpha 5$ -Untereinheit kommen neben einer generellen Rolle in der tonischen Inhibition wichtige Funktionen zu, die direkte Auswirkungen auf das Verhalten haben. Durch einen genetischen Ansatz konnte gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen die $\alpha 5$ -Untereinheit inaktiviert wurde, ein verbessertes Lernverhalten und ein größeres Erinnerungsvermögen zeigen (Collinson et al., 2002). Die genetisch veränderten Mäuse zeigten deutlich schnelleres Erlernen räumlicher Zusammenhänge, aber normales Angstverhalten und keine Veränderung im Lernverhalten bei Aufgaben, für deren Bewältigung der Hippokampus nicht in Anspruch genommen wird. Elektrophysiologische Analysen haben gezeigt, dass bei den genetisch veränderten Tieren die Amplitude inhibitorischer postsynaptischer Ströme (*inhibitory postsynaptic currents*, IPSC's) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren verringert ist. Diese Daten gaben zu der Spekulation Anlass, dass die $\alpha 5$ -Untereinheit trotz ihrer vorwiegend extrasynaptischen Lokalisation eine wichtige Rolle in der Kontrolle synaptischer Transmission spielt und direkten Einfluss auf das Verhalten hat.

Eine feinere Analyse gelang durch genetische Veränderung von Mäusen, bei denen ein Aminosäureaustausch in der $\alpha 5$ -Untereinheit eingeführt wurde. Dabei wurde ein Histidinrest (His105) durch Arginin ersetzt (Crestani et al., 2002), wodurch die $\alpha 5$ -Untereinheit insensitive gegenüber dem Benzodiazepin Diazepam wird. Auf die genetisch veränderten Mäuse hat das Medikament weiterhin die sedierende, krampf- und angstlösende Wirkung und lediglich die normalerweise von Diazepam vermittelte Muskelrelaxation ist bedingt eingeschränkt. Die

Immunreaktivität für die $\alpha 5$ -Untereinheit ist in diesem System im Hippokampus signifikant herabgesetzt, und eine genaue Analyse zeigte, dass vornehmlich extrasynaptische Rezeptoren von der erniedrigten Oberflächenexpression betroffen sind. Desweiteren zeigen die genetisch veränderten Mäuse ein abnormales assoziatives Lernen und die gesteigerte Fähigkeit, zeitlich versetzte Ereignisse miteinander in Verbindung zu bringen. Die $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors ist demnach für höhere Gehirnfunktionen wie räumliches Lernen und Erinnerungsvermögen von kritischer Bedeutung und ihrer extrasynaptischen Lokalisation fällt eine besondere Schlüsselrolle zu.

1.5 Konsequenzen der Inaktivierung von postsynaptischem Gephyrin

Das Gerüstprotein Gephyrin wurde bei der Aufreinigung des Glyzin-Rezeptors identifiziert und ursprünglich als eine seiner Untereinheiten angesehen (Pfeiffer et al., 1982). Später konnte gezeigt werden, dass es sich um ein lösliches, membran-assoziiertes Protein handelt (Schmitt et al., 1987), das direkt an die α -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors bindet (Meyer et al., 1995). Die Rolle von Gephyrin wurde im wesentlichen durch Studien beleuchtet, die seine Lokalisation in Neuronen oder die Konsequenzen funktioneller Inaktivierung beschrieben. Im Rückenmark, wo die schnelle Inhibition vorwiegend durch Glyzin vermittelt wird, lokalisiert Gephyrin gemeinsam mit dem Glyzin-Rezeptor präzise an inhibitorischen Postsynapsen (Triller et al., 1987). Auch im Gehirn, wo GABA der hauptsächlichste, hemmende Neurotransmitter ist, wird Gephyrin vorwiegend an inhibitorischen Synapsen gefunden (Cabot et al., 1995).

Der Befund, dass Gephyrin an polymerisiertes Tubulin bindet (Kirsch et al., 1991) und dass das Zytoskelett regulierend auf die postsynaptische Lokalisation von Gephyrin einwirkt (Kirsch und Betz, 1995), hat die Auffassung unterstützt, dass Gephyrin ein Verbindungsprotein zwischen dem Glyzin-Rezeptor und dem Zytoskelett darstellt und damit die Verankerung des Rezeptors bewirkt. Dieses Modell wurde um die Komponente bereichert, dass Gephyrin gleichzeitig eine Bündelung des Rezeptors verursacht, da es durch Selbstassoziation ein hexagonales Gitter ausbilden kann (Sola et al., 2004).

Gephyrin ist in allen bislang untersuchten Geweben exprimiert und hat neben seiner Funktion als „Clustering“-Faktor für den Glyzin-Rezeptor auch enzymatische Aktivität in der Biosynthese des Molybdän-Kofaktors, der prosthetischen Gruppe der Enzyme Xanthin-Dehydrogenase, Sulfitoxidase und Aldehydoxidase. Im Molybdän-Kofaktor, der sich strukturell vom Pterinring ableitet, wird das Molybdän von zwei Schwefelatomen koordiniert (Bamforth et al., 1990). In seiner Biosynthese ist nach den beiden Proteinen MOCS1 und MOCS2 auch Gephyrin aktiv (Reiss und Johnson, 2003) und scheint für die Insertion des Molybdäns in die Vorstufe Molybdopterin verantwortlich zu sein. Natürlich vorkommende Mutationen in jedem der drei Gene führen zu schweren neurologischen Schädigungen (Brown et al., 1989; Bamforth et al., 1990). Die Ursache für die Abnormalitäten wird hauptsächlich dem Verlust an Sulfitoxidase-Aktivität zugeschrieben (Johnson et al., 2002), da sowohl die Intoxikation mit anorganischem Sulfit als auch der Mangel an Sulfat zu neuronalem Untergang und einer abnormalen Hirnmorphologie führen. Die genetische Inaktivierung von MOCS1 hat den Verlust von Sulfitoxidase-Aktivität zur Folge, beeinträchtigt aber nicht die synaptische Lokalisation von Gephyrin im Rückenmark (Lee et al., 2002).

Die Inaktivierung von Gephyrin durch *antisense*-Oligonukleotide führt zum Verlust des „Clustering“ von postsynaptischen Glyzin-Rezeptoren im Rückenmark (Kirsch et al., 1993). Auch die Bündelung von GABA_A-Rezeptoren geht bei Gephyrin-Depletion verloren (Essrich, 1998). Die selbe Studie zeigte allerdings, dass der Verlust der $\alpha 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors die gleichen Auswirkungen auf das „Clustering“ an inhibitorischen Synapsen hat wie die Anwendung des Gephyrin-*antisense*-Protokolls. Sowohl der Rezeptor als auch Gephyrin selbst traten in beiden Fällen nicht mehr punktförmig verteilt auf, was auf eine reziproke Abhängigkeit beider Faktoren bei ihrer Bündelung schließen lässt.

Die genetische Inaktivierung von Gephyrin in Mäusen hat schließlich gezeigt, dass für alle Glyzin-Rezeptoren und viele GABA_A-Rezeptoren die Bündelung an inhibitorischen Synapsen unterbunden war (Feng et al., 1998; Kneussel et al., 1999). Die neugeborenen Mäuse zeigen keinen Saugreflex, nehmen keine Muttermilch auf und sterben innerhalb eines Tages nach der Geburt. Es ist nicht geklärt, ob Gephyrin-defiziente Mäuse ursächlich wegen des Verlustes an Glyzin-Rezeptor-„Clustern“ oder der fehlenden Sulfitoxidase-Aktivität sterben.

Eine immunhistologische Analyse auf Rückenmarksschnitten von diesen Tieren hat gezeigt, dass nicht ausnahmslos alle GABA_A-Rezeptoren in ihrem „Clustering“ auf Gephyrin angewiesen sind (Kneussel et al., 2001). Diese Studie hat die zuvor gefundene Reduktion in der punktförmigen Verteilung für $\alpha 2$ - und $\alpha 2$ - enthaltende Rezeptoren bestätigen können, demonstrierte aber, dass Rezeptoren, die entweder eine $\alpha 1$ - oder eine $\alpha 5$ -Untereinheit trugen, in ihrem „Clustering“ vollkommen unbeeinträchtigt sind. Diese Beobachtung hat zur Postulation weiterer Faktoren geführt, die GABA_A-Rezeptoren durch einen Gephyrin-unabhängigen Mechanismus in der Plasmamembran bündeln und am Zytoskelett verankern können.

1.6 Zielsetzung

Das Gerüstprotein Gephyrin hat einen maßgeblichen Einfluss auf das „Clustering“ von vielen GABA_A-Rezeptoren, aber solche, die die $\alpha 1$ - oder die $\alpha 5$ -Untereinheit besitzen, werden durch Gephyrin-unabhängige Mechanismen gebündelt und mit dem Zytoskelett verankert.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Interaktionspartner für die $\alpha 1$ - und die $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Beiden Untereinheiten fallen Schlüsselrollen in der schnellen Inhibition zu. Die $\alpha 1$ -Untereinheit stellt die häufigste α -Untereinheit dar und ist somit in einem Großteil der GABA_A-Rezeptoren vertreten. Der $\alpha 5$ -Untereinheit kommt eine besondere Bedeutung zu, weil sie vorwiegend extrasynaptisch lokalisiert und wichtige Funktionen in Prozessen des räumlichen Lernens und der Erinnerung hat. Es ist zur Zeit vollkommen unverstanden, durch welche Mechanismen sie mit dem Zytoskelett verbunden ist, aber die Klärung dieser Fragen ist für das Verständnis von synaptischer Plastizität von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit sollte das Hefe-2-Hybrid-System eingesetzt werden, um neue Bindeproteine für die $\alpha 1$ - und $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors zu identifizieren. Es stellt einen leistungsstarken Ansatz zur Identifikation unbekannter Bindepartner eines Proteins dar, weil mit Ausnahme von Transkriptionsfaktoren und membranständigen Proteinen unter Verwendung einer cDNA-Plasmidbank ein Großteil des zu einem gewissen Zeitpunkt im

gewünschten Gewebe exprimierten Proteoms auf mögliche Interaktion mit dem untersuchten Protein hin getestet werden kann. Die gefundenen, putativen Interaktoren müssen in weiteren Versuchen auf ihr tatsächliches Bindevormögen hin geprüft werden. Dazu sollten sowohl biochemische Ansätze, wie „GST-Pulldown“-Versuche und Koimmunpräzipitation, als auch immunzytochemische Färbungen dienen, die eine mögliche Kolokalisation *in vivo* demonstrieren. Schließlich sollte versucht werden, die Funktion der identifizierten Bindung zu beleuchten, indem Experimente zu ihrer Störung durchgeführt werden. Dabei können sowohl die Verwendung von *antisense*-Oligonukleotiden, kompetierenden Peptiden, als auch die Überexpression in Neuronen und die Charakterisierung von Mutanten oder dominant-negativen Derivaten aufschlussreich sein.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. verwendet und, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: SIGMA-Aldrich (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und VWR (Darmstadt). Restriktionsenzyme wurden von Roche (Mannheim), Fermentas (St.Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt) erworben, T4-DNA-Ligase, T4-Polynukleotidkinase und T4-DNA-Polymerase stammten von Roche (Mannheim), Taq-Polymerase und Desoxyribonukleotide von Gibco (Life Technologies, Karlsruhe) und Pfu Ultra DNA-Polymerase von Stratagene (La Jolla, Kalifornien). Die verwendeten Puffer wurden jeweils vom Hersteller mit den entsprechenden Enzymen geliefert.

2.2 Lösungen und Medien

Für alle Medien und Puffer wurde über ein Milli-Q-System (Millipore, Eschborn) aufgereinigtes Wasser verwendet. Wo angegeben, wurde der pH-Wert mittels NaOH, KOH oder HCl eingestellt. Zur Sterilisierung wurden Lösungen für 20 min bei 121 °C autoklaviert oder, falls vermerkt, mittels einer Membran der Ausschlussgrenze 0,22 µm (Millipore, Eschborn) sterilfiltriert. Die folgenden Standardlösungen für Molekularbiologie und proteinbiochemische Methoden wurden nach den gängigen Handbüchern für die Laborarbeit hergestellt:

2x HBS (HEPES-gepufferte Salzlösung)

Coomassie-Brillant Blue R250-Proteinfärbepuffer

Coomassie-Entfärbepuffer

DNA-Probenpuffer (Typ I, 40% (w/v) Saccharose)

Lysispuffer (Puffer 2 für Plasmidpräparation)

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

Ponceau S-Lösung

Puffer 3 (für Plasmidpräparation)

Resuspendierungspuffer (Puffer 1 für Plasmidpräparation)

4x SDS-Probenpuffer für Proteine

TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA)

TE-Puffer (Tris-EDTA, pH 8,0)

Tris-Glyzin-Elektrophoresepuffer (für Proteingelektrophorese)

Western Blot-Transferpuffer

Folgende weitere Lösungen wurden verwendet:

10x BU-Salzpuffer:

7% (w/v) Na_2HPO_4

3% (w/v) NaH_2PO_4

PCI: Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v)

PEG/LiAc-Lösung:

40% (w/v) PEG3500

100 mM Lithiumacetat

in TE-Puffer

Plasmidpräparationspuffer (für Hefe):

100 mM NaCl

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA

1% (w/v) SDS

2% (v/v) Triton-X-100

Bakterienmedien:

LB (Luria-Bertani):

1% (w/v) Pepton

0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl

Zur Herstellung von Agar wurden jeweils 2% (w/v) Agar-Agar zugegeben. Zur Selektion auf Markergene auf Plasmiden wurden 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin beziehungsweise 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycinsulfat verwendet.

Hefemedien:

YPD-Vollmedium:

20 g Pepton

10 g Hefeextrakt

20 g Glukose ad 1 l Wasser

SC-Glukose-Selektivmedium:

1,7 g Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren

5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

20 g Glukose

100 ml 10x „Drop-Out“-Lösung (siehe unten, nach dem Autoklavieren zugeben)

nach Bedarf Stammlösungen von

 Tryptophan (4 mg/ml, entspricht 100x),

 Uracil (4 mg/ml, entspricht 200x)

 Leuzin (4 mg/ml, entspricht 66x)

 Histidin (4 mg/ml, entspricht 200x)

ad 1 l Wasser

SC-Galaktose-Selektivmedium:

wie oben, nur mit 20 g Galaktose und 10 g Raffinose anstelle der Glukose

ad 1 l Wasser

SC-Galaktose-X-Gal-Medium:

wie oben, zusätzlich:

 100 ml 10x BU-Salzpuffer

 8 ml X-Gal-Stammlösung (100 mg/ml in N,N-Dimethylformamid)

 (beide wurden nach dem Autoklavieren zugeben)

ad 1 l Wasser

10x „Drop-Out“-Lösung:

 300 mg/ml L-IsoLeuzin

 1500 mg/ml L-Valin

 200 mg/ml Adenin-Hemisulfat

 200 mg/ml L-Arginin-Hydrochlorid

 300 mg/ml L-Lysin-Hydrochlorid

200 mg/ml L-Methionin
500 mg/ml L-Phenylalanin
2000 mg/ml L-Threonin
300 mg/ml L-Tyrosin

Zur Herstellung von Agarplatten wurden jeweils 2% (w/v) Agar-Agar zugegeben.

2.3 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme

Zelllinien:

HEK293: humane embryonale Nierenzelllinie, ATCC CRL-1537

Bakterienstämme:

BL-21: *hsdS gal (lcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)*

BL-21-CodonPlus(DE3)-RIL: *E.coli B F⁻ ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal 1(DE3) endA meta::Tn5(kan^r) Hte[argU ileY leuW Camr]*

XL1-Blue: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^r lacZDM15 Tn10(tet^r)]*

Hefestamm:

EGY48: MATa *trp1 his3 ura3 LexA_{op(x6)}-LEU2*

2.4 Antikörper

Die folgenden Primärantikörper wurden in der angegebenen Verdünnung für Immunfluoreszenzfärbung (IF), Koimmunpräzipitation (CoIP) oder Western Blot (WB) verwendet:

Antigen	Spezies	Verdünnung	Referenz
□-GABA _A R-Alpha5	Kaninchen	1:500 (WB), 1:25 (IF), 1:100 (CoIP)	Acris (Hiddenhausen)
□-GABA _A R-Alpha5	Kaninchen	1:500 (WB), 1:100 (CoIP)	A. deBlas (Irvine, Kalifornien)
□-GABA _A R-Alpha1	Kaninchen	1:100 (IF)	Upstate Biotechnology (Hamburg)
□-SV2	Maus	1:100 (IF)	Hybridoma Bank (Universität Iowa, Iowa)
□-Synaptophysin	Ziege	1:100 (IF)	Santa Cruz (Heidelberg)
□-VIAAT	Kaninchen	1:100 (IF)	B. Gasnier (Paris, Frankreich)
□-Gephyrin mab7	Maus	1:100 (IF)	Synaptic Systems (Göttingen)
□-Radixin R21	Ratte	1:1000 (WB), 1:20 (IF)	S. Tsukita (Kyoto, Japan)
□-Myc	Maus	1:1000 (WB), 1:100 (IF)	SIGMA (Taufkirchen)
□-Myc	Kaninchen	1:100 (IF)	SIGMA (Taufkirchen)
□-HA	Maus	1:100 (IF)	Covance Antibodies (Berkeley, Kalifornien)
□-HA	Kaninchen	1:100 (IF)	SIGMA (Taufkirchen)

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Die folgenden Sekundärantikörper wurden verwendet:

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Referenz
□-Maus-488	Ziege	1:1000 (IF)	MoBiTec (Göttingen)
□-Maus-546	Ziege	1:1000 (IF)	MoBiTec (Göttingen)
□-Maus-CY2	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
□-Maus-CY3	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
□-Maus-CY5	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
□-Kaninchen-488	Ziege	1:1000 (IF)	MoBiTec (Göttingen)
□-Kaninchen-546	Ziege	1:1000 (IF)	MoBiTec (Göttingen)
□-Kaninchen-CY2	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
□-Kaninchen-CY3	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
□-Kaninchen-CY5	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
□-Ratte-CY2	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
□-Ratte-CY3	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
□-Ziege-CY2	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
□-Ziege-CY3	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
□-Ziege-CY5	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
□-Maus-HRP	Ziege	1:10.000 (WB)	Dianova (Hamburg)
□-Kaninchen-HRP	Ziege	1:10.000 (WB)	Dianova (Hamburg)
□-Ratte-HRP	Ziege	1:10.000 (WB)	Dianova (Hamburg)

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

2.5 Vektoren und ihre Verwendung

pBKCMV: Expression in eukaryotischen Zellen, Stratagene (Amsterdam, Niederlande)

pcDNA3: Expression in eukaryotischen Zellen, Invitrogen (Karlsruhe)

pEGFP-C2: Expression als EGFP-Fusionsprotein (EGFP N-terminal) in eukaryotischen Zellen

p(EGFP)-N2: Expression als EGFP-Fusionsprotein (EGFP C-terminal)

- pGEX-5X1: IPTG-induzierbare Proteinexpression als GST-Fusionsprotein in Bakterien, Amersham (Freiburg)
- pGilda: Galaktose-induzierbare Proteinexpression als *lexA*-Fusionsprotein in Hefen, Origene (Rockville, Maryland)
- pJG4-5: Galaktose-induzierbare Proteinexpression als B42-AD-Fusionsprotein in Hefen, Origene (Rockville, Maryland)

2.6 Molekularbiologische Techniken

Das Herstellen der im einzelnen verwendeten Plasmide ist im Anhang für jedes Konstrukt beschrieben. Die Vektoren wurden durch geeignete Restriktionsanalyse auf Insertion und Orientierung hin untersucht. Positive Klone wurden durch automatisierte Didesoxy-Sequenzierung vollständig überprüft.

2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im Mini-Maßstab erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Bakterien aus 3 ml einer Übernachtskultur in LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum wurden pelletiert und das Pellet in 100 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 200 µl Puffer 2 lysiert und nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden 150 µl Puffer 3 zur Neutralisation zugegeben. Nach Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (5417C von Eppendorf, Hamburg) wurde die DNA durch Zugabe von einem halben Volumen Isopropanol aus dem Überstand gefällt. Das Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl TE-Puffer aufgelöst. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt. Alternativ wurde auch ein Plasmid-Aufreinigungskit von Qiagen (Hilden) verwendet.

Größere Mengen an DNA (Maxi-Maßstab) wurden nach alkalischer Lyse der Bakterien mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen aufgereinigt. Hier wurde nach den Protokollen des Herstellers Qiagen (Hilden) verfahren.

2.8 Restriktionsverdau

0,5 µg DNA wurde mit 1 Unit des jeweiligen Restriktionsenzym und 2 µl 10x Puffer nach Angaben des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 20 µl für eine Stunde je nach Enzym bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (in der Regel 1% Agarose in TAE) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (1 µg/ml Gelvolumen) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem „QiaQuick Gel-Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wird die Agarose durch Inkubation in einem Puffer mit chaotropen Salzen bei 50° C aufgelöst und die DNA mittels Anionenaustauschersäulen aufgereinigt. Die Elution erfolgte, indem zweimal mit 75 µl reinen Wassers eluiert und das Volumen anschließend in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt wurde.

2.10 Ligation

Zur Ligation von Restriktionsfragmenten wurden 150 ng des Vektorfragmentes mit einer geeigneten Menge an geschnittenem Insertionsfragment (in der Regel im dreifachen stöchiometrischen Überschuss) versetzt. Die Ligationsfragmente wurden mit 10 µl 2x Quick-Ligase-Puffer (New England Biolabs, Frankfurt) und 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl) in einem Volumen von 20 µl für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.11 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation zwecks DNA-Gewinnung wurde der Bakterienstamm XL1-Blue verwendet. Zur Proteinexpression wurde der Stamm BL21 oder BL21-RIL(DE3) eingesetzt. Der gesamte Ligationsansatz

oder 50 ng Plasmid-DNA wurde zu den mit β -Mercaptoethanol behandelten Zellen gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und dann für 30 sec einem Hitzeschock bei 42° C unterzogen. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde die Zellsuspension für 1 Stunde bei 37° C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.12 PCR-Analyse von Bakterienkolonien

Zur schnellen Identifikation von Bakterienkolonien, die einen bestimmten Vektor oder ein Plasmid mit einem bestimmten Insert enthielten, wurden PCR-Reaktionen auf Bakterienkulturen ohne vorherige Aufreinigung der Plasmid-DNA durchgeführt. Die fünfminütige Inkubation bei 95° C, die üblicherweise zur Denaturierung der Matrizen-DNA am Anfang einer PCR-Reaktion durchgeführt wird, reicht aus, um die hinzugefügten Bakterien zu lysieren. Als Matrize diente 1 μ l einer Übernachtskultur, wie sie auch zur Gewinnung von DNA angesetzt wurde. Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1 μ l Bakterienkultur

je 1 μ l Primer (10 pmol/ μ l Stammlösung)

0,5 μ l 5mM dNTPs

0,25 μ l MgCl₂

2,5 μ l 10x PCR-Puffer

0,25 μ l Taq-Polymerase

ad 25 μ l H₂O

Temperaturzyklen:

1x 5 min 95° C

25x 30 sec 95° C

30 sec 60 °C

3 min 72° C

1x 5 min 72° C

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromidlösung angefärbt.

2.13 Amplifikation von PCR-Produkten zur Klonierung

Die gewünschten Fragmente wurden unter Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide durch eine PCR hergestellt. Dabei war in den Oligonukleotiden die Sequenz für eine Restriktionsschnittstelle den homologen Bereichen vor- beziehungsweise nachgeschaltet. In speziellen Fällen wurde auf diese Weise auch eine KOZAK-Konsensussequenz für erhöhte Translationsrate beziehungsweise ein STOP-Kodon zum Beenden der Translation mit eingeführt. Die PCR-Produkte wurden dann mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und in die jeweiligen Vektoren kloniert.

Die Bedingungen und Zusammensetzung in der PCR entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Es wurde folgendes Protokoll für die Temperaturzyklen verwendet:

1x	2 min 95° C
20x	30 sec 95° C
	45 sec 55° C
	1 min/kb 72° C
1x	10 min 72° C

2.14 PCR-basierte Mutagenese

Die Einführung von Mutationen erfolgte mit Hilfe der Reaktionskomplettausstattung „QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, La Jolla, Kalifornien) nach den Angaben des Herstellers. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der Methylierung des *in vivo* hergestellten Mutterstranges und macht sich die methylierungsspezifische Aktivität des Restriktionsenzym *DpnI* zu Nutze. Die neu synthetisierte DNA, die die gewünschte Mutation trägt, wird von *DpnI* nicht abgebaut und kann in *E.coli* vermehrt werden.

2.15 Sequenzanalysen von Plasmid-DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Service-Gruppe Sequenzierungen unter Leitung von Dr. W. Kullmann am ZMNH durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode, bei

der fluorochrome Nukleotide die lineare Polymerisationsreaktion beenden. Die Elektropherogramme wurden mit der EditView-Software Version 1.0.1 (ABI Prism, Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewertet.

2.16 Das Hefe-2-Hybrid-System

Das 2-Hybrid-System ist eine Methode zur Untersuchung spezifischer Protein-Protein-Bindungen. Dabei wird im Fall einer Interaktion der getesteten Proteine die Transkription bestimmter Reportergene angeschaltet, die eine Selektion ermöglichen (Fields und Song, 1989).

Das Prinzip der Methode beruht auf dem modularen Aufbau prokaryotischer Transkriptionsfaktoren. Den unterschiedlichen Domänen kommen getrennte Funktionen zu, die alleine nicht in der Lage sind, die Transkription von Reportergenen anzuschalten. Werden die getrennt voneinander exprimierten Domänen in räumliche Nähe gebracht, kann die Aktivität des Transkriptionsfaktors wieder hergestellt werden.

Potentielle Interaktionspartner werden als Fusionsproteine entweder mit der DNA-Bindedomäne oder der transaktivierenden Domäne exprimiert. Binden beide Proteine aneinander, bilden sie auf diese Weise einen funktionellen Transkriptionsfaktor. Da sich Hefe in großen Mengen kultivieren lässt und leicht genetisch manipuliert werden kann, lässt sich unter Verwendung einer Plasmid-Bank ein bestimmtes Köderprotein auf Protein-Interaktion mit einer großen Zahl möglicher Bindepartner hin untersuchen. Die systematische Suche nach Interaktionspartnern wird gemeinhin als „Screen“ bezeichnet.

2.17 Kultur von Hefen

Hefen wurden in Flüssigkultur oder auf Agarplatten bei 30° C gezüchtet. Falls keine Selektion erforderlich war, wurde YPD-Vollmedium verwendet. Sollte auf die Gegenwart von Plasmiden selektioniert werden, wurde SC-Selektivmedium verwendet, in dem eine oder mehrere der folgenden Komponenten fehlte: Histidin, Uracil, Tryptophan, Leuzin. Für die Selektion auf Proteininteraktionen im 2-Hybridssystem wurde SC-Selektivmedium mit 2% (w/v) Galaktose/ 1% (w/v) Raffinose und ohne Leuzin verwendet. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden Hefekulturen mit einem gleichen Volumen 50% (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

2.18 Transformation von Hefen im kleinen Maßstab

50 ml Flüssigkultur wurden mit einer einzelnen Hefekolonie angeimpft. In vielen Fällen wurden hier, um nicht drei Plasmide auf einmal transformieren zu müssen, Hefen verwendet, die bereits das Reporterplasmid pSH18-34 und ein Köderplasmid enthielten. Wenn die Kultur eine OD von 0,6 erreicht hatte, wurden die Zellen pelletiert und in sterilem Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Hefen in 300 µl TE/LiAc-Puffer aufgenommen. Pro Ansatz wurden 100 µl Hefesuspension, 50 µg Träger-DNA (5 mg/ml; zur Denaturierung frisch aufgekochte DNA aus Lachssperma; SIGMA, Taufkirchen), je 0,3 µg Plasmid-DNA und 600 µl PEG/LiAc-Puffer gemischt und 30 min bei 30° C geschüttelt. Nach Zugabe von 70 µl DMSO wurde ein Hitzeschock von 15 min bei 42° C durchgeführt. Schließlich wurden die Zellen pelletiert, mit sterilem Wasser gewaschen und auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsdruck ausgestrichen.

2.19 Transformation von Hefen im großen Maßstab

Um die Plasmid-Bank in die Hefen einzubringen, wurde das Verfahren zur Transformation im kleinen Maßstab leicht modifiziert. Es wurden Hefen verwendet, die bereits mit dem Reporterplasmid pSH18-34 und dem entsprechenden pGilda-Konstrukt als Köder transformiert waren. Zunächst wurde eine 50 ml Vorkultur wie beschrieben in entsprechendem Selektivmedium über Nacht bei 30° C angezüchtet. Am nächsten Tag wurde 11 Hauptkultur in fünf Kolben zu je 200 ml auf eine optische Dichte von 0,1 angeimpft und bei 30° C inkubiert.

Die Zellen wurden bei OD 0,8 pelletiert, mit sterilem Wasser und danach mit TE/LiAc-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Hefezellen in 20 ml TE/LiAc-Puffer resuspendiert. Es wurden 6 ml Träger-DNA (5 mg/ml frisch aufgekochte DNA aus Lachssperma; SIGMA, Taufkirchen) und 1 mg der cDNA-Bank zugegeben (Gehirn-cDNA-Bank aus adulten Ratten, im Vektor pJG4-5; Origene, Rockville MD; zur Verfügung gestellt von Dr. Oussama El Far). Ferner wurden dem Ansatz 150 ml PEG/LiAc-Puffer zugefügt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 30° C unter Schütteln. Danach wurden 17,5 ml DMSO hinzugegeben, der Ansatz in 13 kleine Schraubgefäße zu je 15 ml Fassungsvermögen aufgeteilt und für 15 min bei 42° C inkubiert. Dabei wurden die Gefäße alle fünf Minuten invertiert, um eine möglichst effiziente Temperaturverteilung zu erreichen. Die Zellen wurden pelletiert, zweimal mit TE-Puffer gewaschen und in 24 ml sterilem Wasser resuspendiert. Je 300 µl der

Zellsuspension wurden auf einer 15 cm-Platte mit SC-Glukose-Selektivmedium ohne Uracil, Histidin und Tryptophan ausplattiert. Zudem wurden zum Abschätzen der Transformationseffizienz Zellen auf mehreren Platten in definierter Verdünnung ausgestrichen.

Nach vier Tagen im Brutschrank wurde die Gesamtzahl der erhaltenen Kolonien durch Auszählen bestimmt. Am gleichen Tag wurden alle erhaltenen Hefekolonien mit TE-Puffer von den Agarplatten gewaschen, pelletiert und in 20 ml TE resuspendiert. Aliquots dieser Suspension wurden mit einem gleichen Volumen 50% (v/v) Glycerin/100 mM MgSO₄ versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert. Der Titer dieses Glyzerinstocks wurde bestimmt, indem ein Aliquot der Zellen aufgetaut und in einer Verdünnungsreihe auf SC-Glukose-Agarplatten ohne Uracil, Histidin und Tryptophan ausplattiert wurde. Zwei bis drei Tage später wurden die erhaltenen Kolonien ausgezählt. Zur Selektion auf LEU2-auxotrophe Interaktionspartner in der cDNA-Bank wurden die Klone auf SC-Galaktoseplatten ohne Uracil, Histidin, Tryptophan und Leuzin plattiert. Dabei wurde die zehnfache Menge der ursprünglich erhaltenen Kolonienanzahl auf Selektivmedium ausgestrichen, um sicherzustellen, dass mit hinreichender Wahrscheinlichkeit jeder der erhaltenen Klone repräsentiert sein würde. LEU2-positive Klone wurden später auf Selektivmedium ohne Leuzin und mit X-Gal ausgestrichen, um die Aktivität beider Reportergene gleichzeitig verfolgen zu können (siehe unten).

2.20 Reporter-, Assays

Zur Selektion auf interagierende Proteine im 2-Hybrid-System standen zwei Reporter-, Assays zur Verfügung. Erstens enthielt der verwendete Hefestamm EGY48 stabil integriert das LEU2-Gen unter Kontrolle eines *lexA*-sensitiven Promotors. Die nichtkovalente Bindung von Köder- und Beuteprotein rekonstituiert die Funktion eines Hybrid-Transkriptionsfaktors aus einer *lexA*-DNA-Bindungsdomäne und der transaktivierenden Domäne von B42 und aktiviert damit das *lexA*-Operon-LEU2-Reporter. Für die Blau-Weiss-Selektionierung wurden Hefen zusätzlich mit dem Plasmid pSH18-34 transfiziert. Dieses enthält das β -Galaktosidasegen unter der Kontrolle eines *lexA*-sensitiven Promotors. Im Falle einer Interaktion von Köder- und Beute-Fusionsprotein wird dieses Enzym exprimiert und kann anhand der Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff nachgewiesen werden. Beide Selektionsverfahren wurden auf Agarplatten durchgeführt. Es wurden nur solche Klone als positiv gewertet, die sowohl LEU2-auxotroph waren als auch β -Galaktosidase exprimierten. Stark interagierende Klone zeigten eine

deutliche Blaufärbung innerhalb von 24 Stunden, schwächere Interaktoren erzeugten eine hellblaue Färbung, wuchsen aber in vielen Fällen schneller auf Selektionsmedium zu Kolonien heran.

2.21 Plasmidpräparation aus Hefe

5 ml einer Übernachtskultur wurden zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Pellet wurde in 200 µl Plasmidpräparationspuffer resuspendiert, mit 300 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und 0,3 g Glaskugeln versetzt und zwei Minuten lang bei voller Stärke in einem Schraubgefäß gevortext. Nach Zentrifugation wurde die obere, wäßrige Phase abgenommen. Diese Lösung wurde entweder direkt als Matrize für eine PCR-Testreaktion verwendet, oder die DNA wurde zur weiteren Aufreinigung und Konzentrierung gefällt. Hierzu wurden 20 µl 3M Natriumacetatlösung und 440 µl 95% (v/v) Ethanol zugegeben. Die Lösung wurde 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert, das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in 10 µl TE-Puffer aufgenommen. Für die Transformation in *E.coli* wurden 0,5 bis 1 µl dieser Lösung verwendet.

2.22 Herstellung von Proteinextrakten aus Hirn

Für biochemische Experimente wurden Zelllysate aus Rattengehirn hergestellt. Den Tieren wurde nach Betäubung mit Halothan (Rebopharm, Bocholt) das Genick gebrochen und das Gehirn entnommen. Alle weiteren Schritte im Umgang mit Proteinlösungen wurden auf Eis oder bei 4° C durchgeführt.

Für die Herstellung eines Gesamtgehirnextraktes wurden die Gehirne von fünf adulten Ratten in eiskaltem Puffer A (50 mM Glukose, 20 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl und 2,5 mM EDTA, mit Protease Inhibitor Tabletten (Roche, Mannheim Germany) und 1 mM PMSF) zerkleinert und in einem Glas-Teflon Homogenisator mit acht Stößen bei 800 Umdrehungen pro Minute homogenisiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 1000x g für 10 min geklärt und dem Überstand wurde das gleiche Volumen an eiskaltem Puffer B (20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 24 mM Natriumdesoxycholate, 1% (v/v) Tween20 und 0,1% (w/v) SDS) zugegeben. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und dreimal für 30 sec sonifiziert. Das Lysat wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Der Proteingehalt wurde mittels Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt und betrug in der Regel 1,7 mg/ml.

Für die Herstellung von Proteinextrakten aus zehn Tage alten Ratten wurden acht Tiere wie beschrieben getötet. Die Hirne wurden in eiskaltem Puffer A aufgenommen, homogenisiert und anschließend wurde der Extrakt auf eine Endkonzentration von 1% (v/v) TritonX-100 eingestellt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Hippokampale Extrakte wurden aus adulten Tieren gewonnen. Dazu wurden zehn Hippokampi präpariert und in eiskaltem Puffer C (320 mM Glukose, 4 mM HEPES, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, Protease Inhibitor Tabletten (Roche, Mannheim) und 1 mM PMSF) homogenisiert. Das Lysat wurde für 10 min durch Zentrifugation bei 1000x g geklärt und der Überstand wurde bei 100.000x g für 2 Stunden zentrifugiert. Das Pellet dieser Zentrifugation wurde in 7,5 ml eiskaltem Puffer C aufgenommen und erneut im Glas-Teflon Homogenisator zu einer einheitlichen Lösung verarbeitet. Das Lysat wurde anschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.23 Herstellung von Proteinextrakten aus transfizierten HEK293 Zellen

HEK-Zellen wurden in 10 cm-Schalen kultiviert und transfiziert wie in Kapitel 2.32 beschrieben. 24 bis 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Pro Schale wurde 1 ml PBS (+1% (v/v) Triton-X-100) zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht) abgelöst. Zur Lyse der Plasmamembran wurde der Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 5 min bei 2000 x g zentrifugiert und der Überstand, der aus großen Teilen der zellulären Membranen sowie Zytosol besteht, wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.24 Proteinexpression in Bakterien

Fusionsproteine aus Glutathion-S-Transferase (GST) und beliebigen Zielproteinen wurden mit Hilfe von pGEX-Vektoren (Amersham, Freiburg) in *E.coli* BL-21 exprimiert. Die verwendeten Vektoren erlauben eine Induktion der Proteinexpression mittels Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG), was die Gefahr der Selektion auf nicht- oder schlechtproduzierende Bakterien während der Wachstumsphase der Kolonie

verringert. Die BL-21-Bakterien wurden mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformiert und eine Übernacht-Vorkultur wurde in LB-Ampicillin-Medium angeimpft. Hieraus wurde eine Kultur von 250 ml Volumen zu einer OD von 0,1 angeimpft. Die Bakterien bis zu einer OD von 0,6 inkubiert und die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG ad 1 mM induziert. Nach einer Expressionsdauer von 7-8 Stunden bei 37° C wurden die Bakterien pelletiert und in der Regel bei -20° C eingefroren. Alternativ wurden Zellen vom Stamm BL21(RIL-DE3) verwendet oder die Expressionsphase auf 12-14 Stunden bei Raumtemperatur verlängert.

Das Pellet wurde in 7,5 ml Sonifizierungspuffer (400 mM NaCl, 100 mM HEPES, pH 8,0, 10% Glycerin mit Protease Inhibitor Tabletten) resuspendiert und dreimal für je 30 sec mit Ultraschall behandelt, um die Zellen aufzuschließen. Das Lysat wurde für 30 min bei 10.000x g zentrifugiert und der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert.

2.25 GST-„Pulldown“ Experimente

Eine Methode zum Nachweis von Proteininteraktionen *in vitro* ist das sogenannte GST-„Pulldown“ Experiment. Hierbei wird einer der Bindepartner als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) in Bakterien hergestellt. Dieses Protein kann aufgrund der Affinität von GST zu ihrem Substrat Glutathion effizient an Glutathion-Sepharose-Kügelchen immobilisiert werden. Die mit Fusionsprotein beladene Sepharose wird anschließend mit einem Zellextrakt inkubiert, der den zweiten Interaktionspartner enthält. Hierzu wurde im allgemeinen Lysat aus Rattenhirn oder transfizierten HEK293 Zellen verwendet. Nach mehreren Waschschrritten können gebundene Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert werden. Der Nachweis von Interaktionspartnern erfolgte nach Auftrennung der Proben mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durch Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper.

Pro Ansatz wurden 50 µl Glutathion-Sepharose-Suspension (Amersham, Freiburg) einmal mit PBS gewaschen (Pelletierung der Sepharose erfolgte hier und im Folgenden durch Zentrifugation für 1 min bei 300x g). Die Sepharose wurde mit 100-400 µl Bakterienlysate für 3-4 Stunden bei 4° C in einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Das Affinitätsharz wurde dreimal mit PBS gewaschen, dann wurde das zu untersuchende Zellysate zugegeben. Nach erneuter Inkubation für 6-8 Stunden wurde erneut mit PBS

gewaschen (Menge an Triton-X-100 entsprechend dem verwendeten Zelllysate). Schließlich wurde der Überstand präzise abgenommen und die Sepharose in 50 μ l PBS aufgenommen, mit 15 μ l 4x SDS-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95° C hitzedenaturiert. Aliquots der Probe wurden zur Analyse auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.26 Koimmunpräzipitation

Zur spezifischen Koimmunpräzipitation wurden Protein G-gekoppelte Sepharose-Kügelchen mit Antikörpern beladen. Dazu wurden je 20 μ l Matrix (Dyna, Oslo, Norwegen) mit PBS gewaschen und 5 μ g Antikörper in einem Volumen von 200 μ l für 4 Stunden bei 4° C rotierend inkubiert. Die Matrix wurde von nicht gebundenem Antikörper durch Waschungen befreit und anschließend mit 1 ml Hirnextrakt oder HEK293-Zelllysate inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Kügelchen mit unspezifischen Immunglobulinen beladen und ebenfalls mit Extrakt inkubiert. Nach 6-8 Stunden wurde die Matrix erneut gewaschen, in 50 μ l PBS aufgenommen, mit 15 μ l 4x SDS-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95° C hitzedenaturiert. Aliquots der Probe wurden zur Analyse auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.27 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihren Molekulargewichten erfolgte durch SDS-PAGE. Die Gelelektrophorese wurde mit Hilfe einer Apparatur (Mini-Protean III, BioRad, München) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. 5%ige Sammelgele und 6 bis 12%ige Trenngele wurden mit 40% (v/w) Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (SIGMA, Taufkirchen) zubereitet. Die Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel entsprechend mit 4-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95° C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 75 V pro Gel in Tris-Glyzin-Elektrophoresepuffer. Anschließend wurden die Proteine entweder mit „Coomassie“-Lösung gefärbt oder durch Western Blot auf PVDF-Membranen immobilisiert.

2.28 Western Blot

Zum Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper wurden sie nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine PVDF-Membran der Porengröße 0,45 μm (Amersham, Freiburg) transferiert. Der Transfer erfolgte in einer „Semidry“-Blotapparatur (SIGMA, Taufkirchen) in Transferpuffer (25 mM Tris, 150 mM Glyzin, pH 8,4 ohne Einstellen, 20% Methanol) bei einer konstanten Stromstärke von 1,7 mA/cm² für 2 Stunden. Durch Anfärbung der Proteine mit Ponceau S-Lösung (1% Ponceau-Rot in 1% Essigsäure) wurde der Transfer überprüft. Die Membran wurde für 10 min in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser und PBS entfärbt.

2.29 Immundetektion

Zur Vermeidung unspezifischer Bindung wurde die PVDF-Membran durch Inkubation mit 5% (w/v) Magermilchpulver und 0,05% (v/v) TritonX-100 in PBS über Nacht bei 4° C oder für 3 Stunden bei 37° C blockiert. Anschließend erfolgte die Bindung des ersten Antikörpers in entsprechender Verdünnung in Blockpuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder für 12 Stunden bei 4° C. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurde die Membran mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper in Blockpuffer für 45 min inkubiert. Erneut wurde viermal mit PBS gewaschen, bevor die Detektion mit einem Chemolumineszenz-basierten System (Applichem, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers erfolgte. Zur Dokumentation wurden lichtsensitive Filme (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) verwendet.

2.30 Kultur von HEK293 Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank (Sterilgard, Baker, Sanford, Maine) unter Verwendung sterilisierter Gefäße und Reagenzien durchgeführt. Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37° C und einer CO₂-Konzentration von 5% (v/v) in wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert.

HEK293-Zellen wurden in MEM-Medium (Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS, Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe), 25 $\mu\text{g/ml}$ Pyruvat und 2 mM

Glutamin kultiviert. Alle Kulturmedien enthielten 50 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe) zur Vermeidung mikrobieller Kontaminationen. Vor Erreichen der Konfluenz wurden Zellen im Verhältnis 1:4 passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) von der Kulturschale gelöst und vereinzelt. Die Protease wurde durch Zugabe von 3 Volumenanteilen frischen Mediums inaktiviert und die Zellen auf frische Kulturschalen verteilt.

2.31 Hippokampale Primärkulturen

Zur Kultivierung von hippokampalen Neuronen wurden neugeborene (P0) Ratten oder Mäuse durch Dekapitation getötet. Die Hippokampi wurden in eiskaltem PBS/10mM Glukose präpariert. Zur Vereinzelung der Zellen wurden die Gewebe in PBS/10 mM Glukose mit 10 µg/ml DNAse I und 0,5 mg/ml Papain (SIGMA, Taufkirchen) für 15 min bei 37° C inkubiert. Nach Waschen in 10 ml Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) mit 10% (v/v) FCS, 25 µg/ml Pyruvat und 2 mM Glutamin wurden die Zellen vorsichtig in 2 ml desselben Mediums mit abgeschmolzenen Pasteurpipetten trituriert. Die Zellen wurden in DMEM-Medium mit Zusätzen (s.o.) in einer Dichte von 110.000 Zellen pro Glasplättchen in den Vertiefungen einer 24-well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Glasoberflächen waren zuvor mit Poly-L-Lysin (1,5 µg/ml in PBS, SIGMA, Taufkirchen) und Laminin (20 µg/ml, Tebu-Bio GmbH, Offenbach) je über Nacht bei 4° C beschichtet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen worden. Die Kulturen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37° C und 5% (v/v) CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Nach 3 Stunden wurde das Medium durch Neurobasalmedium mit den Zusätzen 2 mM Glutamin, 25 µg/ml Pyruvat und 2% (v/v) B27 (Gibco-BRL Life Technologies) ersetzt. Nach 3 Tagen in vitro (DIV3) wurde 3 µM 1-[-D-Arabinofuranosyl]-Cytosin (SIGMA, Taufkirchen) zu den Kulturen gegeben, um die Proliferation von Astrozyten zu stoppen. Am Ende jeder Woche wurde ein Drittel des Kulturmediums durch frisches Medium ersetzt.

2.32 Transfektion von kultivierten Zellen

HEK293-Zellen wurden mit Hilfe von Kalziumphosphat nach der Standardmethoden transfiziert (Chen und Okayama, 1987). Die Zellen wurden in 10 cm-Plastikschalen ausgesät oder auf Glasplättchen ausgebracht, die zuvor eine Stunde lang mit einer Lösung von 25 µg/ml Poly-L-Ornithin in PBS (SIGMA, Taufkirchen) beschichtet worden waren. Kulturen wurden bei ca. 30-50% Konfluenz transfiziert. Für eine 10 cm-Schale wurden 13 µg Plasmid-DNA in 225 µl sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen, mit 75 µl 1M CaCl₂ versetzt und gemischt. Anschließend wurden 300 µl 2x HBS hinzugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren sprudelnd vermischt. Zur Transfektion von Zellen auf einem Deckglas (14 mm Durchmesser in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen) wurde 1 µg Plasmid-DNA verwendet. Die DNA wurde analog in 25 µl 250 mM CaCl₂ und 25 µl 2x HBS vorbereitet. Der Transfektionsmix wurde zum Medium über den Zellen hinzugegeben und die Kulturschalen wurden bis 20 Stunden bei 3% (v/v) CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen weiter bei 5% (v/v) CO₂ gehalten.

Neuronale Primärkulturen wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll transfiziert. Für die Transfektion von Zellen auf einem 12 mm-Glasplättchen mischte man eine Lösung von 2 µg Plasmid-DNA in 12,5 µl 250 mM CaCl₂ mit 12,5 µl 2xHBS-Puffer, vortexte kurz und inkubierte für 15 min bei Raumtemperatur. Das Medium auf den Zellen wurde bis auf eine Menge von 300 µl abgenommen und separat aufbewahrt. Der Transfektionsmix wurde zu den Zellen gegeben und die Kultur für 1 Stunde im Inkubator bei 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Dann wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch eine Mischung aus konditioniertem Medium (ca. 300 µl) und 150 µl frischem Neurobasalmedium mit Zusätzen ersetzt. Zellen wurden zwischen Tag 7 und Tag 9 in vitro transfiziert, und die Expressionsdauer betrug 2-5 Tage.

2.33 Mikroinjektion

Während des Mikroinjizierens wurden die Neuronen in vorgewärmtem Injektionspuffer (10 mM HEPES, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 15 mM Glukose) gehalten.

Die PTO-*antisense*-Oligonukleotide gegen die Radixin mRNA wurden wie beschrieben (Takeuchi et al., 1994) von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Es wurde eine Lösung hergestellt, deren Konzentration 0,1 mM für jedes Oligonukleotid betrug und die entweder 2,5 % (w/v) Lucifer Yellow (SIGMA, Taufkirchen) oder 50 ng/μl pEGFP-C2 Vektor (BD Biosciences, Heidelberg) enthielt. Diese Lösung wurde unter Zuhilfenahme von „Microloader“ Pipettenspitzen in „Femtotips“ Glaskapillaren (beide Eppendorf, Hamburg) eingefüllt und bei einem Druck von 70-100 hPa für 0.1-0.3 sec in den Kern der Zelle injiziert. Dabei wurde der Operationsarm „Transjector 5246“ von der zentralen Steuerungseinheit „Injectman“ (beide Eppendorf, Hamburg) kontrolliert. Die Mikroinjektionen wurden an einem Axiovert 35 Mikroskop mit einem „long-distance“ Phasenkontrast-Objektiv (LD-Plan Neofluar 63x, Zeiss, Hallbergmoos) durchgeführt. 24 Stunden nach der Mikroinjektion wurden die Zellen fixiert und immungefärbt.

2.34 Immunzytochemie

Auf Glasplättchen kultivierte Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 12 min in 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert, mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellmembran 4 min mit PBS/0,25% (v/v) Triton X-100 inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zur Vermeidung unspezifischer Bindungen für 30 min in 1% (w/v) BSA/PBS bei Raumtemperatur blockiert. Die Zellen wurden hierauf für 2 Stunden mit entsprechend verdünntem Erstantikörper in Blockpuffer inkubiert, 4 mal in PBS gewaschen und erneut für 45 min mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper in Blockpuffer im Dunkeln inkubiert. Nach 4 Waschschritten in PBS wurden die Glasplättchen mit Aquamount (Polysciences, Warrington, PA) auf Objektträgern fixiert. Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte durch konfokale Lasermikroskopie mit einem Leica TCS-SP2 „Laser Scanning“-Mikroskop (Leica, Wetzlar). Zur Aufnahme von Fluoreszenzbildern wurde die Software Leica-TCS-NT verwendet.

2.35 Quantitative Analyse und Statistik

Zur Quantifizierung wurden Ausschnitte von Bildern immungefärbter Zellen mit einem Farblaserdrucker ausgedruckt (FS-C5016N, Kyocera, Meerbusch). Die immunreaktiven Punkte wurden anhand ihrer Farbe

voneinander unterschieden und mit Hilfe eines Zellzählers gezählt. Die Verarbeitung der Rohdaten geschah mit dem Programm Excel (Microsoft, München), ebenso die statistische Analyse durch Mittelwerte, Standardabweichung und p-Werte nach „*student's t-test*“.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems nach Interaktionspartnern der $\alpha 1$ - und der $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors gesucht.

3.1 Identifizierung von GABA_AR-Interaktoren mittels Hefe-2-Hybrid Technik

Das Prinzip des Hefe-2-Hybrid Systems beruht auf dem modularen Aufbau von Transkriptionsfaktoren. Sowohl die DNA-Bindung als auch die Transaktivierungsaktivität können getrennten Domänen zugeschrieben werden. In dieser Arbeit wurde zur Identifizierung neuer Bindepartner das LexA-basierende MATCHMAKER Hefesystem (Clontech, Heidelberg) ausgewählt, bei dem das Köderprotein (in diesem Fall die große zytoplasmatische Schleife von GABA_AR- $\alpha 1$ oder - $\alpha 5$) an die DNA-Bindedomäne des bakteriellen Transkriptionsfaktors LexA im Vektor pGILDA fusioniert wird. Die Verwendung einer bakteriellen DNA-Bindedomäne im Hefesystem verbessert im allgemeinen das Ergebnis, weil weniger unspezifische Bindung an die eukaryontische DNA auftritt. Die Beuteproteine liegen im gewählten System als Fusion mit der B42 „Acid-Blob“ Domäne vor, die von dem Vektor pJG4-5 kodiert wird. Der verwendete Hefestamm EGY48 ist auxotroph in Bezug auf die Aminosäuren Tryptophan, Histidin und Leuzin und auf die Nukleobase Uracil. Erst durch Transformation mit den Köder-, Beute- oder Reporter-Vektoren können die Hefen auf entsprechenden Selektionsmedien wachsen. Ein zusätzlicher Vorteil des vorliegenden Systems besteht in der induzierbaren Expression der beteiligten Proteine, da alle Promotoren Operatorbindestellen des Lac-Operons besitzen und somit in Anwesenheit von Glukose reprimiert sind. Erst bei Wachstum auf Galaktose wird die Expression der Fusionsproteine induziert. Ein Vorteil dieser Besonderheit besteht darin, dass auch Proteine untersucht werden können, die bei längerer Exposition toxisch auf die Hefezelle wirken. Als Bibliothek wurde eine Bank von cDNAs aus dem Gehirn adulter Ratten gewählt, deren Komplexität vom Hersteller (Origene, Rockville, Maryland) mit 2×10^6 unabhängigen Plasmiden angegeben wurde.

Bevor ein Köderkonstrukt im Hauptversuch eingesetzt werden kann, muss es auf seine Kerngängigkeit und auf mögliche Autoaktivierung hin untersucht werden. Entsprechende Testverfahren sind vom Hersteller angegeben und speziell benötigte Hilfsplasmide wurden mitgeliefert. Die Kerngängigkeit des Fusionsproteins wird untersucht, indem seine Fähigkeit überprüft wird, an einem eigens dafür konstruierten Reporterplasmid die konstitutive Transkription des Reportergens für β -Galaktosidase zu unterdrücken. Wenn das Köderkonstrukt in der Lage ist, im Zellkern an die Operatorbindestellen im Lac-Promotor auf dem Reporterplasmid zu binden, verzögert sich die Blaufärbung der Hefen auf Induktionsmedium. Die Autoaktivierung eines Fusionsproteins wird getestet, indem man die Hefen auf Induktionsmedium unter Selektionsdruck wachsen lässt, aber kein Beutekonstrukt zur Interaktion anbietet. Bringt schon der Köder die Fähigkeit mit, die Transkription der Reportergene anzuschalten, wachsen die Hefen auch ohne Beuteprotein auf Induktionsmedium mit Selektionsdruck. Die Zellen werden in definierten Verdünnungen parallel auf glukosehaltigem und galaktosehaltigem Selektionsmedium ausgestrichen, um ermitteln zu können, welcher Prozentsatz autoaktiviert. Bereits eine einzige autoaktivierende Zelle aus einer Million verursacht erhebliche Probleme, weil im Verlauf des Versuches viele Milliarden Zellen auf Induktionsmedium ausgestrichen werden. In diesem Fall kann das Köderprotein nicht für die Untersuchung verwendet werden.

Beide hier verwendeten Konstrukte – die Fusionen mit der zytoplasmatische Schleife von GABA_AR- α 1 und - α 5 – wurden sowohl positiv auf ihre Kerngängigkeit, als auch negativ in Bezug auf mögliche Autoaktivierung getestet. Aus über hundert Millionen ausplattierten Zellen schaltete in beiden Fällen keine einzige die Transkription der Reportergene von allein an. Beide Köderkonstrukte waren daher geeignet, um in der systematischen Suche nach neuen Interaktoren („Screening“) eingesetzt zu werden.

3.1.1 „Screening“ einer cDNA Bibliothek aus Gehirn

Der Hefestamm EGY48 wurde zunächst gemäß dem Protokoll für Hefetransformation im kleinen Maßstab mit dem Reporterkonstrukt pSH18-34 und je einem der Köderkonstrukte transfiziert. Die so modifizierten Hefen wurden in glukosehaltigem Selektionsmedium angezogen und für die Transformation im großen Maßstab vorbereitet. Der Transformationsansatz wurde auf 80 große Kulturschalen (150 mm Durchmesser) mit Selektionsmedium ausgestrichen. Anhand verschiedener Verdünnungen wurde die Gesamtzahl der Kolonien für beide Experimente berechnet. Im Fall von GABA_AR-□1 wurden $2,4 \times 10^6$ Kolonien gezählt, für GABA_AR-□5 waren es $2,8 \times 10^6$. In beiden Ansätzen war also die Komplexität der Bibliothek übertroffen worden und jeder der unabhängigen Klone mit großer Wahrscheinlichkeit mindestens einmal in dem Hefegemisch enthalten.

Die Transformationsansätze der beiden Experimente wurden jeweils zu Gefrierkulturen vereinigt und getrennt voneinander titriert. In beiden Fällen lag die Zelldichte nach dem Auftauen eines Aliquots bei mehr als 10^8 cfu/ml Zellsuspension. Das Zehnfache der erhaltenen Transformanden wurde auf Induktionsmedium ausgestrichen und für 10 Tage bei 30° C inkubiert. Die anwachsenden, blaugefärbten Kolonien wurden während dieser Zeit auf frisches Induktionsmedium überführt und insgesamt dreimal neu ausgestrichen, um das Risiko zu verringern, dass zwei unabhängige Beute-Plasmide mitgeführt wurden. Im Fall von GABA_AR-□1 wurden 70 blaue Kolonien erhalten, für GABA_AR-□5 waren es zwölf.

	GABA _A R-□1	GABA _A R-□5
Autoaktivierung	negativ	negativ
Kerngängigkeit	positiv	positiv
Transformanden	$2,4 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$
cfu/ml Zellsuspension	$>10^8$	$>10^8$
blaue Kolonien	70	12

Tabelle 3: Übersicht über die beiden Hefe-2-Hybrid-Versuche

3.1.2 Analyse positiver Klone

Die positiven Kolonien wurden im glukosehaltigem Selektionsmedium angezogen. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und durch Transformation in Bakterien gebracht. Da es sich um ein Gemisch aus Reporter-, Köder- und Beuteplasmid handelte, wurden die Bakterien auf LB-Medium mit X-Gal ausgestrichen. Blaue Kolonien trugen den Reporter pSH18-34, der für die β -Galaktosidase kodiert, und wurden ignoriert. Von den weiß gebliebenen Bakterienkolonien wurden in der Regel vier zu einer Übernachtskultur angeimpft. Je 1 μ l des Kulturvolumens wurde in einer PCR als Matrize benutzt, um unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden eine Sequenz aus dem Rückgrat des Beutevektors pJG4-5 zu amplifizieren und auf diese Weise zwischen Bakterien zu unterscheiden, die mit dem Köder- oder dem Beuteplasmid transformiert worden waren. Von je einem der für pJG4-5 positiven Klone wurde die DNA präpariert und einer Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Hind*III und *Bam*HI unterworfen. Das entstandene Gemisch aus Fragmenten wurde über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und die Bandenmuster der verschiedenen Kandidaten wurden miteinander verglichen. Je eine DNA des jeweils gleichen Musters wurde mit einem sequenzspezifischen Oligonukleotid für pJG4-5 sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mit bekannten Sequenzen verglichen (BLAST unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), um so die Identität der möglichen Interaktionspartner zu ermitteln.

Gleichzeitig wurden Hefen erneut mit dem Reporterplasmid und mit dem pJG4-5 Konstrukt für jeden möglichen Interaktionspartner transformiert und auf Induktionsmedium mit geeignetem Selektionsdruck ausgestrichen, um die Beuteproteine auf mögliche Autoaktivierung hin zu testen. Nur solche Proteine, die die Transkription der Reportergene nicht ohne Köder aktivieren konnten, wurden weiterbearbeitet.

Unter den 70 möglichen Interaktoren für GABA_AR- α 1 fand sich 64 mal das autoaktivierende Protein PLZF (*promyelotic leukemia zinc finger protein*). Von den zwölf möglichen Interaktoren für GABA_AR- α 5 war keiner in der Lage, die Transkription der Reportergene ohne die zytoplasmatische Schleife des Rezeptors anzustellen. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Identität der gefundenen Interaktoren.

GABA _A R- α 1	GABA _A R- α 5
Usp14 (<i>ubiquitin specific protease 14</i>)	Radixin (3x)
Muskelin	Androgen Rezeptor Interagierendes Protein
HDRI Homologes (<i>GATA binding protein homologue</i>)	STAT Inhibitor (<i>signal transducer and activator of transcription inhibitor</i>)
Rab11b (2x)	Protein ähnlich KIAA 1784
PRM1 (<i>transition protein</i>)	SPARC (<i>secreted factor rich in cysteine</i>)
	RAPA2 (<i>TRERF transcriptional regulating factor</i>)
	Zinkfinger Helikase (2x)
	Transkriptionsregulator (2x)

Tabelle 4: Identität der gefundenen Interaktoren

Je eines der gefundenen Proteine, nämlich Muskelin für GABA_AR- α 1 und Radixin für GABA_AR- α 5, wurden in dieser Arbeit weiter untersucht.

Das Protein Muskelin wurde erstmals als zytosolischer Faktor beschrieben, der auf Signale reagiert, die durch das extrazelluläre Matrixprotein Thrombospondin vermittelt werden. Es verdankt seinen Namen dem Befund, dass es im Muskelgewebe stark exprimiert ist und in seiner Sequenz über Homologien zu dem Protein Kelch aus *Drosophila melanogaster* verfügt (Adams et al., 1998).

Radixin gehört zur Familie der ERM-Proteine, die an der Plasmamembran lokalisiert sind und transmembrane Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden können (Tsukita und Yonemura, 1997; Bretscher et al., 2002). Beide Proteine, Muskelin und Radixin, stellen interessante Kandidaten dar, um Erkenntnisse über das „Clustering“, die Verankerung und Lokalisation von GABA_A-Rezeptoren zu gewinnen und sollten im Folgenden charakterisiert werden.

3.2 Interaktion von Muskelin mit der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors

Nachdem eine Sequenzanalyse sichergestellt hatte, dass das Fragment von Muskelin im pJG4-5 Vektor ohne Rasterschub mit der B42 „Acid-Blob“ Domäne fusioniert war, sollte die Bindung an die intrazelluläre Schleife des Rezeptors genauer charakterisiert werden. Zum einen sollte die Bindestelle für Muskelin auf der Rezeptorschleife eingegrenzt werden, zum anderen sollte mit biochemischen Ansätzen die Interaktion beider Partner in einem *in vitro* System überprüft werden. Allen Experimenten mit Muskelin lag die veröffentlichte Sequenz der mRNA aus *Rattus norvegicus* zugrunde (*accession number* NM_031359).

3.2.1 Eingrenzung der Bindestelle in Hefe

Zur Eingrenzung der Bindestelle wurden verschiedene Konstrukte hergestellt, die unterschiedlich lange Teile der intrazellulären Schleife des Rezeptors exprimierten. Für Verkürzungen am N-terminalen Teil der Schleife wurde in die Sequenz des ursprünglichen Vektors durch gezielte Mutagenese im richtigen Leseraster eine *EcoRI* Restriktionsschnittstelle eingeführt. Das Plasmid wurde dann mit *EcoRI* linearisiert und religiert, wobei ein Teil der für die Schleife kodierenden Sequenz verloren ging und die Expression einer verkürzten Schleife möglich wurde. Für C-terminale Verkürzungen wurde durch gezielte Mutagenese ein STOP Kodon eingeführt, um die Translation der Schleife vorzeitig zu beenden.

Durch die Verwendung von zwölf verschiedenen Konstrukten für die Schleife des Rezeptors ist es gelungen, die Bindestelle für Muskelin auf 21 Aminosäuren einzuschränken. Es handelt sich dabei um die Reste 399-420, die am C-Terminus der Schleife vor der vierten Transmembrandomäne lokalisiert sind (siehe Abbildung 3.1).

Die Domänenstruktur des Muskelins zeigt, dass es eine N-terminale Discoidin-ähnliche Domäne besitzt, der zwei kürzere Motive folgen (Prag et al., 2004; siehe Abbildung 3.1). Auf ein etwa 60 Aminosäuren langes Lissencephalie 1-homologes Motiv (LisH), das zuerst in dem Protein Lissencephalie 1 (Lis1) beschrieben worden ist (Hattori et al., 1994), eine α -Helix ausbildet und

bei der Interaktion von Lis1 mit zytoplasmatischem Dynein wichtig ist (Sapir et al., 1997), folgt ein C-terminal davon gelegenes Motiv (CL), dessen Funktion bislang ungeklärt ist. Der C-Terminus von Muskulin wird von einer “Kelch repeat” Sequenz dargestellt, in der sechs hintereinandergeschaltete Sequenzen organisiert sind, die Homologien zu dem Protein Kelch aus *Drosophila melanogaster* aufweisen. Sie bilden eine β -Propeller Tertiärstruktur aus, die aus antiparallelen β -Faltblättern zusammengesetzt ist (Adams, 2002).

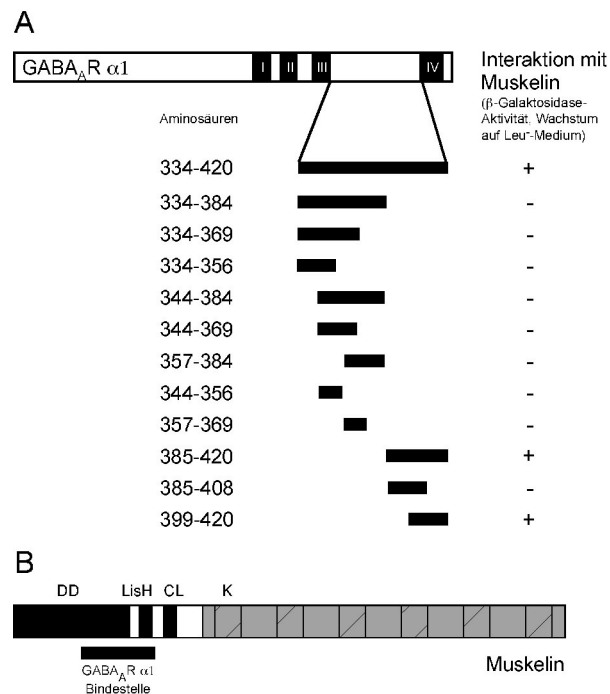


Abbildung 3.1: Bindung von Muskulin an GABA_AR- α 1 im Hefe-2-Hybrid-System.

A: Als Köder wurde die große zytoplasmatische Schleife zwischen den Transmembrandomänen III und IV eingesetzt. Das identifizierte Muskulin-Konstrukt führt zu Wachstum auf Leuzin-freiem Medium und positiver Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test. Verschiedene Verkürzungen der Schleife wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, mit Muskulin zu interagieren. Die Aminosäuren 399-420 des Rezeptors sind ausreichend für die Interaktion, die Aminosäuren 409-420 sind notwendig.

B: Die Domänenstruktur des Proteins Muskulin zeigt, dass es über eine N-terminale Discoidin-ähnliche Domäne verfügt (DD). Ferner sind im N-Terminus zwei Motive lokalisiert (LisH, homolog zu Lissencephalie-1 und CL, C-terminal von LisH). Der C-Terminus besteht aus einer β -Propeller-Struktur, die von sechs in Reihe geschalteten Kelch-repeats (K) geformt wird.

Andere Proteine mit ähnlichen Strukturen sind bekannt, so zum Beispiel die Familie der Galaktose-Oxidasen, aber es ist wahrscheinlich, dass die β -Propeller Domänen in den

verschiedenen Proteinklassen unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Eine Untersuchung von Muskelin hat gezeigt, dass es keine Enzymaktivität als Galaktose-Oxidase besitzt (Adams, 2002).

Die im Hefe-Versuch indentifizierte Sequenz liegt im Muskelin N-terminal. Sie erstreckt sich über die Aminosäuren 89-205 und beinhaltet das LisH-Motiv (siehe Abbildung 3.1).

3.2.2 Biochemische Analyse durch „Pulldown“-Experimente

HEK293 Zellen wurden mit einem Konstrukt für myc-markiertes Muskelin transfiziert und 24 Stunden nach Transfektion aufgeschlossen.

Die intrazelluläre Schleife des GABA_AR- α 1 wurde mit GST fusioniert und in *E.coli* BL21 exprimiert. Die so gewonnenen Fusionsproteine wurden an Glutathion-Sepharose Kügelchen immobilisiert und mit dem Extrakt der HEK293 Zellen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde mit GST beladene Glutathion-Sepharose mit einem gleichen Volumen des selben HEK293-Extraktes inkubiert.

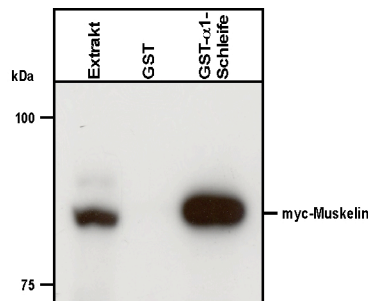


Abbildung 3.2: Biochemische Analyse im Pulldown-Experiment.

Myc-markiertes Muskelin wurde in HEK293 Zellen heterolog exprimiert (Extrakt). Die an GST fusionierte Schleife des GABA_AR- α 1 oder GST alleine wurden mit Glutathion-Sepharose angereichert und mit dem Extrakt inkubiert. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit anti-myc Antikörper entwickelt. Die spezifische Bindung von Myc-Muskelin wird von der Schleife des GABA_A-Rezeptors vermittelt. Die Molekulargewichte eines Standards sind in kDa angegeben.

Im Westernblot ist zu erkennen, dass myc-Muskelin mit spezifischen Antikörpern gegen das myc-Epitop nachgewiesen werden kann (siehe Abbildung 3.2). Myc-Muskelin ist in der Lage, an die mit GST fusionierte Schleife des GABA_AR- α 1 zu binden, wird aber nicht von GST alleine pelletiert.

3.2.3 Lokalisation von Muskelin in Neuronen

Da für die Untersuchungen zur zellulären Lokalisation kein gegen Muskelin gerichteter Antikörper zur Verfügung stand, wurden verschieden affinitätsmarkierte Versionen des Proteins in hippocampalen Neuronen exprimiert.

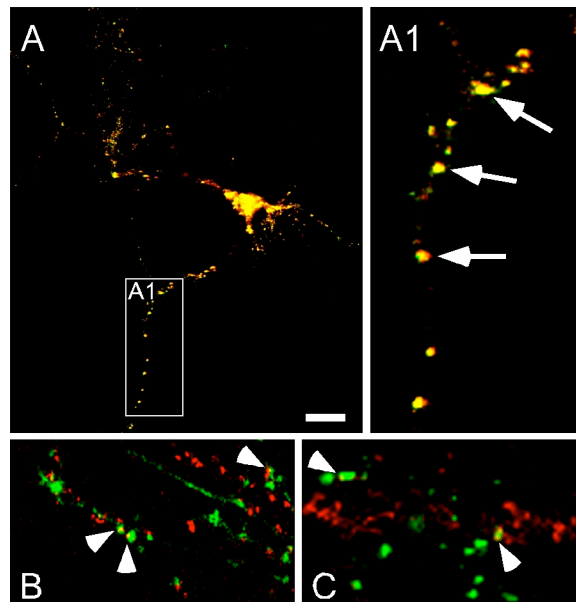


Abbildung 3.3: Synaptische Lokalisation von Muskelin in Neuronen.

A: YFP-Muskelin (grün) und myc-Muskelin (rot) wurden in hippocampalen Neuronen überexprimiert und die Zellen für die Immunzytochemie behandelt. Beide Konstrukte zeigen eine punktförmige Verteilung und kolokalisieren nahezu vollständig miteinander (gelb, Pfeile). A1 stellt einen Ausschnitt aus A dar. Der Größenbalken in A entspricht 20 μ m.

B: YFP-Muskelin (grün) und der Synapsenmarker Synaptophysin (rot) kolokalisieren partiell (gelb, Pfeilspitzen).

C: Auch myc-Muskelin (rot) ist teilweise synaptisch lokalisiert, wie die Überlagerung (gelb, Pfeilspitzen) mit der Immunfluoreszenz für Synaptophysin (grün) zeigt.

Das bereits in der biochemischen Analyse benutzte myc-markierte Muskelin wurde gemeinsam mit einer YFP-markierten (*yellow fluorescent protein*) Version exprimiert, die durch Autofluoreszenz im Mikroskop zu erkennen ist. Beide Affinitätsmarkierungen sind am N-Terminus angebracht.

YFP-Muskelin formt in manchen Zellen punktförmige, klar abgegrenzte Aggregate aus (siehe Abbildung 3.3). Auch myc-markiertes Muskelin wird in diese Aggregate inkorporiert. Ein Teil der beobachteten Punkte kolokalisiert mit der Immunreaktivität des Synapsenmarkers SV2, andere Punkte sind aber nicht synaptisch lokalisiert. Die partiell synaptische Lokalisation von affinitätsmarkiertem Muskelin wurde unabhängig davon beobachtet, ob eine myc- oder YFP-Markierung benutzt wurde (Abb. 3.3B und C).

3.2.4 Kolokalisation von GABA_AR- α 1 mit Muskelin in Neuronen

Um die Lokalisation von Muskelin in Bezug auf den GABA_AR- α 1 zu untersuchen, wurden hippocampale Neuronen mit Konstrukten für YFP-Muskelin und myc-markierten GABA_AR- α 1 transfiziert und mit Antikörpern gegen verschiedene Synapsenmarker immungefärbt (siehe Abbildung 3.4).

Der affinitätsmarkierte Rezeptor verteilt sich wie endogener GABA_AR- α 1 in diskreten Punkten und ist vorwiegend synaptisch lokalisiert (Abb. 3.4A und B). YFP-Muskelin und der myc-markierte Rezeptor kolokalisieren in hohem Maß in Neuronen und werden sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch gefunden, wie durch Färbung des allgemeinen Synapsenmarkers Synaptophysin gezeigt (Abb. 3.4B1). Die partiell synaptische Lokalisation der überlagernden GABA_AR- α 1/Muskelin-Immunreaktivität wird auch beobachtet, wenn die Zellen mit einem Marker für inhibitorische Synapsen gefärbt werden (Abb. 3.4C).

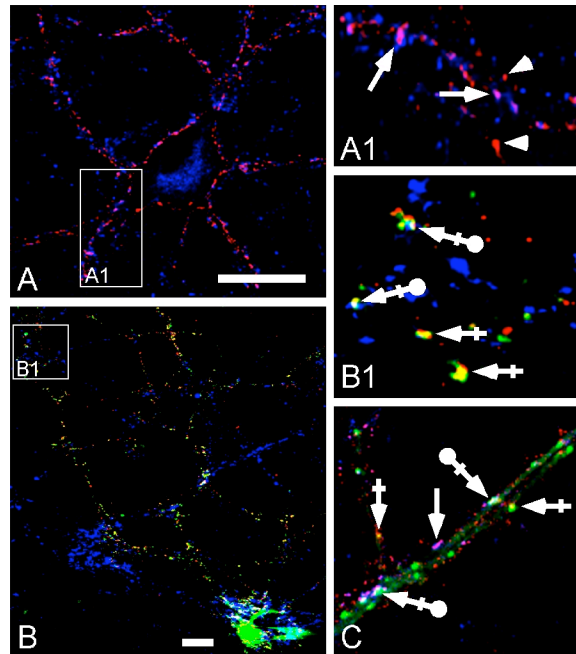


Abbildung 3.4: Kolokalisation von Muskelin und GABA_AR-β1 in Neuronen.

A: Hippokampale Neuronen wurden in Kultur mit einem Antikörper gegen GABA_AR-β1 inkubiert, fixiert und mit einem Antikörper gegen den Synapsenmarker SV2 immungefärbt. A1 stellt einen Ausschnitt dar. Viele GABA_AR-β1 immunreaktive Punkte sind synaptisch lokalisiert (Pfeile), aber einige Punkte sind extra-synaptisch (Pfeilspitzen).

B: Hippokampale Neuronen wurden mit myc-markierten GABA_AR-β1 (rot) und YFP-Muskelin (grün) transfiziert. Drei bis vier Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in Kultur mit anti-myc Antikörpern inkubiert, dann fixiert und mit Antikörpern gegen den allgemeinen Synapsenmarker Synaptophysin immungefärbt (blau). Im Ausschnitt B1 erkennt man Kolokalisation von GABA_AR-β1 mit Muskelin an gelben Punkten (gekreuzter Pfeil) und dreifache Kolokalisation von GABA_AR-β1 und Muskelin an Synapsen als weiße Punkte (gekreuzter und punktierter Pfeil).

C: Hippokampale Neuronen wurden mit myc-markierten GABA_AR-β1 (rot), YFP-Muskelin (grün) und einem Marker für inhibitorische Synapsen (blau) transfiziert und wie in B behandelt. Muskelin kolokalisiert mit GABA_AR-β1 (gelb, gekreuzter Pfeil) und ist im Komplex mit dem Rezeptor an Synapsen zu finden (weiß, gekreuzter und punktierter Pfeil). Myc-GABA_AR-β1 kommt auch ohne Muskelin an Synapsen vor (magenta, Pfeil). Die Größenbalken entsprechen 20µm.

Muskelin und GABA_AR-β1 kolokalisieren als volle Proteine in neuronalen Dendriten und kommen zum Teil an inhibitorischen Synapsen vor.

3.3 Interaktion von Radixin mit der α 5-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors

Unter den Interaktoren für die α 5-Untereinheit befand sich das ERM-Protein Radixin. Es ist erstmals als ein an Aktin bindendes Protein beschrieben worden (Tsukita und Hieda, 1989). Später wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass den drei untereinander homologen Hauptvertretern der ERM-Familie (Ezrin, Radixin, Moesin) viele Eigenschaften gemeinsam sind. So wurde nachgewiesen, dass ERM-Proteine unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, gleichzeitig an F-Aktin und an transmembrane Proteine zu binden, und diese so am Zytoskelett zu verankern (zur Übersicht siehe Bretscher et al., 2002). Radixin stellt daher einen aussichtsreichen Kandidaten für die aufgeworfenen Fragestellungen nach der Verankerung des GABA_A-Rezeptors dar und die Charakterisierung der Radixin/GABA_AR- α 5-Interaktion sollte Aufschluss über die Funktion dieser Bindung geben. Da Radixin und die anderen ERM-Proteine im Gegensatz zu Muskelin in der Literatur vergleichsweise gut beschrieben worden sind, gab es bereits eine Reihe von Vorinformationen, um die Funktion der gefundenen Interaktion zu untersuchen.

Nachdem eine Sequenzanalyse gezeigt hatte, dass das Fragment von Radixin im pJG4-5 Vektor ohne Rasterschub mit der B42 „Acid-Blob“ Domäne fusioniert war, sollte die Bindung an die intrazelluläre Schleife des GABA_AR- α 5 genauer charakterisiert werden. Wie in der Untersuchung von Muskelin sollte die Bindestelle für Radixin auf der Rezeptorschleife zunächst eingegrenzt werden. Außerdem sollte mit biochemischen Ansätzen die Interaktion beider Partner in einem *in vitro* System überprüft werden. Allen Experimenten mit Radixin lagen die veröffentlichten Sequenz der mRNA aus *Rattus norvegicus* (accession number NM_001005889) oder *Mus musculus* (accession number NM_009041) zugrunde.

3.3.1 Eingrenzung der Bindestelle in Hefe

Nach dem für die Schleife der α 1-Untereinheit beschriebenen Schema wurde die Bindung zwischen Radixin und der α 5-Untereinheit durch die Expression verschiedener Verkürzungen

der großen zytoplasmatischen Schleife im Hefesystem eingegrenzt (siehe Abbildung 3.5). Es stellte sich durch den Einsatz von fünf verschiedenen Konstrukten heraus, dass die Aminosäuren 342-357 für die Bindung ausreichend sind.

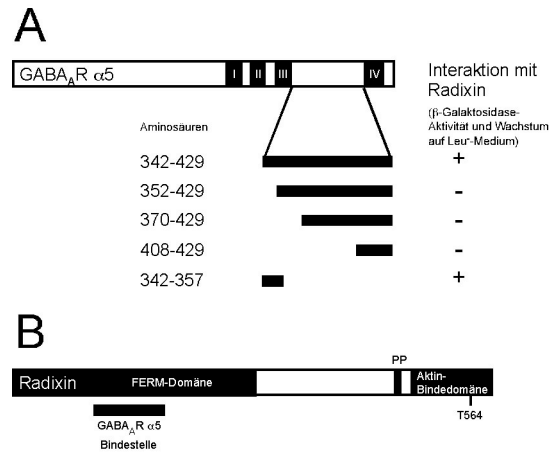


Abbildung 3.5: Bindung von Radixin an GABA_A- α 5 im Hefe-2-Hybrid-System.

A: Als Köder wurde die große zytoplasmatische Schleife zwischen den Transmembrandomänen III und IV eingesetzt. Das identifizierte Radixin-Konstrukt führt zu Wachstum auf Leuzin-freiem Medium und positiver Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test. Verschiedene Verkürzungen der Schleife wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, mit Radixin zu interagieren. Die Aminosäuren 342-357 des Rezeptors sind notwendig und hinreichend für die Interaktion.

B: Das Protein Radixin gehört zur Familie der ERM-Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin), die sich durch die N-terminale FERM-Domäne auszeichnen. Weiter C-terminal ist eine Poly-Prolin-Sequenz gelegen (PP). Ein in der C-terminalen Aktin-Bindedomäne liegendes Threonin (T564) ist für die Aktivierung des Moleküls durch Phosphorylierung essentiell.

Die Domänenstruktur von Radixin (Abb. 3.5B) zeigt, dass es über eine N-terminale FERM-Domäne verfügt (von *band 4.1*, *ezrin*, *radixin*, *moesin*), die sich aus drei Lobi zusammensetzt und die Bindung des Moleküls an die Plasmamembran vermitteln kann (Chishti et al., 1998). Im Mittelteil befindet sich eine Domäne, die wahrscheinlich ein „*coiled-coil*“ Motiv formt. Sie beherbergt eine Polyprolin Sequenz (PP), deren Funktion nicht bekannt ist. Der C-Terminus bildet eine F-Aktin Bindedomäne aus und kann am Rest Threonin 564 phosphoryliert werden (Matsui et al., 1998).

3.3.2 Koimmunpräzipitation von Radixin mit GABA_AR- α 5

Die physiologische Relevanz der gefundenen Interaktion sollte durch Koimmunpräzipitation aus Rattengehirn demonstriert werden. Hierzu wurde ein Extrakt aus Rattengehirn mit Sepharose-Kügelchen inkubiert, auf deren Oberfläche zuvor ein spezifischer Antikörper gegen die α 5-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors gekoppelt worden war. Als Kontrolle wurden Kügelchen verwendet, die mit unspezifischen Immunglobulinen beladen waren. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und diese im Western Blot Verfahren mit spezifischen Antikörpern gegen Radixin entwickelt (siehe Abbildung 3.6).

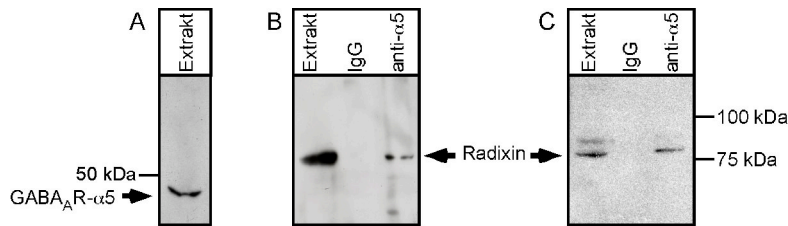


Abbildung 3.6: Biochemische Analyse der Interaktion zwischen Radixin und GABA_AR- α 5.

A: Western Blot Analyse eines Extraktes aus Rattengehirn. Die α 5-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

B und C: Koimmunpräzipitation von Radixin mit der α 5-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors. Radixin ist im Immunpräzipitat nachweisbar, wenn spezifische Antikörper gegen die α 5-Untereinheit eingesetzt werden, nicht aber wenn unspezifisches Immunglobulin aus Kaninchen verwendet wird. B und C unterscheiden sich darin, dass zwei verschiedene, spezifische Antikörper gegen die α 5-Untereinheit eingesetzt wurden. Die Molekulargewichte eines Standards sind in kDa angegeben.

Radixin koimmunpräzipitiert mit nativem GABA_AR- α 5 aus Rattengehirn. Das Ergebnis konnte auch mit einem zweiten Antikörper gegen GABA_AR- α 5 erfolgreich reproduziert werden (Abb. 3.6C).

3.3.3 Einfluss der molekularen Aktivierung von Radixin auf die Bindung an GABA_AR- α 5

Die Funktion der Verbindung von Transmembranproteinen mit dem Aktin-Zytoskelett ist abhängig vom Aktivierungszustand der ERM-Proteine (Bretscher et al., 2002). Im inaktiven

Zustand liegen die Proteine als nicht-kovalenter, intramolekularer Ringschluss vor, indem der C-Terminus den N-Terminus bindet (siehe Abbildung 3.7). Die C-terminale F-Aktin Bindedomäne ist im geschlossenen Zustand maskiert. In einem mehrstufigen Aktivierungsprozess wird diese intramolekulare Bindung aufgehoben und die C-terminale F-Aktin Bindedomäne freigegeben. Eine Voraussetzung für die Aktivierung der ERM-Proteine stellt das Binden an Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP₂) dar, die in Ezrin über vier wichtige Lysinreste vermittelt wird (Barret et al., 2000). Die Phosphorylierung eines konservierten Threoninrestes (in Radixin Threonin 564) führt danach zur weiteren Aktivierung des Moleküls. Sterische und elektrische Effekte durch das Einführen der Phosphatgruppe bedingen die Öffnung der intramolekularen Bindung und legen so die F-Aktin Bindedomäne frei. Die Bindung an PIP₂ führt in Radixin zu einer Konformationsänderung (Hamada et al., 2000) und ist die Voraussetzung dafür, dass das Molekül an Threonin 564 phosphoryliert werden kann.

Um den Einfluss der molekularen Aktivierung des Radixins auf die Bindung an GABA_AR- α 5 zu untersuchen, wurden verschiedene, am C-Terminus myc-markierte Radixin-Mutanten in HEK293 Zellen exprimiert und im „Pulldown“-Experiment auf ihre Fähigkeit hin untersucht, an die immobilisierte Schleife der α 5-Untereinheit zu binden. Der Austausch von Threonin 564 zu Aspartat (T564D) bewirkt das Einführen einer negativen Ladung in Radixin und täuscht die phosphorylierte Form des Restes vor. Das mutierte Protein ist bezüglich der F-Aktin Bindung konstitutiv aktiv (Ishikawa et al., 2001) und liegt stets in der offenen Form vor. Die Veränderung von vier kritischen Lysinresten zu Asparagin in Ezrin verhindert die Bindung an PIP₂ und hat zur Folge, dass das Protein weder an die Membran bindet, noch durch Phosphorylierung in einen aktiven Zustand gebracht werden kann. Hier wurden in Radixin die vier homologen Reste zu Asparagin mutiert (K(262, 263, 253, 254)N), um eine nicht-aktivierbare Form des Proteins untersuchen zu können.

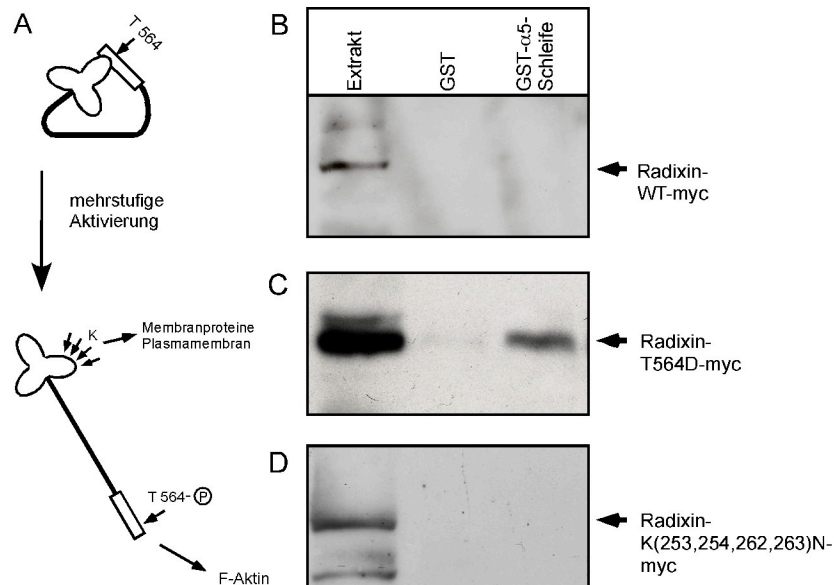


Abbildung 3.7: Die Interaktion von Radixin mit GABA_AR- α 5 ist vom Aktivierungszustand von Radixin abhängig.

A: Modell der Radixin-Aktivierung. Das inaktive Molekül zeigt intramolekulare Bindung der C-terminalen Aktin-Bindedomäne an die N-terminale FERM-Domäne. Die Bindestelle für Aktin ist in dieser Form maskiert. Die Bindung an Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP₂) an vier Lysinreste in der FERM-Domäne (K) stellt eine Voraussetzung für die Phosphorylierung an T564 dar. Durch die Phosphorylierung kommt es schließlich zu einer Konformationsänderung und die C-terminale Aktin-Bindedomäne wird freigegeben. Das aktive Molekül kann Transmembranproteine mit dem Zytoskelett verbinden.

B-D: Western Blot Analyse verschiedener Pull-down-Experimente. Am C-Terminus myc-markierte, in HEK293 Zellen heterolog exprimierte Varianten von Radixin wurden auf ihr Vermögen hin untersucht, die an GST fusionierte Schleife des GABA_AR- α 5 zu binden.

B: Das nicht-mutierte Radixin ist nicht in der Lage, an die Schleife des Rezeptors zu binden.

C: Eine Mutante, in der T564 durch einen Aspartatrest ersetzt wurde (T564D), täuscht aufgrund elektrischer und sterischer Effekte dauerhafte Phosphorylierung vor und dient als Analoges des aktivierten nicht-mutierte Moleküls. Das konstitutiv aktive Radixin bindet spezifisch an die Schleife des GABA_AR- α 5.

D: Eine Gruppenmutante, bei der die vier in Ezrin für die PIP₂-Bindung wichtigen Lysinreste (K253, K254, K262 und K263) jeweils durch die Aminosäure Asparagin (N) ersetzt worden sind, zeigt keine Bindung an die Schleife des Rezeptors.

Erstaunlicherweise zeigt in HEK293 Zellen exprimiertes, nicht-mutierte Radixin im „Pull-down“-Experiment keine Bindung an die Schleife des Rezeptors (Abb. 3.7B). Das konstitutiv aktive Radixin (T564D) hingegen bindet spezifisch an die GST-Fusion der Schleife (Abb. 3.7C). Die nicht-aktivierbare Gruppenmutante Radixin (K(262, 263, 253, 254)N) kann nicht an den Rezeptor binden (Abb. 3.7D).

Das Vermögen von Radixin, an die große, intrazelluläre Schleife des Rezeptors zu binden, ist vom Aktivierungszustand des Moleküls abhängig. Die Bindung an PIP₂ stellt eine Voraussetzung für die Phosphorylierung an Threonin 564 dar. Die phosphomimetische, offene Form von Radixin kann an den Rezeptor binden. HEK293 Zellen sind unter den getesteten Bedingungen nicht in der Lage, Radixin hinreichend zu aktivieren, um die Bindung an GABA_AR- α 5 zu ermöglichen.

3.3.4 Untersuchung von Ezrin und Moesin im „Pull-down“-Experiment

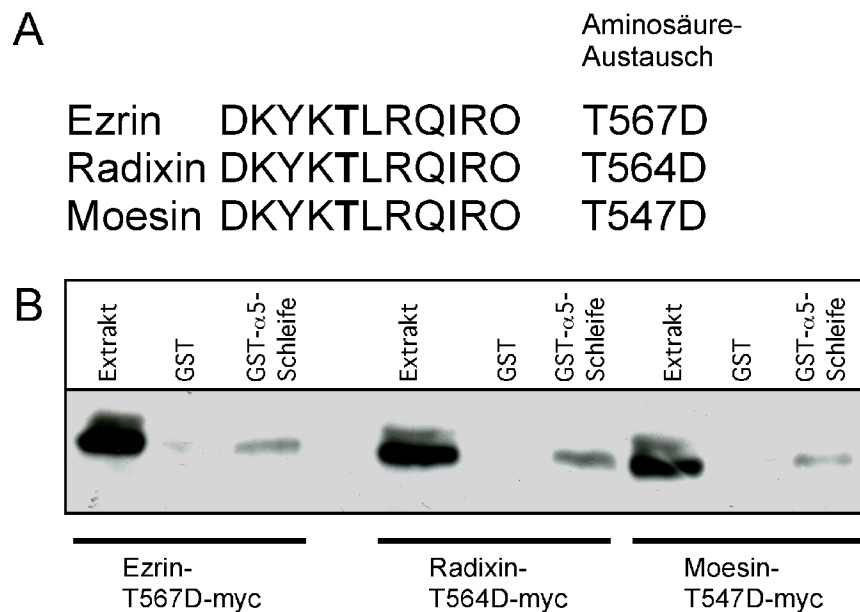


Abbildung 3.8: Vergleichende Pull-down-Experimente mit myc-markierten ERM-Proteinen.

A: Ausschnitt aus den Aminosäuresequenzen der drei homologen Proteine Ezrin, Radixin und Moesin. Im gezeigten Bereich, der den konservierten, für die Aktivierung wichtigen Threonin-Rest umschließt, sind die drei Proteine identisch. Um konstitutiv aktive Moleküle zu erzeugen, wurden die entsprechenden Reste zu Aspartat mutiert.

B: Western Blot Analyse von Pull-down-Experimenten. Die drei homologen, konstitutiv aktiven ERM-Proteine wurden als C-terminal myc-markierte Proteine heterolog in HEK293 Zellen exprimiert und auf ihre Fähigkeit hin überprüft, an die Schleife des GABA_AR- α 5 zu binden. Alle drei Proteine sind potentiell in der Lage, mit dem Rezeptor zu interagieren.

Analog zum vorangegangenen Experiment sollten auch die beiden ERM-Proteine Ezrin und Moesin auf Bindung an die Schleife von GABA_AR- α 5 hin untersucht werden, um zu überprüfen, ob die gefundene Bindung spezifisch für Radixin ist, oder auch mit den beiden Homologen auftreten kann.

Zu diesem Zweck wurden myc-markierte Mutanten hergestellt, bei denen der homologe Threoninrest jeweils durch ein Aspartat ersetzt wurde. Abbildung 3.8A zeigt einen Sequenzvergleich der drei ERM-Proteine an der betreffenden Stelle. Der gesamte Bereich ist in allen drei Proteinen identisch.

Das „Pulldown“-Experiment zeigt, dass alle drei Proteine in ihrer konstitutiv aktiven Form die Fähigkeit haben, an die Schleife von GABA_AR- α 5 zu binden.

3.4 Lokalisation verschiedener Radixin-Mutanten in HEK293 Zellen

Da die Ergebnisse im Abschnitt 3.3.3 gezeigt haben, dass der Aktivierungszustand von Radixin für die Interaktion mit dem Rezeptor *in vitro* maßgeblich ist, wurde nun untersucht, ob sich die dort beschriebenen Mutanten, die verschiedene Aktivierungsstufen des Moleküls darstellen, in einem zellulären Kontext unterschiedlich verhalten. Sie wurden auf ihre Lokalisation hinsichtlich verschiedener Zellkompartimente untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Mutanten als C-terminale GFP-Fusionsproteine heterolog in HEK293 Zellen exprimiert.

3.4.1 Lokalisation an der Plasmamembran

Um die Lokalisation an der Plasmamembran zu untersuchen, wurden die HEK293 Zellen neben dem jeweiligen Konstrukt für Radixin auch noch mit Konstrukten für GABA_AR- α 2 und myc-markierten GABA_AR- α 5 transfiziert. Im Pentamer, gemeinsam mit der α 2-Untereinheit, wird der GABA_AR- α 5 an die Zelloberfläche transportiert. Hier wurde er durch Immunfärbung der lebenden HEK293 Zellen mit spezifischen anti-myc Antikörpern nachgewiesen. Da die Zellen

zum Zeitpunkt der Färbung weder fixiert noch permeabilisiert waren, resultiert die Immunreaktivität aus einer Markierung plasmamembranständiger GABA_A-Rezeptoren.

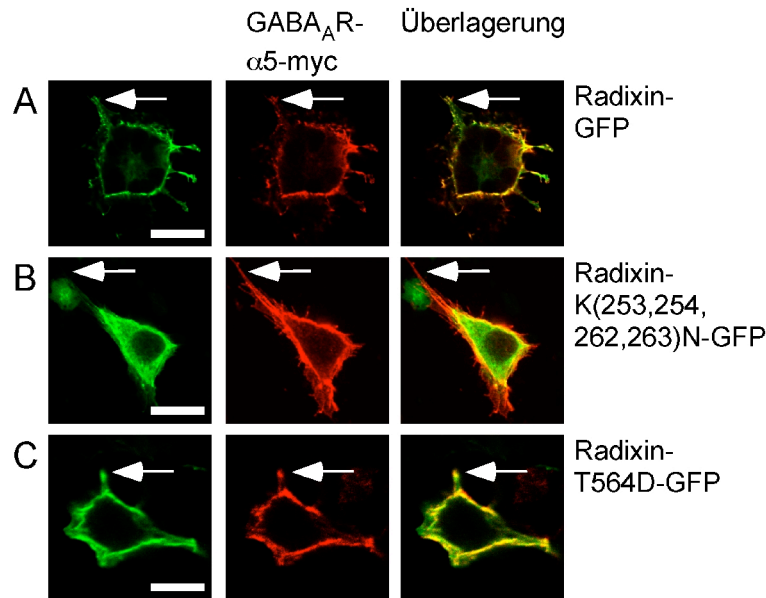


Abbildung 3.9: Charakterisierung verschiedener Radixin-Mutanten in HEK293-Zellen.

HEK293-Zellen wurden mit verschiedenen Radixin-GFP-Konstrukten, GABA_AR- α 2 und myc-markiertem GABA_AR- α 5 transfiziert und in Kultur mit anti-myc Antikörpern inkubiert. Die Zellen wurden dann fixiert und gemäß dem Protokoll für immunzytochemische Färbungen behandelt.

A: Nicht-mutiertes Radixin-GFP lokalisiert an der Plasmamembran und ist auch in Zellfortsätzen zu sehen. Die α 5-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors wird durch die Bildung von Heteropentameren mit der α 2-Untereinheit ebenfalls an die Membran transportiert. In der Überlagerung ist zu sehen, dass beide Proteine im gleichen Zellkompartiment angereichert sind (Pfeil).

B: Die Gruppenmutante von Radixin-GFP, die nicht an PIP₂ binden kann (K253N, K254N, K262N, K263N), lokalisiert nicht an der Plasmamembran. Während der GABA_AR- α 5 auch in Zellfortsätzen zu sehen ist, ist die Verteilung der nicht aktivierbaren Mutante auf das Zytoplasma beschränkt.

C: Die konstitutiv aktive T564D-Mutante lokalisiert im gleichen Zellkompartiment wie der GABA_AR- α 5. In der Überlagerung sind gelbe Signale an der Plasmamembran zu erkennen.

Die Größenbalken entsprechen 20 μ m.

Wie in Abbildung 3.9 gezeigt, verteilt sich Radixin in HEK293 Zellen vorwiegend an der Plasmamembran (Abb. 3.9A). Weite Zellausläufer, die auch für GABA_AR- α 5 positiv sind, sind im grünen Kanal klar zu erkennen. Die nicht-aktivierbare Gruppenmutante Radixin (K(262, 263, 253, 254)N) hingegen ist im Zytoplasma lokalisiert und kann sich nicht an die Plasmamembran anlagern (Abb. 3.9B). Die Grundvoraussetzung zur Aktivierung, die Bindung an PIP₂, ist in dieser Mutante nicht erfüllt. Die phosphomimetische, konstitutiv aktive Mutante ist wiederum in

der Lage, an der Plasmamembran zu lokalisieren. Auch hier wird Autofluoreszenz in Zellfortsätzen beobachtet, die ebenfalls GABA_AR- α 5 enthalten (Abb. 3.9C).

Nicht-mutiertes Radixin wird in HEK293 Zellen ausreichend aktiviert, um an der Plasmamembran zu lokalisieren. Die Aktivierung ist aber nicht ausreichend, um die Bindung an GABA_AR- α 5 zu vermitteln. Die phosphomimetische Mutante, die den Rezeptor binden kann, ist ebenfalls an der Plasmamembran konzentriert.

3.4.2 Lokalisation in F-Aktin-reichen Kompartimenten

Es ist bekannt, dass F-Aktin unter anderem am Zellkortex vorkommt, wo es direkt unter der Plasmamembran sitzt und die Erscheinungsform der Zelle, sowie ihre Motilität beeinflusst. ERM-Proteine, die im aktiven Zustand an F-Aktin binden können, sind in F-Aktin-reichen Kompartimenten beschrieben worden, so zum Beispiel Ezrin in Mikrovilli (Berryman et al., 1995). Die zuvor gezeigte, membranassoziierte Lokalisation von aktivem Radixin ist in Einklang mit der Vorstellung, dass ERM-Proteine in einem aktiven Zustand die Komponenten der Plasmamembran am Zytoskelett verankern.

Durch Färbung von F-Aktin mit Rhodamin-Phalloidin sollten weitere Hinweise zum Aktivierungszustand des Radixin-Moleküls gewonnen werden. Erneut wurden die drei Mutanten als GFP-Fusion in HEK293 Zellen exprimiert und auf ihre Kollokalisation mit F-Aktin-reichen Kompartimenten hin untersucht. Sowohl nicht-mutiertes, als auch konstitutiv aktives Radixin lokalisieren in Membranfortsätzen, die reich an F-Aktin sind (siehe Abbildung 3.10).

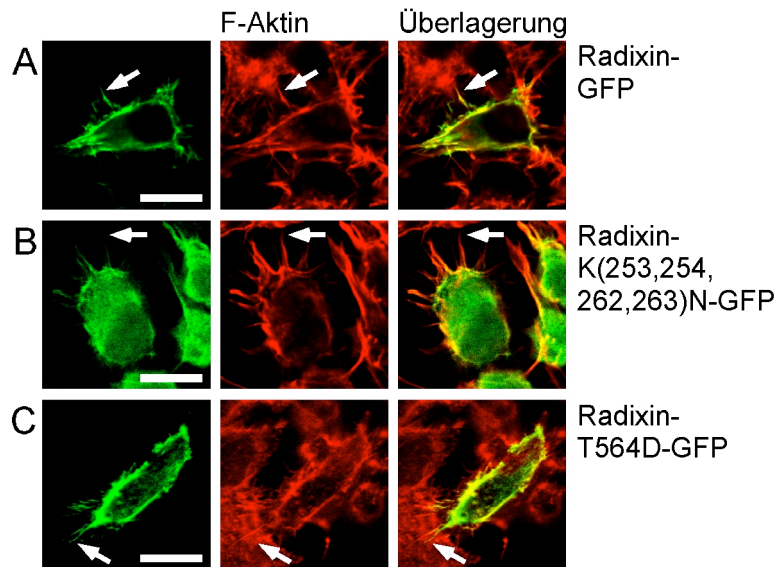


Abbildung 3.10: Charakterisierung der Aktinbindung verschiedener Radixin-Mutanten in HEK293-Zellen.

HEK293-Zellen wurden mit verschiedenen Radixin-GFP-Konstrukten transfiziert, fixiert und mit Rhodamin-Phalloidin behandelt, um F-Aktin anzufärben (rot).

A: Nicht-mutiertes Radixin lokalisiert an der Plasmamembran und ist in Zellfortsätzen zu finden (Pfeil), wo auch F-Aktin angereichert vorkommt.

B: Die nicht aktivierbare Gruppenmutante von Radixin-GFP lokalisiert nicht an der Plasmamembran. Sie ist in Aktin-reichen Zellfortsätzen nicht zu finden (Pfeil).

C: Die konstitutiv aktive T564D-Mutante lokalisiert in Aktin-reichen Zellfortsätzen.

Die Größenbalken entsprechen 20µm.

Die nicht-aktivierbare Gruppenmutante Radixin (K(262, 263, 253, 254)N) verteilt sich gleichmäßig im Zytoplasma und ist nicht in Aktin-reichen Kompartimenten angereichert. Die konstitutiv aktive Radixin (T564D)-Mutante, bei der die F-Aktin Bindedomäne dauerhaft exponiert ist, kolokalisiert in hohem Ausmaß mit F-Aktin. Da die isolierte, C-terminale Domäne der ERM-Proteine eine hohe Affinität zu F-Aktin besitzt (Turunen et al., 1994), ist es wahrscheinlich, dass die beiden Proteine hier in einem zellulären Kontext aneinander binden. Ähnliche Kolokalisation wird mit nicht-mutiertem Radixin und F-Aktin beobachtet und eine Bindung *in vivo* kann, anders als im Fall der Gruppenmutante, hier nicht ausgeschlossen werden. Es ist also möglich, dass Radixin in HEK293 Zellen in einem intermediären Aktivierungszustand existiert, der sowohl die Bindung an die Plasmamembran, als auch an F-Aktin erlaubt, dennoch aber nicht die Interaktion mit GABA_AR- α 5 zeigt.

3.5 Lokalisation von ERM-Proteinen in Neuronen

Bezüglich der neuronalen Lokalisation der ERM-Proteine sollten drei wichtige Aspekte untersucht werden. Die Frage, ob Radixin an Synapsen vorkommen kann, steht im Zusammenhang mit dem GABA_A-Rezeptor im Vordergrund. Desweiteren sollte untersucht werden, ob die drei ERM-Proteine, die potentiell alle mit der Schleife des Rezeptors interagieren können, auch in Neuronen mit GABA_AR- α 5 kolokalisieren. Schließlich sollten durch Färbung gegen F-Aktin Schlüsse auf den Aktivierungszustand des Radixins gezogen werden.

3.5.1 Kolokalisation von Radixin und GABA_AR- α 5 in Neuronen

Ob Radixin und GABA_AR- α 5 in Neuronen kolokalisieren, liefert Hinweise auf eine physiologische Relevanz der gefundenen Interaktion. Dazu wurden hippocampale Neuronen mit Konstrukten für GFP-markiertes Radixin und HA-markierten GABA_AR- α 5 transfiziert und nach fünf Tagen in Kultur mit einem anti-HA Antikörper durch Lebendfärbung immunmarkiert. Die erhaltene Immunreaktivität für den Rezeptor stellt daher oberflächenständigen GABA_AR- α 5 dar. Beide Bindepartner treten in punktförmiger Verteilung auf und kolokalisieren in hohem Maße (siehe Abbildung 3.11). Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn untransfizierte Neuronen mit spezifischen Antikörpern gegen endogenes Radixin und endogenen GABA_AR- α 5 immungefärbt wurden, wobei in diesem Experiment aufgrund der intrazellulären Lage des zur Immunisierung verwendeten Epitopes nicht zwischen intrazellulärem und plasmamembranständigen Rezeptor unterschieden werden kann (Abb. 3.11B). Die Kolokalisation der beiden Bindepartner wurde quantitativ bestimmt. Es wurden n = 3942 Punkte analysiert. Dabei zeigte sich, dass 38,73% \pm 0,94% des Rezeptors mit Radixin assoziiert waren. Bezogen auf die Anzahl der Punkte der Radixin-Immunreaktivität waren 63% \pm 5,9 % mit GABA_AR- α 5 kolokalisiert (Daten nicht gezeigt).

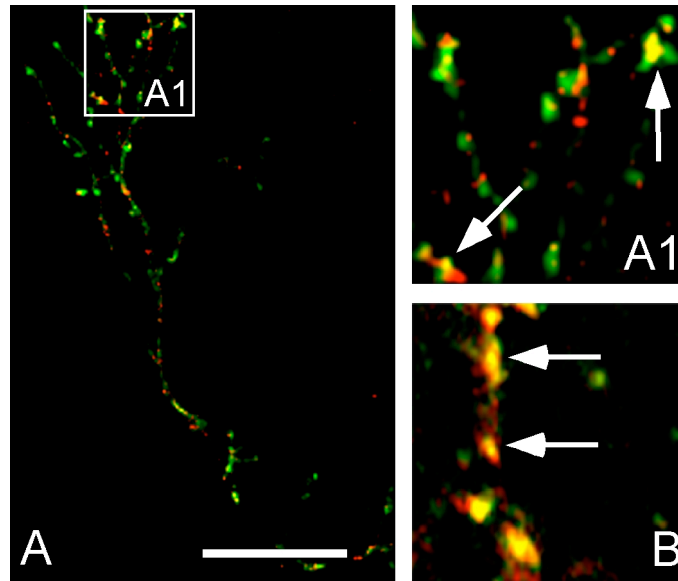


Abbildung 3.11: Kolokalisation von GABA_AR-5 und Radixin in Neuronen.

A: Hippokampale Neuronen wurden mit Konstrukten für Radixin-GFP und HA-markierten GABA_AR-5 transfiziert und mit anti-HA Antikörper immungefärbt (rot). Im Ausschnitt A1 ist zu erkennen, dass beide überexprimierten Bindepartner kolokalisieren (gelb, Pfeil).

B: Immunzytochemische Färbung der endogenen Bindepartner in hippocampalen Neuronen. Radixin (grün) und GABA_AR-5 (rot) zeigen Kolokalisation (gelb, Pfeil).

Der Größenbalken entspricht 20µm.

Radixin und GABA_AR-5 kolokalisieren in hohem Maß in Neuronen. Wie die spezifische Immunfärbung affinitätsmarkierter Rezeptoren zeigt, kolokalisieren auch oberflächenständige GABA_AR-5 mit Radixin.

3.5.2 Untersuchung der ERM-Proteine auf Kolokalisation mit GABA_AR-5

Die große Homologie der ERM-Proteine zueinander und der Befund, dass alle phosphomimetischen Mutanten *in vitro* an die Schleife von GABA_AR-5 binden können, warf die Frage auf, ob auch Ezrin und Moesin mit dem Rezeptor kolokalisieren.

Hippokampale Neuronen wurden mit Konstrukten für HA-markierten GABA_AR-5 und je einem myc-markierten Protein der ERM-Familie transfiziert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit

einem anti-HA Antikörper lebend gefärbt, anschließend fixiert und mit anti-myc Antikörpern behandelt.

Während Ezrin und Radixin in den Dendriten in punktförmig verteilter Form auftreten, ist die Lokalisation von Moesin auf das Soma beschränkt (siehe Abbildung 3.12). Radixin kolokalisiert in hohem Maß mit GABA_AR- α 5, aber die Immunreaktivität für Ezrin fällt nicht mit der des Rezeptors zusammen. Moesin ist ebenfalls nicht mit GABA_AR- α 5 kolokalisiert.

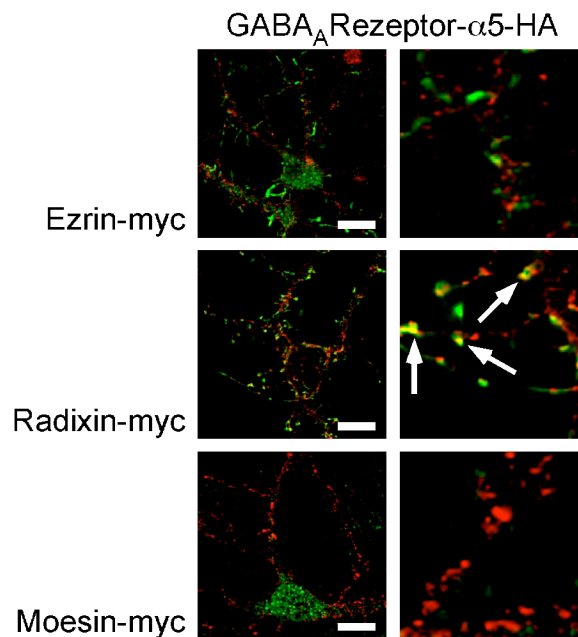


Abbildung 3.12: Kolokalisation von GABA_AR- α 5 und ERM-Proteinen in Neuronen.

Hippokampale Neuronen wurden mit Konstrukten für HA-markierten GABA_AR- α 5 und entweder myc-markiertem Ezrin, Radixin oder Moesin transfiziert und mit anti-myc (grün) und anti-HA Antikörpern (rot) immungefärbt. Ezrin zeigt eine punktförmige Verteilung, die aber nicht mit der Immunreaktivität des Rezeptors überlagert, während Radixin und der Rezeptor kolokalisieren. Moesin ist vorwiegend im Soma der Zellen lokalisiert und zeigt keine Kolokalisation mit dem Rezeptor. Die rechte Bildhälfte zeigt jeweils Vergrößerungen der links gezeigten Zellen. Der Größenbalken entspricht 20 μ m.

Von den drei ERM-Proteinen kolokalisiert nur Radixin in nennenswertem Maß mit GABA_AR- α 5. Auch wenn alle drei Proteine theoretisch die Voraussetzung für eine Bindung an den Rezeptor erfüllen, werden Ezrin und Moesin im zellulären Kontext eines Neurons offenbar nicht hinreichend aktiviert.

3.5.3 Synaptische Lokalisation von Radixin

Um die Lokalisation von Radixin in Neuronen zu untersuchen, wurde nicht-mutiertes Radixin als GFP-Fusion in hippocampalen Neuronen exprimiert.

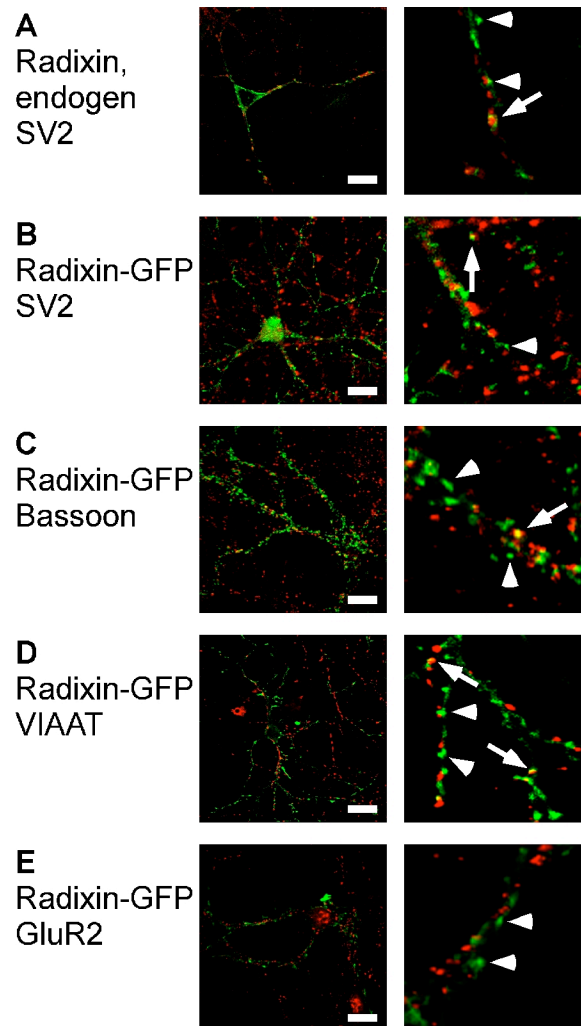


Abbildung 3.13: Untersuchung der synaptischen Lokalisation von Radixin-GFP in Neuronen.

A: Endogenes Radixin (grün) formt Punkte am Zellkörper und entlang des Dendriten (Pfeilspitzen). Einige der Punkte sind synaptisch lokalisiert (gelb, Pfeile), wie an Überlagerung mit der Immunreaktivität für den synaptischen Marker SV2 (rot) zu erkennen ist.

B: Das überexprimierte, C-terminale GFP-Fusionsprotein verhält sich wie endogenes Radixin. Auch hier sind eine punktförmige Verteilung und teilweise synaptische Lokalisation zu sehen.

C: Einige Radixin-GFP-Punkte kolokalisieren mit dem präsynaptischen Marker Bassoon (rot).

D: Radixin-GFP kolokalisiert partiell mit VIAAT, einem Marker für inhibitorische Synapsen (rot).

E: Immunfärbung des AMPA-Rezeptors (GluR2) zeigt keine Kolokalisation mit Radixin-GFP. Der Größenbalken entspricht 20µm.

Die Fragestellung nach der synaptischen Lokalisation wurde adressiert, indem die Zellen gegen verschiedene synaptische Marker immungefärbt wurden.

Zunächst wurde überprüft, ob sich das C-terminal mit GFP markierte Protein genauso verteilt wie endogenes Radixin. Beide Proteine sind punktförmig entlang der Plasmamembran verteilt (siehe Abb. 3.13A und B). Diese aggregierte Form des Proteins ist auch im proximalen und distalen Teil von Dendriten zu beobachten. Die Färbung gegen den allgemeinen synaptischen Marker SV2 zeigt, dass die Mehrzahl der Radixin-Punkte nicht an Synapsen lokalisiert ist. Einige Punkte jedoch fallen mit synaptischer Immunreaktivität zusammen. Das gleiche Ergebnis ist bei Färbung mit Antikörpern gegen den präsynaptischen Marker Bassoon zu sehen (Abb. 3.13C). Einige Radixin-„Cluster“ sind synaptisch lokalisiert, aber die Mehrheit der Punkte ist extrasynaptisch.

Eine Färbung mit VIAAT-spezifischen Antikörpern zeigt, dass Radixin an inhibitorischen Synapsen vorkommt (Abb. 3.13D). Die Färbung gegen den AMPA-Rezeptor (Untereinheit GluR2) hingegen zeigt keine Kollokalisierung (Abb. 3.13E).

Endogenes und markiertes Radixin verteilen sich punktförmig entlang der neuronalen Plasmamembran und sind sowohl auf dem Zellkörper, als auch in Dendriten zu finden. Die Mehrzahl der Radixin-„Cluster“ lokalisiert extrasynaptisch. Radixin-Immunreaktivität wird an inhibitorischen Synapsen gefunden und überlagert nicht mit Signalen für den AMPA-Rezeptor.

3.5.4 Synaptische Lokalisation verschiedener Radixin-Mutanten

Nachdem im Abschnitt 3.3.3 gezeigt wurde, dass die Bindung an GABA_AR- α 5 vom Aktivierungszustand des Radixins abhängig ist, sollte nun untersucht werden, ob die Aktivierung Einfluss auf die synaptische Lokalisation des Moleküls hat. Dazu wurden hippocampale Neuronen mit Konstrukten für GFP-Fusionen von nicht-mutiertem Radixin, der konstitutiv aktiven Mutante Radixin (T564D) und der nicht aktivierbaren Mutante Radixin (K(262, 263,

253, 254)N) transfiziert und mit Antikörpern gegen den Synapsenmarker SV2 immungefärbt. Der Prozentsatz des synaptisch lokalisierten Radixins wurde ermittelt, indem die Zahl der gelben Punkte zu der Gesamtzahl der Radixin-„Cluster“ ins Verhältnis gesetzt wurde.

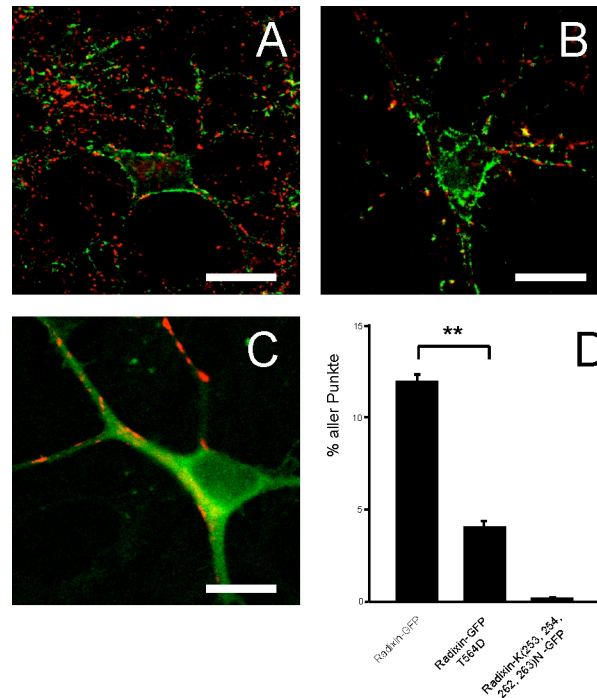


Abbildung 3.14: Lokalisation verschiedener Radixin-Mutanten an inhibitorischen Synapsen.

Die verschiedenen Radixin-Mutanten wurden als GFP-Fusionen in hippocampalen Neuronen überexprimiert. Die Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen VIAAT immungefärbt (rot).

A: Nicht-mutierte Radixin-GFP verteilt sich punktförmig an der Plasmamembran und lokalisiert vorwiegend extrasynaptisch.

B: Die konstitutiv aktive Mutante Radixin (T564D)-GFP lokalisiert ebenfalls in Punkten an der Plasmamembran und ist größtenteils extrasynaptisch.

C: Die nicht aktivierbare Gruppenmutante Radixin (K253N, K254N, K262N, K263N)-GFP verteilt sich im Zytoplasma und bindet nicht an die Membran. Die Verteilung ist diffus und nicht punktförmig.

D: Quantifizierung der synaptischen Lokalisation der Mutanten.

Die Punkte der Autofluoreszenz der GFP-fusionierten Radixine wurden gezählt. Gelbe Punkte wurden als synaptische Lokalisation gewertet, weil sie durch die Überlagerung mit der Immunreaktivität für VIAAT hervorgehen. Gezeigt sind jeweils der Anteil der synaptischen Punkte an der gesamten Autofluoreszenz. Für die nicht aktivierbare Gruppenmutante ergab sich aufgrund der nicht punktförmigen Verteilung eine faktische Kollokalisation von 0%. Der Anteil an synaptischem Radixin ist für die konstitutiv aktive Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt (Klammer mit Sternen, $p < 0,01$).

Der Größenbalken entspricht 20µm.

Nicht-mutiertes Radixin lokalisiert zu 12,03% synaptisch und zu 87,97% extrasynaptisch (siehe Abbildung 3.14). Es wurden n=1665 Punkte gezählt. Die Werte streuen mit einer Standardabweichung von $\pm 2,35\%$ und der SEM-Wert („*standard error of the mean*“) liegt bei $\pm 1,36\%$.

Die konstitutiv-aktive Radixin (T564D)-Mutante hingegen ist signifikant weniger synaptisch lokalisiert. Sie wird nur in 4,11% aller Fälle an der Synapse gefunden. Zu 95,89% lokalisiert sie extrasynaptisch. Es wurden n=1530 Punkte gezählt. Die Standardabweichung beträgt $\pm 1,98\%$, der SEM-Wert $\pm 0,66\%$. Der p-Wert, der sich aus der statistischen Analyse der Daten errechnet („*student's t-test*“, Microsoft Excel Software), liegt bei $p=0,00056619$.

Da für die nicht-aktivierbare Gruppenmutante keine punktförmige Verteilung beobachtet wird, wurde die Kolo-kalisation mit dem Synapsenmarker mit 0% beziffert.

3.5.5 Synaptische Verteilung von Radixin und GABA_AR- α 5

Durch weitere Immunfärbungen sollte die synaptische Lokalisation von Radixin/GABA_AR- α 5-„Coclustern“ untersucht werden. Dazu wurden hippokampale Neuronen mit spezifischen Antikörpern gegen endogenes Radixin und endogenen GABA_AR- α 5, sowie gegen den Synapsenmarker SV2 immungefärbt. Die Quantifizierung der Daten geschah wie oben beschrieben. Es wurden sowohl synaptische, als auch extrasynaptische „Cocluster“ beobachtet (siehe Abbildung 3.15).

Endogenes Radixin lokalisiert zu 13,1% synaptisch und zu 86,7% extrasynaptisch. Dieser Befund bestätigt auch die synaptische Verteilung der nicht-mutierten Radixin-GFP-Fusion (12,03% synaptisch zu 87,97% extrasynaptisch). Die Standardabweichung betrug $\pm 3,95\%$, der SEM-Wert lag bei $\pm 2,28\%$.

Endogener GABA_AR- α 5 ist ebenfalls vorwiegend extrasynaptisch lokalisiert. Er befand sich zu 21,03% an der Synapse und zu 78,97% extrasynaptisch. Die Standardabweichung betrug $\pm 5,29\%$, der SEM-Wert $\pm 3,05\%$.

Die Radixin/GABA_AR- α 5-„Cocluster“ waren fast ausschließlich extrasynaptisch zu finden (92,49%). Nur 7,51% lokalisierten an der Synapse. Die Standardabweichung betrug $\pm 4,63\%$, der

SEM-Wert $\pm 2,67\%$. Im Gesamtexperiment wurde eine Punkteanzahl von $n_{\text{gesamt}}=5739$ ausgewertet, für die synaptische Lokalisation der „Cocluster“ wurde daraus der Anteil $n=1537$ zugrunde gelegt.

Abbildung 3.15 zeigt, dass auch im Falle der Expression markierter Bindepartner sowohl synaptische, als auch extrasynaptische „Cocluster“ beobachtet werden. Die synaptische Lokalisation der überexprimierten Proteine ähnelt der endogenen, wie auch am Beispiel von Radixin-GFP gezeigt. Dies zeigt, dass die Überexpression der Proteine an sich nicht zur einer abnormalen Verteilung führt.

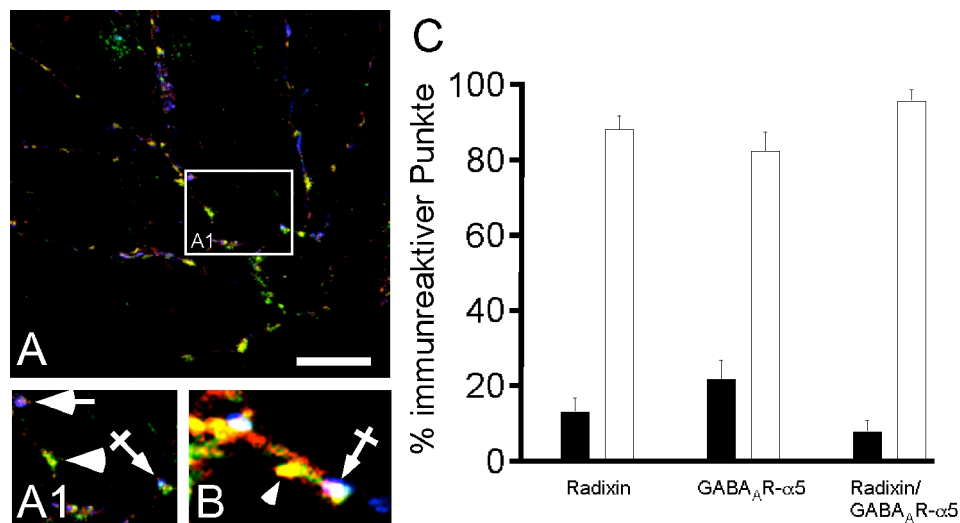


Abbildung 3.15: Synaptische Verteilung von Radixin und GABA_AR-α5.

A: Hippokampale Neuronen wurden mit spezifischen Antikörpern gefärbt, um endogenes Radixin (grün), endogenes GABA_AR-α5 (rot) und Synapsen (blau) sichtbar zu machen. Gelbe Überlagerung der Immunreaktivitäten für Radixin und den Rezeptor zeigen extrasynaptisch lokalisierte „Cocluster“ (im Ausschnitt A1 durch Pfeilspitzen gekennzeichnet). GABA_AR-α5 kommt auch ohne Radixin an Synapsen vor (Pfeil) und in einigen Fällen wurde dreifache Kolokalisation beobachtet (weiß), was einer synaptischen Lokalisation des Radixin/Rezeptor-„Coclusters“ entspricht (gekreuzter Pfeil).

B: Hippokampale Neuronen wurden mit Konstrukten für Radixin-GFP und myc-markierten GABA_AR-α5 transfiziert und mit Antikörpern gegen das myc-Epitop (rot) und gegen VIAAT (blau), einem Marker für inhibitorische Synapsen, gefärbt. Gezeigt ist ein Ausschnitt eines Dendriten. Auch hier sind klar extrasynaptische (gelb) und synaptische (weiß) Radixin/Rezeptor-„Cocluster“ zu erkennen.

Der Größenbalken in A entspricht 20 μm.

D: Synaptische Verteilung der endogenen Proteine. Schwarze Balken repräsentieren den Anteil synaptisch lokalisierter Proteine, weiße Balken den extrasynaptischen Anteil. Sowohl Radixin, als auch GABA_AR-α5 sind vorwiegend extrasynaptisch lokalisiert. Die Radixin/Rezeptor-„Cocluster“ sind fast ausschließlich extrasynaptisch.

Sowohl Radixin als auch GABA_AR- α 5 sind überwiegend extrasynaptisch lokalisiert. Die „Co-Cluster“ werden noch seltener an Synapsen beobachtet, als die getrennt voneinander betrachteten Bindepartner.

3.5.6 Assoziation von Radixin mit F-Aktin in Neuronen

Um zu untersuchen, ob Radixin auch in Neuronen mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert ist, wurden hippocampale Neuronen mit dem Konstrukt für Radixin-GFP transfiziert und nach vier Tagen mit Rhodamin-Phalloidin und Antikörpern gegen den Synapsenmarker SV2 gefärbt (siehe Abbildung 3.16). Es ist zu erkennen, dass fast ausnahmslos alle Radixin-„Cluster“ mit der Färbung für F-Aktin überlagern. Zudem ist gezeigt, dass die überwältigende Mehrheit aller Synapsen reich an F-Aktin ist. Sowohl extrasynaptisches, als auch synaptisches Radixin befindet sich offenbar in einem Aktivierungszustand, der die Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett erlaubt.

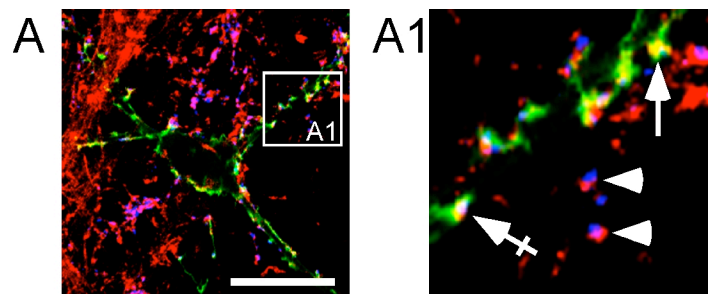


Abbildung 3.16: Aktin-Assoziation von Radixin-GFP in Neuronen.

Hippocampale Neuronen wurden mit dem Konstrukt für Radixin-GFP transfiziert, fixiert und mit Rhodamin-Phalloidin (rot) behandelt, um F-Aktin anzufärben. Außerdem wurden Synapsen durch Behandlung mit Antikörpern gegen den Marker SV2 (blau) sichtbar gemacht.

A: Viele Synapsen sind reich an F-Aktin, wie im Ausschnitt A1 an Magenta-farbenen Überlagerungen zu erkennen ist (Pfeilspitzen). Die Punkte des Radixin-GFP sind fast ausschließlich mit F-Aktin assoziiert. Dabei sind extrasynaptische Ballungen an gelber (Pfeil) und synaptische an weißer Färbung zu erkennen (gekreuzter Pfeil).

Der Größenbalken in A entspricht 20 μ m.

Nachdem die synaptische Lokalisation von Radixin in den Abschnitten 3.5.3 bis 3.5.5 untersucht worden ist, wurde nun durch Immunfärbungen geklärt, ob Radixin mit dem Gerüstprotein Gephyrin in Neuronen kolokalisiert.

3.5.7 Kolokalisation von GABA_AR- α 5 mit Radixin und Gephyrin

Obschon eine direkte Interaktion zwischen dem GABA_A-Rezeptor und Gephyrin nicht demonstriert werden konnte, lokalisieren viele GABA_A-Rezeptoren an Gephyrin-positiven Punkten. Es sollte geklärt werden, ob die Assoziation von GABA_AR- α 5 mit Radixin ebenfalls an Gephyrin-positiven Punkten stattfindet, oder ob Radixin und Gephyrin im zellulären Kontext voneinander unabhängige Systeme darstellen.

Hippokampale Neuronen wurden mit Konstrukten für myc-markiertes Radixin, YFP-Gephyrin und HA-markierten GABA_AR- α 5 transfiziert und nach vier Tagen mit spezifischen Antikörpern gegen die HA- und myc-Epitope immungefärbt.

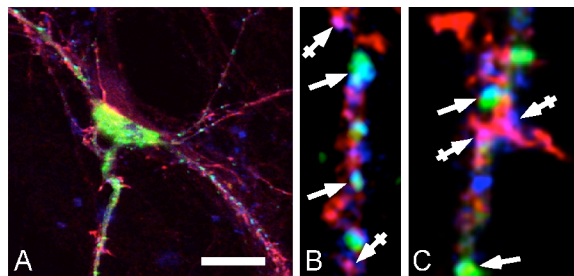


Abbildung 3.17: Lokalisation von GABA_AR- α 5 mit Gephyrin und Radixin.

Hippokampale Neuronen wurden mit Konstrukten für HA-markierten GABA_AR- α 5, YFP-Gephyrin und myc-markiertes Radixin transfiziert und nach vier Tagen mit anti-HA Antikörper (blau) und anti-myc Antikörper (rot) immungefärbt.

A: Übersicht über eine transfizierte Zelle.

B und C: Beispiele von Dendritenausschnitten vergleichbarer Zellen wie in A. Für alle drei visualisierten Proteine ist eine punktförmige Verteilung zu sehen. Der Rezeptor (blau) kolokalisiert stark mit Radixin (rot), was an Magenta-farbenen Überlagerungen zu erkennen ist (gekreuzter Pfeil). Außerdem ist der Rezeptor mit Gephyrin (grün) kolokalisiert (türkise Punkte, Pfeile). Eine Kolokalisation von Radixin und Gephyrin oder allen drei Proteinen wird quasi nicht beobachtet. Der Größenbalken in A entspricht 20 μ m.

In Abbildung 3.17 ist gezeigt, dass der Rezeptor sowohl mit Gephyrin, als auch mit Radixin assoziiert sein kann. Eine Kolo-kalisation von Radixin mit Gephyrin wird allerdings nicht beobachtet. Es ist daher wahrscheinlich, dass Radixin keine Komponente des bislang noch nicht verstandenen, auf Gephyrin basierenden Verankerungssystems für GABA_A-Rezeptoren darstellt.

3.6 Funktionelle Analyse der Radixin/GABA_AR- α 5-Interaktion

Nachdem die Bindung von Radixin an die α 5-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors biochemisch charakterisiert und im zellulären Kontext untersucht worden ist, sollte nun versucht werden, die Interaktion mit verschiedenen induktiven Methoden zu stören. Dabei wurde sowohl auf bereits etablierte Verfahren wie die Verwendung von *antisense*-Oligonukleotiden, als auch auf die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zurückgegriffen.

3.6.1 Applikation von *antisense*-Oligonukleotiden

Mit Hilfe von *antisense*-Oligonukleotiden kann der Titer an einer gewünschten mRNA in der Zelle herunterreguliert werden. In vielen Fällen kommt es in Folge dessen zu derart starkem Verlust an Protein, dass die herkömmlichen Nachweismethoden nicht ausreichen, um noch verbleibende Moleküle zu detektieren.

Das *antisense*-Oligonukleotid lagert sich komplementär an die mRNA des Zielgens an und bildet einen RNA/DNA-Hybrid-Doppelstrang, der rasch von RNaseH abgebaut wird. Auf diese Weise wird die Translation des betreffenden Proteins unterdrückt. Nach Applikation des *antisense*-Oligonukleotides trägt die Halbwertszeit der bereits vorliegenden Proteine maßbeglich zur Kinetik des Abklingens der Proteinmengen in der Zelle bei. Um die Nachhaltigkeit des Effektes zu erhöhen, werden in der Regel chemisch modifizierte Oligonukleotide eingesetzt (PTO-modifiziert), die im zellulären Kontext eine längere Lebensdauer zeigen.

Die Applikation von sequenzspezifischen *antisense*-Oligonukleotiden gegen die Radixin mRNA führt in 24 Stunden zum fast vollständigen Verlust des Proteins in Neuronen (Paglini et al., 1998). Die gleichen Oligonukleotide wurden hier eingesetzt, um die Translation von Radixin zu verhindern. Es wurden *antisense*-Oligonukleotide gegen zwei verschiedene Stellen der mRNA (Nukleotide 1-24 und 1334-1348) als Gemisch eingesetzt und gemeinsam mit dem Farbstoff Lucifer Yellow oder dem Vektor pEGFP-C2 in hippocampale Neuronen mikroinjiziert. 24 Stunden nach der Applikation wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen die $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors und den synaptischen Marker SV2 immungefärbt.

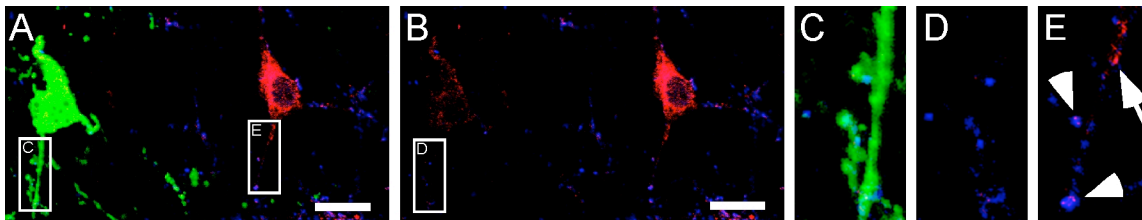


Abbildung 3.18: Mikrojektion von *antisense*-Oligonukleotiden.

Hippocampale Neuronen wurden bis nach der Ausbildung reifer Synapsen kultiviert und mit einem Gemisch aus dem Farbstoff Lucifer Yellow (grün) und *antisense*-Oligonukleotiden gegen die Radixin mRNA mikroinjiziert. 24 Stunden nach Injektion wurden die Zellen fixiert und endogener GABA_AR- $\alpha 5$ (rot), sowie der synaptische Marker SV2 (blau) wurden immungefärbt.

A: Im Bildausschnitt liegen zwei Zellen, von denen die linke mit dem Gemisch mikroinjiziert wurde. Die rechte Zelle ist unbehandelt.

B: Gezeigt ist das gleiche Bild wie in A ohne den grünen Kanal.

C und D: Ein Teilstück eines Dendriten der mikroinjizierten Zelle ist vergrößert dargestellt. Man erkennt, dass die behandelte Zelle zwar über synaptische Kontakte verfügt, aber keine punktförmige Immunreaktivität für GABA_AR- $\alpha 5$ mehr zeigt.

E: Ein vergleichbarer Abschnitt der Kontrollzelle ist dargestellt. Die Immunreaktivität für den GABA_AR- $\alpha 5$ ist punktförmig und lokalisiert sowohl synaptisch (magenta-farben, Pfeilspitzen), als auch extrasynaptisch (Pfeil).

Der Größenbalken in A und B entspricht 20 μ m.

In Abbildung 3.18 ist zu sehen, dass die punktförmige Immunreaktivität für GABA_AR- $\alpha 5$ in der mikroinjizierten Zelle weitgehend verlorenght (Abb 3.18C und D), während die Färbung der Synapsen erhalten bleibt. In einer nebenliegenden, nicht behandelten Zelle erkennt man die typische Verteilung des Rezeptors mit synaptischen und extrasynaptischen „Clustern“ (Abb. 3.18 E).

Zur Kontrolle wurden die entsprechenden, sequenzspezifischen *sense*-Oligonukleotide als Gemisch gemeinsam mit „Lucifer Yellow“ oder dem Vektor pEGFP-C2 mikroinjiziert.

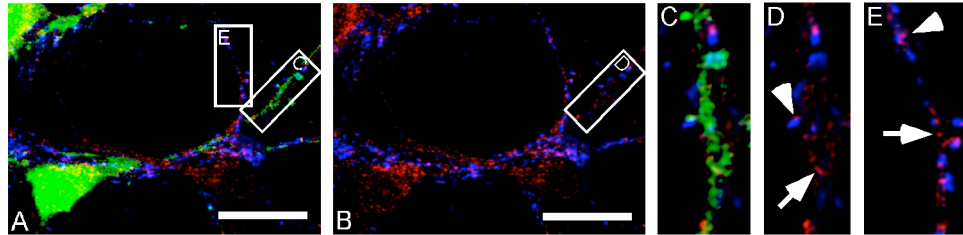


Abbildung 3.19: Mikrojektion von *sense*-Oligonukleotiden.

Als Kontrolle zur *antisense*-Mikrojektion wurden hippocampale Neuronen bis nach der Ausbildung reifer Synapsen kultiviert und mit einem Gemisch aus dem Farbstoff Lucifer Yellow (grün) und *sense*-Oligonukleotiden gegen die Radixin mRNA mikroinjiziert. 24 Stunden nach Injektion wurden die Zellen fixiert und endogener GABA_AR- α 5 (rot), sowie der synaptische Marker SV2 (blau) wurden immungefärbt.

A: Im Bildausschnitt liegen zwei Zellen, von denen die linke mit dem Gemisch mikroinjiziert wurde. Die rechte Zelle ist unbehandelt.

B: Gezeigt ist das gleiche Bild wie in A, nur ohne den grünen Kanal.

C und D: Ein Teilstück eines Dendriten der mikroinjizierten Zelle ist vergrößert dargestellt. Man erkennt, dass die behandelte Zelle über synaptische Kontakte verfügt und dass die Immunreaktivität für den Rezeptor punktförmig entlang des Dendriten verteilt ist. Synaptische Rezeptoren (magenta-farben) sind mit einer Pfeilspitze markiert, extrasynaptische mit einem Pfeil.

E: Ein vergleichbarer Abschnitt der Kontrollzelle ist dargestellt.

Der Größenbalken in A und B entspricht 20 μ m.

sense-Oligonukleotide können sich nicht komplementär an die mRNA anlagern und sollten daher nicht zu einem Verlust des Zielproteins in der Zelle führen.

Wie in Abbildung 3.19 zu sehen ist, bleibt die punktförmige Immunreaktivität für GABA_AR- α 5 in der mikroinjizierten Zelle erhalten (Abb. 3.19 C und D) und gleicht der Verteilung in einer unbehandelten Nachbarzelle (Abb. 3.19 E). Neben den Synapsen sind in beiden Fällen klar sowohl synaptische, als auch extrasynaptische „Cluster“ des Rezeptors zu sehen.

Die Depletion von Radixin führt in Neuronen zum Verlust der punktförmigen Immunreaktivität von GABA_AR- α 5, was einen starken Hinweis für eine Rolle von Radixin im „Clustering“ des Rezeptors darstellt.

3.6.2 Expression eines Radixin-Konstrukts mit dominant-negativer Wirkung

ERM-Proteine sind in der Lage, durch Kopf-Schwanz-Anordnung Dimere und Oligomere auszubilden (Gary und Bretscher, 1993; Gronholm et al., 1999). Es ist gezeigt worden, dass die N-terminale FERM-Domäne eine Affinität für die C-terminale F-Aktin Bindedomäne besitzt und dass beide Teile aneinander binden, wenn sie getrennt voneinander exprimiert werden (Magendantz et al., 1995). Die Expression der alleinstehenden N-terminalen FERM-Domäne hat zur Folge, dass der intakte N-Terminus an den C-Terminus eines endogenen Radixin-Moleküls binden kann. Die Fortführung in eine oligomere Struktur ist dann wegen des fehlenden C-Terminus' unterbunden. Durch die Überexpression einer solch verkürzten Variante wird letztlich die Verankerung der von ERM-Proteinen gebundenen, transmembranen Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett unterdrückt (Roumier et al., 2001).

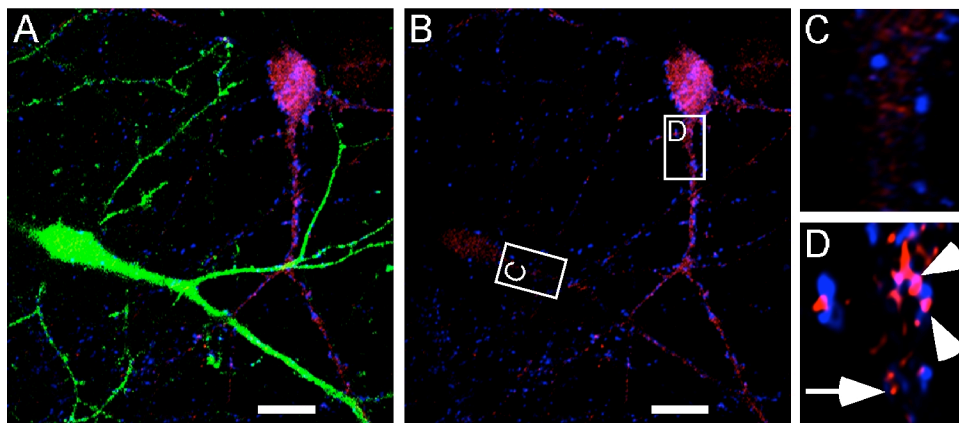


Abbildung 3.20: Überexpression von dominant-negativem Radixin.

Hippokampale Neuronen wurden mit einem Konstrukt für Radixin (1-468)-GFP transfiziert, bis zur Ausbildung reifer Synapsen kultiviert und dann fixiert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen den GABA_AR- α 5 (rot) und den Synapsenmarker SV2 (blau) immungefärbt.

A: Im Bildausschnitt liegen zwei Zellen, von denen die linke mit dem Konstrukt transfiziert wurde. Die rechte Zelle ist unbehandelt.

B: Gezeigt ist das gleiche Bild wie in A, nur ohne den grünen Kanal.

C: Ein Teilstück eines Dendriten der transfizierten Zelle ist vergrößert dargestellt. Man erkennt, dass die behandelte Zelle zwar über synaptische Kontakte verfügt, die punktförmige Immunreaktivität für GABA_AR- α 5 aber drastisch reduziert ist.

D: Ein vergleichbarer Abschnitt der Kontrollzelle ist dargestellt. Die Immunreaktivität für den GABA_AR- α 5 ist punktförmig und lokalisiert sowohl synaptisch (magenta, Pfeilspitzen), als auch extrasynaptisch (Pfeil).

Der Größenbalken in A und B entspricht 20 μ m.

Die C-terminale F-Aktin-Bindedomäne des Radixin wurde durch GFP ersetzt. Die entstandene, verkürzte Mutante Radixin (1-468)-GFP kann so durch Autofluoreszenz visualisiert werden.

In Abbildung 3.20 ist dargestellt, dass die Überexpression von dominant-negativem Radixin (1-468)-GFP zum Verlust von GABA_AR- α 5-„Clustern“ führt. Hippokampale Neuronen wurden mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert, nach zwei Tagen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen GABA_AR- α 5 und den Synapsenmarker SV2 immungefärbt.

Die transfizierte Zelle zeigt einen drastischen Verlust an Zahl und Intensität der Rezeptor-„Cluster“, während eine daneben gelegene, unbehandelte Zelle eine normale Verteilung des Rezeptors zeigt. Zellen, die nur mit einem Vektor für GFP transfiziert wurden, verfügen ebenfalls über ein normales „Clustering“ von GABA_AR- α 5 (Daten nicht gezeigt).

3.6.3 Expression mutanter GABA_A-Rezeptoren, die Radixin nicht binden

Die Eingrenzung der Bindestelle von Radixin auf der Schleife von GABA_AR- α 5 hat gezeigt, dass die Aminosäuren 342-357 für die Bindung ausreichend und notwendig sind. Es sollten nun Mutanten hergestellt werden, die nicht mehr an Radixin binden können. Das Verhalten dieser Rezeptoren sollte weiter Aufschluss über die Funktion der gefundenen Bindung geben.

Dazu wurden systematisch je drei Aminosäuren der großen zytoplasmatischen Schleife von GABA_AR- α 5 zu Alanin mutiert und die entstandenen Konstrukte in drei unabhängigen Versuchsansätzen auf ihre Bindung an Radixin hin überprüft. Erstens gab das Hefe-2-Hybrid-Experiment Aufschluss über eine Interaktion mit dem ursprünglich isolierten Radixin-Konstrukt, zweitens wurden die mutanten Schleifen als GST-Fusion exprimiert und im „Pulldown“-Experiment auf ihre Fähigkeit hin untersucht, myc-markiertes Radixin (T564D) zu binden. Schließlich sollten myc-markierte GABA_AR- α 5 mit den Mutationen in der Schleife in Neuronen exprimiert und auf ihre Kollokalisierung mit Radixin hin untersucht werden.

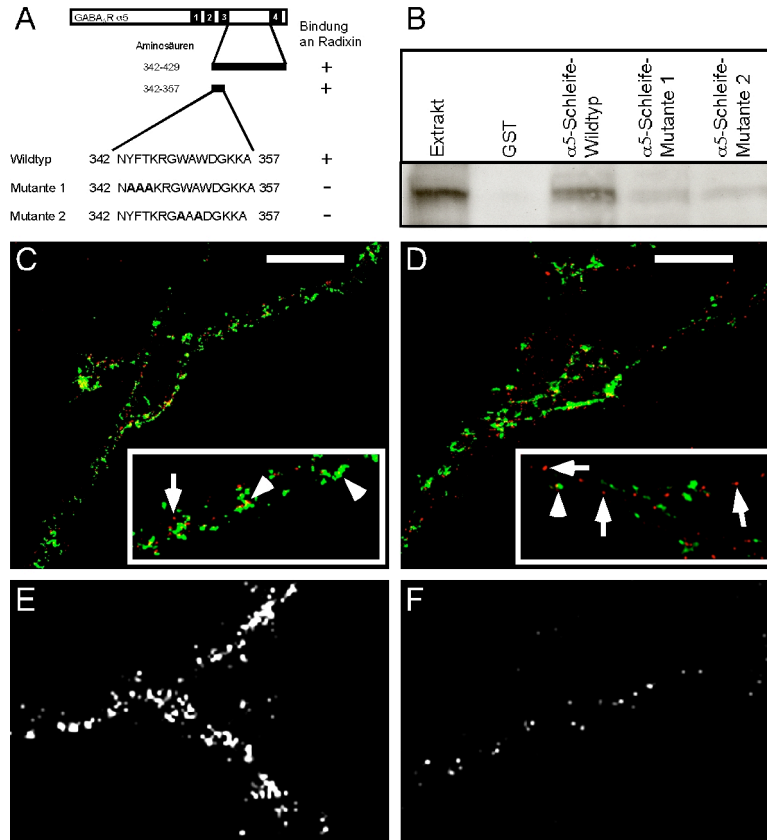


Abbildung 3.21: Charakterisierung einer Gruppenmutante in GABA_AR- α 5, die nicht an Radixin binden kann.

A: Schematische Darstellung der α 5-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors. In die Sequenz der Rezeptorschleife wurden zwei Gruppenmutationen eingefügt (Mutante 1 und 2), indem bestimmte Aminosäuren durch Alanin ersetzt wurden (fettgedrucktes A). Beide Mutanten waren nicht in der Lage, die Expression des β -Galaktosidase-Reportergens oder des LEU2-Gens durch Interaktion mit Radixin anzustellen.

B: Western Blot Analyse von „Pull-down“-Experimenten mit nicht-mutierter und mutierten Schleifen des GABA_AR- α 5. Myc-markiertes Radixin (T564D) wurde in HEK293 Zellen überexprimiert und der Extrakt wurde mit den immobilisierten, an GST fusionierten Schleifen inkubiert. Radixin (T564D)-myc ist im Extrakt zu erkennen und kann mit der nicht-mutierten Schleife des GABA_AR- α 5, nicht aber mit GST alleine, pelletiert werden. Die mutierten Schleifen zeigen ein stark beeinträchtigt Vermögen, Radixin zu binden.

C: Hippokampale Neuronen wurden mit Konstrukten für myc-markierten GABA_AR- α 5 und Radixin-GFP transfiziert und nach vier Tagen mit anti-myc Antikörper in der Kultur inkubiert. Der Rezeptor (rot) verteilt sich punktförmig über Zellkörper und Dendriten und kolokalisiert in vielen Fällen mit Radixin-GFP (gelb, Pfeilspitzen). Einige Rezeptoren sind nicht mit Radixin assoziiert (rot, Pfeile).

D: Gemeinsam mit Radixin-GFP wurde ein Konstrukt für myc-markierten GABA_AR- α 5 transfiziert, in dem die beiden Mutanten 1 und 2 zu einer doppelten Gruppenmutation zusammengefasst sind (Y343A, F344A, T345A, W349A, W351A). Die Kolokalisation mit Radixin ist drastisch reduziert, nur wenige Punkte fallen mit der Autofluoreszenz des Radixin-GFP zusammen.

E: Nicht-mutierter myc-markierter GABA_AR- α 5 zeigt eine punktförmige Verteilung entlang des Dendriten.

F: Die Kombinationsmutante tritt weniger geballt auf. Die Anzahl und Intensität der verbleibenden Punkte ist im Vergleich zum Wildtyp erheblich herabgesetzt.

Die Aufnahmen in C und D, sowie in E und F wurden jeweils unter den exakt gleichen Bedingungen gemacht und die Bilder wurden identisch bearbeitet.

Zwei der vier ursprünglich erhaltenen Gruppenmutanten zeigten sowohl im Hefe-System, als auch im „Pulldown“-Experiment den Verlust der Radixin-Bindung (siehe Abbildung 3.21). Als Mutante 1 wird im Folgenden die Gruppenmutante GABA_AR- α 5 (Y343A, F344A, T345A) bezeichnet, als Mutante 2 die Gruppenmutante GABA_AR- α 5 (W349A, W351A). Beide Mutanten zeigen keine Bindung an Radixin im Hefe-2-Hybrid-System. Im „Pulldown“-Experiment ist zu erkennen, dass beide Mutanten ein erheblich eingeschränktes Vermögen haben, myc-markiertes Radixin (T564D) zu binden.

Für die Untersuchung der Kolo-kalisation wurden die beiden Gruppenmutanten 1 und 2 zu einer Kombinationsmutante zusammengefasst, weil für keine der beiden ein totaler Verlust an Radixin-Bindung im „Pulldown“-Experiment gezeigt werden konnte. Die entstandene Kombinationsmutante GABA_AR- α 5 (Y343A, F344A, T345A, W349A, W351A) wurde als myc-markiertes Protein in hippokampalen Neuronen exprimiert. Es ist ersichtlich, dass der Verlust der Radixin-Bindung nicht mit der Oberflächenexpression des Rezeptors interferiert. Die detektierte Immunreaktivität verteilt sich aber anders als nicht-mutierter, myc-markierter GABA_AR- α 5. Die Kombinationsmutante formt keine großen Aggregate mehr und die verbliebene Immunreaktivität fällt vorwiegend nicht mit Radixin-„Clustern“ zusammen. In vielen Zellen wurde eine diffuse Verteilung des fünffach mutanten Rezeptors beobachtet und sein „Clustering“ war weitgehend unterdrückt. Aufgrund der schwachen Färbung konnten solche Zellen jedoch nicht in hinreichender Qualität aufgenommen werden.

Die molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung der ERM-Proteine führen, sind nicht im Detail bekannt. Einige Arbeiten haben aber gezeigt, dass Vertreter der kleinen GTPasen der Rho-Familie bei der Aktivierung Einfluss nehmen. Daher wurde im letzten Abschnitt der Arbeit überprüft, ob GTPasen der Rho-Familie Einfluss auf den Aktivierungszustand von Radixin und damit auf seine synaptische Lokalisation nehmen.

3.7 Einfluss der Aktivität von GTPasen der Rho-Familie

GTPasen (Guaninnukleotid-Triphosphatasen) der Rho-Familie gehören neben den Ras-, Ran-, Arf- und Rab-Proteinen zur Superfamilie der monomeren GTP-bindenden Proteine. Im GTP-gebundenen Zustand können sie die Aktivität anderer Proteine stimulieren. Durch ihre eigene GTPase-Aktivität jedoch wird das gebundene GTP rasch zu GDP hydrolysiert, wodurch die GTPase inaktiv wird. Auf diese Weise wirken kleine GTPasen als molekulare Schalter, die Signalwege an- oder abzustellen vermögen.

Die Aktivität der GTPasen wird unter anderem durch akzessorische Faktoren reguliert, die das an der GTPase gebundene GDP gegen ein GTP austauschen und das Molekül auf diese Weise wieder aktivieren können. Es ist eine Vielzahl von solchen GEF's („*guanine nucleotide exchange factors*“) beschrieben worden und die meisten von ihnen sind in ihrer Aktivität nicht spezifisch für eine einzige GTPase, sondern können an mehreren Substraten wirken. Ähnliches gilt für die GAP-Faktoren („*GTPase activating protein*“), die die Hydrolyse des GTP an der GTPase fördern und damit zur Inaktivierung des Moleküls beitragen. GDI-Faktoren („*guanine dissociation inhibitor*“) stabilisieren die GDP-gebundene Form der GTPase und verzögern somit ihre Aktivierung.

Die Aktivierung der ERM-Proteine ist in mehrerer Hinsicht mit den Rho-Familie GTPasen verknüpft. Einerseits führt die Aktivierung von Rho zur Rekrutierung von ERM-Proteinen an die Plasmamembran (Mackay et al., 1997), andererseits regulieren die ERM-Proteine auch die Aktivität von Rho, indem sie zum Beispiel im aktiven Zustand an RhoGDI binden, den Faktor dadurch aus dem Bindungsgleichgewicht mit Rho abziehen und somit zu einer Aktivierung von Rho beitragen (Takahashi et al., 1997). Rho-Kinase, eine Rho nachgeschaltete Proteinkinase, kann die ERM-Proteine *in vitro* an dem bereits beschriebenen, konservierten C-terminalen Threoninrest phosphorylieren (Matsui et al., 1998). Später wurde gezeigt, dass die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Rho, RhoV14, die C-terminale Phosphorylierung von ERM-Proteinen erhöht und in NIH3T3 Zellen zur Ausbildung von Mikrovilli führt, wo ERM-Proteine das hochgradig organisierte Aktin-Gerüst mit der Plasmamembran verbinden (Matsui et al., 1999). Die Aktivierung von Rho führt also zur Aktivierung der ERM-Proteine. Dieselbe

Arbeit hat demonstriert, dass *in vivo* nicht Rho-Kinase, sondern Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase die ERM-Proteine am C-Terminus phosphoryliert.

Ein weiteres Mitglied der Rho-Familie, Rac1, ist in vielen Zelltypen charakterisiert worden und verschiedene Gruppen haben demonstriert, dass Rac und Rho antagonistisch wirken können (Sanders et al., 1999). Speziell in Neuronen sind antagonistische Effekte von Rho und Rac zum Beispiel in der Regulation der Morphologie von dendritischen Dornen beschrieben worden (Tashiro et al., 2000).

3.7.1 Einfluss auf die synaptische Lokalisation von Radixin

Da die Aktivierung der ERM-Proteine von GTPasen der Rho-Familie abhängt und Rho und Rac als Antagonisten beschrieben worden sind, sollte der Effekt dieser Signalmoleküle auf die synaptische Lokalisation von Radixin untersucht werden. Hippokampale Neuronen wurden gemeinsam mit Konstrukten für Radixin-GFP und entweder einer konstitutiv aktiven Form von Rac, RacV12, oder einer dominant-negativen Form von Rho, RhoN19, transfiziert und bis zur Ausbildung reifer Synapsen kultiviert. Die Zellen wurden dann fixiert und mit Antikörpern gegen den Synapsenmarker SV2 immungefärbt. Der synaptische Anteil von Radixin-GFP wurde wie beschrieben ermittelt.

Bei Überexpression des dominant-negativen RhoN19, lokalisierten 43,19% des Radixin-GFP an der Synapse, 56,81% waren extrasynaptisch. Die Standardabweichung lag bei $\pm 5,42\%$, der SEM-Wert bei $\pm 2,05\%$. Es wurden $n=1665$ Punkte ausgewertet.

Wurde das konstitutiv aktive RacV12 überexprimiert, waren 41,34% des Radixins synaptisch lokalisiert, 58,66% waren extrasynaptisch (siehe Abbildung 3.22). Die Standardabweichung betrug $\pm 4,74\%$, der SEM-Wert $\pm 1,5\%$. Es wurden $n=2824$ Punkte gezählt.

Beide Befunde unterscheiden sich signifikant von dem Wert, der für Radixin-GFP und endogenes Radixin ohne Behandlung mit Rho-Familie-GTPasen ermittelt wurde ($p_{\text{RacV12}}=0,0000025$; $p_{\text{RhoN19}}=0,000043$).

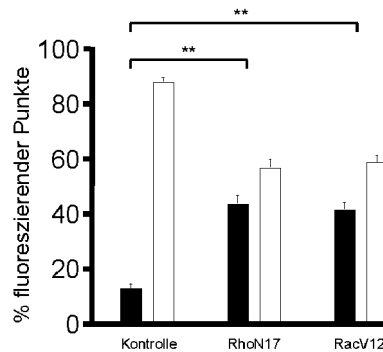


Abbildung 3.22: Einfluss von GTPasen der Rho-Familie auf die synaptische Lokalisation von Radixin-GFP.

Hippokampale Neuronen wurden mit Konstrukten für Radixin-GFP entweder alleine (Kontrolle) oder mit RhoN17 oder RacV12 transfiziert und bis zur Ausbildung reifer Synapsen kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen den Synapsenmarker SV2 immungefärbt. Die Gesamtheit der punktförmigen Radixin-GFP Autofluoreszenzen wurde gezählt und der synaptische Anteil (gelbe Punkte durch Überlagerung mit dem Synapsenmarker) wurde ermittelt. Schwarze Balken bezeichnen synaptisches, weiße Balken extrasynaptisches Radixin-GFP. Die Klammern mit den Sternen geben an, dass zwischen den betreffenden Datensätzen ein signifikanter Unterschied besteht ($p < 0,01$).

Die Inaktivierung von Rho durch dominant-negatives RhoN17 führt zur Akkumulation von Radixin an der Synapse. Konstitutiv-aktives RacV12 bewirkt in antagonistischer Weise den gleichen Effekt.

3.7.2 Einfluss auf die synaptische Lokalisation von GABA_AR- α 5

Nachdem der Einfluss von GTPasen der Rho-Familie auf die synaptische Lokalisation von Radixin gezeigt wurde, sollte überprüft werden, ob auch der Bindepartner von Radixin, GABA_AR- α 5, seine Lokalisation verändert, wenn in das Gleichgewicht der Rho-Aktivierung eingegriffen wird.

Hippokampale Neuronen wurden mit Konstrukten für GFP und das konstitutiv aktive RacV12 transfiziert und bis zur Ausbildung reifer Synapsen kultiviert. Die Zellen wurden dann fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen den Synapsenmarker SV2 und GABA_AR- α 5 immungefärbt. Der synaptische Anteil des Rezeptors wurde wie beschrieben ermittelt.

Bei Überexpression von RacV12 lokalisierten 46,28% des Rezeptors an der Synapse, 53,74% waren extrasynaptisch lokalisiert (siehe Abbildung 3.23). Die Standardabweichung betrug $\pm 2,54\%$, der SEM-Wert lag bei $\pm 1,44\%$. Es wurden $n=1703$ Punkte ausgewertet.

Der synaptische Anteil von endogenem GABA_AR- $\alpha 5$ ist im Vergleich zur unbehandelten Situation signifikant erhöht ($p_{\text{RacV12}}=0,000045$).

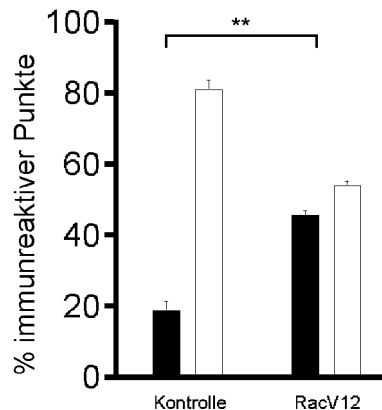


Abbildung 3.23: Einfluss von GTPasen der Rho-Familie auf die synaptische Lokalisation von GABA_AR- $\alpha 5$.

Hippokampale Neuronen wurden entweder ohne Vektor (Kontrolle) oder mit Konstrukten für GFP und RacV12 transfiziert und bis zur Ausbildung reifer Synapsen kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen GABA_AR- $\alpha 5$ und den Synapsenmarker SV2 immungefärbt. Die Gesamtheit der punktförmigen GABA_AR- $\alpha 5$ Immunreaktivität wurde gezählt und der synaptische Anteil (gelbe Punkte durch Überlagerung mit dem Synapsenmarker) wurde ermittelt. Schwarze Balken bezeichnen synaptische Rezeptoren, weiße Balken extrasynaptische. Die Klammer mit den Sternen gibt an, dass zwischen den betreffenden Datensätzen ein signifikanter Unterschied besteht ($p < 0,01$).

Die Expression von konstitutiv-aktivem Rac führt zu einer Umverteilung von GABA_AR- $\alpha 5$ bezüglich seiner synaptischen Lokalisation. Der synaptische Anteil des Rezeptors ist, ähnlich dem von Radixin, gegenüber der Kontrollsituation signifikant erhöht.

4. Diskussion

4.1 Identifikation neuer Bindepartner des GABA_A-Rezeptors

Die schnelle synaptische Inhibition wird im Gehirn vorwiegend von dem Neurotransmitter GABA vermittelt. GABA_A-Rezeptoren gehören zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle. Sie binden den Transmitter mit hoher Affinität und erhöhen daraufhin die Permeabilität der Membran für Cloridionen, was im adulten Gehirn zur Hyperpolarisierung der postsynaptischen Nervenzelle führt.

Für die Gewährleistung einer effizienten Signalübertragung ist es wesentlich, dass GABA_A-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran gebündelt lokalisiert sind. Bis heute sind keine Faktoren beschrieben worden, die direkt an GABA_A-Rezeptoren binden und für das „Clustering“ verantwortlich sind. Die Rolle des an inhibitorischen Synapsen vorkommenden Gerüstproteins Gephyrin in der Bündelung von GABA_A-Rezeptoren ist noch weitgehend unverstanden. Zwar führt ein Verlust von Gephyrin zum Verlust der Konzentrierung vieler GABA_A-Rezeptoren (Kneussel et al., 1999) und die $\alpha 2$ -Untereinheit und Gephyrin scheinen sich in ihrem „Clustering“ gegenseitig zu beeinflussen (Essrich et al., 1998), eine direkte Interaktion zwischen Gephyrin und dem Rezeptor wurde bislang aber nicht berichtet. Auch ist kein Molekül bekannt, das Gephyrin und den GABA_A-Rezeptor an inhibitorischen Synapsen miteinander verbindet. Überdies zeigen einige Untereinheiten des Rezeptors, insbesondere $\alpha 1$ und $\alpha 5$, ein von Gephyrin unabhängiges „Clustering“ (Kneussel et al., 2001), was auf weitere Interaktoren mit dem Rezeptor schließen lässt.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems systematisch nach neuen Interaktionspartnern für die $\alpha 1$ - und die $\alpha 5$ -Untereinheit des Rezeptors gesucht. Je einer der gefundenen Kandidaten, Muskelin und Radixin, wurde mit verschiedenen Methoden auf Bindung an die jeweilige Untereinheit des Rezeptors hin geprüft. Im Fall des GABA_AR- $\alpha 5$ -Bindeproteins Radixin gelang eine umfassende, funktionelle Charakterisierung dieser neu entdeckten Interaktion.

In den folgenden Kapiteln soll zunächst ein Überblick über die in den „Screens“ identifizierten Interaktoren gegeben werden, anschließend werden die für Muskelin und Radixin erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

4.1.1 Interaktionspartner von GABA_AR- α 1

Neben Muskelin wurden im „Screen“ weitere, putative Interaktionspartner identifiziert, die im Rahmen dieser Arbeit aber nicht genauer untersucht werden konnten. Unter den gefundenen Kandidaten waren in der Literatur wenig charakterisierte Proteine, wie ein Homologes zu HDR1, das selbst homolog zu einem GATA-Bindeprotein ist, und das Transitionsprotein PRM1. Zweimal wurde Rab11b identifiziert, das mit der intrazellulären Vesikelverschmelzung in Zusammenhang gebracht wird, einmal USP14. Als Mitglied der Familie von Ubiquitin-spezifischen Proteasen wird USP14 als Faktor gesehen, der Monoubiquitinierungen durch spezifische, proteolytische Aktivität an bestimmten Zielproteinen aufheben kann. Die Markierung von Proteinen mit einem einzigen Ubiquitin-Molekül führt nicht zum Abbau des Zielproteins, sondern bewirkt andere Signaleffekte. So ist zum Beispiel Mono-Ubiquitinierung von Transmembranproteinen als Signal für deren Endozytose aus der Plasmamembran beschrieben worden (zur Übersicht siehe Hicke und Dunn, 2003). Mäuse mit einer natürlich auftretenden Mutation, die zur Inaktivierung von USP14 führt, zeigen Bewegungsstörungen, weswegen diese Mutante den Namen *Ataxia* erhalten hat. Feinere Analysen dieses genetischen Modells haben gezeigt, dass die synaptische Übertragung im Gehirn der mutanten Tiere abnormale elektrophysiologische Charakteristika besitzt (Wilson et al., 2002). Über die Substratspezifität von USP14 ist bislang nichts bekannt, ebenso ist unklar, ob die Interaktion mit GABA_AR- α 1 einen Anteil bei der Ausbildung dieser Symptome hat.

4.1.2 Interaktionspartner von GABA_AR- α 5

Im „Screen“ nach Interaktionspartnern für die α 5-Untereinheit wurden einige Proteine identifiziert, die im Kontext des Zellkerns beschrieben worden sind. Neben einem wenig spezifizierten Transkriptionsregulator wurden auch eine Zinkfinger Helikase, RAPA2 (ein Faktor zur Regulation der Transkription), ein Interaktor für den Androgenrezeptor und der STAT-Inhibitor gefunden. Obwohl alle diese Proteine eine Rolle im Zellkern spielen, zeigten sie keine Autoaktivierung im Hefe-System. Die Gefahr, dass Artefakte vorliegen, ist vergleichsweise hoch, zumal die Bedingungen im eigentlichen „Screen“ und in den Testverfahren aus technischen Gründen nie vollkommen gleich sein können.

Das Protein SPARC ist ein sekretierter Faktor („*secreted protein rich in cysteine*“), dessen Funktion ungeklärt ist. Selbst wenn die Schleife des Rezeptors und SPARC eine hinreichende Affinität zueinander besitzen, um die Transkription der Reportergene im Hefe-System anzustellen, wird die Bindung im physiologischen Kontext nicht stattfinden, weil beide Partner in unterschiedlichen Kompartimenten exprimiert sind.

Das hypothetische Protein KIAA1784 ist noch vollkommen unbeschrieben.

4.2 Bindung von Muskelin an GABA_AR- α 1

Das Protein Muskelin wurde erstmals als intrazellulärer Faktor beschrieben, der bei der Signalübertragung von extrazellulärer Matrix zum Zytoskelett beteiligt ist (Adams et al., 1998). Muskelin wurde im Rahmen einer systematischen Suche nach Proteinen identifiziert, deren Expression als zelluläre Antwort auf Exposition zu Thrombospondin 1 verändert ist. Im menschlichen Genom kodiert nur ein einziges Gen für Muskelin. Es liegt auf Chromosom 7 im Armabschnitt q32. Im Genom von *Mus musculus* wurde das Muskelin-Gen auf Chromosom 6, Abschnitt B1/B2 lokalisiert (Adams und Zhang, 1999). Die Domänenstruktur von Muskelin ist weitgehend aufgeklärt. So besitzt es im C-Terminus eine β -Propeller-Domäne, die aus sechs hintereinander geschalteten „*Kelch-repeats*“ besteht, einem Strukturmotiv, das erstmals im *Drosophila melanogaster* Protein Kelch 1 beschrieben wurde (Xue und Cooley, 1993). Die

Funktion dieser charakteristischen Struktur ist nicht geklärt, es gibt allerdings Hinweise darauf, dass es als Modul für Protein-Protein-Interaktion oder als Aktin-Bindedomäne dienen kann (Robinson und Cooley, 1997). Der Befund, dass das Enzym Galaktose-Oxidase vieler Organismen ebenfalls über eine \square -Propeller-Domäne verfügt (Adams, 2002), hat zu der Spekulation geführt, dass diese evolutionär konservierte Domäne in Verbindung mit verschiedenen Proteinumgebungen unterschiedliche Funktionen ausüben kann. Eine \square -Propeller-Domäne wurde auch in dem Protein Lis 1 identifiziert (Hattori et al., 1994), dessen charakteristische Motive (LisH und C-terminal von LisH) auch im N-Terminus von Muskelin gefunden wurden.

Mutationen in Lis 1 tragen ursächlich zur Ausbildung der Miller-Dieker-Lissencephalie bei (zur Übersicht siehe Morris et al., 1998). In diesem Krankheitsbild kommt es zu Fehlbildungen des Gehirns, die zu geistiger Behinderung, Epilepsie und frühem Tod führen. Das Protein Lis 1 bindet an Mikrotubuli und an den zytoplasmatischen Dynein-Komplex (Sapir et al., 1997; Vallee et al., 2000), Andere Mikrotubuli-regulierende Proteine verfügen ebenfalls über das LisH-Motiv, so zum Beispiel die p60 Untereinheit des Katanin (Hartman et al., 1998). Es ist aber nicht bekannt, ob die Ausbildung des Krankheitsbildes mit der Mikrotubuli-Assoziation von Lis 1 zusammenhängt.

Muskelin wurde als Interaktionspartner des Prostaglandin EP3 Rezeptor identifiziert (Hasegawa et al., 2000). Es bindet spezifisch an den zytoplasmatischen C-Terminus dieses transmembranen, G-Protein gekoppelten Rezeptors und lokalisiert sowohl im Zytoplasma, als auch an der Plasmamembran in HEK293 Zellen. In dieser Studie wurde gezeigt, dass Muskelin die durch Applikation eines Agonisten induzierte Internalisierung des Rezeptors teilweise inhibiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde Muskelin als Interaktionspartner der \square 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors identifiziert. Diese Bindung wurde im Hefe-System charakterisiert, auf wenige Aminosäuren der zytoplasmatischen Schleife des Rezeptors eingeschränkt, und durch biochemische Experimente *in vitro* demonstriert (Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2). Es wurde ferner gezeigt, dass Muskelin und der Rezeptor als Proteine voller Länge im zellulären Kontext eines Neurons kolokalisieren und teilweise an Synapsen gefunden werden. Die beobachtete Konzentrierung der Immunreaktivität verschiedener, affinitätsmarkierter Formen von Muskelin

in Neuronen ist konsistent mit dem Befund, dass sich das Protein selbst binden kann (Prag et al., 2004). In dieser Studie wurde gezeigt, dass der N-Terminus und der C-Terminus miteinander interagieren können, gleichzeitig wurde festgestellt, dass Muskelin weder an Aktin, noch an Tubulin bindet. Die Aufgabe der konservierten β -Propeller-Domäne scheint im Muskelin daher im Bereich der Multimerisierung zu liegen. Eine mögliche Rolle des Muskelin beim „Clustering“ von $\alpha 1$ -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren wäre mit der Beobachtung, dass auch andere Bündelungsfaktoren in multimerer Form auftreten – so zum Beispiel Gephyrin (Sola et al., 2004) – konsistent.

Ein weiterer Aspekt könnte eine mögliche Regulation der Kerngängigkeit des Muskelins sein. So wurde es als Partner in einem ternären Komplex im Zellkern beschrieben (Umeda et al., 2003). Die N-terminale Hälfte des Muskelins wurde bei Expression in HEK293 Zellen ebenfalls im Kern beobachtet (Hasegawa et al., 2000), das volle Protein jedoch ist vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Möglicherweise nimmt die Assoziation mit der $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors auf die nukleäre Lokalisation von Muskelin regulierend Einfluss. Ähnliche Systeme, in denen Interaktoren von Transmembranproteinen in der Signaltransduktion von der Plasmamembran zum Zellkern eine Rolle spielen könnten, sind beschrieben worden. So bindet GRIP1 an den AMPA-Rezeptor (Dong et al., 1997) und wird im Zellkern gefunden, wo es gemeinsam mit DLX Homöobox-Proteinen die Transkription von Zielgenen anstellt (Yu et al., 2001). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass GRIP als Transkriptions-Koaktivator für DLX2- und DLX5-abhängige Gene fungieren kann, aber der genaue Mechanismus, der die Translokation von der Synapse in den Zellkern steuert, ist unbekannt. Es mehren sich Hinweise darauf, dass GRIP1 ein Botenmolekül in einem Signaltransduktionsweg von der Plasmamembran in den Zellkern darstellt. Ein ähnliches Szenario ist auch für Muskelin und den GABA_A-Rezeptor denkbar.

Die Assoziation von Muskelin mit dem GABA_A-Rezeptor könnte auch eine Rolle bei Prozessen des Transportes spielen. Die in dieser Arbeit gefundene, geringe synaptische Lokalisation des Muskelin/Rezeptor-Komplexes deutet darauf hin, dass die Assoziation auch außerhalb der Synapse, in anderen Zellkompartimenten, wichtig ist. Muskelin könnte eine Adapter-Funktion zukommen, um den Rezeptor mit anderen Proteinkomplexen – zum Beispiel molekularen Motoren – zu verbinden. Im Einklang mit dem Befund, dass Muskelin über das LisH- und das

CL-Motiv verfügt, ist die Vorstellung, dass es mit dem GABA_A-Rezeptor interagiert, während es mittels zytoplasmatischem Dynein entlang Mikrotubuli transportiert wird. Solch ein System ist für den NMDA-Rezeptor beschrieben worden, der durch die Adaptoren mLin-2, mLin-7 und mLin-10 an das neuronenspezifische Motorprotein KIF17 gekoppelt wird, das den vesikelständigen Rezeptor entlang Mikrotubuli transportiert (Setou et al., 2000).

Die Störung der Bindung zwischen Muskelin und der α 1-Untereinheit sollte Aufschluss über ihre mögliche Funktion geben. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Interaktion mit dem GABA_A-Rezeptor weitreichende Konsequenzen hat, die bis zu neuroprotektiven Wirkungen reichen. So wurde unter anderem Muskelin als eines der Proteine beschrieben, die binnen 24 Stunden nach ischämischer Präkonditionierung hochreguliert werden (Dhodda et al., 2004). Bei Ratten, die drei Tage nach einer solchen Präkonditionierung einem akuten Sauerstoffmangel durch vorübergehende Abschnürung der mittleren Cerebralarterie ausgesetzt waren, wurde im Vergleich zu nicht vorbehandelten Kontrolltieren eine signifikant erhöhte Überlebensrate festgestellt. Die Klärung der Frage, ob die Interaktion von Muskelin mit der α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors im Fall der epileptischen Symptome bei Miller-Dieker-Lissencephalie und bei der akuten Ischämie wichtig ist, wird maßgebend für das Verständnis der molekularen Prozesse in diesen Krankheitsbildern sein.

4.3 Bindung von Radixin an GABA_AR- α 5

Das Protein Radixin wurde erstmals als Aktin-Bindeprotein aus Rattenleber isoliert (Tsukita und Hieda, 1989). Später wurde es der Familie der ERM-Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin) zugerechnet, die sich durch große Homologien untereinander auszeichnen. Den ERM-Proteinen ist eine einzigartige Domäne gemein, die wegen ihres Vorkommens in dem Erythrozyten-Protein Bande 4.1 als FERM-Domäne bezeichnet wird („*four.one, ezrin, radixin, moesin*“; (Chishti et al., 1998). Die FERM-Domäne setzt sich aus drei globulären Lobi zusammen (F1, F2 und F3), die Homologien zu der Ras-Bindedomäne von Raf und zu Ubiquitin (F1), zum Acyl-CoenzymA-Bindeprotein (F2) und zu Pleckstrin Homologie-Domänen und Phosphotyrosin-Bindedomänen

(F3) besitzen und in einer dreigliedrigen Kleeblattstruktur organisiert sind (zur Übersicht siehe Bretscher et al., 2002).

Eine ebenfalls unter den ERM-Proteinen konservierte F-Aktin-Bindedomäne wurde zuerst in Ezrin beschrieben (Turunen et al., 1994) und vervollständigte die Ansicht, dass ERM-Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert sind.

Die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Interaktion von Radixin und GABA_AR- β 5 ist konsistent mit anderen Arbeiten zu Bindungen der ERM-Proteine an transmembrane Proteine. So wurde beispielsweise gezeigt, dass der Na⁺-H⁺-Austauscher NHE 1 an die drei ERM-Proteine binden kann (Denker et al., 2000). Überdies binden die drei ERM-Proteine an den Hyaluronat-Rezeptor CD44 (Tsukita et al., 1994). Interessanterweise sind in beiden Fällen juxtamembranäre, positiv geladene Aminosäurereste des Transmembranproteins für die Assoziation wichtig (Yonemura et al., 1998), im Fall von Radixin und GABA_AR- β 5 hingegen spielen dabei vor allem große, hydrophobe, sowie polare Reste eine Rolle, wie an der nicht bindende Gruppenmutante GABA_AR- β 5 (Y343A, F344A, T345A, W349A, W351A) zu erkennen ist.

Neben direkten Interaktionen mit Transmembranproteinen sind auch indirekte Wechselwirkungen beschrieben worden, die von akzessorischen Faktoren vermittelt werden. So werden die ERM-Proteine über den Adapter EBP50 (ERM-bindendes Phosphoprotein 50) mit dem Na⁺-H⁺-Austauscher NHE 3 verbunden (Yun et al., 1997).

Radixin ist als Bestandteil der Stereocilien im Innenohr beschrieben worden (Pataky et al., 2004) und Mäuse, bei denen Radixin genetisch inaktiviert wurde, sind taub (Kitajiri et al., 2004). Sie zeigen außerdem den Verlust des Multidrogen-Resistenz-Proteins Mrp2 in den Membranen der Gallengänge. Neben leichten Leberschäden haben die Mäuse aber keine auffälligen Beeinträchtigungen (Kikuchi et al., 2002). Andere Ansätze, in denen die Expression von ERM-Proteinen zum Beispiel durch die Verwendung von *antisense*-Oligonukleotiden unterdrückt wurde, haben gezeigt, dass Zelladhäsion und die Bildung von Mikrovilli auf die Präsenz eines der drei Proteine angewiesen sind (Takeuchi et al., 1994). Eine strenge Trennung der Aufgaben der ERM-Proteine gelang in dieser Studie nicht, da manche Funktionen eines der ERM-Proteine in diesem System teilweise von einem anderen übernommen werden konnten. Ein ähnlicher Ansatz zeigte in Neuronen, dass die gleichzeitige Unterdrückung von Radixin und Moesin die

Morphologie und die Beweglichkeit von Wachstumskegeln verändert (Paglini et al., 1998). Diese Effekte wurden nicht beobachtet, wenn simultan Radixin und Ezrin oder Ezrin und Moesin herunterreguliert wurden. Das Modell der genetischen Moesin-Inaktivierung hat gezeigt, dass die mutanten Mäuse über unbeeinträchtigte Zelladhäsion, unveränderte Entwicklung, Zellbeweglichkeit und ein normales Aktin-Zytoskelett verfügen, was einen weiteren Hinweis auf teilweise funktionelle Redundanz innerhalb der Familie der ERM-Proteine darstellt (Doi et al., 1999). Die selbe Studie hat allerdings auch demonstriert, dass beim Verlust von Moesin die Transkription der Gene für Radixin und Ezrin nicht hochreguliert wird. Eine genetische Interaktion der ERM-Proteine ist bislang nicht berichtet worden.

Der Befund der vorliegenden Arbeit, dass der GABA_A-Rezeptor in Neuronen in hohem Maß mit Radixin und nicht mit Ezrin oder Moesin kolokalisiert (Abschnitt 3.5.2), spricht dafür, dass die Verbindung der α 5-Untereinheit mit dem Aktin-Zytoskelett in einem zellulären Kontext nur von Radixin bewerkstelligt wird. Biochemische Analysen haben aber im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass alle drei ERM-Proteine das Potential zur Bindung an die zytoplasmatische Schleife des Rezeptors bergen. Es ist daher nicht absehbar, welche Ergebnisse die Untersuchung Radixin-depletierter Mäuse in Bezug auf den GABA_A-Rezeptor liefern würde.

Die Aktivität der ERM-Proteine ist über Konformationsänderungen reguliert (zur Übersicht siehe Bretscher et al., 2002). Für Ezrin, den am besten untersuchten Vertreter der drei Proteine, wurde zuerst gezeigt, dass der N-Terminus durch intramolekulare Assoziation den C-Terminus binden kann und auf diese Weise die dort befindliche F-Aktin-Bindedomäne maskiert (Gary und Bretscher, 1995). Die Aktivierung der ERM-Proteine ist ein mehrstufiger Prozess, in dem die Bindung an Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP₂) und die Phosphorylierung am C-Terminus nacheinander wirken (Fievet et al., 2004). Röntgenstrukturanalysen von Kristallen der FERM-Domäne von Radixin haben gezeigt, dass sich die Konformation des Moleküls durch die Bindung an das PIP₂-Analogon Inositoltriphosphat (IP₃) verändert (Hamada et al., 2000). Eine Gruppenmutation in der FERM-Domäne des Ezrin unterdrückt die PIP₂-Assoziation und dadurch die Anlagerung des Moleküls an die Plasmamembran (Barret et al., 2000). Der Befund, dass derart verändertes Ezrin nicht mehr phosphoryliert wird, hat der Annahme Vorschub geleistet,

dass die Assoziation mit PIP₂ eine Voraussetzung für die nachfolgende Phosphorylierung darstellt, die ihrerseits durch sterische und elektrostatische Kräfte zur Öffnung der intramolekularen Bindung und damit zur Exposition der F-Aktin-Bindedomäne führt (Simons et al., 1998). In der Folge wurde sowohl für Moesin (Huang et al., 1999), als auch für Radixin (Ishikawa et al., 2001) gezeigt, dass die Phosphorylierung des konservierten Threonin-Restes im C-Terminus zur Bindung an F-Aktin, beziehungsweise zur Öffnung des Moleküls führt. Weitere Hinweise darauf, dass die Aktivierung der ERM-Proteine ein komplexer, vielstufiger Prozess ist, lieferte eine Studie, in der an Ezrin gezeigt wurde, dass selbst die am C-Terminus phosphorylierte Form nicht voll aktiv ist (Chambers und Bretscher, 2005) und dass weitere, bislang unbeschriebene Mechanismen bei der Aktivierung existieren müssen.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Lokalisation von Radixin an der Plasmamembran ist konsistent mit den Beschreibungen in der Literatur. Die Untersuchung von Radixin in HEK293 Zellen gibt Hinweise darauf, dass Radixin in diesem System mit der Membran assoziiert. Es bleibt aber fraglich, ob auch tatsächlich eine Phosphorylierung am C-Terminus stattfindet, zumal nicht-mutiertes Radixin aus HEK293 Zellen nicht in der Lage ist, *in vitro* an die Schleife des Rezeptors zu binden, konstitutiv aktives Radixin aus HEK293 Zellen hingegen schon.

Gemeinsam mit der Beobachtung, dass nur aktives Radixin an GABA_AR- α 5 binden kann und dass die Mehrheit der Radixin-Punkte in Neuronen mit dem Rezeptor assoziiert ist (63% \pm 5,9%), lässt die nahezu vollständige Kolo-kalisation mit F-Aktin in Neuronen darauf schließen, dass in diesem zellulären Kontext ein Großteil der Moleküle in der geöffneten Form vorliegt, in der die F-Aktin-Bindedomäne exponiert ist. Die ausschließlich zytoplasmatische Verteilung der nicht aktivierbaren Gruppenmutante entspricht dem Verhalten der analogen Gruppenmutante in Ezrin (Barret et al., 2000). Während in dieser Arbeit beobachtet wurde, dass die Interaktion des mutanten Ezrin mit dem zytoplasmatischen C-Terminus von CD44 *in vitro* nicht beeinträchtigt war, hat eine andere Studie demonstriert, dass die Bindung von Ezrin an EBP50 nur in der geöffneten Konformation stattfinden kann, weil die Bindestelle im inaktiven Zustand durch den C-Terminus maskiert ist (Reczek et al., 1997). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Abhängigkeit der Interaktion mit GABA_AR- α 5 vom Aktivierungszustand des Radixins lässt

darauf schließen, dass die Bindestelle für den Rezeptor im inaktiven Molekül ebenfalls maskiert ist.

Die Untersuchung der synaptischen Verteilung von Radixin mit Hilfe verschiedener Marker hat gezeigt, dass es vorwiegend extrasynaptisch lokalisiert ist, zu einem geringen Prozentsatz aber auch an inhibitorischen Synapsen gefunden wird. Es wurde in dieser Arbeit ebenfalls demonstriert, dass die Assoziation mit GABA_AR- α 5 hauptsächlich in extrasynaptischen Membrankompartimenten stattfindet, dass aber auch Radixin/GABA_AR- α 5-„Cocluster“ an Synapsen vorkommen. Besonderes Gewicht fällt dieser Beobachtung zu, da die synaptische Verteilung von Radixin vom Aktivierungszustand des Moleküls abhängig ist. Die phosphomimetische Mutante ist signifikant weniger synaptisch lokalisiert als nicht-mutiertes Radixin. Da die Phosphorylierung zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen synaptischer und extrasynaptischer Lokalisation von Radixin führt, muss es eine Zwischenstufe der Radixin-Aktivierung geben, die gleichzeitig die Bindung an GABA_AR- α 5 und den Verbleib an der Synapse ermöglicht. Eine Feinanalyse des mehrstufigen Aktivierungsprozesses könnte durch weiterführende Mutationsstudien gelingen, in denen mehr als die beiden in dieser Arbeit verwendeten Mutanten als Modelle für unterschiedliche Aktivierungsstufen des Moleküls identifiziert und charakterisiert werden müssten.

4.4 Funktion der Radixin/GABA_AR- α 5-Bindung

Um Hinweise auf die Funktion der gefundenen Interaktion zu bekommen, wurde in dieser Arbeit durch drei verschiedene Ansätze versucht, die Bindung zwischen Radixin und dem Rezeptor, beziehungsweise die Verankerung des Rezeptors mit dem Zytoskelett zu stören. Die Applikation von *antisense*-Oligonukleotiden führt in Neuronen binnen 24 Stunden zum fast vollständigen Verlust von Radixin (Paglini et al., 1998). In der hier vorliegenden Arbeit wurden die gleichen Oligonukleotide verwendet und in hippokampale Neuronen mikroinjiziert. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass es in mikroinjizierten Zellen zu drastischen Einbußen der Immun-

reaktivität von GABA_AR- α 5 kam. Die verbleibenden, detektierbaren Rezeptoren waren nicht mehr in „Clustern“ organisiert, sondern zeigten vorwiegend diffuse Immunreaktivitäten. Bei der Kontrollinjektion von *sense*-Oligonukleotiden wurde dieser Effekt nicht beobachtet (Abschnitt 3.6.1). Diese Daten weisen darauf hin, dass Radixin einen „Clustering“-Faktor für GABA_A-Rezeptoren darstellt, die die α 5-Untereinheit tragen. Die wenigen in Abwesenheit von Radixin verbleibenden „Cluster“ können darauf zurückzuführen sein, dass in einigen Rezeptoren die α 5-Untereinheit gemeinsam mit der α 2-Untereinheit im Pentamer organisiert ist und dass die α 2-Untereinheit den Kontakt zum Gerüstprotein Gephyrin herstellt. Einen Hinweis für die Existenz dieser Kombination liefert die Kolo-kalisation von GABA_AR- α 5 mit Gephyrin in dieser Arbeit. In der Literatur sind ebenfalls Kombinationen des Rezeptors beschrieben worden, die sowohl die α 5-, als auch die α 2-Untereinheit tragen (McKernan und Whiting, 1996).

Auch der Befund, dass die Gruppenmutante GABA_AR- α 5 (Y343A, F344A, T345A, W349A, W351A), die nicht mehr an Radixin binden kann, in hippokampalen Neuronen ein stark beeinträchtigtes „Clustering“ zeigt, weist auf eine Funktion von Radixin in der Bündelung des Rezeptors hin. Da die mutanten Rezeptoren an der Zelloberfläche detektiert werden können, ist ausgeschlossen, dass die Bindung an Radixin für die Oberflächenexpression des Rezeptors essentiell ist. Eine mögliche Internalisierung des lateral diffundierenden Rezeptors kann nicht ausgeschlossen werden und müsste durch elektrophysiologische Ableitungen überprüft werden. Verbleibende, punktförmige Immunreaktivität dieser Gruppenmutante kann aus der Assoziation mit dem Gephyrin-Gerüst resultieren, oder durch das Vorkommen zweier α 5-Untereinheiten verursacht sein. Es ist denkbar, dass in diesem Fall ein pentamerer Rezeptor detektiert wurde, der zwar die myc-markierte, gruppenmutierte α 5-Untereinheit trug, gleichzeitig aber durch eine zweite, endogene α 5-Untereinheit an Radixin gebunden war.

Die Vorstellung, dass Radixin die Funktion eines „Clustering“-Faktors übernehmen könnte, ist konsistent mit Daten, die belegen, dass die ERM-Proteine in der Lage sind, Homo- und Heterodimere, sowie Homo-Oligomere auszubilden. Die Stöchiometrie der Radixin/GABA_AR- α 5-Bindung ist nicht bekannt, aber für das „Clustering“ des Rezeptors ist es notwendig, dass eine gewisse Zahl an Molekülen am selben Ort mit dem Zytoskelett verankert wird. Die Suche nach Bindepartnern von Radixin mittels Affinitätschromatographie hat neben dem Protein Bande

4.1 auch Radixin selbst als Bindepartner identifiziert (Magendantz et al., 1995). Die Studie hat demonstriert, dass neben einer *cis*-Bindung von N- und C-terminaler Domäne auch eine *trans*-Bindung und damit theoretisch die Ausbildung von Filamenten durch eine Kopf-Schwanz-Anordnung möglich ist. Auch für Ezrin und Merlin, ein verwandtes Protein, sind Homodimeren beschrieben worden (Gronholm et al., 1999). Die selbe Studie hat auch Ezrin/Merlin-Heterodimeren beobachtet. Heterotypische Assoziation ist auch für Ezrin und Moesin gezeigt worden (Gary und Bretscher, 1993). Eine Bindung von Ezrin an Radixin ist unter bestimmten Bedingungen ebenfalls beobachtet worden (Andreoli et al., 1994). Klare Hinweise auf einen homooligomeren Zustand eines ERM-Proteins kamen von einer Studie, in der Ezrin als einer der Hauptbestandteile der Mikrovilli in der Plazenta beschrieben und zum Teil als stabiles Multimer isoliert wurde (Berryman et al., 1995). Weitere Aspekte einer möglichen Selbstassoziation der ERM-Proteine ergeben sich aus Beobachtungen von Tyrosin-Phosphorylierungen. So wurde gezeigt, dass Moesin in Blutplättchen nach Stimulation mit Arachidonsäure an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Meyer et al., 1998). Tyrosinphosphorylierungen sind auch für Ezrin bekannt und es wurde demonstriert, dass der Mikroorganismus *Helicobacter pylori* zur Dephosphorylierung an Tyrosinen in Ezrin führt (Selbach et al., 2004). Der F3-Lobus der ERM-Proteine besitzt Homologien zu Phosphotyrosin-Bindeproteinen (zur Übersicht siehe Bretscher et al., 2002). Es ist nicht ausgeschlossen, dass die FERM-Domäne auch in der Lage ist, an Phosphotyrosine zu binden. Durch den Befund, dass ERM-Proteine an Tyrosin phosphoryliert werden können, eröffnet sich neben der Kopf-Schwanz-Oligomerisierung auch die Möglichkeit einer lateralen Assoziation von Radixin.

Da gezeigt wurde, dass Radixin durch seine C-terminale Domäne an F-Aktin binden kann (Simons et al., 1998) und die Bindestelle für GABA_AR- α 5 im inaktiven Molekül durch die Assoziation mit dieser Domäne maskiert ist, wurde ein verkürztes Radixin in Neuronen überexprimiert, bei dem die C-terminale Domäne durch GFP ersetzt wurde (Abschnitt 3.6.2). Dieses Molekül sollte wegen der fehlenden Maskierung in der Lage sein, GABA_AR- α 5 zu binden, eine Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett kann aber nicht stattfinden. Der Rezeptor wird somit von der intakten, endogenen Radixin-Verankerung abgeschirmt. Das überexprimierte

Radixin (1-468)-GFP war vornehmlich zytoplasmatisch verteilt, nur in Ausnahmefällen wurde bei besonders starker Überexpression eine teilweise Assoziation mit der Plasmamembran beobachtet. Diese Verteilung entsprach den Beobachtungen bei der Charakterisierung eines ähnlichen Konstruktes in der Literatur (Henry et al., 1995).

Die Immunreaktivität des GABA_AR- α 5 war in Zellen, die das verkürzte Radixin exprimierten, ähnlich reduziert wie im *antisense*-Experiment. Der Rezeptor trat weniger stark gebündelt auf und die verbliebenen „Cluster“ waren von geringerer Intensität als in nicht-behandelten Kontrollzellen. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die von Radixin vermittelte Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett für das „Clustering“ des Rezeptors wichtig ist. Die Annahme wird weiter von der Beobachtung gestützt, dass Radixin in Neuronen vorwiegend sowohl mit F-Aktin, als auch mit GABA_AR- α 5 kolokalisiert.

4.5 Einfluss von GTPasen der Rho-Familie

Rho-Proteine gehören zu der Familie der monomeren GTPasen und sind in einer Vielzahl von zellulären Prozessen steuernd beteiligt. Die Auswirkungen der Aktivität von Rho, Rac und Cdc42 auf das Aktinzytoskelett sind besonders gut untersucht. So führt Rho-Aktivität zur Ausbildung von starken F-Aktin-Fibrillen, sogenannten „stressfibers“, Rac reguliert die Lamellipodia und Cdc42 kontrolliert die Bildung von Filopodien und „microspikes“, kleinen nadelförmigen Erhebungen in der Plasmamembran (zur Übersicht siehe Hall, 1992).

Der Einfluss von Rho auf den Aktivierungszustand der ERM-Proteine ist in einigen Fällen beschrieben worden. So führte die Mikroinjektion des C3-Toxins aus *Clostridium botulinum* zur einer Umverteilung der ERM-Proteine in MDCK-Zellen („*Madin Darby Canine Kidney*“, Epithelzellen aus Hundenieren). Das C3-Toxin ist ein Exoenzym, das die ADP-Ribosylierung von Rho katalysiert und die GTPase dadurch irreversibel hemmt. Die Inhibition von Rho führte in dieser Studie dazu, dass die Assoziation der ERM-Proteine mit F-Aktin-Bündeln in der Peripherie der Zelle und am Zellkortex unterdrückt wurde (Kotani et al., 1997).

Eine andere Untersuchung hat ebenfalls gezeigt, dass die Inaktivierung von Rho die Inaktivierung der ERM-Proteine nach sich ziehen kann. Die Applikation des C3-Toxins führte

hier zu einer drastischen Abnahme des am C-Terminus phosphorylierten Anteiles der ERM-Proteine (Yonemura et al., 2002). Durch die Inaktivierung von Rho verließen die ERM-Proteine in Folge ihrer eigenen Inaktivierung die Plasmamembran und lokalisierten vornehmlich im Zytosol. Auch die Zahl der Mikrovilli nahm drastisch ab. Die selbe Studie hat aber auch Hinweise darauf geliefert, dass es Rho-unabhängige Mechanismen der ERM-Aktivierung geben muss.

Die molekularen Mechanismen, durch die Rho Einfluss auf den Aktivitätszustand der ERM-Proteine nimmt, sind nur in Anfängen aufgeklärt. So konnte gezeigt werden, dass Rho-Kinase (ROCK), ein nachgeschaltetes Enzym im Rho-Signalweg, die drei ERM-Proteine *in vitro* an dem konservierten, C-terminalen Threoninrest phosphorylieren kann (Matsui et al., 1998). *In vivo* wird die Phosphorylierung der ERM-Proteine durch konstitutiv aktives Rho stark erhöht, kann aber durch spezifische Inhibitoren der nachgeschalteten ROCK-Kinase nicht inhibiert werden (Matsui et al., 1999). Schließlich gibt es Hinweise darauf, dass auch die ERM-Proteine Einfluss auf Rho nehmen können. So binden die ERM-Proteine in ihrer aktiven Form den Rho GTPase Dissoziationsinhibitor RhoGDI, einen Faktor, der die Aktivität von Rho negativ beeinflusst. Indem aktive ERM-Proteine diesen Faktor binden und aus dem Gleichgewicht mit Rho entziehen, wird die Aktivierung von Rho direkt gefördert (Takahashi et al., 1997). Auf diese Weise scheinen Rho und die ERM-Proteine in ihrer Regulation einem positiven *feedback* zu unterliegen.

Der Befund der vorliegenden Arbeit, dass Radixin in der phosphomimetischen Form signifikant weniger synaptisch lokalisiert ist und die Tatsache, dass die Applikation einer dominant-negativen Rho-Mutante zu erhöhter synaptischer Lokalisation von Radixin führt, gehen mit der Ansicht konform, dass die Inaktivierung von Rho eine Inaktivierung der ERM-Proteine nach sich zieht. Im vorliegenden Fall ist keine Umverteilung von Radixin ins Zytoplasma beobachtet worden, was darauf schließen lässt, dass die Inaktivierung nicht vollständig abläuft, sondern nur bis zur Stufe des bereits postulierten Aktivierungs-Intermediates (Abschnitt 4.3) voranschreitet. Auch die Beobachtung, dass Rho und andere kleine GTPasen in verschiedenen Neuronen exprimiert werden (Olenik et al., 1997) und in Dendriten vorkommen (Hashimoto et al., 1999)

stützt die Ansicht, dass die Regulation der Aktivität von Radixin durch Rho-abhängige Prozesse gesteuert sein könnte.

Ogleich eine hierarchische Ordnung innerhalb der Familie der kleinen GTPasen beschrieben worden ist, in der Cdc42 das Protein Rac aktiviert und aktives Rac wiederum Rho anschaltet (Hall, 1998), mehren sich die Hinweise darauf, dass Rho und Rac auch direkt antagonistisch wirken können. So fördern Cdc42 und Rac Prozesse, die zur Ausbildung protrusiver Ausläufer in Fibroblasten führen, während Rho ein Zurückziehen dieser Ausläufer induziert (Sanders et al., 1999). Bei der Regulation der Morphologie von dendritischen Dornen sind Rho und Rac ebenfalls als Antagonisten beschrieben worden (Tashiro et al., 2000). Die Autoren zeigten, dass Rac die Bildung von dendritischen Dornen fördert, während Rho sie unterdrückt. Die auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten dominant-negativen, beziehungsweise konstitutiv aktiven Mutanten von Rho und Rac haben an der Aufklärung der antagonistischen Effekte großen Anteil gehabt. Auch bei der Ausbildung von Neuriten ist berichtet worden, dass Rho und Rac gegensätzlich wirken und dass Rho die Aktivierung von Rac durch ROCK-Kinasen verhindern kann (Yamaguchi et al., 2001).

Der hier beobachtete Befund, dass Radixin sowohl durch die Inaktivierung von Rho, als auch durch die Aktivierung von Rac vermehrt synaptisch lokalisiert, ist im Einklang mit der Ansicht, dass Rho und Rac antagonistische Effekte ausüben können.

Der Einfluss von GTPasen der Rho-Familie auf GABA_A-Rezeptoren ist weniger gut untersucht. Hinweise darauf, dass Rac1 eine steuernde Rolle in der Regulation der Funktion von GABA_A-Rezeptoren übernimmt, kamen von einer Studie, die sich mit dem Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die Aktivität des Rezeptors beschäftigte (Meyer et al., 2000). In der Arbeit wurde demonstriert, dass die Applikation des Agonisten Muscimol zu einer nachhaltigen Reduktion der GABAergen Ströme führt, wenn entweder die Integrität des Aktin-Zytoskeletts oder die Aktivität von Rac1 beeinträchtigt wurde.

Beide Effekte wurden durch die Anwendung spezifischer Toxine erzielt, die die ADP-Ribosylierung von globulärem Aktin (Toxin C2 aus *Clostridium botulinum*) oder Rac1 und Cdc42 (lethales Toxin aus *Clostridium sordellii*) katalysieren. Die Autoren beobachteten in beiden Fällen eine Abnahme der Muscimol-induzierten Ströme und schlossen daraus, dass sowohl die

Integrität des Aktin-Zytoskeletts als auch die Aktivität von Rac1 oder Cdc42 für die Funktion von GABA_A-Rezeptoren wichtig sind. Die Effekte wurden allerdings nur beobachtet, wenn die Neuronen repetitiv mit Muscimol stimuliert wurden. Da bekannt ist, dass GABA_A-Rezeptoren nach repetitiver Stimulation durch Endozytose aus der Plasmamembran entfernt werden (Tehrani und Barnes, 1991), untersuchten die Autoren, ob die Abnahme der Ströme mit einer Abnahme der Oberflächenexpression des Rezeptors korreliert. Es zeigte sich, dass die Inaktivierung von Rac1 oder Cdc42 durch das lethale Toxin bei repetitiver Stimulation mit Muscimol die Abnahme von oberflächenständigen Rezeptoren verstärkte. Eine Veränderung der Anzahl von GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche wurde bei Inaktivierung von Rac1 oder Cdc42 ohne repetitive Stimulation aber nicht beobachtet. Da sich die hier angewendete Technik der Ganzzell-Stromableitung nicht zur Unterscheidung von Strömen eignet, die von synaptischen oder von extrasynaptischen Rezeptoren vermittelt werden, bleibt die Frage nach einer lateralen Verschiebung des Rezeptors unbeantwortet. Die von Meyer et al. beobachteten Effekte können allerdings nur bedingt zu der hier aufgeworfenen Fragestellung in Bezug gesetzt werden, da bei der Anwendung des lethalen Toxins neben Rac1 auch Cdc42 inhibiert wird und eine ursächliche Zuordnung des erzielten Effektes nicht möglich ist. Außerdem wurde in den Immunfärbungen mit der α 2-, und nicht mit der α 5-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors gearbeitet, was einen Vergleich zusätzlich erschwert.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Rekrutierung von GABA_A-Rezeptoren in die Synapse durch Aktivierung der GTPase Rac ist ein neuer Befund. Es ist wahrscheinlich, dass bei der Verschiebung des Rezeptors das Protein Radixin maßgeblich beteiligt ist, da auch Radixin nach Behandlung mit Rac erhöhte synaptische Lokalisation zeigt und gleichzeitig für die Bündelung von α 5-enhaltenden GABA_A-Rezeptoren und ihre Verankerung am Aktin-Zytoskelett verantwortlich ist.

4.6 Modell der synaptischen Aktivierung

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse können gemeinsam mit den in der Literatur beschriebenen Daten zu einem Modell zusammengefügt werden.

GABA_A-Rezeptoren, die die β 5-Untereinheit tragen, werden durch direkte Bindung von Radixin gebündelt und mit dem Zytoskelett verankert. Die Bindung von Radixin an GABA_AR- β 5 ist vom Aktivierungszustand des ERM-Proteins abhängig. Im inaktiven Zustand liegt das Molekül im Zytoplasma vor und die C-terminale F-Aktin-Bindedomäne ist von Teilen der FERM-Domäne maskiert, umgekehrt wird die Bindestelle für GABA_AR- β 5 wahrscheinlich vom C-Terminus bedeckt. Die Aktivierung von Radixin ist ein mehrstufiger Prozess, in dem sowohl die Bindung an PIP₂, als auch Phosphorylierung am C-Terminus eine wichtige Rolle spielen (siehe Abbildung 4.1). Die PIP₂-Bindung stellt eine Voraussetzung für die Phosphorylierung an Threonin 564 dar. Durch die Einführung der negativen Ladung öffnet sich die intramolekulare Bindung von Radixin und die Assoziation mit F-Aktin geschieht. Auf diese Weise wird der Rezeptor in der Plasmamembran mit dem Zytoskelett verbunden.

Der überwiegende Teil der Radixin/GABA_AR- β 5-„Cocluster“ ist extrasynaptisch lokalisiert. Das Verhältnis von extrasynaptischem zu synaptischem Rezeptor kann durch die Aktivität von kleinen GTPasen der Rho-Familie verschoben werden. Auf diese Weise kann der Anteil von synaptischem Rezeptor ungefähr verdoppelt werden. Die hier gefundenen Ergebnisse deuten erstmals darauf hin, dass neben der lateralen Diffusion von einzelnen Rezeptoren in der postsynaptischen Membran auch bereits gebündelte Aggregate gemeinsam mit dem „Clustering“-Faktor Radixin in die Synapse gelangen könnten. Die molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung von Rac und damit zur Einflussnahme auf Radixin führen, sind bislang unbekannt. Weitere Experimente müssen klären, ob die laterale Verschiebung von β 5-enthaltenden GABA_A-Rezeptoren zur Synapse durch den aktiven Transport von Rezeptor-Bündeln erfolgt.

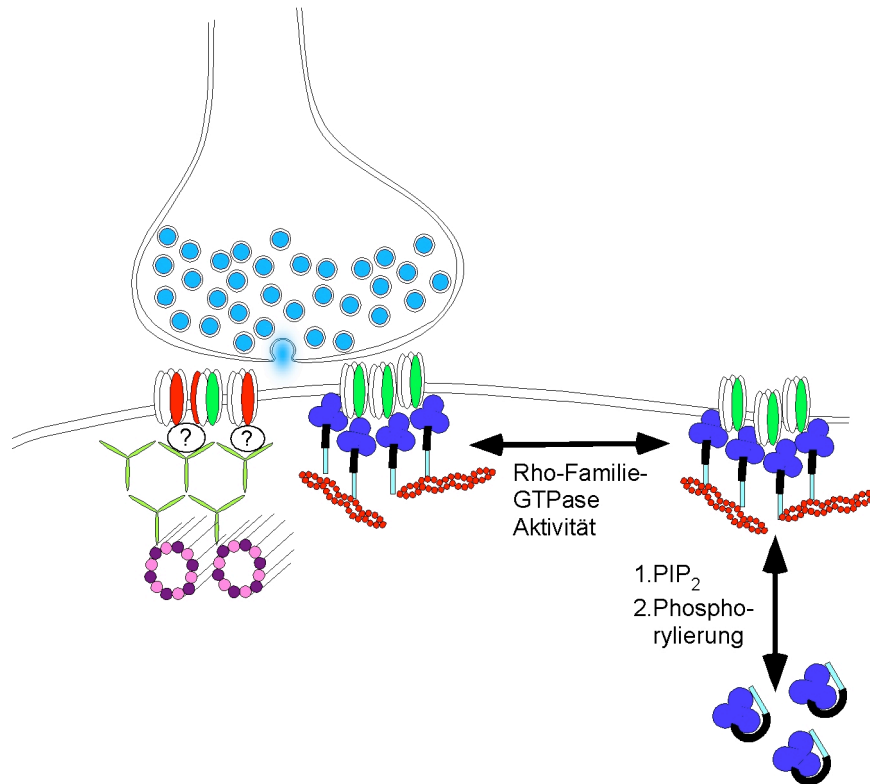


Abbildung 4.1: Modell der synaptischen Aktivierung.

Im inaktiven Zustand liegt Radixin im Zytoplasma vor und die F-Aktin Bindedomäne ist durch intramolekulare Interaktion maskiert. In einem stufenartigen Prozess wird das Molekül aktiviert. Dabei spielt die Bindung an PIP₂ eine initiiierende Rolle und stellt eine Voraussetzung für eventuelle weitere Aktivierungen dar. Phosphorylierung an Threonin 564 führt schließlich zum Öffnen des Moleküls und damit zur Freigabe der F-Aktin Bindedomäne. Im phosphorylierten Zustand kann Radixin auch an GABA_AR- α 5 binden und aufgrund seiner Fähigkeit zur Selbstassoziation den Rezeptor in extrasynaptischen Spezialisierungen bündeln. Die Aktivität von GTPasen der Rho-Familie führt zur lateralen Verschiebung von sowohl Radixin als auch GABA_AR- α 5 in die Synapse hinein, beziehungsweise aus ihr heraus.

Unabhängig vom Radixin-System existiert die Verankerung über Gephyrin an der Synapse. Die pentameren GABA_A-Rezeptoren binden über bislang unbekannte Faktoren an Gephyrin, das ein hexagonales Gitter ausbildet und möglicherweise an Mikrotubuli bindet. Je nach Zusammensetzung des Pentamers werden α 5-Untereinheiten gemeinsam mit Radixin oder mit Gephyrin, nicht aber mit beiden, beobachtet.

Die Verankerung durch Radixin ist unabhängig vom Gephyrin-System, wo GABA_A-Rezeptoren über unbekannte Faktoren mit einem Gerüst von Gephyrin assoziiert sind, das wahrscheinlich an Mikrotubuli bindet (Kirsch et al., 1991) und indirekt mit F-Aktin verbunden ist (Giesemann et al., 2003). Durch die Möglichkeit, pentamere Rezeptoren aus Kombinationen verschiedener Untereinheiten zu assemblieren, kommt auch GABA_AR- α 5 im Gephyrin-System vor.

Eine genaue Analyse der pentameren Zusammensetzung des Rezeptors könnte die Frage klären, ob GABA_AR- α 5 und eine andere Untereinheit bezüglich der Zuordnung zum Radixin- oder Gephyrin-System miteinander konkurrieren und ob dabei dominante Effekte auftreten würden.

Das in dieser Arbeit entstandene Modell stellt eine erweiterte Möglichkeit zur Regulation synaptischer Plastizität an postsynaptischen Membranspezialisierungen dar.

5. Anhang

5.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung	HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
ATP	Adenosintriphosphat	HRP	„ <i>Horseradish Peroxidase</i> “
bp	Basenpaare	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
BSA	Rinderserumalbumin („ <i>bovine serum albumine</i> “)	kDa	Kilo Dalton
cDNA	Komplementäre DNA („ <i>complementary DNA</i> “)	min	Minute
cfu	„ <i>Colony forming unit</i> “	OD	Optische Dichte
CY2	Carbocyanin	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
CY3	Indocarbocyanin	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („ <i>Phosphate buffered saline</i> “)
CY5	Indodicarbocyanin	PCR	Polymerasekettenreaktion („ <i>Polymerase chain reaction</i> “)
DMSO	Dimethylsulfoxid	PSD	Postsynaptische Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PTO	Phosphorothioate
DNase	Desoxyribonuklease	PVDF	Polyvinylidendifluorid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	rpm	Umdrehungen pro Minute („ <i>revolutions per minute</i> “)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat („ <i>Sodium dodecyl sulfate</i> “)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	sec	Sekunde
EGFP	„ <i>Enhanced green fluorescent protein</i> “	TE	Tris-EDTA
ER	Endoplasmatisches Reticulum	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
g	Erdbeschleunigungskonstante	VIAAT	Vesikulärer inhibitorischer Aminosäuretransporter
GABA	γ -amino-Buttersäure	v/v	Volumenprozent
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor („ <i>Guanine nucleotide exchange factor</i> “)	w/v	Gewichtprozent
GST	Glutathion-S-Transferase	X-Gal	(5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl)- β -D-Galactosid
GTP	Guanosintriphosphat	YFP	gelb fluoreszierendes Protein („ <i>yellow fluorescent protein</i> “)
HA	Hämagglutinin		
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung („ <i>BES-buffered saline</i> “)		
HEK	„ <i>Human embryonic kidney</i> “		

5.2 verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'	Verwendung
SL-GABA-A1-PCR-loop-1s	AAAGAATTCAACTATTTACCA AGAGAGGGTATGC	Klonierung der intrazellulären Schleife von GABA _A R- \square 1 in pGilda und pGEX-5X1
SL-GABA-A1-PCR-loop-2as	TGCAGTCGACTCATCGGTTCGATT TTGCTGACGCTGT	
SL-GABA-A5-PCR-loop-1s	AAAGAATTCAACTACTTTACAA AGAGAGGATGGGC	Klonierung der intrazellulären Schleife von GABA _A R- \square 5 in pGilda und pGEX-5X1
SL-GABA-A5-PCR-loop-2as	TGCAGTCGACTCATTTGTTCGATC TTGCTGATGCTGT	
SL-GABA-A1-PCR-KOZAK-1s	ccgGAATTCgCCACCatgaagaaagtcg gggtctctctg	Klonierung von GABA _A R- \square 1 in pBK-CMV
SL-GABA-A1-PCR-3as	atagttaGCGGCCGctgatggggtgtggg	
SL-myc-Hind-1s	AGCTTatggagcagaagctgatctccgaggag gacctgA	Einführung einer myc-Markierung am N-Terminus von GABA _A R- \square 1
SL-myc-Hind-2as	AGCTTcaggtctctctcggagatcagcttctgct ccatA	
SL-GABA-A5-PCR-1s	aaaaCTGCAGGCCACCatggacaatgga atgctctc	Klonierung von GABA _A R- \square 5 in pBK-CMV
SL-GABA-A5-PCR-2as	tccgCTCGAGttactttggagaggtagcc	
SL-myc-BglII-1s	GATCTatggagcagaagctgatctccgaggag gacctgA	Einführung einer myc-Markierung am N-Terminus von GABA _A R- \square 5
SL-myc-BglII-2as	GATCTcaggtctctctcggagatcagcttctgct ccatA	
SL-HAtag-BglII-1s	GATCTtaccatacagatgttccagattaccgtA	Einführung einer HA-Markierung am N-Terminus von GABA _A R- \square 5
SL-HAtag-BglII-2as	GATCTagcgtaatctggaacatcgtatgggtaA	
SL-Radixin-PCR-4s	acgcGGATCCGCCACCatgccgaagcca atcaatgtaagag	Klonierung von Radixin in pBK-CMV
MK-Radixin-PCR-2-as	acgcGTCGACTcacatggcttcaaactcatcga t	
SL-Radixin-PCR-5s	atcgCTCGAGCCACCatgccgaagccaat caatg	Klonierung von Radixin in pEGFP-N2
SL-Radixin-PCR-6as	gtcaGGTACCGcatggcttcaaactcatcg	
SL-myc-Not-1s	GGCCGCAatggagcagaagctgatctccgag gaggacctgTGAGC	
SL-myc-Not-2as	GGCCGCTCAcaggtctctctcggagatcag cttctgctccatTGC	Einführung einer myc-Markierung am C-Terminus von Radixin
PTO-Rad-1as	TCTTACATTGATTGGCTTCggcat	
PTO-Rad-2as	AAGCTTTGTGctgcc	„antisense“-Oligonukleotide zur Unterdrückung der Translation der Radixin mRNA
PTO-Rad-1s	ATGCCGAAGCCAATCAATGtaaga	„sense“-Oligonukleotide zur Kontrolle des „antisense“-Experimentes
PTO-Rad-2s	GGCAGCACAAagctt	

5.3 verwendete Plasmide

SL-pGilda- α 1	Expression der großen zytoplasmatischen Schleife von GABA _A R- α 1 in Hefe
SL-pGilda- α 5	Expression der großen zytoplasmatischen Schleife von GABA _A R- α 5 in Hefe
SL-pGEX- α 1	Fusion der Schleife von GABA _A R- α 1 an GST
SL-pGEX- α 5	Fusion der Schleife von GABA _A R- α 5 an GST
SL-pBK-CMV- α 1	Expression von GABA _A R- α 1 in Säugerzellen
SL-pBK-CMV- α 5	Expression von GABA _A R- α 5 in Säugerzellen
SL-pBK-CMV-Radixin-myc	Expression von Radixin-myc in Säugerzellen
SL-pEGFP-N2-Radixin	Expression von Radixin-GFP in Säugerzellen
SL-pEYFP-C2-Gephyrin	Expression von YFP-Gephyrin in Säugerzellen (subkloniert aus pEGFP-C2-Gephyrin von Dr. Jens Fuhrmann, damals Frankfurt)
pcDNA3myc-Muskelin	Expression von Muskelin in Säugerzellen (erhalten von Dr. M. Negishi, Kyoto)
pEXV-RacV12	Expression von RacV12 in Säugerzellen (erhalten von Dr. E. Evers, damals Frankfurt)
pEXV-RhoN19	Expression von RhoN19 in Säugerzellen (ebenfalls erhalten von Dr. E. Evers, damals Frankfurt)

Literaturverzeichnis

- Adams, J. C. (2002). "Characterization of a *Drosophila melanogaster* orthologue of muskelin." Gene **297**(1-2): 69-78.
- Adams, J. C., B. Seed and J. Lawler (1998). "Muskelin, a novel intracellular mediator of cell adhesive and cytoskeletal responses to thrombospondin-1." Embo J **17**(17): 4964-4974.
- Adams, J. C. and L. Zhang (1999). "cDNA cloning of human muskelin and localisation of the muskelin (MKLN1) gene to human chromosome 7q32 and mouse chromosome 6 B1/B2 by physical mapping and FISH." Cytogenet Cell Genet **87**(1-2): 19-21.
- Andreoli, C., M. Martin, R. Le Borgne, H. Reggio and P. Mangeat (1994). "Ezrin has properties to self-associate at the plasma membrane." J Cell Sci **107** (Pt 9): 2509-2521.
- Ayalon, G. and Y. Stern-Bach (2001). "Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions." Neuron **31**(1): 103-113.
- Bamforth, F. J., J. L. Johnson, A. G. Davidson, L. T. Wong, G. Lockitch and D. A. Applegarth (1990). "Biochemical investigation of a child with molybdenum cofactor deficiency." Clin Biochem **23**(6): 537-542.
- Barret, C., C. Roy, P. Montcourrier, P. Mangeat and V. Niggli (2000). "Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution." J Cell Biol **151**(5): 1067-1080.
- Beck, M., K. Brickley, H. L. Wilkinson, S. Sharma, M. Smith, P. L. Chazot, S. Pollard and F. A. Stephenson (2002). "Identification, molecular cloning, and characterization of a novel GABAA receptor-associated protein, GRIF-1." J Biol Chem **277**(33): 30079-30090.
- Bedford, F. K., J. T. Kittler, E. Muller, P. Thomas, J. M. Uren, D. Merlo, W. Wisden, A. Triller, T. G. Smart and S. J. Moss (2001). "GABA(A) receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1." Nat Neurosci **4**(9): 908-916.
- Berryman, M., R. Gary and A. Bretscher (1995). "Ezrin oligomers are major cytoskeletal components of placental microvilli: a proposal for their involvement in cortical morphogenesis." J Cell Biol **131**(5): 1231-1242.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.

Brandon, N., J. Jovanovic and S. Moss (2002). "Multiple roles of protein kinases in the modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptor function and cell surface expression." Pharmacol Ther **94**(1-2): 113-122.

Brandon, N. J., P. Delmas, J. Hill, T. G. Smart and S. J. Moss (2001). "Constitutive tyrosine phosphorylation of the GABA(A) receptor gamma 2 subunit in rat brain." Neuropharmacology **41**(6): 745-752.

Bretscher, A., K. Edwards and R. G. Fehon (2002). "ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(8): 586-599.

Brown, G. K., R. D. Scholem, H. B. Croll, J. E. Wraith and J. J. McGill (1989). "Sulfite oxidase deficiency: clinical, neuroradiologic, and biochemical features in two new patients." Neurology **39**(2 Pt 1): 252-257.

Cabot, J. B., A. Bushnell, V. Alessi and N. R. Mendell (1995). "Postsynaptic gephyrin immunoreactivity exhibits a nearly one-to-one correspondence with gamma-aminobutyric acid-like immunogold-labeled synaptic inputs to sympathetic preganglionic neurons." J Comp Neurol **356**(3): 418-432.

Caillard, O., Y. Ben-Ari and J. L. Gaiarsa (1999). "Long-term potentiation of GABAergic synaptic transmission in neonatal rat hippocampus." J Physiol **518** (Pt 1): 109-119.

Chambers, D. N. and A. Bretscher (2005). "Ezrin mutants affecting dimerization and activation." Biochemistry **44**(10): 3926-3932.

Charych, E. I., W. Yu, R. Li, D. R. Serwanski, C. P. Miralles, X. Li, B. Y. Yang, N. Pinal, R. Walikonis and A. L. De Blas (2004). "A four PDZ domain-containing splice variant form of GRIP1 is localized in GABAergic and glutamatergic synapses in the brain." J Biol Chem **279**(37): 38978-38990.

Chen, C. and H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." Mol Cell Biol **7**(8): 2745-2752.

Chih, B., H. Engelman and P. Scheiffele (2005). "Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins." Science **307**(5713): 1324-1328.

Chishti, A. H., A. C. Kim, S. M. Marfatia, M. Lutchman, M. Hanspal, H. Jindal, S. C. Liu, P. S. Low, G. A. Rouleau, N. Mohandas, J. A. Chasis, J. G. Conboy, P. Gascard, Y. Takakuwa, S. C. Huang, E. J. Benz, Jr., A. Bretscher, R. G. Fehon, J. F. Gusella, V. Ramesh, F. Solomon, V. T. Marchesi, S. Tsukita, K. B. Hoover and et al. (1998). "The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane." Trends Biochem Sci **23**(8): 281-282.

Christie, S. B., C. P. Miralles and A. L. De Blas (2002). "GABAergic innervation organizes synaptic and extrasynaptic GABAA receptor clustering in cultured hippocampal neurons." J Neurosci **22**(3): 684-697.

Collinson, N., F. M. Kuenzi, W. Jarolimek, K. A. Maubach, R. Cothliff, C. Sur, A. Smith, F. M. Otu, O. Howell, J. R. Atack, R. M. McKernan, G. R. Seabrook, G. R. Dawson, P. J. Whiting and T. W. Rosahl (2002). "Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor." J Neurosci **22**(13): 5572-5580.

Crestani, F., R. Keist, J. M. Fritschy, D. Benke, K. Vogt, L. Prut, H. Bluthmann, H. Mohler and U. Rudolph (2002). "Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8980-8985.

Dabiri, G. A., F. Lai, R. A. Drakas and K. Nishikura (1996). "Editing of the G_{LuR}-B ion channel RNA in vitro by recombinant double-stranded RNA adenosine deaminase." Embo J **15**(1): 34-45.

Denker, S. P., D. C. Huang, J. Orłowski, H. Furthmayr and D. L. Barber (2000). "Direct binding of the Na⁺-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation." Mol Cell **6**(6): 1425-1436.

Dhodda, V. K., K. A. Sailor, K. K. Bowen and R. Vemuganti (2004). "Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis." J Neurochem **89**(1): 73-89.

Doi, Y., M. Itoh, S. Yonemura, S. Ishihara, H. Takano, T. Noda and S. Tsukita (1999). "Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout." J Biol Chem **274**(4): 2315-2321.

Dong, H., R. J. O'Brien, E. T. Fung, A. A. Lanahan, P. F. Worley and R. L. Huganir (1997). "GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors." Nature **386**(6622): 279-284.

Engert, F. and T. Bonhoeffer (1999). "Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity." Nature **399**(6731): 66-70.

Essrich, C., M. Lorez, J. A. Benson, J. M. Fritschy and B. Luscher (1998). "Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin." Nat Neurosci **1**(7): 563-571.

Esteban, J. A., S. H. Shi, C. Wilson, M. Nuriya, R. L. Huganir and R. Malinow (2003). "PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity." Nat Neurosci **6**(2): 136-143.

Feng, G., H. Tintrup, J. Kirsch, M. C. Nichol, J. Kuhse, H. Betz and J. R. Sanes (1998). "Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity." Science **282**(5392): 1321-1324.

Ferrer-Montiel, A. V. and M. Montal (1996). "Pentameric subunit stoichiometry of a neuronal glutamate receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 2741-2744.

Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-246.

Fievet, B. T., A. Gautreau, C. Roy, L. Del Maestro, P. Mangeat, D. Louvard and M. Arpin (2004). "Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin." J Cell Biol **164**(5): 653-659.

Fremeau, R. T., Jr., M. D. Troyer, I. Pahner, G. O. Nygaard, C. H. Tran, R. J. Reimer, E. E. Bellocchio, D. Fortin, J. Storm-Mathisen and R. H. Edwards (2001). "The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse." Neuron **31**(2): 247-260.

Gaiarsa, J. L., O. Caillard and Y. Ben-Ari (2002). "Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance." Trends Neurosci **25**(11): 564-570.

Gary, R. and A. Bretscher (1993). "Heterotypic and homotypic associations between ezrin and moesin, two putative membrane-cytoskeletal linking proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10846-10850.

Gary, R. and A. Bretscher (1995). "Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site." Mol Biol Cell **6**(8): 1061-1075.

Ghosh, A. and M. E. Greenberg (1995). "Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences." Science **268**(5208): 239-247.

Giesemann, T., G. Schwarz, R. Nawrotzki, K. Berhorster, M. Rothkegel, K. Schluter, N. Schrader, H. Schindelin, R. R. Mendel, J. Kirsch and B. M. Jockusch (2003). "Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system." J Neurosci **23**(23): 8330-8339.

Gronholm, M., M. Sainio, F. Zhao, L. Heiska, A. Vaheri and O. Carpen (1999). "Homotypic and heterotypic interaction of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein merlin and the ERM protein ezrin." J Cell Sci **112** (Pt 6): 895-904.

Gunther, U., J. Benson, D. Benke, J. M. Fritschy, G. Reyes, F. Knoflach, F. Crestani, A. Aguzzi, M. Arigoni, Y. Lang and et al. (1995). "Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the gamma 2 subunit gene of gamma-aminobutyric acid type A receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7749-7753.

Hall, A. (1992). "Ras-related GTPases and the cytoskeleton." Mol Biol Cell **3**(5): 475-479.

Hall, A. (1998). "G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch." Science **280**(5372): 2074-2075.

Hamada, K., T. Shimizu, T. Matsui, S. Tsukita and T. Hakoshima (2000). "Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain." Embo J **19**(17): 4449-4462.

Hanchar, H. J., P. D. Dodson, R. W. Olsen, T. S. Otis and M. Wallner (2005). "Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity." Nat Neurosci **8**(3): 339-345.

Hardingham, G. E., Y. Fukunaga and H. Bading (2002). "Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways." Nat Neurosci **5**(5): 405-14.

Hartman, J. J., J. Mahr, K. McNally, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Thomas, S. Cheesman, J. Heuser, R. D. Vale and F. J. McNally (1998). "Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit." Cell **93**(2): 277-287.

Hasegawa, H., H. Katoh, H. Fujita, K. Mori and M. Negishi (2000). "Receptor isoform-specific interaction of prostaglandin EP3 receptor with muskelin." Biochem Biophys Res Commun **276**(1): 350-354.

Hashimoto, R., Y. Nakamura, H. Kosako, M. Amano, K. Kaibuchi, M. Inagaki and M. Takeda (1999). "Distribution of Rho-kinase in the bovine brain." Biochem Biophys Res Commun **263**(2): 575-579.

Hattori, M., H. Adachi, M. Tsujimoto, H. Arai and K. Inoue (1994). "Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [corrected]." Nature **370**(6486): 216-218.

- Henry, M. D., C. Gonzalez Agosti and F. Solomon (1995). "Molecular dissection of radixin: distinct and interdependent functions of the amino- and carboxy-terminal domains." J Cell Biol **129**(4): 1007-1022.
- Hicke, L. and R. Dunn (2003). "Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 141-172.
- Hirbec, H., O. Perestenko, A. Nishimune, G. Meyer, S. Nakanishi, J. M. Henley and K. K. Dev (2002). "The PDZ proteins PICK1, GRIP, and syntenin bind multiple glutamate receptor subtypes. Analysis of PDZ binding motifs." J Biol Chem **277**(18): 15221-15224.
- Huang, L., T. Y. Wong, R. C. Lin and H. Furthmayr (1999). "Replacement of threonine 558, a critical site of phosphorylation of moesin in vivo, with aspartate activates F-actin binding of moesin. Regulation by conformational change." J Biol Chem **274**(18): 12803-12810.
- Huntley, G. W., J. C. Vickers and J. H. Morrison (1994). "Cellular and synaptic localization of NMDA and non-NMDA receptor subunits in neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease." Trends Neurosci **17**(12): 536-543.
- Ishikawa, H., A. Tamura, T. Matsui, H. Sasaki, T. Hakoshima and S. Tsukita (2001). "Structural conversion between open and closed forms of radixin: low-angle shadowing electron microscopy." J Mol Biol **310**(5): 973-978.
- Johnson, J. L., K. V. Rajagopalan, W. O. Renier, I. Van der Burgt and W. Ruitenbeek (2002). "Isolated sulfite oxidase deficiency: mutation analysis and DNA-based prenatal diagnosis." Prenat Diagn **22**(5): 433-436.
- Kang, E. and M. Gabriel (1998). "Hippocampal modulation of cingulo-thalamic neuronal activity and discriminative avoidance learning in rabbits." Hippocampus **8**(5): 491-510.
- Kannenberg, K., R. Baur and E. Sigel (1997). "Proteins associated with alpha 1-subunit-containing GABAA receptors from bovine brain." J Neurochem **68**(4): 1352-1360.
- Kannenberg, K., W. Sieghart and H. Reuter (1999). "Clusters of GABAA receptors on cultured hippocampal cells correlate only partially with functional synapses." Eur J Neurosci **11**(4): 1256-1264.
- Kikuchi, S., M. Hata, K. Fukumoto, Y. Yamane, T. Matsui, A. Tamura, S. Yonemura, H. Yamagishi, D. Keppler and S. Tsukita (2002). "Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes." Nat Genet **31**(3): 320-325.
- Kirsch, J. and H. Betz (1995). "The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton." J Neurosci **15**(6): 4148-4156.

Kirsch, J., D. Langosch, P. Prior, U. Z. Littauer, B. Schmitt and H. Betz (1991). "The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin." J Biol Chem **266**(33): 22242-22245.

Kirsch, J., I. Wolters, A. Triller and H. Betz (1993). "Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons." Nature **366**(6457): 745-748.

Kitajiri, S., K. Fukumoto, M. Hata, H. Sasaki, T. Katsuno, T. Nakagawa, J. Ito and S. Tsukita (2004). "Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia." J Cell Biol **166**(4): 559-570.

Kittler, J. T., I. L. Arancibia-Carcamo and S. J. Moss (2004). "Association of GRIP1 with a GABA(A) receptor associated protein suggests a role for GRIP1 at inhibitory synapses." Biochem Pharmacol **68**(8): 1649-1654.

Kittler, J. T., P. Delmas, J. N. Jovanovic, D. A. Brown, T. G. Smart and S. J. Moss (2000). "Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons." J Neurosci **20**(21): 7972-7977.

Kittler, J. T. and S. J. Moss (2003). "Modulation of GABAA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition." Curr Opin Neurobiol **13**(3): 341-347.

Kleckner, N. W. and R. Dingledine (1988). "Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes." Science **241**(4867): 835-837.

Kneussel, M., J. H. Brandstatter, B. Gasnier, G. Feng, J. R. Sanes and H. Betz (2001). "Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABA(A) receptor subtypes." Mol Cell Neurosci **17**(6): 973-982.

Kneussel, M., J. H. Brandstatter, B. Laube, S. Stahl, U. Muller and H. Betz (1999). "Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice." J Neurosci **19**(21): 9289-9297.

Kneussel, M., S. Haverkamp, J. C. Fuhrmann, H. Wang, H. Wassle, R. W. Olsen and H. Betz (2000). "The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8594-8599.

Kornau, H. C., L. T. Schenker, M. B. Kennedy and P. H. Seeburg (1995). "Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95." Science **269**(5231): 1737-1740.

Kotani, H., K. Takaishi, T. Sasaki and Y. Takai (1997). "Rho regulates association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells." Oncogene **14**(14): 1705-1713.

Laube, B., J. Kuhse, N. Rundstrom, J. Kirsch, V. Schmieden and H. Betz (1995). "Modulation by zinc ions of native rat and recombinant human inhibitory glycine receptors." J Physiol **483** (Pt **3**): 613-619.

Lee, H. J., I. M. Adham, G. Schwarz, M. Kneussel, J. O. Sass, W. Engel and J. Reiss (2002). "Molybdenum cofactor-deficient mice resemble the phenotype of human patients." Hum Mol Genet **11**(26): 3309-3317.

Lee, H. K., K. Takamiya, J. S. Han, H. Man, C. H. Kim, G. Rumbaugh, S. Yu, L. Ding, C. He, R. S. Petralia, R. J. Wenthold, M. Gallagher and R. L. Huganir (2003). "Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory." Cell **112**(5): 631-643.

Lin, J. W., M. Wyszynski, R. Madhavan, R. Sealock, J. U. Kim and M. Sheng (1998). "Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants of NMDA receptor subunit NR1." J Neurosci **18**(6): 2017-2027.

Lu, Y. M., I. M. Mansuy, E. R. Kandel and J. Roder (2000). "Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP." Neuron **26**(1): 197-205.

Mackay, D. J., F. Esch, H. Furthmayr and A. Hall (1997). "Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins." J Cell Biol **138**(4): 927-938.

Magendantz, M., M. D. Henry, A. Lander and F. Solomon (1995). "Interdomain interactions of radixin in vitro." J Biol Chem **270**(43): 25324-25327.

Marty, S., R. Wehrle and C. Sotelo (2000). "Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus." J Neurosci **20**(21): 8087-8095.

Matsui, T., M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi and S. Tsukita (1998). "Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association." J Cell Biol **140**(3): 647-657.

Matsui, T., S. Yonemura and S. Tsukita (1999). "Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidyl-inositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases." Curr Biol **9**(21): 1259-1262.

- McDonald, B. J., A. Amato, C. N. Connolly, D. Benke, S. J. Moss and T. G. Smart (1998). "Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase." Nat Neurosci **1**(1): 23-28.
- McIntire, S. L., R. J. Reimer, K. Schuske, R. H. Edwards and E. M. Jorgensen (1997). "Identification and characterization of the vesicular GABA transporter." Nature **389**(6653): 870-876.
- McKernan, R. M. and P. J. Whiting (1996). "Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?" Trends Neurosci **19**(4): 139-143.
- Meyer, D. K., C. Olenik, F. Hofmann, H. Barth, J. Leemhuis, I. Brunig, K. Aktories and W. Norenberg (2000). "Regulation of somatodendritic GABAA receptor channels in rat hippocampal neurons: evidence for a role of the small GTPase Rac1." J Neurosci **20**(18): 6743-6751.
- Meyer, G., J. Kirsch, H. Betz and D. Langosch (1995). "Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit." Neuron **15**(3): 563-572.
- Meyer, T., T. Uher, P. Schwartz and A. B. Buchwald (1998). "Tyrosine Phosphorylation of Moesin in Arachidonic Acid-Stimulated Human Platelets." J Thromb Thrombolysis **6**(2): 117-124.
- Migaud, M., P. Charlesworth, M. Dempster, L. C. Webster, A. M. Watabe, M. Makhinson, Y. He, M. F. Ramsay, R. G. Morris, J. H. Morrison, T. J. O'Dell and S. G. Grant (1998). "Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein." Nature **396**(6710): 433-439.
- Mohler, H., D. Benke, J. Benson, B. Luscher and J. M. Fritschy (1995). "GABAA-receptor subtypes in vivo: cellular localization, pharmacology and regulation." Adv Biochem Psychopharmacol **48**: 41-56.
- Morales, B., S. Y. Choi and A. Kirkwood (2002). "Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex." J Neurosci **22**(18): 8084-8090.
- Morris, S. M., U. Albrecht, O. Reiner, G. Eichele and L. Y. Yu-Lee (1998). "The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC." Curr Biol **8**(10): 603-606.
- Moss, S. J., G. H. Gorrie, A. Amato and T. G. Smart (1995). "Modulation of GABAA receptors by tyrosine phosphorylation." Nature **377**(6547): 344-348.

- Naisbitt, S., E. Kim, J. C. Tu, B. Xiao, C. Sala, J. Valtschanoff, R. J. Weinberg, P. F. Worley and M. Sheng (1999). "Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin." Neuron **23**(3): 569-582.
- Nusser, Z., W. Sieghart, D. Benke, J. M. Fritschy and P. Somogyi (1996). "Differential synaptic localization of two major gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha subunits on hippocampal pyramidal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11939-11944.
- Nymann-Andersen, J., H. Wang and R. W. Olsen (2002). "Biochemical identification of the binding domain in the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) mediating dimer formation." Neuropharmacology **43**(4): 476-481.
- Okabe, S., H. D. Kim, A. Miwa, T. Kuriu and H. Okado (1999). "Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity." Nat Neurosci **2**(9): 804-811.
- Olenik, C., H. Barth, I. Just, K. Aktories and D. K. Meyer (1997). "Gene expression of the small GTP-binding proteins RhoA, RhoB, Rac1, and Cdc42 in adult rat brain." Brain Res Mol Brain Res **52**(2): 263-269.
- Paglini, G., P. Kunda, S. Quiroga, K. Kosik and A. Caceres (1998). "Suppression of radixin and moesin alters growth cone morphology, motility, and process formation in primary cultured neurons." J Cell Biol **143**(2): 443-455.
- Pataky, F., R. Pironkova and A. J. Hudspeth (2004). "Radixin is a constituent of stereocilia in hair cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2601-2606.
- Pfeiffer, F., D. Graham and H. Betz (1982). "Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord." J Biol Chem **257**(16): 9389-9393.
- Prag, S., G. D. Collett and J. C. Adams (2004). "Molecular analysis of muskelin identifies a conserved discoidin-like domain that contributes to protein self-association." Biochem J **381**(Pt 2): 547-559.
- Prior, P., B. Schmitt, G. Grenningloh, I. Pribilla, G. Multhaup, K. Beyreuther, Y. Maulet, P. Werner, D. Langosch, J. Kirsch and et al. (1992). "Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein." Neuron **8**(6): 1161-1170.
- Rajgopal, Y. and M. C. Vemuri (2002). "Calpain activation and alpha-spectrin cleavage in rat brain by ethanol." Neurosci Lett **321**(3): 187-191.
- Rakic, P. (2002). "Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence." Nat Rev Neurosci **3**(1): 65-71.

- Reczek, D., M. Berryman and A. Bretscher (1997). "Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family." J Cell Biol **139**(1): 169-179.
- Reiss, J. and J. L. Johnson (2003). "Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH." Hum Mutat **21**(6): 569-576.
- Robinson, D. N. and L. Cooley (1997). "Drosophila kelch is an oligomeric ring canal actin organizer." J Cell Biol **138**(4): 799-810.
- Roumier, A., J. C. Olivo-Marin, M. Arpin, F. Michel, M. Martin, P. Mangeat, O. Acuto, A. Dautry-Varsat and A. Alcover (2001). "The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation." Immunity **15**(5): 715-728.
- Sanders, L. C., F. Matsumura, G. M. Bokoch and P. de Lanerolle (1999). "Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase." Science **283**(5410): 2083-2085.
- Sans, N., C. Racca, R. S. Petralia, Y. X. Wang, J. McCallum and R. J. Wenthold (2001). "Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway." J Neurosci **21**(19): 7506-7516.
- Sapir, T., M. Elbaum and O. Reiner (1997). "Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit." Embo J **16**(23): 6977-6984.
- Schmitt, B., P. Knaus, C. M. Becker and H. Betz (1987). "The Mr 93,000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor complex is a peripheral membrane protein." Biochemistry **26**(3): 805-811.
- Selbach, M., S. Moese, S. Backert, P. R. Jungblut and T. F. Meyer (2004). "The Helicobacter pylori CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin." Proteomics **4**(10): 2961-2968.
- Setou, M., T. Nakagawa, D. H. Seog and N. Hirokawa (2000). "Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport." Science **288**(5472): 1796-1802.
- Simons, P. C., S. F. Pietromonaco, D. Reczek, A. Bretscher and L. Elias (1998). "C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton." Biochem Biophys Res Commun **253**(3): 561-565.
- Sola, M., V. N. Bavro, J. Timmins, T. Franz, S. Ricard-Blum, G. Schoehn, R. W. Ruigrok, I. Paarmann, T. Saiyed, G. A. O'Sullivan, B. Schmitt, H. Betz and W. Weissenhorn (2004). "Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin." Embo J **23**(13): 2510-2519.

- Song, J. Y., K. Ichtchenko, T. C. Sudhof and N. Brose (1999). "Neuroigin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1100-1105.
- Sur, C., K. Quirk, D. Dewar, J. Atack and R. McKernan (1998). "Rat and human hippocampal alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric AcidA receptors have alpha5 beta3 gamma2 pharmacological characteristics." Mol Pharmacol **54**(5): 928-933.
- Takahashi, K., T. Sasaki, A. Mammoto, K. Takaishi, T. Kameyama, S. Tsukita and Y. Takai (1997). "Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein." J Biol Chem **272**(37): 23371-23375.
- Takamori, S., J. S. Rhee, C. Rosenmund and R. Jahn (2000). "Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons." Nature **407**(6801): 189-194.
- Takeuchi, K., N. Sato, H. Kasahara, N. Funayama, A. Nagafuchi, S. Yonemura and S. Tsukita (1994). "Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members." J Cell Biol **125**(6): 1371-1384.
- Tashiro, A., A. Minden and R. Yuste (2000). "Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho." Cereb Cortex **10**(10): 927-938.
- Tehrani, M. H. and E. M. Barnes, Jr. (1991). "Agonist-dependent internalization of gamma-aminobutyric acidA/benzodiazepine receptors in chick cortical neurons." J Neurochem **57**(4): 1307-1312.
- Tehrani, M. H. and E. M. Barnes, Jr. (1993). "Identification of GABAA/benzodiazepine receptors on clathrin-coated vesicles from rat brain." J Neurochem **60**(5): 1755-1761.
- Terunuma, M., I. S. Jang, S. H. Ha, J. T. Kittler, T. Kanematsu, J. N. Jovanovic, K. I. Nakayama, N. Akaike, S. H. Ryu, S. J. Moss and M. Hirata (2004). "GABAA receptor phospho-dependent modulation is regulated by phospholipase C-related inactive protein type 1, a novel protein phosphatase 1 anchoring protein." J Neurosci **24**(32): 7074-7084.
- Thiels, E., G. Barrionuevo and T. W. Berger (1994). "Excitatory stimulation during postsynaptic inhibition induces long-term depression in hippocampus in vivo." J Neurophysiol **72**(6): 3009-3016.
- Thimm, J., A. Mechler, H. Lin, S. Rhee and R. Lal (2005). "Calcium-dependent open/closed conformations and interfacial energy maps of reconstituted hemichannels." J Biol Chem **280**(11): 10646-10654.
- Triller, A., F. Cluzeaud and H. Korn (1987). "gamma-Aminobutyric acid-containing terminals can be apposed to glycine receptors at central synapses." J Cell Biol **104**(4): 947-956.

- Tsukita, S. and Y. Hieda (1989). "A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization." J Cell Biol **108**(6): 2369-2382.
- Tsukita, S., K. Oishi, N. Sato, J. Sagara and A. Kawai (1994). "ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons." J Cell Biol **126**(2): 391-401.
- Tsukita, S. and S. Yonemura (1997). "ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction." Trends Biochem Sci **22**(2): 53-58.
- Turunen, O., T. Wahlstrom and A. Vaheri (1994). "Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family." J Cell Biol **126**(6): 1445-1453.
- Umeda, M., H. Nishitani and T. Nishimoto (2003). "A novel nuclear protein, Twa1, and Muskelin comprise a complex with RanBPM." Gene **303**: 47-54.
- Vallee, R. B., N. E. Faulkner and C. Y. Tai (2000). "The role of cytoplasmic dynein in the human brain developmental disease lissencephaly." Biochim Biophys Acta **1496**(1): 89-98.
- Vicario-Abejon, C., C. Collin, R. D. McKay and M. Segal (1998). "Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons." J Neurosci **18**(18): 7256-7271.
- Wang, J., S. Liu, U. Haditsch, W. Tu, K. Cochrane, G. Ahmadian, L. Tran, J. Paw, Y. Wang, I. Mansuy, M. M. Salter and Y. M. Lu (2003). "Interaction of calcineurin and type-A GABA receptor gamma 2 subunits produces long-term depression at CA1 inhibitory synapses." J Neurosci **23**(3): 826-836.
- Wilson, S. M., B. Bhattacharyya, R. A. Rachel, V. Coppola, L. Tessarollo, D. B. Householder, C. F. Fletcher, R. J. Miller, N. G. Copeland and N. A. Jenkins (2002). "Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-specific protease." Nat Genet **32**(3): 420-425.
- Wisden, W., D. J. Laurie, H. Monyer and P. H. Seeburg (1992). "The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon." J Neurosci **12**(3): 1040-1062.
- Xue, F. and L. Cooley (1993). "kelch encodes a component of intercellular bridges in Drosophila egg chambers." Cell **72**(5): 681-693.

Yamaguchi, Y., H. Katoh, H. Yasui, K. Mori and M. Negishi (2001). "RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway." J Biol Chem **276**(22): 18977-83.

Yang, X. D., J. A. Connor and D. S. Faber (1994). "Weak excitation and simultaneous inhibition induce long-term depression in hippocampal CA1 neurons." J Neurophysiol **71**(4): 1586-1590.

Yonemura, S., M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo and S. Tsukita (1998). "Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2." J Cell Biol **140**(4): 885-895.

Yonemura, S., T. Matsui and S. Tsukita (2002). "Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo." J Cell Sci **115**(Pt 12): 2569-2580.

Yu, G., T. Zerucha, M. Ekker and J. L. Rubenstein (2001). "Evidence that GRIP, a PDZ-domain protein which is expressed in the embryonic forebrain, co-activates transcription with DLX homeodomain proteins." Brain Res Dev Brain Res **130**(2): 217-230.

Yun, C. H., S. Oh, M. Zizak, D. Steplock, S. Tsao, C. M. Tse, E. J. Weinman and M. Donowitz (1997). "cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3010-3015.

Danksagung

Herrn PD. Dr. Matthias Kneussel danke ich ganz besonders für die gute, freundschaftliche Zusammenarbeit, für die unermüdliche Betreuung, für die Anregungen, für die Unterstützung und für die Ermutigungen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Pongs am ZMNH für die Erstellung des ersten Dissertationsgutachtens.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Wiese für die Betreuung am Fachbereich Biologie als Zweitgutachter.

Den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe danke ich für die kritischen Anmerkungen, die hilfreiche gegenseitige Unterstützung und dafür, dass man über alles mit ihnen reden kann. An die Adresse von Sandra Plant richte ich ausdrücklichen Dank.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. Oussama El Far, Dr. Yannik Großkreutz, Dr. Gregory O'Sullivan, Melanie Bausen und Dr. Jens Fuhrmann, die mir einen guten Start beschert haben.

Allen Mitgliedern der benachbarten Nachwuchsforschergruppen am ZMNH danke ich für die freundliche Atmosphäre und ihre große Hilfsbereitschaft. Zu besonderem Dank bin ich der EDV verpflichtet, die großen Belastungen ausgesetzt war.

Meinen Freunden danke ich dafür, dass sie oft Geduld mit mir hatten und Verständnis für meine Situation aufgebracht haben. Aparna Shetty, Dmytro Puchkov, Robin Klemm, Matthias Hamdorf und Martin Blaser danke ich für ihre treue, jahrelange Freundschaft und dafür, dass sie auch in den unmöglichsten Situationen für mich da waren.

Meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern danke ich dafür, dass sie mir immer Mut zugesprochen haben und mir mit ihrer Lebenserfahrung zur Seite stehen.

Wissenschaftlicher Werdegang

Grundstudium der Biochemie an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main mit dem Schwerpunkt Biophysikalische Chemie von 1997 – 1999.

Hauptstudium an der Goethe-Universität mit Schwerpunkt Immunologie und Neurobiochemie von 1999 – 2001. Während dieser Zeit Stipendium des Evangelischen Studienwerks Villigst und Teilnahme an der Studieninitiative der BASF AG. Studentische Hilfskraft an den Instituten für Mikrobiologie und für Molekulargenetik.

Aufenthalt als Gastforscher im Sommer 2001 am Institut für Weinbiotechnologie, Universität von Stellenbosch, in Stellenbosch, Südafrika.

Diplomarbeit 2002 am Institut für Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Entian in der Arbeitsgruppe „Stoffwechselregulation in Hefe“ mit dem Thema „Biochemische Analyse von Substraten der Proteinkinase Cat1p in *Saccharomyces cerevisiae*“.

Seit April 2002 in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kneussel am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt und seit Oktober 2002 Doktorand am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg.