

**Mikrotubuli-assoziiertes Transport von
postsynaptischem NLG1 in *Rattus
norvegicus* (Berkenhout, 1769) und *Mus
musculus* (Linnaeus, 1758)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
in der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
Department Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Inga Schapitz

aus Berlin

Hamburg, Juli 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn PD Dr. Matthias Kneussel
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. Konrad Wiese
Tag der Disputation: 04. September 2009

Hamburg, den 21. August 2009



Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	9
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
ZUSAMMENFASSUNG	13
1 EINLEITUNG	15
1.1 Das Zentralnervensystem der Säugetiere	15
1.2 Synapsen	16
1.2.1 Inhibitorische Synapsen.....	17
1.2.2 Exzitatorische Synapsen.....	18
1.3 Synaptische Plastizität	22
1.4 Neuroligin	25
1.5 PSD-95	28
1.6 Intrazellulärer Transport	31
1.7 Kinesin	34
1.8 Dynein	36
1.9 Zielsetzung der Arbeit	39
2 MATERIAL UND METHODEN	40
2.1 Materialien	40
2.1.1 Geräte	40
2.1.2 Chemikalien und Enzyme.....	41
2.1.3 Medien, Puffer, Lösungen	42
2.1.4 Reaktionskomplettausstattungen (Kits).....	45
2.1.5 Bakterienstämme, Labortiere, Zelllinien.....	45
2.1.6 Größenstandards.....	46
2.1.7 Oligonukleotide.....	46

2.1.8	Vektoren und Konstrukte.....	47
2.1.9	Antikörper.....	48
2.2	Methoden.....	51
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	51
2.2.1.1	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	51
2.2.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	51
2.2.1.3	Präparation von Gesamt-RNA aus Gehirn.....	52
2.2.1.4	cDNA-Synthese.....	52
2.2.1.5	Agarosegelelektrophorese.....	52
2.2.1.6	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	52
2.2.1.7	Quantifizierung und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren	53
2.2.1.8	Restriktionsanalyse.....	53
2.2.1.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	53
2.2.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten	53
2.2.1.11	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	53
2.2.1.12	Transformation von Bakterien	54
2.2.1.13	Isolierung von Plasmid-DNA.....	54
2.2.1.14	DNA-Sequenzierung	54
2.2.2	Proteinchemische Methoden.....	55
2.2.2.1	Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA-Assay).....	55
2.2.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
2.2.2.3	Western Blot.....	55
2.2.2.4	Immundetektion.....	55
2.2.2.5	Herstellung von Zelllysaten	56
2.2.2.6	Proteinextraktion aus Maus- und Rattengehirn.....	56
2.2.2.7	Koimmunpräzipitation.....	56
2.2.2.8	Präparation von synaptosomalen Membranen (Kortex).....	57
2.2.2.9	Saccharosedichtegradientenzentrifugation	57
2.2.2.10	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen.....	58
2.2.2.11	Applikation von <i>antisense/sense</i> -Oligonukleotiden.....	58
2.2.3	Zellbiologische Methoden	59
2.2.3.1	Kultivierung von HEK293-Zellen.....	59
2.2.3.2	Präparation und Kultivierung primärer Neurone	59
2.2.3.3	Transfektion	60
2.2.3.4	Immunzytochemie	61
2.2.3.5	Nachweis von internalisierten Oberflächenproteinen.....	61
2.2.3.6	<i>Time-lapse</i> -Videomikroskopie.....	62
2.2.3.7	Elektronenmikroskopie.....	62
2.2.3.8	Elektrophysiologie.....	63
2.2.4	Quantitative Analyse und Statistik.....	63

ERGEBNISSE.....	64
3.1 Retrograder Transport von Neuroligin 1.....	64
3.1.1 Kofraktionierung der Dynein Intermediären Kette, PSD-95 und Neuroligin 1/3....	65
3.1.2 Koimmunpräzipitation der Dynein Intermediären Kette und PSD-95 mit Neuroligin 1	66
3.1.3 Koimmunpräzipitation von Neuroligin 1 und Dynein Intermediärer Kette mit Hilfe von Extrakten von PSD-95-mutierten Mäusen	67
3.1.4 Internalisierung von Neuroligin 1 in HEK293-Zellen und kultivierten hippocampalen Neuronen.....	69
3.1.5 Retrograder Transport von Neuroligin 1	74
3.1.6 Visualisierung des retrograden Kotransports von Neuroligin 1 und Dynein Intermediäre Kette.....	76
3.1.7 Analyse der Synapsenzahl in Dynamitin überexprimierenden Mäusen.....	78
3.1.8 Elektronenmikroskopische Untersuchung von PSD-Länge und <i>Spine</i> -Kopfgröße in Dynamitin überexprimierenden Mäusen	81
3.1.9 Analyse der Synapsenzahl in mit pDynamitin-EGFP transfizierten kultivierten hippocampalen Neuronen.....	82
3.1.10 Elektrophysiologische Registrierung von Membranströmen in mit pDynamitin-EGFP transfizierten kultivierten hippocampalen Neuronen.....	83
3.2 Anterograder Transport von Neuroligin 1.....	85
3.2.1 Anterograde Mobilisierung von Neuroligin 1	85
3.2.2 Koimmunpräzipitation von KIF21B mit Neuroligin 1.....	86
3.2.3 Analyse der Bindestelle von Neuroligin1 und KIF21B	88
3.2.4 Einfluss von KIF21B-Fragmenten auf die NLG1-Zelloberflächenlokalisierung	88
3.2.5 Kolokalisation von KIF21B und Neuroligin 1.....	89
3.2.6 Inhibition der KIF21B-Expression und Einfluss auf Neuroligin 1	91
3.3 Einfluss der synaptischen Aktivität auf Neuroligin 1	93
3.3.1 Analyse von Neuroligin 1 nach LTD-Induktion.....	94
3.3.2 Analyse der Mikrotubuliabhängigkeit während der LTD-Induktion auf Neuroligin 1	95
3.3.3 Analyse von Neuroligin 1 nach LTP-Induktion.....	97
3.3.4 Analyse von Neuroligin 1 nach LTP-Induktion und gleichzeitiger Inhibition der KIF21B-Expression.....	100
4 DISKUSSION.....	102
4.1 Anterograder und retrograder Transport von NLG1.....	102
4.2 Mikrotubuli-vermittelter Transport	104
4.3 Einfluss der Motorinhibition auf NLG1.....	108
4.4 Einfluss von synaptischer Aktivität auf den NLG-Transport	111

4.5	Funktion des NLG-Transports	114
4.6	Modell des Neuroligin-Transports	116
4.7	Ausblick.....	118
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	120
6	DANKSAGUNG	140

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schema einer exzitatorischen Synapse.....	21
Abb. 1.2: Strukturmodell des transsynaptischen Komplexes von NLG1 und β -NRX1.....	26
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des NLG-NRX-Komplexes an der Synapse in Wildtyp- und Autismus-assoziiierter Situation.....	28
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PSD-95.....	29
Abb. 1.5: Aktinfilamente und Mikrotubuli.....	34
Abb. 1.6: Strukturmodell von zytoplasmatischem Dynein.....	37
Abb. 3.1: Kofraktionierung von NLG, PSD-95 und Dynein.....	65
Abb. 3.2: Koimmunpräzipitation der Dynein Intermediären Kette und PSD-95 mit NLG1..	67
Abb. 3.3: Koimmunpräzipitation von PSD-95 und NLG1/3 mit DIC in PSD-95-mutierten Mäusen.....	68
Abb. 3.4: Koimmunpräzipitation des PSD-95 Homologs SAP97 mit Dynein Intermediärer Kette.....	68
Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Analyse von NLG1-Internalisierungsprozessen.....	70
Abb. 3.6: Quantitative Analyse der myc-NLG1-Internalisierung in HEK293-Zellen und kultivierten hippokampalen Neuronen.....	71
Abb. 3.7: Einfluss von Fab-Fragmenten als Sekundärantikörper auf die Internalisierung von myc-NLG1 in HEK293-Zellen.....	72
Abb. 3.8: HEK293-Zellen exprimieren PDZ-domänenhaltige Proteine.....	72
Abb. 3.9: Quantitative Analyse der NLG1 Oberflächenlokalisierung in HEK293-Zellen.....	73
Abb. 3.10: Retrograde Bewegung von NLG1.....	75
Abb. 3.11: Kotransport von GFP-NLG1 und mRFP-DIC in kultivierten hippokampalen Neuronen.....	77
Abb. 3.12: Kontrolle der Proteinexpression synaptischer Proteine in zytosolischen Gehirnextrakten von Wildtyp und Dynamitin überexprimierenden Tieren.....	79
Abb. 3.13: Ultrastrukturelle Analyse der exzitatorischen und inhibitorischen Synapsenzahl in Wildtyp und Dynamitin überexprimierenden Mäusen.....	81
Abb. 3.14: Größere Postsynaptische Dichten und <i>Spine</i> -Köpfe in Dynamitin überexprimierenden Mäusen.....	82

Abb. 3.15: Reduktion von Synapsenzahlen in mit pDynamitin-EGFP transfizierten hippokampalen Primärkulturen.....	83
Abb. 3.16: Elektrophysiologische Analyse von mit pDynamitin-EGFP transfizierten DIV10 hippokampalen Primärkulturen.....	84
Abb. 3.17: Anterograder Transport von GFP-NLG1 in hippokampalen Primärkulturen.....	85
Abb. 3.18: Anterograder Transport von GFP-NLG1 in <i>Spines</i>	86
Abb. 3.19: Koimmunpräzipitation von KIF21B mit NLG1.....	87
Abb. 3.20: Koimmunpräzipitation von NLG mit KIF21B.....	87
Abb. 3.21: NLG1 kopräzipitiert mit EGFP-KIF21B-Fragmenten in HEK293-Zellen.....	88
Abb. 3.22: Quantitative Analyse der NLG1 Oberflächenlokalisierung in HEK293-Zellen.....	89
Abb. 3.23: Immunzytochemische Analyse der KIF21B-Lokalisation in hippokampalen Primärkulturen.....	90
Abb. 3.24: Immunzytochemische Analyse der KIF21B und GFP-NLG1 Kollokalisierung.....	91
Abb. 3.25: Inhibition der KIF21B-Expression in hippokampalen Primärkulturen.....	92
Abb. 3.26: Analyse der NLG Oberflächenlokalisierung bei gleichzeitiger Inhibition der KIF21B-Expression.....	93
Abb. 3.27: Analyse der NLG-Oberflächenlokalisierung nach LTD-Induktion.....	94
Abb. 3.28: Analyse der GFP-NLG1 mobilen Punkte pro Zelle nach LTD-Induktion.....	95
Abb. 3.29: Analyse der NLG Oberflächenlokalisierung nach DHPG- und anschließender Nocodazolbehandlung.....	96
Abb. 3.30: Analyse der NLG Oberflächenlokalisierung nach gleichzeitiger Applikation von DHPG und Nocodazol.....	97
Abb. 3.31: Quantitative Analyse der NLG Oberflächenlokalisierung nach LTP-Induktion in hippokampalen Primärkulturen.....	98
Abb. 3.32: Proteinlokalisierung in aufgereinigten Synaptosomen nach LTP-Induktion.....	99
Abb. 3.33: Analyse der NLG Zelloberflächenlokalisierung bei inhibierter KIF21B-Expression und gleichzeitiger LTP-Induktion.....	101
Abb. 4.1: Modell des NLG1-Transports in Dendriten.....	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme, Säugetierzelllinien und Labortiere.....	45
Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.....	46
Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Grundvektoren und Konstrukte.....	47
Tabelle 2.4: Übersicht der eingesetzten Antikörper.....	50
Tabelle 2.5: Übersicht der PCR-Reaktionsansätze.....	51
Tabelle 2.6: Übersicht der PCR-Bedingungen.....	52
Tabelle 2.7: Übersicht der für Transfektionen eingesetzten Chemikalien.....	60
Tabelle 3.1: Quantifizierung der zytosolischen Gehirnextrakte von Wildtyp und Dynamitin überexprimierenden Mäusen.....	80
Tabelle 3.2: Ergebnisse der elektrophysiologischen Vermessung von Dynamitin überex- primierenden hippocampalen Primärkulturen.....	84

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
AS	Aminosäure
as	<i>antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
ds	Doppelstrang
d.h.	das heißt
DHC	Dynein schwere Kette
DIC	Dynein intermediäre Kette
DIV	<i>days in vitro</i>
DLC	Dynein leichte Kette
DLIC	Dynein leichte intermediäre Kette
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiotreitol
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
G	Guanin
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GK	<i>guanylat kinase</i>
GluR	Glutamatrezeptor
GlyR	Glyzinrezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-1 Piperazinethansulfonsäure
HPSF	<i>high purity salt free</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KHC	Kinesin schwere Kette
KIF	Kinesin-Superfamilie-Protein
KLC	Kinesin leichte Kette
l	Liter
LB	Luria-Bertani
L-Glu	L-Glutamin
LTD	<i>Long-term depression</i>
LTP	<i>Long-term potentiation</i>
M	Molar, Mol/Liter
mA	Milliampere
MAGUK	membrane associated guanylate kinase
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mGluR	metabotroper GluR
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mRFP	<i>monomeric red flurescent protein</i>
MTOC	<i>microtubule organizing center</i>
mV	Millivolt
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NLG	Neuroigin
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR	NMDA-Rezeptor-Untereinheit
NRX	Neurexin
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

PDZ	<i>PSD-95 (PSD protein of 95 kDa)/Dlg (disc large)/ZO-1 (zona occludens 1)</i>
pH	$-\log [H^+]$
PIPES	Piperazin- <i>N,N'</i> -bis(2-ethansulfonsäure)
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	Postsynaptische Dichte
PSD-95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
PSD-93	<i>postsynaptic density protein 93</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	<i>sense</i>
s	Sekunde
SAP97	<i>synapse-associated protein 97</i>
SAP102	<i>synapse-associated protein 102</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	<i>Src homology 3</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBST	Tris gepufferte Salzlösung
TG	Transgen
U	Enzymeinheiten (<i>units</i>)
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
ZNS	Zentralnervensystem

Zusammenfassung

Die Kontaktstellen zwischen Neuronen, die Synapsen, bilden die Grundlage der neuronalen Kommunikation für ca. 10^{11} Neurone im humanen ZNS und dienen als Grundeinheit zur Informationsspeicherung im Gehirn. Die Fähigkeit Informationen zu verarbeiten, zu lernen oder ein Gedächtnis auszubilden, basiert auf kontinuierlichen Veränderungen in der neuronalen Kommunikation (synaptische Plastizität). Eine Form der Plastizität ist die aktivitätsabhängige Potenzierung oder Depression von Synapsen, welche sich in langanhaltenden strukturellen und molekularen Anpassungen der Synapse äußert (LTP, LTD). Die Umsetzung dieser plastischen Veränderungen ist genau reguliert und beinhaltet u.a. den intrazellulären Transport von hierfür benötigten Komponenten entlang von Aktinfilamenten und Mikrotubuli als hauptsächliche Zytoskelettstrukturen. Der Langstreckentransport wird hierbei von molekularen Motorproteinen entlang der Mikrotubuli übernommen, wobei Kinesin den anterograden Transport in Richtung der Zellperipherie und Dynein den retrograden Transport in Richtung des Zellsomas vermittelt. Für den Kurzstreckentransport sind Motorproteine der Myosin-Familie entlang der Aktinfilamente zuständig.

Das postsynaptische transmembrane Zelladhäsionsmolekül Neuroligin 1 (NLG1) bildet mit seinem präsynaptischen Bindepartner Neurexin (NRX) einen transsynaptischen heterophilen Komplex. Über die Bindung an das postsynaptische Gerüstprotein PSD-95 ist NLG1 in der synaptischen Membran verankert und kann so andere postsynaptische Proteine rekrutieren oder zusammen mit PSD-95 über retrograde Signalwege von der Post- zur Präsynapse kommunizieren. Aufgrund dieser Funktionen ist NLG in Prozesse der Synaptogenese und Synapsenreifung involviert, weshalb die präzise Lokalisation und Konzentration von NLG an der Synapse für funktionale neuronale Netzwerke von Bedeutung ist.

Über die genauen Mechanismen hinsichtlich der Lokalisation und des Transports von NLG zur Synapse ist jedoch wenig bekannt. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit der intrazelluläre Transport von NLG entlang von Mikrotubuli analysiert werden. Außerdem sollte die Beteiligung von akzessorischen Proteinen hinsichtlich des NLG-Transports untersucht werden. Da NLG durch seine Lokalisation und Funktion an der Synapse ein interessanter Kandidat für die Umsetzung der plastischen synaptischen Veränderungen ist, wurde weiterhin die aktivitätsabhängige Regulation des NLG-Transports untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anterograde und retrograde Mobilität von NLG1 in Dendriten und *Spines* mit Hilfe der *Time-Lapse* Videomikroskopie beobachtet werden. Durch biochemische Experimente konnten die zugrundeliegenden NLG1-Transportkomplexe identifiziert werden, wobei der anterograde Transportkomplex aus NLG1 und dem Motorprotein KIF21B besteht. Den retrograden Transport vermittelt ein Komplex, der NLG1, PSD-95 und das Motorprotein Dynein beinhaltet. Im Gegensatz zum anterograden Transport wird NLG1 in retrograde Richtung zusammen mit dem Adaptorprotein PSD-95 transportiert.

Weiterhin ist die Internalisierung von an der Zelloberfläche lokalisierten NLG1 von PSD-95 und Dynein abhängig. Ein funktionierender Transport durch das Motorprotein Dynein ist wichtig für die Synapsenstruktur und Anzahl der Synapsen, da in ultrastrukturellen Analysen vergrößerte postsynaptische Dichten und *Spine*-Köpfe sowie eine reduzierte Anzahl an exzitatorischen Synapsen festgestellt werden konnte.

In dieser Arbeit konnten diese identifizierten NLG1-Transportkomplexe mit aktivitäts-abhängigen Mechanismen in Verbindung gebracht werden. Eine Induktion von LTD verursachte eine vom Mikrotubuli-Transport abhängige Reduktion von NLG1 an der Zelloberfläche, wohingegen die Induktion von LTP eine KIF21B-abhängige Zunahme von NLG1 in der synaptischen Membran hervorrief.

Bei NLG1 handelt es sich demnach nicht um ein statisches Zelladhäsionsmolekül, sondern vielmehr um ein dynamisch reguliertes Protein, welches, ähnlich der Neurotransmitterrezeptoren, auf Veränderungen der synaptischen Aktivität reagieren kann. Dies wird mit Hilfe des Transports entlang von Mikrotubuli erreicht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein funktionaler NLG1-Transport zu und von der Synapse bei der Ausbildung der synaptischen Plastizität von Bedeutung ist, wodurch NLG1 möglicherweise in Lernprozessen involviert sein könnte. Zusätzlich kann NLG1 das exzitatorische/inhibitorische Synapsenverhältnis (E/I-Verhältnis) regulieren (Prange *et al.*, 2004, Levinson *et al.*, 2005). Ein abnormales E/I-Verhältnis ist im Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen wie Autismus beschrieben (Rubenstein *et al.*, 2003), weshalb ein Ziel zukünftiger Arbeiten sein sollte zu untersuchen, welche Rolle dem NLG1-Transport in diesem Zusammenhang zukommt.

1 Einleitung

1.1 Das Zentralnervensystem der Säugetiere

Die Gesamtheit des Nervengewebes, welches als funktionelle und morphologische Einheit zur Reizaufnahme, -weiterleitung und -verarbeitung befähigt ist, bezeichnet man als Nervensystem. Dabei wird im Nervensystem von Säugetieren zwischen zentralem Nervensystem (ZNS), welches das Gehirn und das Rückenmark umfasst, und peripherem Nervensystem (PNS) unterschieden. Letzteres besteht aus nicht im Gehirn oder Rückenmark gelegenen peripheren Hirnnerven und Nervknoten (Ganglien).

Im Nervensystem werden hauptsächlich zwei Zelltypen voneinander unterschieden: Gliazellen und Neurone. Im Vergleich zu 10^{11} Neuronen im menschlichen ZNS sind Gliazellen 10-50 fach häufiger vorhanden (Kandel *et al.*, 2000). Sie lassen sich in folgende Zelltypen einteilen: Astrozyten, Oligodendrozyten, Schwann-Zellen, Mikroglia und Ependymzellen. Astrozyten sind die häufigsten Gliazellen und übernehmen Aufgaben wie die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke und die Regulation der chemischen Zusammensetzung des extrazellulären Raums. Weiterhin werden ihnen Stütz- und Ernährungsaufgaben zugesprochen. Die elektrische Isolierung von Neuronen wird durch die Umwicklung der Axone mit einer Myelinscheide erreicht. Myelin wird im ZNS durch Oligodendrozyten und im PNS durch Schwann-Zellen gebildet. Mikroglia vermitteln die Hauptform der aktiven Immunantwort im ZNS, da sie durch Entzündungen oder Verletzungen aktiviert werden und abgestorbene Neurone und Oligodendrozyten phagozytieren. Ependymzellen kleiden die Flüssigkeitsräume des ZNS, den Zentralkanal und die Ventrikel, aus und trennen so die Hirnflüssigkeit vom Nervengewebe (Kandel *et al.*, 2000, Bear *et al.*, 2001).

Neurone sind elektrisch erregbare, hochspezialisierte, polarisierte Zellen und besitzen einen charakteristischen Grundbauplan bestehend aus dem Zellkörper (Soma), den Dendriten und dem Axon. Das Soma ist das metabolische Zentrum des Neurons und Hauptintegrationsort der neuronalen Aktivität. Am Soma entspringen mehrere sich distal verzweigende Fortsätze, die Dendriten, welche sich zu einem Dendritenbaum verzweigen, Reize empfangen und an das Soma weiterleiten. Am Soma entspringt ein weiterer, bis zu 1 m (Mensch) langer Fortsatz, das Axon, welches für die Weiterleitung des Reizes verantwortlich ist und sich zu seinem Ende hin verzweigt.

Die elektrische Erregbarkeit der neuronalen Membran ist die Grundvoraussetzung für die Kommunikation der Neurone untereinander und mit anderen Zellen. Voraussetzung dafür ist die ungleiche Verteilung von Ionen zwischen Extra- und Intrazellularraum, welche durch den Transport von Ionen durch spezifische Ionenkanäle und Ionenpumpen erzeugt wird. Daraus resultiert ein elektrochemisches Potential, welches durch aktiven Transport von Ionen aufrechterhalten wird. In Neuronen wird das Ruhepotential (-65 mV) vor allem durch K^+ -Ionen bestimmt, da im Ruhezustand der Neurone im Gegensatz zu Cl^- - und Na^+ -Ionenkanälen

einige K^+ -Ionenkanäle geöffnet sind, wodurch K^+ -Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten in den Extrazellularraum strömen. Durch einen lokalen Reiz kann ein Neuron erregt werden. Hierbei werden liganden- und spannungsabhängige Ionenkanäle geöffnet, wodurch positiv geladene Ionen (v.a. Na^+) in die Zelle einströmen können und diese depolarisieren. Erreicht diese Depolarisierung am Soma einen bestimmten Schwellenwert, wird am Ursprung des Axons, dem Axonhügel, nach dem Alles-oder-nichts-Gesetz ein Aktionspotential ausgelöst, um die Erregung bis zu den axonalen Endigungen weiterzuleiten. Um das Aktionspotential auszulösen, öffnen sich lokal spannungsabhängige Na^+ -Ionenkanäle, welche sich nach einem Na^+ -Ioneneinstrom in die Zelle sofort wieder schließen und inaktiv bleiben. Dadurch wird die Erregung nur in eine Richtung des Axons weitergeleitet. Durch das lokal angestiegene Membranpotential werden nun benachbarte spannungsabhängige Ionenkanäle geöffnet, welche für die Weiterleitung des Signals (Na^+ -Ionenkanäle) und für die Repolarisation (K^+ -Ionenkanäle) zum Ruhepotential zuständig sind (Kandel *et al.*, 2000).

1.2 Synapsen

Die neuronale Reizübertragung findet an Kontaktstellen zwischen Neuronen, den sogenannten Synapsen, statt. Die 10^{11} Neurone im menschlichen ZNS (Kandel *et al.*, 2000) bilden Synapsen mit über 1000 weiteren Neuronen, wodurch 10^{14} - 10^{15} synaptische Kontakte gebildet werden (Brose, 1999). Synapsen werden zwischen den präsynaptischen, reizleitenden axonalen Endigungen und den postsynaptischen Dendriten oder Zellsomata einer Nervenzelle, sowie postsynaptischen Muskel-, Drüsen- und Gliazellen gebildet. Im ZNS können sich außerdem noch dendro-dendritische und axo-axonische synaptische Kontakte ausbilden. Desweiteren wird zwischen elektrischen und chemischen Synapsen unterschieden.

Elektrische Synapsen vermitteln schnelle, stereotype und synchrone elektrische Transmission über *Gap junctions*, welche die Zytoplasmen zweier Zellen miteinander verbinden. Bei einer *Gap junction* sind die prä- und postsynaptische Membran durch einen 3 nm breiten Spalt voneinander getrennt, wobei dieser von Connexinen durchspannt wird. Sechs Connexine bilden einen Halbkanal, das Connexon, welches zusammen mit einem weiteren Connexon der Nachbarzelle einen Kanal zum bidirektionalen Austausch von Ionen und Metaboliten bildet. Elektrische Synapsen werden zwischen Gliazellen und zwischen Neuronen, die hochsynchronisiert aktiv sind, ausgebildet. Desweiteren sind sie oft mit chemischen Synapsen assoziiert (Pereda *et al.*, 2003).

Chemische Synapsen bilden den größten Teil der Synapsen im menschlichen Nervensystem. Auf der ultrastrukturellen Ebene wird zwischen der präsynaptischen axonalen Endigung, dem 20-50 nm weiten synaptischen Spalt und der postsynaptischen Spezialisierung unterschieden. Die prä- und postsynaptischen Membranen werden durch Zelladhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixproteine miteinander verbunden (Craig *et al.*, 2006, Dean *et al.*, 2006, Dityatev *et al.*, 2006, Waites *et al.*, 2005). Eine präsynaptische Endigung beinhaltet mehrere hundert, 50 nm große, Neurotransmitter-gefüllte synaptische Vesikel, welche nahe einer spezialisierten präsynaptischen Region, der aktiven Zone „geclustert“ vorliegen. Wird die präsynaptische Endigung durch ein Aktionspotential depolarisiert, werden spannungs-

abhängige Ca^{2+} -Ionenkanäle geöffnet. Der Ca^{2+} -Einstrom löst die Exozytose der synaptischen Vesikel aus, wobei diese zur aktiven Zone transferiert werden und mit der Plasmamembran fusionieren um ihren Neurotransmitterinhalt in den synaptischen Spalt auszuschütten. Die Neurotransmitter binden auf der postsynaptischen Membran an spezifische Rezeptoren, wobei es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle handelt, welche sich durch die Ligandenbindung öffnen und so zu einer Veränderung des postsynaptischen Potentials führen. Somit werden an der chemischen Synapse elektrische Signale in Form von Aktionspotentialen in chemische Signale (Neurotransmitter) und an der postsynaptischen Membran wieder in elektrische Impulse umgewandelt. Im Vergleich zu elektrischen Synapsen werden an chemischen Synapsen Signale amplifiziert. Durch die Entladung nur eines synaptischen Vesikels werden mehrere tausend Neurotransmitter entladen. Gewöhnlich werden zwei Neurotransmitter für die Öffnung eines postsynaptischen Ionenkanals benötigt (Kandel *et al.*, 2000), wodurch es kleinen präsynaptischen Endigungen ermöglicht wird, größere postsynaptische Zellen zu depolarisieren.

Obwohl die bisher beschriebenen Merkmale bei allen chemischen Synapsen vorzufinden sind, gibt es doch Variationen hinsichtlich der Morphologie und Funktion. Zum einen werden je nach Neurotransmitter und postsynaptischen Rezeptoren inhibitorische und exzitatorische Synapsen voneinander unterschieden (vgl. 1.2.1, 1.2.2) und zum anderen variiert die Größe von Prä- und Postsynapsen entsprechend ihrer synaptischen Aktivität (vgl. 1.3).

1.2.1 Inhibitorische Synapsen

Morphologisch können inhibitorische Synapsen von exzitatorischen Synapsen durch das Vorhandensein von einem schmalen 20 nm breiten synaptischen Spalt, nach der Fixierung oval erscheinenden synaptischen Vesikeln und einer kleinen $1 \mu\text{m}^2$ großen aktiven Zone unterschieden werden (Kandel *et al.*, 2000). Prä- und vor allem postsynaptische Spezialisierungen sind im Vergleich zu exzitatorischen Synapsen weniger prominent ausgebildet, weswegen inhibitorische auch als symmetrische Synapsen bezeichnet werden. Inhibitorische Synapsen sind hauptsächlich am Soma, Axonhügel und dendritischen Schaft und nur zu einem geringen Teil auf dendritischen *Spines* (Megias *et al.*, 2001) lokalisiert.

Inhibitorische synaptische Transmission wird vor allem mit Hilfe der Neurotransmitter GABA (γ -Aminobuttersäure) und Glyzin im adulten ZNS vermittelt, wobei GABA der am meisten genutzte inhibierende Neurotransmitter im Gehirn ist. Für die Ausübung der inhibierenden Wirkung der Neurotransmitter binden diese an korrekt in der Postsynapse verankerte Neurotransmitterrezeptoren. Die schnelle GABA vermittelte Inhibition wird über die Bindung an ionotrope, Cl^- -Ionen permeable GABA_A -Rezeptoren hervorgerufen. Speziell in der Retina wird zusätzlich der ionotrope, Cl^- -Ionen permeable GABA_C -Rezeptor exprimiert. Die langsame GABA vermittelte Inhibition basiert auf der Bindung an metabotrope GABA_B -Rezeptoren, welche meist über eine *Second messenger* Kaskade zur Öffnung eines Kaliumkanals führen. Glyzin bindet an ionotrope, Cl^- -Ionen permeable Glyzin-Rezeptoren. Durch die Aktivierung der inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren wird die postsynaptische Zelle durch den Einstrom von Cl^- -Ionen, im Falle der ionotropen

Neurotransmitterrezeptoren, oder durch den Ausstrom von K^+ -Ionen, im Falle der metabotropen Neurotransmitterrezeptoren, hyperpolarisiert. In der frühen Embryonalentwicklung hingegen wirken GABA und Glyzin aufgrund einer veränderten Cl^- - und K^+ -Ionenverteilung depolarisierend. Durch die Expression eines neuronalen Cl^- - und K^+ -Ionentransporters (KCC2) wird in reifen Neuronen die Ionenverteilung insofern verändert, als dass die GABA und Glyzin vermittelte Öffnung von Ionenkanälen zum oben beschriebenen hyperpolarisierten Effekt führt (Rivera *et al.*, 1999, Kandel *et al.*, 2000, Jacob *et al.*, 2008).

Glyzin-Rezeptoren werden durch direkte Bindung an das Gerüstprotein Gephyrin mit dem Mikrotubulizytoskelett in der inhibitorischen Postsynapse zentriert und verankert (Schmitt *et al.*, 1987, Kirsch *et al.*, 1991, Kneussel *et al.*, 1999). Außerdem verbindet Gephyrin über die Interaktion mit Aktinbindeproteinen wie etwa Mena/VASP die gebundenen Neurotransmitterrezeptoren mit dem Aktinzytoskelett. Auch $GABA_A$ -Rezeptoren werden durch die Bindung an Gephyrin in der Postsynapse verankert (Jacob *et al.*, 2008, Treter *et al.*, 2008). Außerhalb der Synapse binden $GABA_A$ -Rezeptoren über das zur ERM (Ezrin, Radixin, Moesin)-Proteinfamilie gehörende Radixin an das Aktinzytoskelett (Loebrich *et al.*, 2006). Als weiterer Faktor für die genaue Positionierung und Funktion von $GABA_A$ -Rezeptoren in der Postsynapse wird das Zelladhäsionssystem bestehend aus dem präsynaptischen α -Neurexin und dem postsynaptischen Neuroligin 2 (NLG2, vgl. 1.4) diskutiert. Beide Proteine induzieren eine lokale Akkumulation von Gephyrin und $GABA_A$ -Rezeptoren (Graf *et al.*, 2004, Chih *et al.*, 2005, Graf *et al.*, 2006, Chubykin *et al.*, 2007). Zusätzlich wird in NLG bzw. Neurexin defizienten Tieren eine reduzierte GABAerge synaptische Transmission sowie eine reduzierte Anzahl an inhibitorischen Synapsen und geclusterten Rezeptoren im Hirnstamm beobachtet (Varoqueaux *et al.*, 2006, Missler *et al.*, 2003).

1.2.2 Exzitatorische Synapsen

Als exzitatorische Neurotransmitter können Aspartat, Noradrenalin, Dopamin, Serotonin und Glutamat wirken, wobei Glutamat den am meisten verbreiteten Neurotransmitter des ZNS darstellt. Glutamat aktiviert metabotrope und ionotrope ligandenabhängige Neurotransmitterrezeptoren, wobei die ionotropen Glutamatrezeptoren für die schnelle Glutamat-vermittelte Antwort verantwortlich sind. Bei den ionotropen ligandenabhängigen Neurotransmitterrezeptoren wird aufgrund der unterschiedlichen Reaktion bezüglich Glutamat und pharmakologischen Agonisten unterteilt in α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptoren (AMPA), N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (NMDAR) und Kainat-Rezeptoren (Kandel *et al.*, 2000, Lau *et al.*, 2007).

Metabotrope Glutamatrezeptoren werden aufgrund ihrer spezifischen Bindung an G-Proteine in drei Gruppen mGluRI-III unterteilt und tragen über die Aktivierung von *Second messenger* Kaskaden zur langsamen und modulierenden Glutamat-vermittelten Antwort und zu bestimmten Formen der synaptischen Plastizität bei (mGluR vermittelte *Long-term depression*, LTD, vgl. 1.3, Bellone *et al.*, 2008).

Ionotrope AMPAR werden aus verschiedenen Kombinationen von GluR1-4 Rezeptoruntereinheiten zu Homo- oder Heterotetrameren assembliert. Die Auswahl der

Untereinheiten hängt dabei von der Gehirnregion, dem Entwicklungsstadium und von der synaptischen Aktivität ab und beeinflusst die Leitfähigkeit, den Transport und die Stabilität des Rezeptors. In reifen hippokampalen Synapsen bestehen AMPAR vor allem aus GluR1/GluR2-Untereinheiten und leiten Na^+ - und K^+ -Ionen (Kandel *et al.*, 2000, Derkach *et al.*, 2007). Durch die Bindung von Glutamat öffnet sich der AMPAR und führt zu einer durch den Na^+ -Ioneneinstrom verursachten Depolarisierung der Postsynapse. Wird etwa die GluR2-Untereinheit gegen eine andere Untereinheit ausgetauscht, führt dies, zusätzlich zu einer erhöhten Leitfähigkeit von Na^+ - und K^+ -Ionen, zu einer Ca^{2+} -Leitfähigkeit, wodurch diese Rezeptoren zur Etablierung von *Long-term potentiation* (LTP, vgl. 1.3), einer Form der synaptischen Plastizität, beitragen (Malenka *et al.*, 2004, Derkach *et al.*, 2007).

NMDAR bilden aus zwei, teilweise drei Untereinheiten (NR1, NR2A-D, NR3A-B) zusammengesetzte, heterotetramere Komplexe, wobei vor allem 2NR1/2NR2-Komplexe verbreitet sind (Köhr *et al.*, 2006). Ähnlich der AMPAR-Situation ist die Wahl der Untereinheiten abhängig vom Entwicklungsstadium sowie der Lokalisation und kann so die Stabilität und die Leitfähigkeit des Rezeptors regulieren. NMDAR benötigen zur Öffnung ihres Ionenkanals die Bindung von Glutamat und Glyzin als Kofaktor, um so Na^+ -, K^+ -Ionen und zusätzlich Ca^{2+} -Ionen zu leiten (Kleckner *et al.*, 1988). Allerdings unterscheiden sich NMDAR zusätzlich zur Ca^{2+} -Leitfähigkeit insofern von AMPAR, als dass sie liganden- und spannungsabhängig sind. Dies basiert auf Mg^{2+} -Ionen, welche die Kanalpore während des Ruhepotentials blockieren. Nur durch eine gleichzeitige Bindung von Glutamat und einer partiellen, durch AMPAR verursachten Depolarisierung der Postsynapse wird diese Mg^{2+} -Blockade entfernt, wodurch die Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionen durch den NMDAR strömen und Signalkaskaden aktivieren können. Dadurch wirken NMDAR als Koinzidenzdetektoren, welche den Ionenstrom nur ermöglichen, wenn die prä- und postsynaptische Zelle gleichzeitig erregt sind. Im Gegensatz zu AMPAR, welche den frühen Anteil des erregenden postsynaptischen Potentials hervorrufen, vermitteln NMDAR somit die späte Komponente des erregenden postsynaptischen Potentials.

Über die Funktion von ionotropen Kainat-Glutamatrezeptoren ist bisher am wenigsten bekannt. Fünf verschiedene Untereinheiten (GluK1-5) können in verschiedenen Kombinationen funktionelle Rezeptoren bilden. Untersuchungen lassen auf einen modulatorischen Einfluss auf die GABAerge sowie glutamaterge synaptische Transmission schließen (Jane *et al.*, 2009).

Ultrastrukturell weisen exzitatorische Synapsen präsynaptische Endigungen mit angereicherten, nach der Fixierung rund erscheinenden synaptischen Vesikeln und einer aktiven Zone von 1-2 μm^2 auf. Der synaptische Spalt ist im Vergleich zu inhibitorischen Synapsen mit 30 nm etwas breiter. Morphologisch sehr auffällig ist eine elektronendichte, durchschnittlich 300-400 nm lange und 30-50 nm dicke Struktur der postsynaptischen Membran, die postsynaptische Dichte (PSD), welche viele Rezeptoren, Gerüstproteine, Zelladhäsionsmoleküle, Zytoskelettelemente und Signaltransduktionsproteine enthält. Aufgrund dieser elektronendichten Struktur im Vergleich zur Präsynapse werden exzitatorische Synapsen auch asymmetrische Synapsen genannt. Eine durchschnittliche PSD

von 360 nm Länge hat in quantitativen Analysen eine totale molekulare Masse von $1,1 \pm 0,36$ GDa ergeben. Nimmt man an, dass in der PSD nur 100 kDa große Proteine vorkommen, dann bestünde die PSD aus 10.000 verschiedenen Proteinen oder 100 Kopien von 100 verschiedenen Proteinen (Chen *et al.*, 2005, Sheng *et al.*, 2007). Dies erklärt die elektronendichte Erscheinungsform der PSD.

Exzitatorische Synapsen sind auf Dendriten, aber vor allem auf dendritischen Dornen (*Spines*) lokalisiert. Bei den dendritischen *Spines* handelt es sich um kleine, etwa 0,5-2 μm lange, membranöse dendritische Ausstülpungen, an deren Spitze die PSD lokalisiert ist. Sie werden durch einen dünnen Hals mit dem Dendriten verbunden und verhindern so die Diffusion von Molekülen aus und in den *Spine*, wodurch die *Spines* ein von anderen Synapsen abgegrenztes biochemisches und elektrisches Kompartiment bilden. Die Form von *Spines* variiert von einer dünnen, pilzförmigen bis zu einer untersetzten Erscheinung. Ebenso variiert die Größe und die Dichte der *Spines*, wobei eine Dichte von 1-10 *Spines* pro μm Dendrit in Hauptneuronen beschrieben wurde (Sorra *et al.*, 2000). Die Größe der *Spines* ist hoch korreliert mit der PSD-Größe, der assoziierten präsynaptischen aktiven Zone und der Stärke der synaptischen Transmission. *Spines* mit großen Köpfen werden allgemein mit einer höheren Expression an Neurotransmitterrezeptoren und einer relativ hohen Stabilität hinsichtlich ihrer Mobilität in Verbindung gebracht. Kleinere *Spines* sind meist mobiler und weniger stabil und bilden im Gegensatz zu größeren *Spines* weniger starke synaptische Verbindungen (Matsuzaki *et al.*, 2004, Holtmaat *et al.*, 2006). Allgemein wird die Dichte, Größe und Form der *Spines* mit plastischen Veränderungen der Synapsen (vgl. 1.3) und interneuronaler Konnektivität verbunden (Kandel *et al.*, 2000, Sheng *et al.*, 2007).

Eine unterschiedliche Verteilung von Rezeptoren und anderen Proteinen bedingt die laterale Organisation der PSD. So sind AMPAR vor allem in der Peripherie der PSD und NMDAR im PSD-Zentrum lokalisiert (Kharazia *et al.*, 1997). Dies spiegelt die größere Mobilität der AMPAR in der Plasmamembran und deren Austausch mit extrasynaptischen AMPAR wieder. Desweiteren weist die PSD eine laminare Organisation auf. Die erste Ebene wird von Ionenkanälen, transmembranen Zelladhäsionsmolekülen und den C-terminalen Enden der Glutamaterezeptoren gebildet und ist 12 nm in die PSD hineingestreckt. Die zweite Ebene ist mit Gerüstproteinen der MAGUK (*Membrane associated guanylate kinase homologs*)-Familie, v.a. PSD-95 (*Postsynaptic density protein 95*), und die dritte Ebene mit den Gerüstproteinen GKAP und Shank angereichert, wobei sich die dritte Ebene ca. 25 nm entfernt von der Plasmamembran im Zytosol der PSD befindet (Valtschanoff *et al.*, 2001) und weiterhin mit dem Aktinzytoskelett verbunden ist. Durch die Bindung von verschiedenen zytoplasmatischen Proteinen und Enzymen an die verschiedenen Gerüstebenen, organisieren die Gerüstproteine die PSD in bestimmte Signalkaskadenkomplexe, um Informationen schnell zu verarbeiten und weiterzuleiten. Über verschiedene Domänen der PSD-Proteine, wie etwa die PDZ (PSD-95, Dlg und ZO1)-Domäne, können die jeweiligen Proteine multimerisieren und weitere Supramodulkomplexe bilden, um so dynamisch auf die jeweiligen Informationen zu reagieren (Feng *et al.*, 2009). Eine wichtige Eigenschaft der PSD, trotz der molekularen Komplexität, ist weiterhin ihre dynamische Regulation hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Größe je nach Entwicklungsstand und Aktivität (vgl. 1.3).

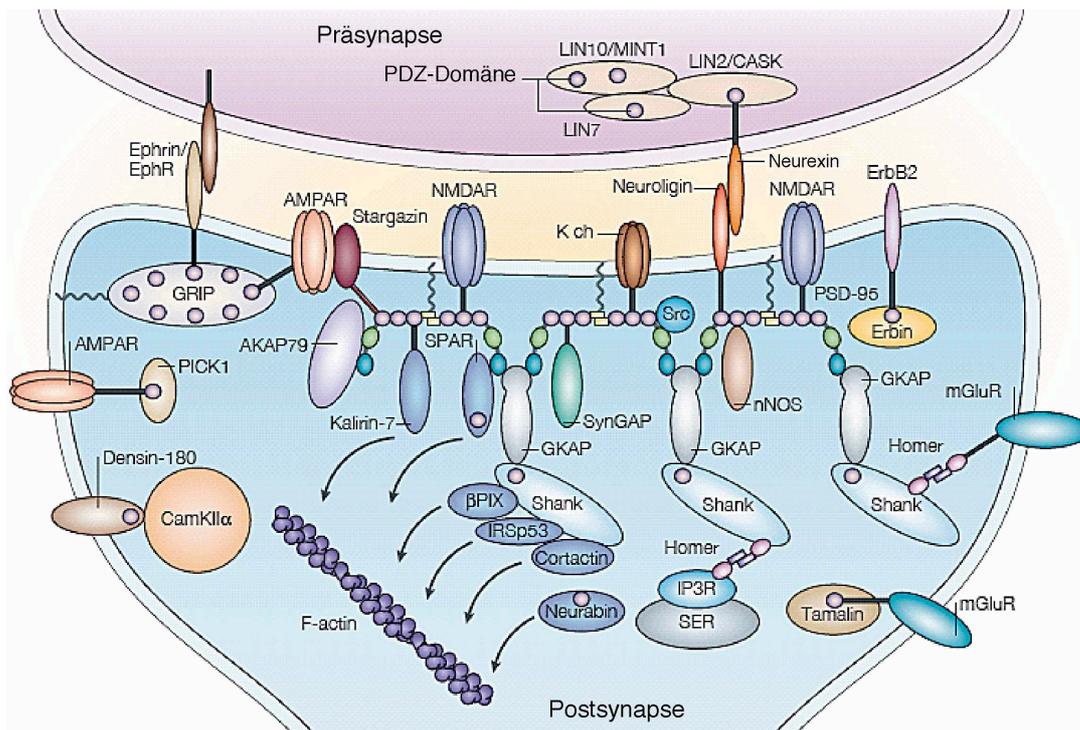


Abb. 1.1: Schema einer exzitatorischen Synapse.

Dargestellt ist die Prä- und Postsynapse mit einer Auswahl an Proteinen, welche bei der Organisation der exzitatorischen Synapse involviert sind. Verändert nach Kim und Sheng, 2004.

Glutamatrezeptoren werden in der PSD über die Interaktion mit verschiedenen Proteinen mit dem Zytoskelett verankert und an Signalwege angeschlossen. So bindet etwa der C-Terminus der NR1/NR2A enthaltenden NMDAR direkt an eine PDZ-Domäne des Gerüstproteins PSD-95, NR1/NR2B enthaltende NMDAR hingegen an eine PDZ-Domäne des Gerüstproteins SAP102 (*Synapse associated protein 102*) (Lau *et al.*, 2007). Außerdem interagiert PSD-95 indirekt über das TARP (*Transmembrane AMPA receptor-binding protein*)-Protein Stargazin mit AMPAR. Weiterhin binden AMPAR PDZ-Domänen-haltige Proteine wie SAP-97 (*Synapse associated protein 97*), PICK (*Protein kinase C-interacting protein*) oder GRIP (*Glutamate receptor interacting protein*). Kainat-Rezeptoren können ebenfalls durch die Bindung an PSD-95 verankert werden (Garcia *et al.*, 1998). Metabotrope Glutamatrezeptoren sind über die Bindung an Homer mit dem Gerüstprotein Shank stabilisiert. Neben der Bindung von postsynaptischen Gerüstproteinen können Glutamatrezeptoren über die Bindung von Zelladhäsionsmolekülen oder sekretierten Molekülen in ihrer Verankerung und in ihrem *Clustering* moduliert werden. Extrazellulär bindet beispielsweise N-Cadherin (*Neuronal Cadherin*) an AMPA-Rezeptoren (Saglietti *et al.*, 2007) und die Tyrosinkinase EphB an NMDA-Rezeptoren (Dalva *et al.*, 2000). Außerdem beeinflusst das Neuroligin-Neurexin-Zelladhäsionssystem das *Clustering* von Glutamatrezeptoren (Graf *et al.*, 2004; Nam *et al.*, 2005; Chih *et al.*, 2005). Weiterhin induzieren Proteine der Pentraxin-Familie wie das präsynaptische sekretierte NP1 (*Neuronal pentraxin 1*) gemeinsam mit dessen Rezeptor (NPR, *Neuronal pentraxin receptor*) sowie das ebenfalls präsynaptische sekretierte Narp (*Neuronal activity-regulated pentraxin*) das *Clustering* der AMPAR (O'Brien *et al.*, 1999; Sia *et al.*, 2007).

1.3 Synaptische Plastizität

Eine aktivitätsabhängige Veränderung in der Stärke der synaptischen Transmission wird als synaptische Plastizität bezeichnet. Zwei Beispiele dazu sind langanhaltende (Stunden-Wochen) Phänomene wie LTP (*Long-term potentiation*) und LTD (*Long-term depression*), welche als zelluläre und molekulare Modelle für Lernen und Gedächtnisbildung im Säugetierhirn herangezogen werden (Bliss *et al.*, 1973, Feldman *et al.*, 2009). LTP wird durch kurze, hochfrequente und LTD durch lange, niedrigfrequente Stimulation induziert. Hierbei induziert der Ca^{2+} -Einstrom durch NMDAR die Plastizität, die sich u.a. mit Hilfe einer durch Insertion oder Elimination der Rezeptoren veränderten AMPAR-Konzentration an Synapsen manifestiert. Morphologisch werden diese Veränderungen durch Synapsenbildung, -elimination und durch Anpassungen in der *Spine*-Form, -zahl und -größe ausgedrückt (Strukturelle Plastizität, Alvarez *et al.*, 2007, Feldman *et al.*, 2009).

Verschiedene Studien konnten demonstrieren, dass *Spines* nicht statisch sind, sondern sich je nach Alter und sensorischer Stimulation bezüglich ihrer Zahl, Dichte und Struktur verändern, wobei der *Spine-Turnover* mit dem Alter abnimmt und *Spines*, die über Tage und Wochen stabil sind, in ihrem Volumen zunehmen und Synapsen ausbilden (Grutzendler *et al.*, 2002, Trachtenberg *et al.*, 2002, Holtmaat *et al.*, 2005, Alvarez *et al.*, 2007). Das *Spine*-Volumen korreliert dabei mit der Größe der PSD und der AMPAR-Konzentration, welches eine Verstärkung der synaptischen Transmission reflektieren kann (Harris *et al.*, 1989, Nusser *et al.*, 1998, Knott *et al.*, 2006). So konnte durch eine LTP-Induktion in hippokampalen Gehirnschnitten ein fast doppelter Anstieg des *Spine*-Volumens und der AMPAR-vermittelten Ströme beobachtet werden (Matsuzaki *et al.*, 2001, Matsuzaki *et al.*, 2004). Zusätzlich wird eine LTP-Induktion mit dem Wachstum neuer Filopodien und *Spines* und eine LTD-Induktion mit einem Verschwinden der *Spines* assoziiert (Engert *et al.*, 1999, Nägerl *et al.*, 2004).

Auf der molekularen Ebene wird die Plastizität über eine unterschiedliche Konzentration und Zusammensetzung der Glutamatrezeptoren sowie deren veränderte Mobilität und Verankerung in der PSD ausgedrückt. Für die Aufrechterhaltung oder Konsolidierung der Plastizität werden in der späten Phase Transkriptions- und Translationsprozesse bestimmter Gene bzw. Proteine aktiviert (Derkach *et al.*, 2007, Bramham *et al.*, 2007).

Bei der NMDAR-vermittelten LTP führt eine NMDAR-Aktivierung bei gleichzeitiger postsynaptischer Depolarisierung zu einem Ca^{2+} -Einstrom durch die NMDAR und dadurch zu einer Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung von CaMKII (*Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II*, Fukunaga *et al.*, 1993). CaMKII phosphoryliert die AMPAR-Untereinheit GluR1 an Serin 831, wodurch die AMPAR-Leitfähigkeit erhöht wird (Barria *et al.*, 1997, Benke *et al.*, 1998). Weiterhin sind diverse andere Signalkaskaden mit der LTP-Induktion involviert, beispielsweise führt die Phosphorylierung der GluR1-Untereinheit an Serin 845 durch Proteinkinase A (PKA) zu einer erhöhten *Open Channel Probability* des Rezeptors und zu einer AMPAR-Insertion in der Plasmamembran (Roche *et al.*, 1996, Banke *et al.*, 2000, Man *et al.*, 2007). Außerdem werden während der LTP-Induktion durch eine Rekrutierung wie etwa der GluR2-fehlenden AMPAR die intrinsischen Eigenschaften von synaptischen AMPAR, u.a. bezüglich der Ca^{2+} -Leitfähigkeit und der *Open Channel Probability*, verändert

und die AMPAR-Konzentration erhöht (Burnashev *et al.*, 1992, Swanson *et al.*, 1997, Plant *et al.*, 2006). Neben den AMPAR tragen auch NMDAR zur LTP-Expression bei, wobei die Potenzierung der NMDAR-Antwort etwas später als die AMPAR-Antwort erfolgt (Grosshans *et al.*, 2002, Watt *et al.*, 2004). Der Beitrag der NMDAR ist im Vergleich zu den AMPAR viel weniger erforscht, erfolgt aber ebenfalls durch eine Aktivierung verschiedener Kinasen. So erhöht die PKC die *Open Channel Probability* und zusammen mit der Tyrosinkinase Src die Insertion von NR2A-enhaltenden-NMDAR (Grosshans *et al.*, 2002). Ferner wurde beobachtet, dass während der LTP-Expression extrasynaptische NR2D-NMDAR in die Synapse rekrutiert werden (Harney *et al.*, 2008)

In der Abwesenheit von Plastizität-induzierenden Stimuli unterliegen AMPAR einem konstitutiven, perisynaptischen *Cycling* durch Endo- und Exozytose, womit die Dichte und Konzentration der AMPAR in der Plasmamembran beeinflusst werden kann (Ehlers *et al.*, 2000, Passafaro *et al.*, 2001). Nach erfolgter Exozytose diffundieren AMPAR lateral in die PSD, wo sie durch die Interaktion mit intrazellulären Gerüstproteinen verankert werden können. Durch LTP-induzierende Stimuli werden AMPAR vermehrt exozytiert, wobei vor allem AMPAR, welche eine GluR1-Untereinheit enthalten, in die Plasmamembran inseriert werden (Hayashi *et al.*, 2000, Shi *et al.*, 2001, Park *et al.*, 2004). Die AMPAR-Diffusion ist sehr sensitiv gegenüber lokalen Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration (Borgdorff *et al.*, 2002), weshalb die LTP-induzierenden Stimuli zusätzlich die laterale Diffusion von GluR1- und GluR2-AMPA reduzieren (Newpher *et al.*, 2008). Weiterhin kann die Mobilität von AMPAR durch interagierende Proteine reguliert werden, die AMPAR synaptisch verankern. So ist etwa die Phosphorylierung von Stargazin oder PSD-95 durch verschiedene Kinasen wie PKA, CaMKII oder PKC mit einer vermehrten synaptischen Lokalisation der AMPAR und der Ausbildung von LTP impliziert (Tomita *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2007). Für die Verankerung der AMPAR ist weiterhin die Interaktion mit dem Zytoskelett über das Proteinnetzwerk der PSD essentiell. Vor allem das Aktinzytoskelett als hauptsächlicher Zytoskelettbestandteil der dendritischen *Spines* beeinflusst durch die Organisation der *Spine*-Morphologie und durch die Organisation von Membranmikrodomänen die Diffusion von Rezeptoren (Kusumi *et al.*, 2005, Alvarez *et al.*, 2007). Wird beispielsweise F-Aktin depolymerisiert, so folgt eine 40% Reduktion von synaptischen AMPAR- und NMDAR-Clustern (Allison *et al.*, 2000). Desweiteren können LTP- oder LTD-induzierende Stimuli mit einer Aktinpolymerisation oder -depolymerisation korreliert werden (Okamoto *et al.*, 2004, Lin *et al.*, 2005).

Die für die späte Phase der LTP-Expression benötigten Transkriptions- und Translationsprozesse werden durch Signalmoleküle und deren Signalkaskaden, beispielsweise durch PKA-, CaMKIV- und MAPK-Signalkaskaden und dem hauptsächlichen Transkriptionsfaktor CREB induziert (Lynch *et al.*, 2004, Malenka *et al.*, 2004). Bei den neusynthetisierten Proteinen kann es sich um AMPAR-Untereinheiten, Gerüstproteine oder andere regulatorische Proteine handeln, die für die LTP-Expression benötigt werden (Derkach *et al.*, 2007). Interessanterweise werden mRNAs etwa kodierend für CaMKII und GluR1/2 als Antwort auf neuronale Aktivität in Dendriten transportiert und dort lokal mit Hilfe der in Dendriten und in *Spines* vorhandenen Polyribosomen, Translationsfaktoren und -regulatoren

translatiert (Mayford *et al.*, 1996, Tang *et al.*, 2002, Asaki *et al.*, 2003, Schumann *et al.*, 2006, Grooms *et al.*, 2006).

Um Veränderungen der Postsynapse mit der präsynaptischen Seite zu koordinieren, werden verschiedene retrograde Signale wie NO oder aber auch Zelladhäsionsmoleküle diskutiert (Malenka *et al.*, 2004, Futai *et al.*, 2007).

Es existieren verschiedene Formen der LTD. Hinsichtlich NMDAR-abhängiger LTD führt der Ca^{2+} -Einstrom durch NMDAR zu einer Aktivierung von Proteinphosphatasen, wie Calcineurin (Mulkey *et al.*, 1994), welche den C-terminalen Teil der AMPAR-Untereinheit GluR1 dephosphorylieren und etwa durch eine Dephosphorylierung an Serin 845 die *Open Channel Probability* des Rezeptors reduzieren. Neben Veränderungen im Phosphorylierungsgrad wird außerdem durch eine erhöhte Internalisierung die Menge an AMPAR an der Oberfläche reduziert (Banke *et al.*, 2000, Ehlers *et al.*, 2000). Die erhöhte Dynamin- und Clathrin-abhängige Internalisierung von AMPAR (Carroll *et al.*, 1999, Man *et al.*, 2000) kann durch eine erhöhte laterale Diffusion des Rezeptors in der Plasmamembran bewirkt werden, indem Proteine, wie PSD-95 oder GRIP, die die Rezeptoren an der Membran verankern und in ihrer Diffusion einschränken, durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert werden (Colledge *et al.*, 2003). Die damit verursachte fehlende Verankerung führt zu einer erhöhten lateralen Rezeptordiffusion zu perisynaptischen Stellen und dortiger Endozytose (Newpher *et al.*, 2008). Im Kontrast zu AMPAR sind NMDAR in ihrer Mobilität weniger empfindlich gegenüber Veränderungen der synaptischen Aktivität (Groc *et al.*, 2004), können aber trotzdem als Antwort auf eine LTD-Induktion Dynamin- und Clathrin-abhängig internalisiert werden (Lavezzari *et al.*, 2003, Montgomery *et al.*, 2005, Lau *et al.*, 2007).

Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) sind außerhalb der PSD in der extrasynaptischen Plasmamembran lokalisiert und können über ein *Spill Over* von Glutamat aktiviert werden, wobei verschiedene Formen der mGluR-vermittelten LTD-Induktion beschrieben sind (Bellone *et al.*, 2008). Die am besten charakterisierte Form umfasst die der Gruppe 1 vermittelte mGluR-LTD-Induktion. Durch die Aktivierung der postsynaptischen mGluR1 und mGluR5 (Gruppe 1) wird das intrazellulär an den Rezeptor gebundene G_q -Protein aktiviert, durch die aktivierte Phospholipase C (PLC) Diazylglyzerin (DAG) und Inositol-1,4,5-tris-Phosphat (IP3) produziert und somit eine Ca^{2+} -Ausschüttung von intrazellulären Speichern sowie eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) induziert. Zusätzlich zu der anschließenden Aktivierung von MAPK/ERK-Signalkaskaden können mGluR der Gruppe 1 Signalkaskaden des Phosphoinositid-3-Kinase/Akt/*Mammalian target of rapamycin* (PI3K/Akt/mTOR)- Signalweges aktivieren. Beide Signalwege regulieren die Translation, etwa von AMPAR-Untereinheiten, wodurch die Mobilität und Leitfähigkeit von AMPAR beeinflusst werden kann (Ju *et al.*, 2004, Derkach *et al.*, 2007, Bellone *et al.*, 2008). Weiterhin wird durch die Aktivierung der Gruppe 1 mGluR eine Umverteilung und eine erhöhte Internalisierung von AMPAR induziert (Wang *et al.*, 2000, Malenka *et al.*, 2004).

Die Cannaboidrezeptor des Typ 1 (CB1)-vermittelte LTD (CB1-LTD) kann durch die Aktivierung von Ionenkanälen und mGluR der Gruppe 1 zu einer postsynaptisch erhöhten Ca^{2+} -Konzentration führen und exprimiert werden. Hierbei werden Endocannabinoide

synthetisiert, welche retrograd durch den synaptischen Spalt diffundieren und an präsynaptische CB1-Rezeptoren binden, um dort eine Reduktion der Neurotransmitterausschüttung zu verursachen, indem Ca^{2+} -Kanäle inhibiert oder K^{+} -Kanäle aktiviert werden (Bellone *et al.*, 2008).

1.4 Neuroligin

Das Typ 1 transmembrane Zelladhäsionsmolekül Neuroligin (NLG) konnte als postsynaptischer Bindepartner vom präsynaptischen transmembranen Zelladhäsionsmolekül Neurexin (NRX) identifiziert werden (Ichtchenko *et al.*, 1995). In Säugetieren gibt es 4 Neuroligin Gene *NLG1-4*, wobei in Menschen zusätzlich auf dem Y-Chromosom das Gen *NLG4Y* oder *NLG5* lokalisiert ist (Ichtchenko *et al.*, 1996, Bolliger *et al.*, 2001, Jamain *et al.*, 2003). Sequenzanalysen ergeben eine hohe Konservierung v.a. der Extrazellulärdomäne von NLG, wobei der jeweilige Homologiegrad zwischen NLG1, NLG3, NLG4 und NLG5 höher ist als gegenüber NLG2. NLG wird vor allem im Gehirn und spezifisch in Neuronen exprimiert, wobei die Expression postnatal ansteigt und NLG4 nur sehr schwach im Gehirn exprimiert wird (Ichtchenko *et al.*, 1995, Varoqueaux *et al.*, 2006). Die extrazelluläre N-terminale Domäne von NLG ist zu einem großen Teil homolog zur Acetylcholinesterase (AChE), aber ohne für die Aktivität wichtigen Aminosäurereste im aktiven Zentrum, wodurch NLG enzymatisch inaktiv ist. Über diese Domäne bilden NLG konstitutive Homodimere und interagieren zusätzlich mit monomeren Neurexinmolekülen, um einen Ca^{2+} abhängigen, heterotetrameren transsynaptischen Komplex auszubilden. Die AChE-Domäne wird durch eine hoch glykosylierte Region mit der transmembranen Domäne verbunden, an welche sich eine kurze C-terminale, intrazelluläre Region mit einer PDZ-Bindedomäne anschließt. Die Bindeaffinität und Spezifität zwischen NRX und NLG wird durch alternatives Spleißen vermittelt. NLG kann an zwei Spleißstellen A und B in der AChE-Domäne und NRX an fünf Stellen 1-5 in der extrazellulären Domäne gespleißt werden. Hierbei sind vor allem NLG1-Spleißvarianten an glutamatergen Synapsen dominierend, welche das Insert B tragen und spezifisch an β -NRX ohne das 4. Insert binden, wohingegen β -NRX mit dem 4. Insert an NLG ohne das Insert B an GABAergen Synapsen binden. Alle anderen NLG binden an α - und β -NRX. Durch alternatives Spleißen besteht also die Möglichkeit die Lokalisation von NLG an Synapsen zu beeinflussen (Boucard *et al.*, 2005, Chih *et al.*, 2006), wobei NLG1 vor allem an exzitatorischen (Song *et al.*, 1999), NLG2 an inhibitorischen (Varoqueaux *et al.*, 2004) und NLG3 an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen lokalisiert ist (Budreck *et al.*, 2007).

Weiterhin kann die synaptische Spezifität von NLG-Isoformen über eine unterschiedliche Rekrutierung von intrazellulären Bindeproteinen vermittelt werden. Ein Hinweis dafür ist die weniger konservierte C-terminale Region von NLG (Ichtchenko *et al.*, 1995). Desweiteren binden NLG ähnlich wie NRX intrazellulär postsynaptische Proteine über ihre PDZ-Bindedomäne, wie etwa das der MAGUK-Familie angehörige PSD-95 (Irie *et al.*, 1997, vgl. 1.5) oder S-SCAM (*Synaptic scaffolding protein*, Iida *et al.*, 2004). Über diese Bindung wird NLG mit dem ebenfalls an PSD-95 bindenden NMDAR oder K^{+} -Kanal verbunden, sowie im

Falle von S-SCAM mit β -Catenin-Cadherin basierter Zelladhäsion und deren Signalwegen. Darüber hinaus erfolgt über die Bindung an PSD-95 eine Verbindung mit den Gerüstproteinen der PSD, GKAP und Shank (vgl. 1.2.2). Für die postsynaptische Bindung von NLG2 an inhibitorischen Synapsen wird eine Interaktion mit Gephyrin und GABA_A-Rezeptoren (Graf *et al.*, 2004, Chih *et al.*, 2005, Graf *et al.*, 2006, Chubykin *et al.*, 2007) vermutet.

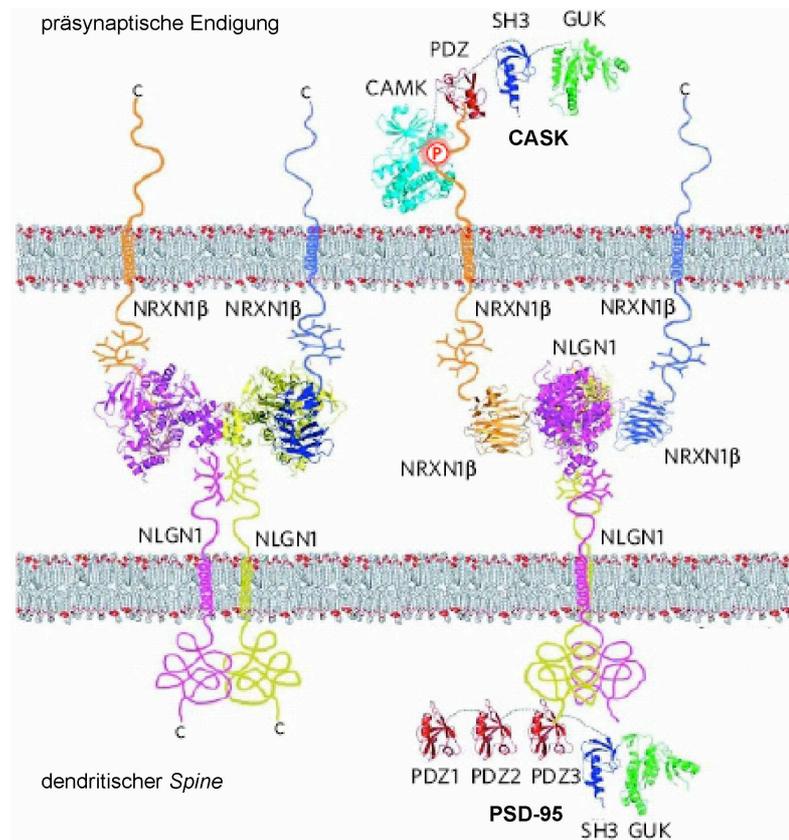


Abb. 1.2: Strukturmodell des transsynaptischen Komplexes von NLG1 und β -NRX1.

Der NLG-NRX-Komplex ist in zwei Orientierungen zu sehen. Links: Das NLG1-Dimer bindet präsynaptisch lokalisierte β -NRX-Monomere über die Azetylcholinesterase-Domäne. Rechts: In der 90° Rotation vom linken Teil der Abbildung wird das räumliche Arrangement des Komplexes im synaptischen Spalt sowie die Bindung der intrazellulären Proteinen CASK und PSD-95 an die PDZ-Bindedomäne von NRX und NLG verdeutlicht. CASK: Ca^{2+} /Calmodulin-dependent serine protein kinase. SH3: src homology domain, GUK: Guanlyate kinase domain. Verändert nach Südhof, 2008.

Der Einfluss von NLG an inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen konnte durch die Expression von NLG in nicht-neuronalen HEK293-Zellen und gleichzeitiger Kokultur mit Neuronen gezeigt werden, da hier präsynaptische Endigungen an Kontaktstellen beider Zelltypen durch NLG induziert werden können (Scheiffele *et al.*, 2000, Graf *et al.*, 2004). Zusammen mit weiteren Experimenten, bei denen eine NLG Überexpression die Bildung neuer Synapsen induziert, während der NLG-Knockdown die Bildung neuer Synapsen reduziert, kann NLG eine synaptogenetische Funktion *in vitro* zugewiesen werden (Graf *et al.*, 2004, Chih *et al.*, 2005), welche durch eine NLG-abhängige Rekrutierung synaptischer Proteine vermittelt wird. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass der NLG-Bindepartner PSD-95 zusammen mit NLG das Verhältnis von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen (E/I-Verhältnis) *in vitro* sowie die Lokalisation von NLG an

exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen beeinflussen kann (Prange *et al.*, 2004, Levinson *et al.*, 2005).

In vivo Untersuchungen an NLG1-3 defizienten Mäusen, welche postnatal wegen einer respiratorischen Dysfunktion sterben, zeigen trotz einer Reduktion von glutamatergen (75%) und GABAergen (90%) synaptischen Transmissionen im respiratorischen Zentrum des Hirnstamms keine Veränderung bezüglich der Synapsenzahl und der synaptischen Morphologie (Varoqueaux *et al.*, 2006). Die Funktion von NLG liegt demnach in der Vermittlung der Synapsenreifung, anstelle der initialen Synapsenbildung. Dies wird wahrscheinlich durch die spezifische Rekrutierung und Stabilisierung von synaptischen Proteinen und durch die Aufrechterhaltung ihrer Funktion vermittelt. Im Komplex mit NRX könnte NLG prä- und postsynaptische Funktionen und Signalwege aktivieren, indem synaptische Vesikel, postsynaptische Gerüstproteine und Rezeptoren rekrutiert und geclustert werden. Eine Rolle von NLG bei bidirektionalen, bzw. retrograden Signalwegen kann durch eine PSD-95- und NLG-abhängige Modulation der präsynaptischen Neurotransmitterausschüttung und einer dadurch veränderten Kurzzeitplastizität demonstriert werden (Futai *et al.*, 2007). Durch eine chronische Inhibition von NMDA-Rezeptoren oder der generellen synaptischen Aktivität wird die induzierende Wirkung von NLG1 oder NLG2 auf Synapsen *in vitro* inhibiert. Weitere Hinweise für eine Rolle von NLG in aktivitätsabhängigen, synaptischen Funktionen zeigen Studien, bei denen NLG1 für die Expression von LTP (*Long-term potentiation*) und bestimmten Gedächtnisformen zuständig ist. Wird hierbei die NLG1 Expression reduziert, äußert sich dies in Defiziten bezüglich der LTP-Ausbildung und der Speicherung von Erinnerungen zusammenhängend mit assoziativer Angst (*associative fear memory*) in der Amygdala. NLG1-Überexpression in transgenen Mäusen führt hingegen zu einer Reduktion der LTP-Ausbildung und verringerten Leistungen in räumlicher Gedächtnisbildung im Hippokampus (Kim *et al.*, 2008, Dahlhaus *et al.*, 2009). Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind allerdings noch nicht vollständig erklärt.

Als Ursache von bestimmten neurologischen Erkrankungen wie Autismus wird eine Veränderung des Verhältnisses von exzitatorischen zu inhibitorischen Synapsen diskutiert (Rubenstein *et al.*, 2003). Da dieses Verhältnis von NLG moduliert werden kann (Prange *et al.*, 2004, Levinson *et al.*, 2005, Hines *et al.*, 2008), wird eine Rolle des NLG/NRX-Komplexes im Zusammenhang mit Autismus-Erkrankungen (ASD, *Autism spectrum disorders*) vermutet. In Übereinstimmung damit konnten bei Autismus-Patienten Mutationen in den Genen für NRX1, NLG3 und NLG4 identifiziert werden. Hierbei wurden X-chromosomale Deletionen in Bereichen des *NLG4*-Lokus, *Frame shift* Mutationen sowie Punktmutationen im *NLG4* und *NLG3* Gen und außerdem Translokations-, Punkt- und Deletionsmutationen für das *NRX1* Gen beschrieben. Allerdings gab es Patienten, bei denen die Mutationen nicht symptomatisch waren, bzw. die diese Mutationen nicht aufwiesen (Yan *et al.*, 2005, Blasi *et al.*, 2006, Wermter *et al.*, 2008, Südhof *et al.*, 2008). Das *Mapping* von Autismus-assoziierten Mutationen mit NLG-Strukturdaten ergibt ein Modell für die Rolle von NLG in ASD (Fabrichny *et al.*, 2007, Levinson *et al.*, 2007, Abb. 1.3). Durch Autismus-assoziierte Mutationen könnte die Faltung und Dimerisierung von NLG inhibiert sowie eine reduzierte Bindeaffinität gegenüber NRX verursacht werden. Dies hätte gestörte NLG/NRX-

Signaltransduktionswege als Folge, wodurch die Funktion der Synapse beeinträchtigt werden könnte.

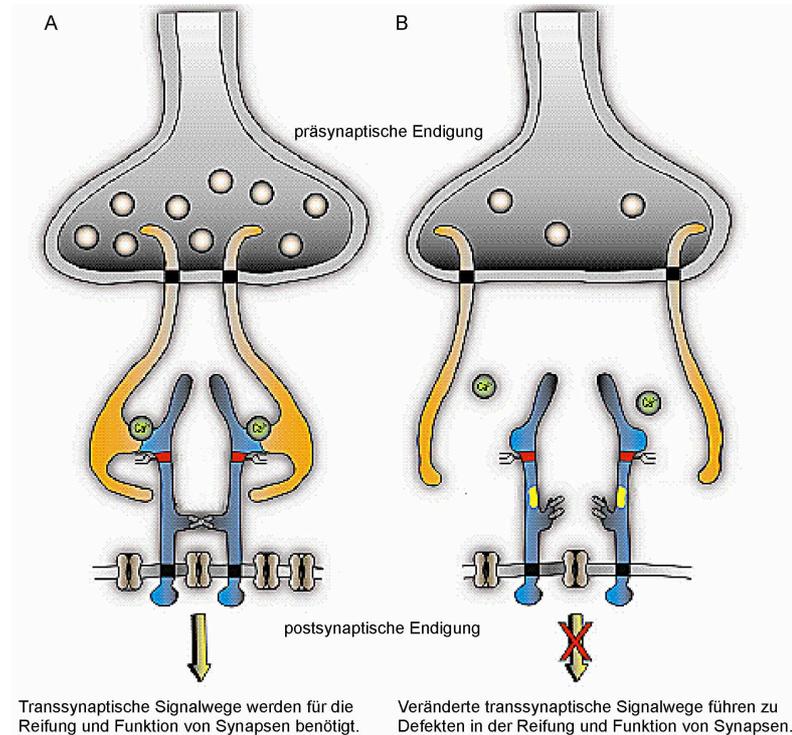


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des NLG-NRX-Komplexes an der Synapse in Wildtyp- und Autismus-assoziiierter Situation.

A Neurologin (blau) dimerisiert und bindet präsynaptisches Neurexin (orange). **B** Mit Autismus-assoziierte Mutationen (gelb) verhindern die Neurologin-Dimerisierung und reduzieren die Bindeaffinität gegenüber Neurexin, weshalb Signalwege für die Reifung und Funktion von Synapsen inhibiert werden. Verändert nach Levinson *et al.*, 2007.

1.5 PSD-95

Das am besten charakterisierte Protein der PSD (vgl. 1.2.2) ist das der MAGUK (*Membrane associated guanylate kinase homologs*)-Familie angehörende Protein PSD-95 (*Postsynaptic density protein 95*). Die MAGUK-Familie umfasst eine Gruppe von sehr homologen Proteinen, wie PSD-93, PSD-95, SAP97 und SAP102. Allen gemeinsam ist das Vorhandensein dreier PDZ (PSD-95, *discs large* und *zona occludens 1*)-, einer SH3 (*src homology domain*)- und einer GK (*Guanlyate kinase domain*)-Domäne (Abb. 1.4), durch welche vielfache Interaktionen mit anderen Proteinen ermöglicht werden. Mit 300 Kopien in einer durchschnittlichen PSD von 360 nm ist PSD-95 eine der Hauptkomponenten in der PSD (Chen *et al.*, 2005), wobei PSD-95 12 nm unter der postsynaptischen Plasmamembran lokalisiert werden kann (Valtschanoff *et al.*, 2001). Über N-terminale palmitoylierte Cysteinreste sowie über die PDZ-Domänen kann PSD-95 multimerisieren (Hsueh *et al.*, 1999, Christopherson *et al.*, 2003, Feng *et al.*, 2009). Hierdurch bildet PSD-95 ein Gerüst für

interagierende Proteine und organisiert Signalkomplexe, um dynamisch auf Signale zu reagieren und diese weiterzuvermitteln.

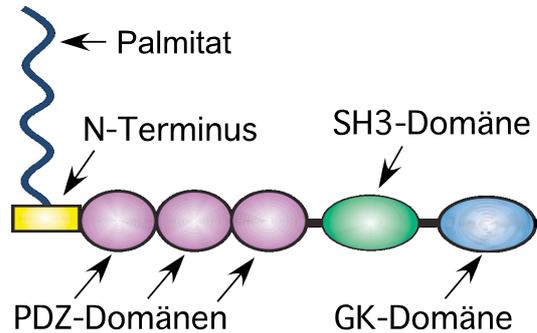


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PSD-95.

SH3: *src* homology domain, GK: *Guanylate kinase domain*, PDZ: PSD-95, Dlg und ZO1.

Über die Bindung an die PDZ-Domäne 1 und 2 können transmembrane Proteine wie der NMDAR und der *Shaker* K⁺-Kanal synaptisch lokalisiert und geclustert werden (Kornau *et al.*, 1995, Kim *et al.*, 1995). NLG bindet hingegen über die PDZ-Domäne 3 an PSD-95 (Irie *et al.*, 1997, vgl. 1.4). Neben den Transmembranproteinen können auch weitere Gerüstproteine der PSD (vgl. 1.2.2) und zyttoplasmatische Signalproteine wie etwa die über die PDZ-Domäne 2 interagierende, neuronale NO-Synthase (nNOS) gebunden werden (Brenman *et al.*, 1996). Weiterhin binden mikrotubulibindende Zytoskelettproteine wie CRIPT über die PDZ-Domänen und MAP1A über die GK-Domäne an PSD-95 (Passafaro *et al.*, 1999, Gundelfinger *et al.*, 2000). Außerdem kann PSD-95 als Adaptor zwischen Motorproteinen und Glutamaterezeptoren den Transport dieser Rezeptoren über die direkte Interaktion mit dem Mikrotubulimotor KIF1B α und dem ebenso an PSD-95 gebundenen NMDAR, sowie über die Stargazin-vermittelte Bindung von AMPAR beeinflussen (Chen *et al.*, 2000, Mok *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2004). Das Aktinzytoskelett ist indirekt über den Komplex bestehend aus GKAP, DLC (*Dynein light chain*) und Myosin V mit PSD-95 verbunden (Naisbitt *et al.*, 2000). Anhand dieser Auswahl an interagierenden Proteinen wird die essentielle Funktion von PSD-95 an der Synapse hervorgehoben.

Dies kann zusätzlich mit der Rolle von PSD-95 in der synaptischen Transmission verdeutlicht werden. PSD-95 wird bei synaptischer Aktivität verstärkt exprimiert (Bao *et al.*, 2004) und ist ein bedeutender Regulator der synaptischen Stärke. In kultivierten hippokampalen Neuronen bleibt die NR1-Untereinheit des NMDAR bei einer PSD-95 Überexpression unbeeinflusst, wohingegen das Gerüstprotein GKAP und das Zelladhäsionsmolekül NLG in der PSD angehäuft werden und eine Verschiebung des exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen-Verhältnisses (E/I-Verhältnis) hervorrufen (El-Husseini *et al.*, 2000, vgl. 1.4, Prange *et al.*, 2004). Eine PSD-95 Überexpression erhöht außerdem zusammen mit NLG durch retrograde Signalwege die Wahrscheinlichkeit der präsynaptischen Neurotransmitterausschüttung (Futai *et al.*, 2007). Weiterhin resultiert eine Überexpression von PSD-95 in einem erhöhten *Clustering*, einer erhöhten Aktivität und Insertion von AMPAR sowie einer erhöhten *Spine*-Zahl und -Größe (El-Husseini *et al.*, 2000). Der potenzierende Einfluss auf AMPAR kann mit der Rekrutierung des AMPAR mit dessen Bindepartner Stargazin und an Stargazin

bindendes PSD-95 zu Synapsen erklärt werden (Chen *et al.*, 2000, Schnell *et al.*, 2002, Bats *et al.*, 2007). Allerdings ist die durch PSD-95 Überexpression hervorgerufene Potenzierung von AMPAR-Strömen von der posttranslational erfolgten Palmitoylierung zweier Cysteinreste von PSD-95 abhängig, da eine Depalmitoylierung zu einer AMPAR-Internalisierung und einer Reduktion von PSD-95 an Synapsen führt (El-Husseini *et al.*, 2002). Auch durch eine Dephosphorylierung an Serin 295 durch den Rac-JNK1-Signalweg kann die PSD-95-Konzentration sowie die Insertion von AMPAR an Synapsen reduziert werden. Dies entspricht der LTD-Situation. Eine Phosphorylierung des Serinrestes bewirkt eine synaptische Akkumulation von PSD-95 und eine erhöhte AMPAR-Insertion, was einer LTP-Situation entspricht (Kim *et al.*, 2007). Auch das Ubiquitin-Proteasom-System ist in der Regulation von PSD-95 über eine durch NMDAR-Aktivierung verursachte PSD-95 Degradation und einer damit einhergehenden AMPAR-Internalisierung involviert, welches der LTD-Situation entspricht (Colledge *et al.*, 2003). Ferner wird die N-terminale Region von PSD-95 durch Cdk5 (*Cyclin-dependent kinase 5*) phosphoryliert, welches das *Clustering* von PSD-95 und den interagierenden K⁺-Kanal negativ beeinflusst (Morabito *et al.*, 2004).

Diese *in vitro* Ergebnisse der durch PSD-95-Überexpression verursachten AMPAR-Potenzierung kontrastieren mit Untersuchungen in PSD-95-mutierten Mäusen, da diese eine normale Synapsenmorphologie sowie eine erhöhte LTP- und eine reduzierte LTD-Expression aufweisen (Migaud *et al.*, 1998). Die molekulare Redundanz unter den MAGUK-Proteinen könnte hier zu einer funktionellen Kompensation führen. Beispielsweise kann bei PSD-95 und PSD-93 doppeldefizienten Mäusen eine 55%ige Reduktion der AMPAR-vermittelten synaptischen Transmission beobachtet werden (Elias *et al.*, 2006). Vollständig PSD-95 defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte AMPAR-vermittelte Transmission, eine langsamere *Decay-Zeit* von NMDAR-vermittelten Strömen sowie eine erhöhte Anzahl von ausschließlich NMDAR enthaltenden Synapsen, in denen AMPAR fehlen, sogenannte *Silent synapses* (Beique *et al.*, 2006).

Synaptisches PSD-95 ist dynamisch und unterliegt einem kontinuierlichem *Turnover*, wobei die durchschnittliche Halbwertszeit 36 h beträgt (Ehlers *et al.*, 2003, El-Husseini *et al.*, 2002). Große PSDs in großen *Spines* beinhalten dabei mehr PSD-95 und lokalisieren außerdem PSD-95 länger als kleine PSDs (Gray *et al.*, 2006). *Time-lapse* Videomikroskopie mit pGFP-PSD-95 transfizierten hippocampalen Neuronen zeigen, dass 40% der GFP-PSD-95 enthaltenden PSDs dynamisch sind, indem GFP-PSD-95-Cluster innerhalb von 15 min erscheinen und verschwinden, wachsen und sich innerhalb des *Spines* bewegen (Marrs *et al.*, 2001).

Eine starke NMDAR-Aktivierung führt in jungen kortikalen Neuronen des visuellen Kortex zu einer Translokation von PSD-95 zu Dendriten und Synapsen durch BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*) induzierte TrkB-PI3K-AKT Signalwege. Hierdurch wird im gesamten dendritischen Baum PSD-95 verteilt und die LTP-Expression an benachbarten Synapsen vereinfacht (Yoshii *et al.*, 2007). Aktivitätsabhängiger Transport von PSD-95 kann weiterhin durch Phosphorylierung an Serin 73 durch CaMKII (*Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase*) reguliert werden (Steiner *et al.*, 2008). Weiterhin zeigt diese Studie, dass PSD-95 für

aktivitätsabhängiges *Spine*-Wachstum notwendig ist. Zusammengefasst unterstreichen diese und die oben genannten Studien die Rolle von PSD-95 in synaptischer Plastizität.

1.6 Intrazellulärer Transport

Neurone sind sehr polare und spezialisierte Zellen, deren Funktion durch die asymmetrische Verteilung von Zellorganellen, Proteinen und mRNAs aufrechterhalten wird. Zytoskelettstrukturen sind maßgeblich an der Umsetzung der Zellpolarität beteiligt, in dem sie die Zellform aufrechterhalten und dynamisch modulieren, sowie an intrazellulären aktiven Transportprozessen von Proteinen, mRNAs und Zellorganellen beteiligt sind. Im Gegensatz zum passiven Transport mittels Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten, erfordert der aktive Transport die Umsetzung chemischer Energie, um so schnell die Zelle über weite Entfernungen und entgegen Konzentrationsgradienten mit ihren benötigten Komponenten zu versorgen.

Der intrazelluläre, zytoskelettbasierte Transport erfolgt hierbei über Motorproteine entlang von Aktinfilamenten und Mikrotubuli als hauptsächliche Zytoskelettbestandteile in diesem Prozess, wobei Aktinfilamente im Kurzstreckenbereich und Mikrotubuli im Langstreckenbereich involviert sind (Goode *et al.*, 2000). Die dabei benutzten molekularen Motorproteine umfassen im Fall von Aktin-basiertem Transport die Myosin-Familie und im Falle von Mikrotubuli-basiertem Transport Dynein und Kinesine. Durch wiederholte Zyklen von Bindung und Ablösung ihrer *Head*-Domäne an die Zytoskelettelemente können die Motorproteine durch die Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) sich und an ihre *Tail*-Domäne gebundenes Transportgut (*Cargo*) fortbewegen. Neben der direkten *Cargo*-Bindung können die Motoren aber auch indirekt über sogenannte Adaptorproteine an ihr *Cargo* binden.

Der Transport entlang von Aktinfilamenten beruht auf Myosin-Motorproteinen. In Menschen sind 40 Myosin-Gene beschrieben, welche in 12 Klassen eingeteilt werden (Mermall *et al.*, 1998). Myosine der Klasse I, II, V und VI sind dabei mit Organell- und Vesikel-Transportprozessen in Neuronen assoziiert (Bridgman *et al.*, 2003). Myosine bewegen sich bis auf Myosin VI in Richtung des Plus-Endes der Aktinfilamente.

Globuläres ATP-gebundenes Aktin (G-Aktin) selbstassoziiert spontan zu filamentösem Aktin (F-Aktin), einem helikalen, 8 nm breiten Homopolymer, wobei das ATP im F-Aktin langsam zu ADP hydrolysiert wird. Da sich die G-Aktin-Monomere immer in der gleichen Richtung aneinanderlagern, resultiert daraus ein polares Aktinfilament mit zwei unterschiedlichen Enden. Die Polymerisation findet vor allem am sogenannten Plus-Ende und die Depolymerisation vor allem am Minus-Ende statt. Durch den ständigen Ein- und Ausbau von G-Aktin sind Aktinfilamente sehr dynamische Strukturen. Während des *Steady-state* und bei einer bestimmten G-Aktin-Konzentration ist die Rate der am Plus-Ende stattfindenden Polymerisation und der am Minus-Ende stattfindenden Depolymerisation gleich, woraus ein Nettofluss von G-Aktin durch das Filament und ein dynamisches *Turnover* des Aktinfilaments bei gleichzeitiger Längenkonstanz resultiert. Dieser Vorgang wird als *Treadmilling* bezeichnet. Verschiedene Aktin-bindende Proteine können diesen Vorgang

beeinflussen, indem sie stabilisierend oder destabilisierend an den jeweiligen Enden wirken. Weiterhin können andere Aktin-bindende Proteine die Aktinfilamente untereinander zu Aktinbündeln und Gelen verlinken (Cingolani *et al.*, 2008). Die Orientierung der im Vergleich zu Mikrotubuli eher kurzen Aktinfilamente ist im Zellinneren eher zufällig, an bestimmten Bereichen wie am Zellkortex und in dendritischen *Spines* hingegen sind die Aktinfilamente mit ihren Plus-Enden in Richtung der Zelloberfläche angeordnet (Langford *et al.*, 2002, Ross *et al.*, 2008, Cingolani *et al.*, 2008). Die Aktinfilamente bilden in Synapsen prä- und postsynaptisch die hauptsächliche Zytoskelettstruktur und sind mit der strukturellen Plastizität an Synapsen, d.h. etwa mit dem Wachstum von *Spines* nach einer LTP-Induktion assoziiert (vgl. 1.3, Carlisle *et al.*, 2005, Alvarez *et al.*, 2007).

Grundbestandteil der Mikrotubuli sind α,β -Tubulinheterodimere. Durch eine lineare Anordnung dieser Heterodimere entstehen Protofilamente. Dreizehn dieser Protofilamente wiederum assoziieren, um einen 24 nm breiten, zylindrischen Mikrotubulus zu bilden. Da die α,β -Tubulinheterodimere immer in der gleichen Orientierung assoziiert vorliegen (*Head to tail association*), bildet sich eine polare Struktur, wobei die β -Untereinheit in Richtung des Plus-Endes und die α -Untereinheit in Richtung des Minus-Endes zeigt. Das Minus-Ende ist am Zentrosom oder an anderen Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOC) verankert, wobei eine dritte Tubulinform, das γ -Tubulin, den korrekten Zusammenbau der Mikrotubuli am MTOC unterstützt (Erickson *et al.*, 2000). Die Plus-Enden weisen vom Zellkern in Richtung der Zellmembran. Durch die unterschiedliche Geschwindigkeit des Wachstums an den Enden kann die Polarität der Mikrotubuli weiter unterstützt werden. Hierbei ist eine höhere Wachstumsrate an Plus-Enden im Vergleich zu Minus-Enden festzustellen (Desai *et al.*, 1997). Hauptsächlich findet aber die Polymerisation und Depolymerisation an den Plus-Enden statt. Für den neuen Einbau einer Untereinheit bindet ein GTP-gebundenen Tubulinheterodimer am Plus-Ende und wird erst kurz nach der Assemblierung zu GDP-Tubulin hydrolysiert, wodurch sich eine GTP-Kappe am Plus-Ende ausbildet, welche die Mikrotubulstruktur stabilisiert. Fehlt diese GTP-Kappe, depolymerisieren die Mikrotubuli. Diese schnellen Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation werden als dynamische Instabilität bezeichnet. Die Mikrotubuli erreichen keinen *steady-state* Zustand, sondern existieren entweder im Wachstums- oder im Abbauzustand (*Dynamic instability*, Desai *et al.*, 1997, Conde *et al.*, 2009). Diese Polymerisierungsdynamik ermöglicht den Mikrotubuli sich je nach Zellkontext schnell zu reorganisieren. Weiterhin ist die Dynamik der Mikrotubuli durch assoziierte Proteine beeinflussbar, welche die Mikrotubuli de- oder stabilisieren können. Auch die drei α -($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$) und die fünf β -(βI , βII , βIII , βIVa , βIVb) Tubulinisoformen sowie posttranslationale Modifikationen können die Eigenschaften der Mikrotubuli regulieren. In Neuronen sind Mikrotubuli in Axon und Dendrit bezüglich ihrer Orientierung und ihrer Assoziation mit bestimmten stabilisierenden Proteinen (*Microtubule-associated proteins*, MAPs) unterschiedlich organisiert. Zum einen ist die Orientierung der Mikrotubuli in Axonen uniform, d.h. mit den Plus-Enden zu den axonalen Endigungen gerichtet. In proximalen Dendriten hingegen ist die Orientierung gemischt, d.h. mit den Plus- und Minus-Enden zum Zellkörper angeordnet. In den distalen Dendriten sind die Mikrotubuli wie in Axonen orientiert (Baas *et al.*, 1988). Weiterhin unterscheiden sich Axone und

Dendriten bezüglich ihrer Assoziation mit MAPs. Beispielsweise ist Tau vor allem axonal und MAP2 vor allem dendritisch lokalisiert. Hierdurch können die Mikrotubuli untereinander im Falle von Tau-assoziierten Mikrotubuli einen Abstand von 25 nm sowie im Falle von MAP2-assoziierten Mikrotubuli einen Abstand von 65 nm zueinander einnehmen (Chen *et al.*, 1992, Conde *et al.*, 2009).

Allgemein vermitteln Dynein-Motoren (vgl. 1.8) den retrograden, zum Minus-Ende der Mikrotubuli gerichteten, und die Motorproteine der Kinesin-Familie (vgl. 1.7) den anterograden, zum Plus-Ende der Mikrotubuli gerichteten aktiven Transport. Dabei können beide Motoren gleichzeitig in einem Transportvesikel oder an ein *Cargo* gebunden werden. Somit können die Motoren indirekt an andere Bestimmungsorte in der Zelle mittransportiert werden (Motorprotein-Recycling) oder aber mit dem jeweils anderen Motorprotein um den Transport und die Richtung konkurrieren (*Tug-of-war*, Kural *et al.*, 2005, Ross *et al.*, 2008). Dieser Tausch von Motoren an demselben *Cargo* kann wiederum durch andere Faktoren moduliert werden. Beispielsweise wirkt das Protein Huntingtin je nach Phosphorylierungsstatus als regulatorischer Schalter für Kinesin- oder Dynein-vermittelten Transport (Colin *et al.*, 2008). Es kann ferner durch die Assoziation mit HAP40 (*Huntingtin-associated protein 40*) und der kleinen GTPase Rab5 die Zytoskelettaffinität von frühen Endosomen beeinflussen (Pal *et al.*, 2006). Weiterhin können Aktin-Motorproteine mit Mikrotubuli-Motoren an dasselbe *Cargo* binden, wodurch ein Motor-Wechsel an Aktinfilament- und Mikrotubuli-Kreuzungen vereinfacht wird (Brown *et al.*, 1999).

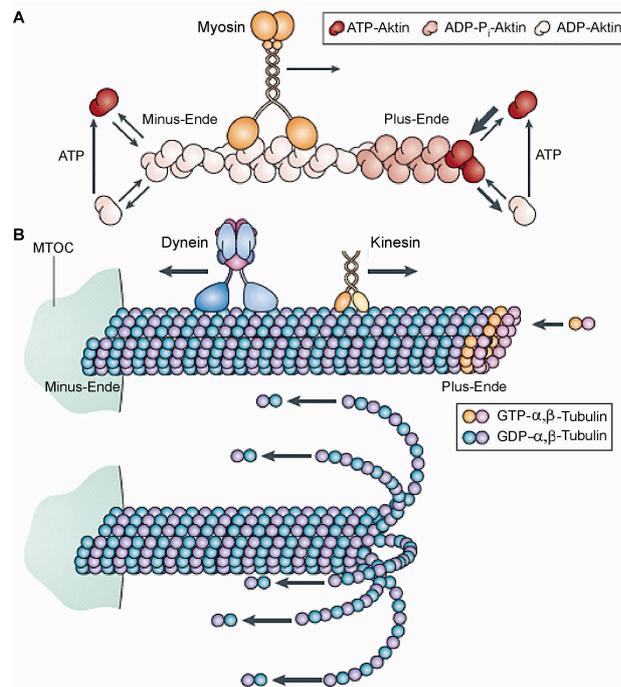


Abb. 1.5: Aktinfilamente und Mikrotubuli.

A Dynamisches Aktinfilament mit Myosin als Motorprotein. Myosine vermitteln vor allem anterograden Transport. Eine Ausnahme bildet das retrograde Motorprotein Myosin VI. **B** Dynamische Mikrotubuli mit Kinesin und Dynein als Motorproteine. Dyneine vermitteln den retrograden Transport, Kinesine vor allem den anterograden Transport. Mikrotubuli sind oft über ihr Minus-Ende an Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOC) verankert. Hier ist ein Mikrotubulus in der Wachstumsphase dargestellt. Unterer Teil: Nach Verlust von GTP- α,β -Tubulin depolymerisieren Mikrotubuli schnell. Verändert nach Li *et al.*, 2008.

1.7 Kinesin

Die Kinesin-Superfamilie (KIF) ist unterteilt in 14 Familien mit 45 Mitgliedern (Miki *et al.*, 2001), 38 davon werden im Gehirn exprimiert (Hirokawa *et al.*, 2008). Durch alternatives Spleißen kann die Zahl der möglichen exprimierten KIF-Proteine noch mindestens verdoppelt werden. Je nach Lage ihrer Motordomäne wird die KIF-Proteinfamilie in drei Gruppen unterteilt: N-Kinesine (N-terminaler Motor), M-Kinesine (mittiger Motor) und C-Kinesine (C-terminaler Motor) (Miki *et al.*, 2001). Hierbei stellt die Gruppe der N-Kinesine die Mehrheit. Zusammen mit der Gruppe der M-Kinesine bewegen sich die N-Kinesine in anterograde Richtung (in Richtung der Plus-Enden) entlang der Mikrotubuli. C-Kinesine hingegen bewegen sich in retrograde Richtung (in Richtung der Minus-Enden). Die größte Homologie zeigen die Kinesine in ihrer Motordomäne (*Head*), welche die Mikrotubuli-bindung sowie die ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse (ATPase-Funktion) vermittelt. Außerhalb der Motordomäne sind die einzelnen Kinesine sehr divers. An die Motordomäne schließt sich meist eine *Stalk*- und eine *Tail*-Domäne an, über welche die Interaktion mit anderen assoziierten Untereinheiten sowie die *Cargo*-Bindung vermittelt werden kann. Über die *coiled-coiled* Region in der *Stalk*-Domäne kann die Mehrheit der Kinesine homodimerisieren, allerdings gibt es auch monomere Kinesine (KIF1) und heterotrimere Kinesine

(KIF3-Komplex). Weiterhin ist die *Stalk*-Domäne bei der Motor-Direktion und die *Tail*-Domäne in der Aktivitätsregulation der Motordomäne beteiligt (Henningsen *et al.*, 1997, Endow *et al.*, 1998, Coy *et al.*, 1999). Die beiden Motordomänen in Kinesin-Dimeren binden abwechselnd an die Mikrotubuli (*Hand-over-hand*-Modell), wobei jeder Schritt einer *Head*-Domäne einer konstanten Länge von 8 nm entspricht und unter ATP-Hydrolyse entsteht. Die maximale Kraft des Motors variiert dabei im Bereich von 5-8 pN (Coy *et al.*, 1999, Visscher *et al.*, 1999). Jedes KIF hat eine charakteristische Geschwindigkeit, die von 0,2–1,5 $\mu\text{m/s}$ variiert (Hirokawa *et al.*, 1998).

Der Langstreckentransport zur Peripherie in Neuronen wird hauptsächlich von den Kinesinen übernommen (Hirokawa *et al.*, 1998). Aufgrund der geringen Homologie außerhalb der Motordomäne können die Kinesine zwischen diversen unterschiedlichen *Cargoes* unterscheiden und diese zu spezifischen Zielorten transportieren. Dies wird weiterhin durch die Zuhilfenahme von Adaptoren erreicht, welche zwischen Motor und *Cargo* positioniert werden. Dabei handelt es sich meist um spezifische Proteine, aber auch Lipide können die Spezifität der Bindung vermitteln. Es ist aber noch unklar, ob die Bindung an das Lipid die Spezifität oder eine Verstärkung der Bindung des Motors an das *Cargo* reguliert. Beispielsweise bindet KIF16B über PH-Domänen (*Pleckstrin homology*) in der *Tail*-Domäne an PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, Hirokawa *et al.*, 2008). Weiterhin können Adaptoren die Direktion von Motoren in verschiedene Zellkompartimente beeinflussen. So wird KIF5 über die Bindung an JIP-Proteine (*c-jun N-terminal kinase (JNK)-interacting proteins*) in Axone dirigiert, während die Bindung an GRIP1 (*Glutamat receptor interacting protein 1*) KIF5 in Dendriten lokalisiert (Verhey *et al.*, 2001, Setou *et al.*, 2002).

Das N-Kinesin KIF21B ist Mitglied der Kinesin 4 Familie und im Gegensatz zu dem zu 60% homologen, axonal und dendritisch lokalisierten KIF21A ausschließlich in Dendriten angereicht. Auch dieses Kinesin verfügt neben der Motordomäne über eine *coiled-coil* beinhaltende *Stalk*-Domäne und eine C-terminale *Tail*-Domäne. In der *Stalk*-Domäne befinden sich neben einem *Cluster* negativ geladener Aminosäuren sieben WD40-*Repeats*, durch welche eventuell die *Cargo*-Bindung über die Interaktion mit PH- oder TPR-(*Tetratricopeptide repeats*) Domänen vermittelt wird (Marszalek *et al.*, 1999). Über potenzielle *Cargoes* oder über die Funktion von KIF21B in Dendriten ist bisher nichts bekannt.

Transportkomplexe mit KIF17 und KIF5 sind über den Transport von Glutamatrezeptoren für die Funktion von Neuronen, d.h. für die Funktion von Synapsen mitverantwortlich. So ist KIF5 über das Adaptorprotein GRIP für den Transport des AMPA Glutamatrezeptors (vgl. 1.2.2, 1.3) zu Synapsen zuständig. Weiterhin transportiert das N-Kinesin KIF17 über einen Gerüstkomplex mit den Adaptorproteinen mLin10, mLin2 und mLin7 die NMDAR-Untereinheit NR2B zur Postsynapse (Setou *et al.*, 2000). Durch eine Überexpression von KIF17 in transgenen Mäusen wird die Lern- und Gedächtnisleistung in bestimmten Lerntests verbessert. Gleichzeitig ist die Expression von NR2B parallel zu KIF17 hochreguliert, welches wahrscheinlich durch die erhöhte Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie CREB (*cAMP responsive element binding protein*) vermittelt wird. Die Regulation von

Motorproteinen wie KIF17 wirkt sich hierdurch auf Neurotransmitterrezeptoren wie den NMDAR und dadurch auf Lern- und Gedächtnisleistungen aus (Wong *et al.*, 2002).

1.8 Dynein

Die Dynein Motorproteinfamilie vermittelt den retrograden (in Richtung der Minus-Enden) Transport entlang von Mikrotubuli. Es wird zwischen fünf verschiedenen axonemalen und zwei zytoplasmatischen Dyneinformen unterschieden. Die axonemalen Dyneine sind für das Schlagen von Geißeln und Zilien verantwortlich. Zytoplasmatisches Dynein 2 ist fast ausschließlich innerhalb und an der Basis von Geißeln und Zilien anzufinden, wo es dem intraflagellaren Transport dient (Porter *et al.*, 1999, Mikami *et al.*, 2002). Zytoplasmatisches Dynein 1 ist ubiquitär exprimiert und für den intrazellulären Transport von Organellen und mRNA zuständig. Desweiteren spielt zytoplasmatisches Dynein 1 eine Rolle bei Zellpolarisationsprozessen, bei der Mitose und bei der Zellmigration.

Dyneine sind 1,2 MDa große Multiproteinkomplexe und gehören zur Familie der AAA+ (*ATPase associated with various activities*) ATPasen. Ein Bestandteil dieses Multiproteinkomplexes, der bei allen Dyneinen vorliegt, ist die > 500 kDa große Dynein Schwere Kette (DHC, *Dynein heavy chain*), welche für die Mikrotubulibindung, ATPase- und Motorfunktion zuständig ist (Holzbaur *et al.*, 1994, Höök *et al.*, 2009). Am C-Terminus der DHC befindet sich die Motordomäne, gefolgt von einer 10 nm langen *Linker*- und einer *Tail*-Domäne, an welcher die *Cargo*-Bindung und die Dimerisierung mit einer zweiten DHC stattfindet. Die Motordomäne ist aus sechs AAA-Domänen zu einem Ring geformt. AAA1-AAA4 besitzen konservierte ATP-Binde- und ATP-Hydrolysemotive, aber nur AAA1 ist essentiell für die Dynein-Mobilität, während die restlichen AAA-Domänen regulatorische Funktionen übernehmen (Reck-Peterson *et al.*, 2004, Kon *et al.*, 2004). Zwischen AAA-Domäne 4 und 5 ragt die 15 nm lange *coiled-coil Stalk*-Domäne hervor, über deren Spitze die Mikrotubulibindung vermittelt wird (Gee *et al.*, 1997). Die DHC ist vor allem in der Motordomäne im Vergleich zu der etwas divergenteren *Tail*-Domäne sehr konserviert. Neben zwei DHCs umfasst zytoplasmatisches Dynein zwei Intermediäre Ketten (DIC, *Dynein intermediate chains*), mehrere Dynein leichte intermediäre Ketten (DLIC, *Dynein light intermediate chains*), Dynein leichte Ketten (DLC, *Dynein light chains*) sowie weitere akzessorische Proteine, welche an die *Tail*-Domäne binden (Vallee *et al.*, 2004). Über die Assoziation mit verschiedenen Polypeptiden kann über die *Tail*-Domäne die Spezifität in der *Cargo*-Bindung, aber auch die Prozessivität des Motors reguliert werden. Die DIC interagiert mit der p150^{Glued} Untereinheit des Dynaktin-Komplexes (Karki *et al.*, 1995). Dieser Komplex besteht aus elf Untereinheiten und kann zusätzlich zum Dynein-Komplex an Mikrotubuli und an *Cargoes* binden (Waterman-Storer *et al.*, 1995, Schroer *et al.*, 2004). Dynaktin kann unabhängig von der Mikrotubulibindung die Motorfunktion von Dynein regulieren, indem die Prozessivität und Effizienz von Dynein erhöht wird (Waterman-Storer *et al.*, 1997, Kardon *et al.*, 2009). Überexpression der Dynaktin-Untereinheit Dynamitin (p50) führt zu einer Dissoziation des Dynaktin-Komplexes und inhibiert den Dynein-Transport in der Zelle (Echeverri *et al.*, 1996, Burkhardt *et al.*, 1997).

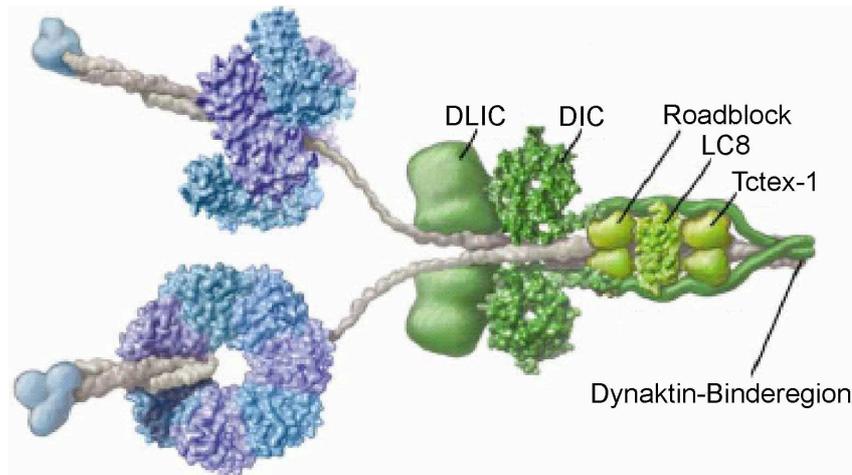


Abb. 1.6: Strukturmodell von zytoplasmatischem Dynein.

Die Motordomäne (blau) der Dynein schweren Kette (DHC, grau) bildet eine Ringstruktur, die eine *Stalk*-Domäne mit Mikrotubuli-Bindedomäne entspringt (grau mit hellblau). An die *Tail*-Domäne der DHC können Dynein leichte Kette (DLIC, grün), Dynein intermediäre Kette (DIC, grün) und verschiedene Dynein leichte Ketten (Roadblock, LC8, Tctex-1, hellgrün) binden. Der Dynaktin-Komplex (nicht gezeigt) kann über die Bindung mit DIC die Prozessivität von Dynein beeinflussen. Verändert nach Vale 2003.

Es wird vermutet, dass Dynein sich entlang von Mikrotubuli nach dem *Hand-Over-Hand*-Modell bewegt (Mallik *et al.*, 2004, Toba *et al.*, 2006), wobei die Schrittgröße hauptsächlich 8 nm beträgt (Reck-Peterson *et al.*, 2006), aber auch stärker variierend (4-32 nm) als bei Kinesin (8 nm) beobachtet werden kann. Die maximale Kraft des Motors variiert von 1-8 pN (Mallik *et al.*, 2004, Toba *et al.*, 2006). Weiterhin werden bidirektionale Bewegungen mit Unterbrechungen beobachtet. Zusammen mit den variablen Schrittgrößen ergibt sich eine höhere diffusive Komponente und Flexibilität des Dynein-Motors, um etwa Hindernisse zu umgehen oder um auf andere Protofilamente zu wechseln (Wang *et al.*, 1995, Ross *et al.*, 2006, Reck-Peterson *et al.*, 2006). Dynein-Motoren können durchschnittliche Geschwindigkeiten zwischen 1-2 $\mu\text{m/s}$ erreichen (Paschal *et al.*, 1987, Ma *et al.*, 2002). Die Energie der ATP-Hydrolyse wird in Konformationsänderungen der DHC, v.a. der *Linker*- und der *coiled-coil Stalk*-Domäne umgesetzt. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, dennoch existiert folgendes Modell. Die ATP-Bindung induziert eine Dissoziation von den Mikrotubuli. Durch die ATP-Hydrolyse wird Dynein durch einen Ruderschlag der *Linker*-Domäne vorwärtsbewegt, wobei Dynein durch einen ersten Ruderschlag (*Priming stroke*) mit der *Stalk*-Domäne in Richtung des Minus-Endes, in einem 45° Winkel zu den Mikrotubuli positioniert wird. Reassoziation mit den Mikrotubuli löst einen zweiten Ruderschlag der *Linker*-Domäne (*Power stroke*) und die Dissoziation von $\text{ADP} + \text{P}_i$ aus, wodurch Dynein in retrograde Richtung bewegt wird (Burgess *et al.*, 2003, Carter *et al.*, 2008, Roberts *et al.*, 2009, Kon *et al.*, 2009).

In Neuronen ist Dynein für den schnellen axonalen Transport in retrograde Richtung verantwortlich (Paschal *et al.*, 1987, Hirokawa *et al.*, 1990). Transgene Mäuse, welche postnatal die Dynaktin-Untereinheit Dynamitin überexprimieren, zeigen eine Motorneuron-Degeneration und Akkumulation von Neurofilamenten in Zellfortsätzen und axonalen

Schwellungen. Diese Phänotypen weisen Ähnlichkeiten zu der im Menschen vorkommenden Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) auf, weswegen diese transgene Mauslinie als Modell für ALS-Erkrankungen dienen könnte (LaMonte *et al.*, 2002). Weiterhin kann Dynein die Verzweigung von Dendriten sowie die Größe des Dendritenbaums beeinflussen (Satoh *et al.*, 2008) und ist essentiell für die Orientierung von axonalen Mikrotubuli (Zheng *et al.*, 2008). Dynein-vermittelte Transportprozesse sind ferner mit dem Transport von synaptischen Proteinen impliziert. Beispielsweise wird das präsynaptische Gerüstprotein Bassoon über die Bindung an DLC oder der aktivierte Neurotrophin Rezeptor (Trk) zusammen mit Dynein transportiert (Heerssen *et al.*, 2004, Fejtova *et al.*, 2009). Auch in Dendriten konnte retrograder Transport von synaptischen Komponenten festgestellt werden. So wird etwa der Glyzin-Rezeptor über den Adaptor Gephyrin an DIC gebunden und transportiert (Mass *et al.*, 2006). Dynein-vermittelte Transportprozesse tragen demnach zu neuronaler Funktionalität bei.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Das postsynaptische Zelladhäsionsmolekül NLG bildet zusammen mit seinem präsynaptischen Bindepartner NRX einen transsynaptischen Komplex. Über die Bindung an das Gerüstprotein PSD-95 ist NLG in der PSD verankert und indirekt mit ebenfalls an PSD-95 bindenden Proteinen wie Glutamatrezeptoren und Ionenkanälen in Kontakt. *In vitro* Studien deuten auf eine synaptogenetische Funktion von NLG hin, welche aber *in vivo* bisher nicht gezeigt werden konnte. Vielmehr lassen diese Untersuchungen eine Funktion von NLG in der Spezifität und Reifung von Synapsen, sowie in retrograder Kommunikation zwischen und Post- und Präsynapse vermuten (Irie *et al.*, 1997, Scheiffele *et al.*, 2000, Varoqueaux *et al.*, 2006, Futai *et al.*, 2007).

Über die genauen Mechanismen bezüglich der Lokalisation und des Transports von NLG zur Synapse ist jedoch wenig bekannt. Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern NLG durch Mikrotubuli-abhängige Motoren, wie zytoplasmatisches Dynein bzw. Proteine der Kinesin-Familie, entlang der Mikrotubuli transportiert wird. Dabei ist Dynein für den retrograden und Kinesin für den anterograden Transport zuständig. Darüber hinaus sollten potentielle NLG-Transportkomplexe genauer in Bezug auf aktivitäts-abhängige Regulationsmechanismen an Synapsen untersucht werden. Dazu wurden biochemische, immunzytochemische, elektronenmikroskopische und elektrophysiologische Analysen in kultivierten hippocampalen Neuronen und in transgenen Tieren durchgeführt. Weiterhin wurden GFP-Fusionsproteine mittels *Time-lapse* Videomikroskopie analysiert, um den Transport von NLG zu visualisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

CCD-Kamera	12.0 Monochrome w/o IR-18 (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, Michigan, USA)
Entwicklermaschine	CURIX60 (Agfa, Leverkusen)
Geldokumentation	UV-Gel Dokumentationsystem (Herolab, Wiesloch)
Gelkammern (Agarosegele)	Modell B2, Modell B1A (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH)
Gelkammern (Polyacrylamidgele)	Mini-PROTEAN 3 Cell (Biorad, München)
Heizblock	Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Homogenisator	Potter S (B. Braun Melsungen, Melsungen)
Laborwaagen	PM 4000 (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz)
Mikroskope	AXIOVERT 200M (Zeiss, Oberkochen) Inverses Mikroskop Leica DM IRBE (Leica, Wetzlar) TELAVAC31 (Zeiss, Oberkochen) EM 902 (Zeiss, Oberkochen)
pH-Meter	SevenEasy pH (Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Schweiz)
Pipetten	Pipetman (Gilson, Limburg-Offheim) Labmate (Abimed, Langenfeld)
Photometer	Ultraspec®3000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, England)
PCR-Maschinen	T-1 Thermocycler (Biometra, Göttingen) PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, MA)
Schüttler	GIO Gyrotory®Shaker (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) Polymax 2040 (Heidolph, Schwabach)

Spannungsgeräte	E844 (Consort, Turnhout, Belgien) Power Pac 300 (Biorad, München)
Sterilbänke	Gelaire SBB 4A (Flow Laboratories GmbH, Meckenheim) SterilGARD Class II TypA/B3 (Baker Company, Sanford, ME)
<i>Timelapse</i> -Steuerung	MAC 5000 (Visitron Systems, Puchheim)
UV-Illuminator	UVT2035 (Herolab, Wiesloch)
Vortex	Minishaker MS1 (IKA, Staufen)
Wasserbad	GFL Typ 1013 (GFL, Burgwedel)
Western Blot Apparatur	B2529 Semi-Dry Blotter (Sigma, Taufkirchen)
Zellkulturinkubatoren	NUAIRE IR AUTOFLOW CO ₂ Water- Jacketed Incubator (Zapf Instrumente, Sarstedt), Heraeus-Inkubator (Heraeus, Hanau) Hera-Cell Inkubator (Heraeus, Hanau)
Zentrifugen Karlsruhe)	Mikrozentrifuge Modell SD (Roth, Zentrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg) TL-100 und L7 Ultrazentrifuge, J2-21M/E (Beckmann Coulter, Krefeld)
Zentrifugenrotoren	JA-10, JA-20, J-13.1, SW40, TLA100.3 (Beckman Coulter, Krefeld)

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben von folgenden Firmen mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse (p.A.)“ bzw. in höchstmöglicher Reinheit bezogen: AppliChem (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt).

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Fermentas (St.Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt) und Roche (Mannheim) erworben. Desoxyribonukleotide und *Taq*-DNA-Polymerase wurden von Invitrogen (Karlsruhe), die *PfuUltra*-DNA-Polymerase von Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA) bezogen. Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) und T4-DNA-Ligase stammten von NEB (Frankfurt) und Roche (Mannheim). Die mit den Enzymen verwendeten Puffer wurden jeweils vom Hersteller mit den entsprechenden Enzymen geliefert. Außerdem erfolgte in biochemischen Experimenten der Proteaseinhibitorzusatz durch cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Mannheim).

2.1.3 Medien, Puffer, Lösungen

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

Blockierungspuffer: (Immundetektion)	5% (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST
Blockierungspuffer: (Immunzytochemie)	1% (w/v) Bovines Serumalbumin (BSA) in 1x PBS
D-MEM/F-12 complete: (Zellkultur)	500 ml D-MEM/F-12 (1:1, w/o L-Glu) 10% FCS (v/v) 2 mM L-Glutamin 25 µg/ml Pyruvat 5 ml Penizillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml)
6x DNA-Ladepuffer: (Agarose-Gelelektrophorese)	7,5 g Ficoll 0,125 g Bromphenolblau ad 50 ml H ₂ O Lagerung von Aliquots bei -20°C
2x HBS: (Transfektion)	1,6 g NaCl 0,074 g KCl 0,027 g Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O 0,2 Dextrose 1 g HEPES ad 100 ml H ₂ O; pH 7,05 (NaOH) sterilfiltrieren, Lagerung von Aliquots bei -20°C

HEK293-Medium: (Zellkultur)	500 ml D-MEM (+ 4500 mg/L Glukose + GlutaMAX™ I, - Pyruvat) 5 ml Penizillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml) 50 ml FBS
HEPES-Puffer:	10 mM HEPES (pH 7,4) 135 mM NaCl 5 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂ 5 mM Glukose
LB-Agar: (Nährmedium Bakterien)	LB-Medium 1,5% (w/v) Agar autoklavieren, auf ca. 50°C abkühlen Antibiotika-Supplementation: Ampizillin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml)
LB-Medium: (Nährmedium Bakterien)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O; pH 7,5 (NaOH) autoklavieren
IM-Ac-Puffer:	20 mM HEPES (pH 7,2, HCl) 100 mM K-Acetat 40 mM KCl 5 mM EGTA 5 mM MgCl ₂
IP-Waschpuffer: (Immunpräzipitation)	50 mM Tris (pH 7,5, HCl) 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Neurobasalmedium: (Zellkultur)	500 ml Neurobasal 2 mM L-Glutamin 25 µg/ml Pyruvat 5 ml Penizillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml) 2% (v/v) B27 – kurz vor Gebrauch hinzugeben

Paraformaldehydlösung: (Immunzytochemie)	40 g Paraformaldehyd 40 g Saccharose ad 1000 ml 1x PBS, pH 7,2 (NaOH), Lagerung von Aliquots bei -20°C
PBS (10x):	2 g KCl 2,4 g KH ₂ PO ₄ 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 80 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O; pH 7,4 (NaOH oder HCl) autoklavieren
SDS-Laufpuffer (10x): (SDS-PAGE)	250 mM Tris 2,5 M Glyzin 1% (w/v) SDS pH 8,3 (HCl)
5x SDS-Probenpuffer: (SDS-PAGE)	400 mM Tris (pH 6,8) 500 mM DTT 50% (v/v) Glycerin 10% (w/v) SDS 0,8% (w/v) Bromphenolblau
SOB-Puffer: (kompetente Zellen)	2% (w/v) Bactotrypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ pH 6,7 (KOH)
Stripping Puffer: (Immundetektion)	25 mM Glyzin 1% SDS pH 2 (HCl)
TAE (50x): (Agarose-Gelelektrophorese)	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1000 ml H ₂ O

TB-Puffer: (kompetente Zellen)	10 mM PIPES 250 mM KCl pH 6,7 (KOH) 55 mM MnCl ₂ 15 mM CaCl ₂
TBST (10x): (Immundetektion)	100 mM Tris (pH 8,0, HCl) 1,5 M NaCl 0,5% (v/v) Triton-X-100
Transferpuffer: (Western Blot)	25 mM Tris 150 mM Glyzin 20% (v/v) Methanol

2.1.4 Reaktionskomplettausstattungen (Kits)

- Immobilion™ Western HRP Substrate (Millipore Corporation, Billerica, USA)
- BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA)
- NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
- Plasmid Maxi Kit (Qiagen®, Hilden)
- Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche, Mannheim)

2.1.5 Bakterienstämme, Labortiere, Zelllinien

	Name	Quelle
Bakterienstamm	<i>Escherichia coli</i> XL-1Blue	Stratagene (La Jolla, USA)
Zelllinien	<i>Human Embryonic Kidney</i> 293 (HEK293)	ATCC CRL-1537 (ATTC, Manassas, USA)
Labortiere	<i>Rattus norvegicus</i> (Wistar-Ratte) <i>Mus musculus</i> (FVB, C57Bl6/J, CBA x C57Bl6/J)	Zentrale Tierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)
	PSD-95-mutierte Mäuse (Migaud <i>et al.</i> , 1998)	SG Grant (Cambridge, UK)
	Dynamitin überexprimierende transgene Mäuse, M21 Linie (LaMonte <i>et al.</i> , 2002)	EL Holzbaur (Philadelphia, USA)

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme, Säugetierzelllinien und Labortiere.

2.1.6 Größenstandards

DNA-Standard Hyperladder I™ (Bioline, Luckenwalde)
 Protein-Standard Precision Plus Protein™ Standards All Blue (Bio-Rad, München)

2.1.7 Oligonukleotide

Alle eingesetzten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) mit HPSF-Qualität (*high purity salt free*) synthetisiert. Gelieferte Oligonukleotide wurden in sterilem H₂O aufgenommen, so dass die Endkonzentration 10 pmol/μl betrug.

Oligonukleotide		
Name	5'-3'-Sequenz	Verwendung
IS-N1-1s	CCAAAAGCTTCCACC AT GGCACTTCCCAGATGCATG	Klonierung von pNLG1ΔPDZBD-EGFP (HindIII, BamHI)
IS-N1-1as	GCAAGGATCCAATGAATGGGGGTGAGGGTG	
IS-N1-2as	CGCTCTAGATCATGAATGGGGGTGAGGGTG	Klonierung von pmyc-NLG1ΔPDZBD (XbaI)
CL-N1-5'MCS-1s	GCACCAAATCAACGGGAC	Sequenzierung von pEGFPN-Vektoren
CL-EGFP-5'WT1as	CTTCAGGGTCAGCTTGCC	
EGFP-C-seq-pr-as	CAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCA	Sequenzierung von pEGFPC-Vektoren
NT-GFPendSeq-1s	GTCCTGCTGGAGTTCGAGACCGCC	
IS-mKIF21B-2s	GTCTCGAGGTGCCACGGACACG	Klonierung von pEGFP-Kif21B(Ende) (XhoI, Sall)
IS-mKIF21B-22as	CCGTCGACTCAAGGGTGGGCTGCTGGTAG	
IS-mKIF21B-17s	CCGAATTCAGCGCGCTGCGGGCTGAG	Klonierung von pEGFP-Kif21B(Mitte) (EcoRI, Sall)
IS-mKIF21B-21as	CCGTCGACGTC AACCTCGAGATTGCCGAGG	
IS-mKIF21B-5s	GATCCAGA ACTACATCCGG	Sequenzierung von mKif21B
IS-mKIF21B-6s	CTGGTGACAGGGCAGGAG	
IS-mKIF21B-7s	CAAGGCTGGTATGGCAATGAG	
IS-mKIF21B-12s	CAGTGAAGAGAGCCTGGTAGAC	
IS-mKIF21B-14s	GCAAATGCGTGAGGAGCAGCAGCGG	
IS-KIF21Batg-s	gCCGGAGGACCATGGCTGGCC	Knockdown von mKif21B
IS-KIF21Batg-as	gGCCAGCCATGGTCTCCGGC	
IS-KIF21B3UTR-s	aAGACGAGGTGGAGGAGGGA	
IS-KIF21B3UTR-as	tCCCTCCTCCACCTCGTCTT	

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.

Unterstrichen dargestellt sind die jeweiligen Restriktionsschnittstellen. Das Startcodon ist fett gekennzeichnet. Kleinbuchstaben bezeichnen PTO-modifizierte Basen. s: *sense*, as: *antisense*, m: Maus

2.1.8 Vektoren und Konstrukte

Vektoren		
Name	Herstellung/Herkunft	Verwendung
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe	Klonierung von myc-Neurologin1 Δ PDZBD
pEGFP-N1	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)	Expression von C- oder N-terminal markierten EGFP-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen
pEGFP-C1	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)	
pEGFP-C2	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)	
pmRFP-DIC	AG Kneussel, ZMNH, Hamburg	Expression von N-terminal mRFP-markiertem DIC in eukaryotischen Zellen
pDynamitin-EGFP	R. Vallee, Columbia University USA (Palazzo et al. 2001)	Expression von EGFP-markiertem Dynamitin in eukaryotischen Zellen
pEGFP-Kif21B(Ende)	PCR mit IS-mKIF21B-2s, IS-mKIF21B-22as und cDNA, Restriktion und Ligation in pEGFP-C1 (XhoI, Sall)	Expression von EGFP-markiertem Kinesin 21B (AS 1211-1640) in eukaryotischen Zellen
pEGFP-Kif21B(Mitte)	PCR mit IS-mKIF21B-17s, IS-mKIF21B-21as und cDNA, Restriktion und Ligation in pEGFP-C2 (EcoRI, Sall)	Expression von EGFP-markiertem Kinesin 21B (AS 387-1212) in eukaryotischen Zellen
pEYFP-Neurologin1	A.M.Craig, Washington University, USA (Graf et al., 2004)	Expression von EYFP-markiertem Neurologin1 in eukaryotischen Zellen
pGFP-Neurologin1	P.Washbourne, University of California, USA (Fu et al. 2003)	Expression von EGFP-markiertem Neurologin1 in eukaryotischen Zellen
pmyc-Neurologin1	N.Brose, MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen	Expression von myc-markiertem Neurologin1 in eukaryotischen Zellen
pNeurologin1 Δ PDZBD-EGFP	PCR mit IS-N1-1s und IS-N1-1as auf pGFP-Neurologin1, Restriktion und Ligation in pEGFP-N1(HindIII, BamHI)	Expression von EGFP-markiertem Neurologin1 ohne PDZ-Bindedomäne in eukaryotischen Zellen
pmyc-Neurologin1 Δ PDZBD	PCR mit IS-N1-1s und IS-N1-2as auf myc-Neurologin1, Restriktion und Ligation in pcDNA3 (HindIII, XbaI)	Expression von myc-markiertem Neurologin1 ohne PDZ-Bindedomäne in eukaryotischen Zellen
pEGFP-PSD-95	AG Kneussel, ZMNH, Hamburg	Expression von EGFP-markiertem PSD-95 in eukaryotischen Zellen
pEGFP-PSD-95(256-398)	AG Kneussel, ZMNH, Hamburg	Expression der EGFP-markierten PDZ3 Domäne von PSD-95 in eukaryotischen Zellen

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Grundvektoren und Konstrukte.

Grundvektoren wurden zur Subklonierung von PCR-Produkten und zur Konstruktion von eukaryotischen Expressionsvektoren verwendet. Korrespondierende Sequenzen sind unter der jeweiligen Quelle einsehbar.

2.1.9 Antikörper

Primäre Antikörper			
Antikörper	Spezies	Verdünnung oder eingesetzte Menge	Quelle
α -Aktin	polyklonal, Kaninchen	1:2000 (WB)	Sigma (Taufkirchen)
α -pan-Cadherin	monoklonal, Maus	1:2000 (WB)	Abcam (Cambridge, UK)
α -GAD65/67	monoklonal, Maus	1:20.000 (WB), 1:2000 (IF)	BioTrend (Köln)
α -DIC	monoklonal, Maus	1:2000 (WB), 4 μ g (IP)	Chemicon (Temecula, Kalifornien, USA)
α -Flag	monoklonal, Maus	1:5000 (IF)	Sigma (Taufkirchen)
α -Gephyrin mAb7	monoklonal, Maus	1:100 (IF)	Synaptic Systems (Göttingen)
α -GFP	polyklonal, Kaninchen	1:2000 (WB), 4 μ g (IP)	Sigma (Taufkirchen)
α -GluR1	polyklonal, Kaninchen	1:1000 (WB), 1:100 (IF)	Chemicon (Temecula, Kalifornien, USA)
IgG (unspezifische Immunglobuline)	Kaninchen	4 μ g (IP)	Sigma (Taufkirchen)
IgG (unspezifische Immunglobuline)	Maus	4 μ g (IP)	Sigma (Taufkirchen)
α -Kif5C	polyklonal, Kaninchen	1:2000 (WB)	ABR/Dianova (Hamburg)
α -Kif21B	polyklonal, Kaninchen	1:2000 (WB), 1:200 (IF), 4 μ g (IP)	Upstate (New York, USA)
α -myc	polyklonal, Kaninchen	1:100 (IF)	Sigma (Taufkirchen)
α -NeuN	monoklonal, Maus	1:1000 (WB), 1:100 (IF)	Upstate (New York, USA)
α -NLG1/3	monoklonal, Maus	1:2000 (WB), 4 μ g (IP)	Synaptic Systems (Göttingen)
α -NLG1	monoklonal, Maus	1:2000 (WB), 4 μ g (IP)	Synaptic Systems (Göttingen)
α -NLG3	polyklonal, Kaninchen	4 μ g (IP)	Synaptic Systems (Göttingen)

α -nNOS	polyklonal, Kaninchen	1:1000 (WB)	CST (Danvers, USA)
α -NSF	monoklonal, Maus	1:5000 (WB)	BD Biosciences (Heidelberg)
α -pan-PDZ	polyklonal, Kaninchen	1:2000 (WB)	H.-J. Kreienkamp, UKE, Hamburg
α -PSD-93	monoklonal, Maus	1:200 (WB)	Alomone (Jerusalem, Israel)
α -PSD-95	monoklonal, Maus	1:2000 (WB), 1:200 (IF), 4 μ g (IP)	ABR/Dianova (Hamburg)
α -SAP-97	polyklonal, Kaninchen	1:1000 (WB)	ABR/Dianova (Hamburg)
α -SAP-102	polyklonal, Kaninchen	1:300 (WB)	ABR/Dianova (Hamburg)
α -SNX4	polyklonal, Ziege	1:500 (WB)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, USA)
α -SV2	monoklonal, Maus	1:100 (IF)	K. M. Buckley, Harvard Medical School, USA
α -Synapsin	polyklonal, Kaninchen	1:2000 (WB)	CST (Danvers, USA)
α -Synaptophysin	polyklonal, Ziege	1:50 (IF)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, USA)
α -Synaptophysin	polyklonal, Kaninchen	1:100 (IF)	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
α -VGLUT	polyklonal, Kaninchen	1:10.000 (WB), 1: 5000 (IF)	Synaptic Systems (Göttingen)
Sekundäre Antikörper			
Antikörper	Spezies	Verdünnung oder eingesetzte Menge	Quelle
α -Maus IgG Alexa Fluor® 488 gekoppelt	Ziege	1:500 (IF)	Invitrogen (Karlsruhe)
α -Kaninchen <i>AffiniPure</i> <i>Fab Fragment</i> CY3™ gekoppelt	Esel	1:50 (IF)	Dianova (Hamburg)

α -Kaninchen <i>AffinityPure Fab</i> <i>Fragment CY5™</i> gekoppelt	Esel	1:50 (IF)	Dianova (Hamburg)
α -Maus IgG CY2™ gekoppelt	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
α -Maus IgG CY3™ gekoppelt	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
α -Maus IgG CY5™ gekoppelt	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
α -Kaninchen IgG CY2™ gekoppelt	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
α -Kaninchen IgG CY3™ gekoppelt	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
α -Kaninchen IgG CY5™ gekoppelt	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
α -Ziege IgG CY2™ gekoppelt	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
α -Ziege IgG CY3™ gekoppelt	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
α -Ziege IgG CY5™ gekoppelt	Esel	1:500 (IF)	Dianova (Hamburg)
α -Maus IgG HRP- gekoppelt	Ziege	1:10.000 (WB)	Dianova (Hamburg)
α -Kaninchen IgG HRP- gekoppelt	Ziege	1:10.000 (WB)	Dianova (Hamburg)
α -Ziege IgG HRP- gekoppelt	Esel	1:10.000 (WB)	Dianova (Hamburg)

Tabelle 2.4: Übersicht der eingesetzten Antikörper.

IF= Immunfluoreszenz, IP: Immunpräzipitation, WB= Western Blot.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde die DNA-Sequenz von Interesse mittels PCR (vgl. 2.2.1.2) amplifiziert, wobei rekombinante Plasmid-DNA oder cDNA als Matrizen dienten und über geschwänzelte Starteroligonukleotide (*Primer*) Restriktionsschnittstellen an das PCR-Produkt gefügt wurden. Der Reaktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.2.1.5) und das modifizierte Amplifikat aus dem Agarosegel isoliert (vgl. 2.2.1.6). Nach einer präparativen Restriktion (vgl. 2.2.1.8) des gesamten Amplifikates wurde die DNA wiederum aufgereinigt (vgl. 2.2.1.6) und quantifiziert (vgl. 2.2.1.7). Parallel hierzu wurde der Zielvektor präparativ restringiert (vgl. 2.2.1.8), dessen 5'-Enden dephosphoryliert (vgl. 2.2.1.9) und anschließend aufgereinigt (vgl. 2.2.1.6) und quantifiziert (vgl. 2.2.1.7). Die ligierten DNA-Fragmente (vgl. 2.2.1.10) wurden nun in *E. coli*-Zellen transformiert (vgl. 2.2.1.12). Einzelne gewachsene Kolonien wurden gepickt und in 5 ml-Kulturen (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) überführt. Positive Klone, die das rekombinante Plasmid trugen, wurden nach Plasmid-DNA-Minipräparation (vgl. 2.2.1.13) durch analytische Restriktion (vgl. 2.2.1.8) identifiziert. Die Überprüfung der Plasmide erfolgte durch DNA-Sequenzierung (vgl. 2.2.1.14).

2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Klonierung verschiedener DNA-Fragmente (vgl. 2.2.1.1) wurden diese unter Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide (*Primer*) durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis *et al.*, 1986) amplifiziert. Dabei enthielten die Oligonukleotide je eine Sequenz für eine Restriktionsschnittstelle. Die PCR-Produkte wurden dann mit den entsprechenden Enzymen restringiert (vgl. 2.2.1.8) und in die jeweiligen Vektoren kloniert (vgl. 2.2.1.1). Die PCR wurde mit Hilfe der *PfuUltra*-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) oder der *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Taq DNA-Polymerase-Mix	PfuUltra-DNA Polymerase Mix
1x Polymerasepuffer + 1,5 mM MgCl ₂	1x Finaler Polymerasepuffer (inklusive 2 mM MgCl ₂)
0,2 mM jedes dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,2 mM jedes dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,2 µM je <i>Primer</i>	0,2 µM je <i>Primer</i>
50 ng Plasmid-DNA oder 200 ng cDNA-Bibliothek als Matrize	50 ng Plasmid-DNA oder 200 ng cDNA-Bibliothek als Matrize
2,5 U Polymerase	1 U Polymerase
ddH ₂ O ad Gesamtvolumen von 30-50 µl	ddH ₂ O ad Gesamtvolumen von 30-50 µl

Tabelle 2.5: Übersicht der PCR-Reaktionsansätze.

Es wurden folgende Standard-Protokolle für die Temperaturzyklen verwendet:

	Taq DNA-Polymerase	PfuUltra-DNA Polymerase Mix
Initiale Denaturierung	94°C; 2-5 min	95°C; 1-2min
Denaturierung	94°C; 45 s	95°C; 20 s
Primer-Anlagerung	4-6°C unter der Primer-Schmelztemperatur, 20-30 s	
Kettenverlängerung		
	72°C; 1 min/kb des gewünschten Produkts	72°C; 15 s wenn Produkt ≤ 1 kb; 15s/kb des gewünschten Produkts wenn Produkt > 1 kb
Kettenverlängerung	72°C; 10 min	72°C; 3 min
		4°C; ∞

Tabelle 2.6: Übersicht der PCR-Bedingungen.

Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.1.5) analysiert und gegebenenfalls aufgereinigt (vgl. 2.2.1.6).

2.2.1.3 Präparation von Gesamt-RNA aus Gehirn

Es wurden Gehirne adulter Mäuse präpariert und in einem Glas-Homogenisator zerkleinert. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte durch die Zugabe von TRIZOL® Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben und beruht auf der Einschnitt-RNA-Isolation von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski *et al.*, 1987). Nach der RNA-Präparation wurden die entstandenen Pellets bei -80°C eingefroren.

2.2.1.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit 2 µg der gewonnenen RNA nach Herstellerangaben mit der SuperScript™ II reversen Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt und diente als Ausgangsmaterial für PCRs (vgl. 2.2.1.2, 2.2.1.3).

2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in 1%igen (w/v), Ethidiumbromid-enthaltenden Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TAE durch Aufkochen gelöst und Ethidiumbromid hinzugefügt (0,5 µg/ml Gelvolumen). Als Lauffuffer wurde 1x TAE verwendet. Die DNA wurde mit DNA-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen aufgetragen und bei etwa 7-10 V/cm Gellänge elektrophoretisch aufgetrennt. Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert, konnte diese nach der Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden (UV-Gel Dokumentationssystem von Herolab, Wiesloch). Als Größenstandard und zur DNA-Konzentrationsabschätzung (vgl. 2.2.1.7) wurde der Hyperladder I™ (Bioline, Luckenwalde) verwendet.

2.2.1.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe eines Kits (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Roche, Mannheim) entsprechend der

Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente (vgl. 2.2.1.5) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Auflösen der Agarose durch Inkubation in einem Puffer mit chaotropen Salzen bei 56°C mittels Anionenaustauschersäulen aufgereinigt.

2.2.1.7 Quantifizierung und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren

Eine qualitative und quantitative Überprüfung von DNA und RNA in wässriger Lösung erfolgte photometrisch mit einem Ultraspec®3000 Photometer (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) nach Sambrook *et al.* (1989). Die Quantifizierung der DNA konnte außerdem durch einen Intensitätsvergleich der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente (vgl. 2.2.1.5) und dem Größenstandard Hyperladder I™ (Bioline, Luckenwalde) durchgeführt werden. Die DNA-Konzentrationen der Banden des Größenstandards werden vom Hersteller angegeben.

2.2.1.8 Restriktionsanalyse

Restriktionsanalysen der DNA erfolgten mit Typ-II Restriktionsendonukleasen nach Angaben der Hersteller. Pro 1 µg DNA wurde in der Regel 1 Unit des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt und die Reaktionsansätze in vom Hersteller empfohlenen Puffer und bei entsprechender Temperatur inkubiert. Die restringierte DNA wurde anschließend über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt (vgl. 2.2.1.5, 2.2.1.6).

2.2.1.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation restringierter Vektoren zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) entfernt. Dazu wurde 1 µl CIP (10 U/µl) zum Reaktionsansatz hinzugefügt, für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt (vgl. 2.2.1.5, 2.2.1.6).

2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von Vektor und DNA-Fragment wurde die T4-DNA-Ligase (5 U/µL) verwendet. In der Regel wurden hierbei 50 ng Vektor und der dreifache molare Überschuss an DNA-Fragment eingesetzt (Crouse *et al.*, 1983). Die Ligationsfragmente wurden mit 2 µl 5x Ligase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase und x µl H₂O in einem Volumen von 10 µl über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Transformation von *E. coli*-Zellen (vgl. 2.2.1.12) wurden 5-10 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

2.2.1.11 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

In Anlehnung an Inoue *et al.* (1990) wurde zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zunächst eine 3 ml-Vorkultur von *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-Blue in LB-Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurde eine Maxikultur in 250 ml SOB-Puffer angeimpft und diese bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6

inkubiert (24-40 h). Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurde die Bakterienkultur bei 4°C für 10 min mit 2500 rpm im Beckmann JA-10 Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C für 10 min mit 2500 rpm im Beckmann JA-10 Rotor wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und unter Schwenken mit 1,4 ml DMSO versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.12 Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet. Die Transformation erfolgte nach einer Methode von Inoue *et al.* (1990). Pro Ansatz wurden 100 µl chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (vgl. 2.2.1.11) mit 1,7 µl β-Mercaptoethanol (1:10) für 10 min auf Eis unter gelegentlichem, vorsichtigem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe des Ligationsansatzes (vgl. 2.2.1.10) oder 0,5 µg Plasmid-DNA und Inkubation für 30 min auf Eis erfolgte für 30 sec ein Hitzeschock bei 42°C. Nach Abkühlen auf Eis für 2 min wurden die Zellen mit 800 µl LB-Medium für 45 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.13 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im 5 ml Übernachtkultur-Maßstab wurde durch alkalische Lyse (Birnboim *et al.*, 1979) mit anschließender Aufreinigung mittels Anionenaustauschersäulen nach dem Protokoll des NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) durchgeführt. Größere Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien im 200 ml Übernachtkultur-Maßstab wurden ebenfalls nach alkalischer Lyse der Bakterien mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen nach dem Protokoll des Plasmid Maxi Kits (Qiagen®, Hilden) isoliert.

2.2.1.14 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der ZMNH Service-Gruppe Sequenzierung unter Leitung von PD Dr. S. Hoffmeister-Ullerich mit einem ABI Prism® 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt) und dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Das verwendete Verfahren beruht auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). Die Elektropherogramme wurden mit der EditView-Software Version 1.0.1 (ABI Prism, Perkin Elmer, Applera, Weiterstadt) ausgewertet. Die Sequenzauswertung erfolgte über die Apple Macintosh-Software DNA-Strider 1.4fl (CEA, France).

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA-Assay)

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte mittels BCATM Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) nach Herstellerangaben.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch denaturierende SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989). Die Elektrophorese mit 9 x 6 cm großen Gelen wurde mit Hilfe der Mini-Protean III-Apparatur durchgeführt. Es wurden 8%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele mit 40% (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamidlösung nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt. Die jeweiligen Proteinproben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C 10 min denaturiert und anschließend bei ca. 120 V in 1x SDS-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente der Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard (Bio-Rad, München). Anschließend wurden die Proteine durch Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert (vgl. 2.2.2.3).

2.2.2.3 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen durch Immundetektion (vgl. 2.2.2.4) wurden die Proteine zunächst nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (vgl. 2.2.2.2) auf eine PVDF-Membran der Porengröße 0,45 µm (Hybond-P, Amersham, Freiburg) übertragen. Die Membran wurde kurz in Methanol aktiviert und dann zusammen mit *Whatman*-Papieren in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot wurde ausgehend von der Kathodenseite wie folgt aufgebaut: drei Lagen *Whatman*-Papier, Gel, Membran, drei Lagen *Whatman*-Papier. Der Transfer wurde in einer *Semi-Dry*-Blotapparatur bei einer konstanten Stromstärke von 1,7 mA/cm² für 2 h durchgeführt. Nach dem Blot erfolgte sofort die Immundetektion (vgl. 2.2.2.4).

2.2.2.4 Immundetektion

Um auf PVDF-Membranen immobilisierte Proteine durch spezifische Antikörper nachzuweisen, wurde die Membran zunächst für 30 min bei 37°C in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen durch die im Puffer enthaltenen Proteine abzusättigen. Nach dieser Blockierung erfolgte die Bindung des Primärantikörpers in entsprechender Verdünnung in Blockierungspuffer (vgl. Tabelle 2.4) bei 4°C über Nacht oder für 1-2 h bei RT bei leichtem Schütteln. Die Membran wurde 3-mal für 5 min mit 1x TBST gewaschen, um anschließend mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper entsprechender Verdünnung in Blockierungspuffer (vgl. Tabelle 2.4) für 30 min bei RT zu inkubieren. Im Anschluss an drei weitere fünfminütige Waschschrte in 1x TBST wurden die antikörpermarkierten Proteine mit Hilfe des ECL-Systems (*Enhanced Chemiluminescence*; ImmobilonTM Western HRP Substrate, Millipore Corporation,

Billerica, USA) nach Herstellerangaben auf lichtsensitiven Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) detektiert.

2.2.2.5 Herstellung von Zelllysaten

Um Zelllysate von HEK293-Zellen (vgl. 2.2.3.1) oder von kultivierten Neuronen (vgl. 2.2.3.2) herzustellen, wurden die jeweiligen Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und mit 1x PBS/1% Triton-X-100 und Proteaseinhibitorzusatz (Roche, Mannheim) lysiert. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellsuspensionen bei 1.000 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2.6 Proteinextraktion aus Maus- und Rattengehirn

Für die in Koimmunpräzipitationsexperimenten (vgl. 2.2.2.7) verwendeten Gehirnllysate wurden diese nach einem modifizierten Protokoll von Saito *et al.* (1997) hergestellt. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Sechs Ratten (P10) oder 4 adulte Mäuse (PSD-95-mutierte Tiere und Wildtypiere, vgl. Tabelle 2.1) wurden dekapitiert, die Gehirne komplett entnommen und in eiskaltem IM-Ac-Puffer supplementiert mit 5 mM DTT, 2 mM Mg-ATP und Proteaseinhibitorzusatz (1 mM PMSF und cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim) mit einem Glas-Teflon Homogenisator mit vier Stößen bei 800 rpm homogenisiert. Anschließend wurden fünf weitere Stöße bei größter Geschwindigkeit durchgeführt. Das Lysat wurde durch Zentrifugation mit 1.000 x g für 10 min bei 4°C im Beckmann JA20-Rotor geklärt. Der Überstand wurde im gleichen Rotor mit 10.000 x g für weitere 10 min bei 4°C sedimentiert. Das so gewonnene Pellet (P2), das große Zellorganellen und Membranbruchstücke enthält, wurde verworfen. Der S2-Überstand wurde für 1 h mit 100.000 x g bei 4°C im Beckmann SW40-Rotor ultrazentrifugiert, um eine mit Vesikeln angereicherte Fraktion zu gewinnen. Das Pellet (P3) wurde in 2 ml (PSD-95 KO und WT Mäuse) oder 3 ml (Ratten) IM-Ac-Puffer resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der S3-Überstand wurde für 1 h mit 400.000 x g bei 4°C im Beckmann TLA 100.3-Rotor ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet (P4), das restliche kleine Vesikel und große Proteinkomplexe enthält, wurde in 2-3 ml IM-Ac-Puffer resuspendiert und in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung aller Aliquots erfolgte bei -80°C.

Für Immunpräzipitationsexperimente (vgl. 2.2.2.7) wurde dem P3-Pellet Triton-X-100 zugesetzt, um bei der Inkubation von Extrakt und immobilisierten Antikörpern unspezifische Anreicherungen durch intakte Vesikel zu minimieren.

2.2.2.7 Koimmunpräzipitation

Zur Koimmunpräzipitation wurden mit Protein G-gekoppelte magnetische Dynabeads® (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen) mit Antikörpern gekoppelt und mit Proteinextrakten (vgl. 2.2.2.5, 2.2.2.6), welche die Proteine von Interesse enthielten, inkubiert. Die Aufreinigung der Dynabeads® erfolgte über den Dynal MPC (Dynal Magnetic Particle Concentrator, Invitrogen Dynal AS, Oslo,

Norwegen). 30 µl Dynabeads® wurden dreimal mit IP-Puffer/0,5% (v/v) Triton-X-100 gewaschen und dann zur Kopplung mit 4 µg Antikörper in 800 µl IP-Puffer/0,5% (v/v) Triton-X-100 für 4 h bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch drei Waschschriffe mit IP-Puffer/0,5% (v/v) Triton-X-100 entfernt. Nun wurden die immobilisierten Antikörper mit 0,2-1 ml Proteinextrakt über Nacht bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert, 5-mal für 5 min gewaschen und mit 45 µl H₂O eluiert. Anschließend wurden die Proben mit 5x SDS- Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95°C hitzedenaturiert und zur Analyse auf ein SDS-Polyacrylamidgel (vgl. 2.2.2.2) aufgetragen und nach erfolgten Western Blot immundetektiert (vgl. 2.2.2.3, 2.2.2.4).

2.2.2.8 Präparation von synaptosomalen Membranen (Kortex)

Um Synaptosomen von kultivierten Kortexneuronen (DIV14) aufzureinigen (vgl. 2.2.3.2) wurden die Zellen nacheinander zweimal mit 1 ml Puffer 1 (0,32 mM Saccharose; 2 mM EDTA; 4 mM HEPES pH 7,4; Proteaseinhibitorzusatz) lysiert, in einem Glas-Teflon Homogenisator zehnmal per Hand homogenisiert (Aliquot 1+2) und 10 min bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5417C, Hamburg). Die vereinigten Überstände wurden nun 15 min bei 10.000 x g und 4°C im Beckmann JA20-Rotor sedimentiert. Die hierdurch gewonnenen Pellets wurden zweimal in 1 ml Puffer 1 resuspendiert und jeweils wie zuvor zentrifugiert (Aliquot 3 vom Überstand). Nun wurde das erhaltene Pellet in 2 ml eiskalten Puffer 2 (2 mM EDTA; 4 mM HEPES pH 7,4; Proteaseinhibitorzusatz) resuspendiert, dreimal im Glas-Teflon Homogenisator homogenisiert (Aliquot 4) und 30 min bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler hypotonisch lysiert. Die bei der darauffolgenden 30-minütigen Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C (Beckmann JA20-Rotor) erhaltenen Fraktionen enthielten im Überstand die groben synaptischen Vesikel (Aliquot 5) und im Pellet die synaptischen Membranen, welche in 1 ml Puffer 3 (2 mM EDTA; 50 mM HEPES pH 7,4; Proteaseinhibitorzusatz) gelöst, homogenisiert, mit 0,5% Triton-X-100 versetzt und 15 min bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert wurden. Die in der anschließenden 20-minütigen Zentrifugation bei 32.000 x g und 4°C erhaltenen Pellets (angereicherte postsynaptische Dichten) wurden in 100 µl Puffer 3 resuspendiert und mittels SDS-PAGE (vgl. 2.2.2.2) und Western Blot (vgl. 2.2.2.3) analysiert.

2.2.2.9 Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Gehirne von acht Ratten (P10) wurden präpariert und wie unter (vgl. 2.2.2.6) beschrieben homogenisiert und differentiell zentrifugiert, um die mit Vesikeln angereicherten Pellets (P3) zu erhalten. Diese wurden nun in 1,5 ml 2 M Saccharoselösung resuspendiert, mit 0,1% Triton-X-100 versetzt, auf einen Saccharosegradienten (0,3 M; 0,4 M; 0,5 M; 0,6 M; 0,7 M; 0,8 M; 0,9 M; 1 M; 1,3 M; 1,5 M; 1,8 M; 2 M) geschichtet und über Nacht bei 4°C und 100.000 x g (Beckmann SW40-Rotor) ultrazentrifugiert. Anschließend wurden die verschiedenen Fraktionen vorsichtig in 500 µl Aliquots abgenommen und 15 µl

jeder Probe per SDS-PAGE (vgl. 2.2.2.2) und Western Blot (vgl. 2.2.2.3) analysiert.

2.2.2.10 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Um Zelloberflächenproteine zu biotinylieren wurden entweder 4 cm Kulturschalen mit HEK293-Zellen (vgl. 2.2.3.1) oder kultivierten primären Neuronen (vgl. 2.2.3.2) einmal mit 1x PBS gewaschen und mit 1 mM Biotinylierungsreagenz (Biotinamidohexansäure 3-sulfo-N-hydroxysuccinimidester Natriumsalz, Sigma, Taufkirchen) 20 min bei 4°C inkubiert. Die Biotinylierungsreaktion wurde durch zweimalige 20 minütige Inkubation mit 100 mM Glyzin in HEPES-Puffer bei 4°C beendet und die Zellen lysiert (vgl. 2.2.2.5). Die biotinylierten Proben wurden nun mit zweimal in 1x PBS/1% (v/v) Triton-X-100 gewaschenen Dynabeads® Myone™ (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen) für 3 h bei 4°C inkubiert. Anschließend folgten dreimal 6 minütige Waschschriffe mit 1x PBS/1% (v/v) Triton-X-100, Elution in 45 µl H₂O, SDS-PAGE (vgl. 2.2.2.2) und Western Blot-Analyse (vgl. 2.2.2.3).

Bei aktivitätsabhängigen Untersuchungen erfolgten vor dem eigentlichen Biotinylierungsexperiment entweder chemische LTD- oder LTP-Induktionen (Palmer *et al.*, 1997, Huber *et al.*, 2001, Otmakhov *et al.*, 2003). Für ersteres wurden DIV10 hippocampale Rattenneurone mit 50 µM (RS)-3,5-Dihydroxyphenylglyzin (DHPG, TOCRIS bioscience, USA) 5 min bei 37°C inkubiert und einmal mit 1x PBS gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C in Neurobasalmedium folgte die Biotinylierungsreaktion. Um chemische LTP zu induzieren, inkubierte man DIV10 hippocampale Rattenneurone 20 min in ACSF (1 mM MgCl₂, 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 33 mM (D)-Glukose, 25 mM HEPES, pH 7,3) und 10 min in ACSF (125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 33 mM (D)-Glukose, 25 mM HEPES, pH 7,3) supplementiert mit 50 µM Forskolin und 0,1 µM Rolipram (TOCRIS bioscience, USA). Als Kontrolle diente ACSF (125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 33 mM (D)-Glukose, 25 mM HEPES, pH 7,3) supplementiert mit DMSO (1:1000, SIGMA, Taufkirchen). Anschließend erfolgte ebenfalls die oben beschriebene Biotinylierungsreaktion.

2.2.2.11 Applikation von *antisense/sense*-Oligonukleotiden

Zur spezifischen Inhibition der Kif21B-Expression wurden *antisense*-Oligonukleotide sowie *sense*-Oligonukleotide als Negativkontrolle appliziert. Dafür wurden 5' modifizierte PTO (Phosphorothioat)-Oligonukleotide (vgl. Tabelle 2.2) verwendet, die sich durch eine verbesserte Nukleaseresistenz auszeichnen. Zudem steigert die Modifikation die Aktivität der RNase H, welche die durch das gebundene *antisense*-Oligonukleotid markierte mRNA abbaut. In Anlehnung an ein *antisense*-Protokoll von Ferreira *et al.* (1992), bei dem die Oligonukleotide durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, wurden 4 cm Kulturschalen primärer hippocampaler Neurone von DIV3 bis DIV7/8 täglich mit 5 µM PTO-

Oligonukleotiden behandelt. Die an DIV7/8 biotinylierten Neurone (vgl. 2.2.2.10) wurden anschließend per SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank und unter Verwendung sterilisierter Gefäße und Reagenzien durchgeführt. Alle Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% (v/v) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die HEK293-Zellen wurden in HEK293-Medium auf 10 cm Ø-Kulturschalen (Sarstedt, Nümbrecht) oder für Mikroskopiezwecke auf Poly-L-Ornithin (0,01%, Sigma, Taufkirchen)-beschichteten 12 mm Ø-Glasplättchen (Roth, Karlsruhe) kultiviert. Alle 2 bzw. 3 Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 bis 1:8 je nach Konfluenz passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit vorgewärmten 1x PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1 ml 1x Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) für 1-3 min bei RT von der Kulturschale und aus dem Zellverband gelöst. Die Protease wurde durch Zugabe von 3 ml HEK293-Medium inaktiviert, die Zellen durch Triturieren vereinzelt und anschließend auf frische Kulturschalen mit 9 ml vorgelegtem Medium verteilt. Auf den 12 mm-Glasplättchen wurden jeweils 70.000 Zellen ausgesät.

2.2.3.2 Präparation und Kultivierung primärer Neurone

Zur Kultivierung hippokampaler Neuronen wurden acht neugeborene (P0) Ratten oder Mäuse durch Dekapitation getötet. Die Hippokampi wurden in eiskaltem 1x PBS/10mM Glukose präpariert. Zur Vereinzeln der Zellen wurden die Gewebe in 5 ml 1x PBS/10 mM Glukose mit 10 µg/ml DNase I und 0,5 mg/ml Papain für 25 min bei 37°C inkubiert. Nach Waschen in 10 ml DMEM/F12-complete wurden die Zellen zum Vereinzeln vorsichtig in 2 ml desselben Mediums mit abgeschmolzenen Pasteurpipetten trituriert. Die Zellen wurden in DMEM/F12-complete auf 12 mm-Glasplättchen (Roth, Karlsruhe) oder in eine Kammer einer 4-Well-Lab-Tek®II-Chamber-Coverglass System #155382 (Nalge Nunc International, Naperville, Illinois, USA) in einer Dichte von 110.000 Zellen/Glasplättchen (Rattenneuronen) bzw. 130.000 Zellen/Glasplättchen (Mausneuronen) in den Vertiefungen einer 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Glasoberflächen waren zuvor mit Poly-L-Lysin (50 µg/ml H₂O, Sigma, Taufkirchen) und Laminin (20 µg/ml H₂O, Sigma, Taufkirchen) je über Nacht bei 4°C beschichtet und nach jedem Beschichtungsschritt zweimal mit H₂O gewaschen worden. Die Kammern der 4-Well-Lab-Tek®II-Chamber-Coverglass System-Schalen wurden über Nacht mit Poly-L-Ornithin (0,01%, SIGMA, Taufkirchen) beschichtet. Die Kulturen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Nach 5 h wurde das Medium durch 1 ml Neurobasalmedium ersetzt. Nach 3 Tagen *in vitro* (DIV3) wurde 3 µM 1-[β-D-Arabinofuranosyl]-

Cytosin zu den Kulturen gegeben, um die Proliferation von Astrozyten zu stoppen. Alle 7 Tage in Kultur wurde ein Drittel des Kulturmediums durch frisches Neurobasalmedium ersetzt.

Um Synaptosomen von kultivierten Kortexneuronen (DIV14) aufzureinigen, wurden diese auf mit Poly-L-Lysin (50 µg/ml H₂O, Sigma, Taufkirchen) beschichteten 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Ansonsten wurde der oben beschriebenen Kultivierungsmethode von hippokampalen Neuronen gefolgt.

2.2.3.3 Transfektion

HEK293-Zellen (vgl. 2.2.3.1) wurden mit Hilfe von Kalziumphosphat nach der Standardmethode (Chen *et al.*, 1987) transient transfiziert. Die Zellen wurden wie beim Passagieren zunächst vereinzelt und auf 10 cm Kulturschalen oder 12 mm-Glasplättchen ausgesät. Die Glasplättchen waren zuvor durch Inkubation mit einer Lösung von Poly-L-Ornithin (0,01%ig, SIGMA, Taufkirchen) in 1x PBS für mindestens 1 h bei 37°C beschichtet worden. Kulturen wurden bei ca. 50-80% Konfluenz transfiziert. Hierzu wurde die Plasmid-DNA in sterilem H₂O aufgenommen, mit 1 M CaCl₂ versetzt und mit 2x HBS durch mehrmaliges Triturieren sprudelnd vermischt (vgl. Tabelle 2.7). Während einer zehnmütigen Inkubation bei RT bildeten sich Kalziumphosphat-Präzipitate, die anschließend tropfenweise zu den Zellen hinzugefügt wurden. Die Zellen wurden bis zu 20 Stunden bei 37°C und 3% (v/v) CO₂ inkubiert, um die Transfektionseffizienz zu erhöhen. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen weiter bei 5% (v/v) CO₂ kultiviert, bis sie lysiert (vgl. 2.2.2.5) oder für die Immunzytochemie (vgl. 2.2.3.4) fixiert wurden.

12 mm Ø Glasplättchen	3,5 cm Ø Kulturschale	10 cm Ø Kulturschale
1- 2 µg DNA	2-4 µg DNA	10-18 µg DNA
ad 18,75 µl steriles H ₂ O	ad 37,5 µl steriles H ₂ O	ad 225 µl steriles H ₂ O
6,25 µl 1 M CaCl ₂	12,5 µl 1 M CaCl ₂	75 µl 1 M CaCl ₂
25 µl 2x HBS	50 µl 2x HBS	300 µl 2x HBS

Tabelle 2.7: Übersicht der für Transfektionen eingesetzten Chemikalien.

Neuronale Primärkulturen (vgl. 2.2.3.2) auf 12 mm-Glasplättchen oder in den 4-Well-Lab-Tek®II-Chamber-Coverglass System #155382-Schalen wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll zwischen DIV4 und DIV10 transfiziert. 2 µg Plasmid-DNA wurden in 18,75 µl sterilem H₂O aufgenommen, mit 6,25 µl 1 M CaCl₂ versetzt, mit 25 µl 2x HBS durch mehrmaliges Triturieren sprudelnd vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Vom Medium der zu transfizierenden Zellen wurden 500 µl abgenommen und separat aufbewahrt. Der Transfektionsansatz wurde zu den Zellen gegeben und die Kultur für 1-3 h bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Nun wurde 3-mal mit vorgewärmten HEPES-Puffer gewaschen

und das zuvor abgenommene Medium und zusätzlich 300 µl frisches Neurobasalmedium auf die Zellen gegeben. Die Expressionsdauer betrug je nach Konstrukt 12-48 h. Anschließend wurden die Zellen für immunzytochemische Experimente (vgl. 2.2.3.4) fixiert oder für *Time-lapse*-Videomikroskopie (vgl. 2.2.3.6) verwendet.

2.2.3.4 Immunzytochemie

Auf 12 mm-Glasplättchen kultivierte Zellen (vgl. 2.2.3.1, 2.2.3.2) wurden mit 1x PBS gewaschen und für 10 min mit 1x PBS/4% (w/v) Paraformaldehyd bei RT fixiert. Nach drei Waschschrritten in 1x PBS wurden die Zellen für 4 min mit 1x PBS/0,25% (v/v) Triton-X-100 permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen zur Minimierung unspezifischer Bindungen für 30 min mit Blockierungspuffer bei RT versetzt. Die Inkubation mit dem jeweiligen in Blockierungspuffer entsprechend verdünntem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C oder für 3 h bei RT. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit entsprechenden, fluoreszierenden und in Blockierungspuffer verdünnten Sekundärantikörpern bei RT für 45 min im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Deckgläser dreimal mit 1x PBS gewaschen und auf Objektträgern mit Hilfe von AquaPoly/Mount (Polysciences, Warrington, Pennsylvania, USA) fixiert. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind Tabelle 2.4 zu entnehmen. Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4°C unter Lichtausschluss. Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte durch konfokale Lasermikroskopie mit dem inversen Mikroskop Leica DM IRBE unter Verwendung der Software LCS TCS-SP2.

Um die Spezifität des Kif21B-Antikörpers (vgl. Tabelle 2.4) in immunzytochemischen Experimenten zu kontrollieren, wurde dieser Primärantikörper vor Inkubation der Zellen mit demselbigen 30 min bei 4°C mit dem für die Herstellung des Antikörpers benutzen Peptid (200-400 ng Peptid, RDKVSRTVSLPTRGST) inkubiert. Anschließend folgte der normale immunzytochemische Versuchsablauf.

2.2.3.5 Nachweis von internalisierten Oberflächenproteinen

Um die Internalisierung von NLG1 in mit pmyc-NLG1 transfizierten hippocampalen Neuronen oder HEK293-Zellen zu verfolgen, wurden die Zellen 1 h mit gegen myc-gerichtetem Primärantikörper (1 µg/50 µl HEPES-Puffer, vgl. Tabelle 2.4) bei 4°C inkubiert, zweimal mit 1x PBS gewaschen und zurück in ihr jeweiliges Medium bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ überführt. Nach zweistündiger Internalisierung wurden die Zellen mit einem kaninchenspezifischen CY5TM gekoppelten Sekundärantikörper (1 µg/50 µl Blockierungspuffer, vgl. Tabelle 2.4) bei 4°C für 2 h oberflächengefärbt, zweimal in 1x PBS gewaschen und mit 1x PBS/4% (w/v) Paraformaldehyd bei RT für 10 min fixiert. Nach anschließendem zweimaligen 1x PBS-Waschschrritten folgte zunächst eine 30 minütige Inkubation mit Blockierungspuffer bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit kaninchenspezifischen CY3TM gekoppelten Sekundärantikörper (0,25 µg/50 µl Blockierungspuffer, vgl. Tabelle 2.4) bei RT für 2 h intrazellulär gefärbt, dreimal

mit 1x PBS gewaschen und auf Objektträgern mit Hilfe von AquaPoly/Mount (Polysciences, Warrington, Pennsylvania, USA) fixiert. Um die Endozytose zu blockieren (Negativkontrolle) erfolgte die Versuchsdurchführung in Anwesenheit von 350 mM Saccharose. Die Daten wurden durch konfokale Lasermikroskopie mit einem inversen Leica DM IRBE Mikroskop unter Verwendung der Software LCS TCS-SP2 erfasst und mit der MetaMorph 6.3r7 Software analysiert.

2.2.3.6 Time-lapse-Videomikroskopie

Für die *Time-lapse* Videomikroskopie wurde das Neurobasalmedium der in 4-Well-Lab-Tek®II-Chamber-Coverglass System #155382-Schalen kultivierten Neuronen durch vorgewärmten HEPES-Puffer ersetzt. Die Analyse der Zellen erfolgte unter einem Axiovert 200 Mikroskop bei einer konstanten Temperatur von 37°C in einer Inkubationskammer (Harnischmacher-Labor Technik, Kassel). Alle 5-15 Sekunden wurden Aufnahmen gemacht, die mit dem Programm MetaView 6,2r6 (Universal Imaging Corp., West Chester, Pennsylvania, USA) erfasst und ausgewertet wurden.

Für FM® 4-64 (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbte aktive Synapsen (Gaffield *et al.*, 2006) wurden die Zellen mit 15 µM FM4-64 in einer Stimulationslösung (31,5 mM NaCl, 90 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 50 µM DL-AP5, 30 mM (D)-Glukose) für 1 min bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Nun wurden die Zellen 3-mal mit 50 µM DL-AP5 und 10 µM CNQX/10 µM DNQX supplementierten vorgewärmten HEPES-Puffer gewaschen und gleichfalls analysiert.

2.2.3.7 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde mit Hilfe der Servicegruppe Morphologie des ZMNH unter Leitung von Dr. Michaela Schweizer durchgeführt. Dafür wurden 100 µm Vibratomserienschnitte (VT 1000S Leica, Wetzlar) von Wildtyp und Dynamitin überexprimierenden Mäusen (vgl. Tabelle 2.1) angefertigt, deren Gehirne zuvor in 1x PBS/4% (w/v) Paraformaldehyd, 3% (w/v) Glutaraldehyd fixiert wurden. Die Schnitte wurden nun mit 0,1 M Na-Cacadoylatpuffer pH 7,3/1% (w/v) OsO₄ 2 h bei 4°C osmiert. Nach zweimaligen Waschschritten mit 0,1 M Na-Cacadoylatpuffer erfolgte eine Entwässerung über eine Ethanolreihe (je 10 min bei 30%, 50% 70%, 80%, 90% und zweimal 30 min bei 100%), eine Inkubation von zweimal 20 min in Propylenoxid und die Einbettung in Epon (Roth, Karlsruhe). Hierzu wurden die Schnitte zunächst für 2 h bei RT in einem Propylen-Epon-Gemisch (1:1) und in einem Propylenoxid-Epon-Gemisch (1:2) sowie anschließend in purem Epon über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine weitere dreistündige Inkubation in frischem Epon, woran sich die Aushärtung der flach ausgelegten Gehirnschnitte für 2 Tage bei 60°C anschloss. Nun wurden kleine, den Cerebellum enthaltende Bereiche ausgeschnitten und auf vorpolymerisierte Eponblöcke befestigt, um Semidünnschnitte (0,5 µm) anzufertigen und diese anschließend mit Toloidinblau zur Visualisierung und Qualitätskontrolle des Gewebes zu färben. Anschließend wurden Ultradünnschnitte (50-70 nm) angefertigt, auf Formvar beschichtete Netze gezogen und kontrastiert

(Richardson *et al.*, 1960). Hierfür wurden die Schnitte zunächst 20 min auf einen Tropfen 2%iger Uranylacetatlösung inkubiert, mit H₂O gespült, um dann ein zweites Mal 7 min in Bleicitrat (0,04%) kontrastiert zu werden. Nach abschließender Spülung mit H₂O wurden die Netze mit Hilfe eines EM 902 (Zeiss, Oberkochen) und der MetaMorph 6.3r7 Software (Universal Imaging Corp., West Chester, Pennsylvania, USA) analysiert.

2.2.3.8 Elektrophysiologie

Für die elektrophysiologische Registrierung von Membranströmen an mit pDynamitin-EGFP (Palazzo *et al.*, 2001) transfizierten hippokampalen DIV10 Neuronen (vgl. 2.2.3.2, 2.2.3.3) wurde die Ganzzellkonfiguration der *patch-clamp* Technik (Hamill *et al.*, 1981) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.R. Schwarz (ZMNH) angewendet. Zur Stimulation und Datenaufzeichnung wurde die Pulse 8.65 Software (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz) in Kombination mit einem EPC9 *patch-clamp* Verstärker angewendet. Die bei RT gewonnenen Daten wurden bei 9 kHz tiefpassgefiltert. Die mit Sigmacote (Sigma, Taufkirchen) beschichteten Pipetten aus Borsilikatglas wurden mit einer Pipettenlösung (120 mM K-Glukonat, 8 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 14 mM Phosphokreatin, 2 mM Mg-ATP, 0,3 mM Na-GTP, pH 7,3) gefüllt und die mEPSCs bei einem Haltepotential von $E = -80$ mV aufgenommen. Dabei betrug der Pipettenwiderstand in der Pipettenlösung 3-4 M Ω . Bei der Registrierung der synaptischen Ströme wurde eine extrazelluläre Lösung verwendet, die sich wie folgt zusammensetzte: 143 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,8 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM (D)-Glukose, pH 7,3. Dabei wurden 0,5 μ M TTX und 20 μ M Bicucullin hinzugefügt, um Na⁺-Ströme und damit Aktionspotentiale sowie GABA_A-Rezeptor vermittelte Ströme zu blockieren.

2.2.4 Quantitative Analyse und Statistik

Zur Quantifizierung wurden die Programme ImageJ 1.38v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) und MetaMorph 6.3r7 (Universal Imaging Corp., West Chester, Pennsylvania, USA) verwendet. Die Verarbeitung der Rohdaten sowie die statistische Analyse durch Mittelwerte, Standardabweichung und p-Werte nach *student's t-test* geschah mit dem Programm Excel (Microsoft, München).

3 Ergebnisse

Das transmembrane Zelladhäsionsprotein Neuroligin 1 (NLG1) ist in der postsynaptischen Dichte über die Bindung an PSD-95 verankert und bildet zusammen mit Neurexin in der präsynaptischen Membran einen heterophilen, transsynaptischen Komplex. Wichtige Funktionen von NLG umfassen die Synapsenentwicklung und -reifung sowie die Spezifizierung des exzitatorischen und inhibitorischen Synapsenverhältnisses (Prange et al., 2004, Dean et al., 2006). Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass die präzise NLG-Lokalisation und NLG-Konzentration für funktionale neuronale Netzwerke von Bedeutung sind. Dabei spielt die Frage, ob und wie NLG transportiert wird, eine entscheidende Rolle für dessen subzelluläre Lokalisation.

In dieser Arbeit wurde das Zelladhäsionsprotein NLG1 bezüglich seiner Mobilität untersucht. Dabei wurde ein retrograder und anterograder Neuroligin-Transportkomplex identifiziert und funktionell charakterisiert. Darüber hinaus konnten aktivitätsabhängige Mechanismen hinsichtlich der Regulation von NLG identifiziert und mit NLG-Transportprozessen in Verbindung gebracht werden.

3.1 Retrograder Transport von Neuroligin 1

In Vorarbeiten konnte der Kotransport des postsynaptischen Gerüstproteins PSD-95 mit dem retrograden Motorprotein Dynein beobachtet werden (AG Kneussel, ZMNH, persönliche Mitteilung). Diese beiden Proteine bilden einen Transportkomplex, welcher immunzytochemisch, biochemisch und zusätzlich mittels *Time-lapse* Videomikroskopie belegt werden konnte. Verschiedene Motoren interagieren über postsynaptische Gerüstproteine als Adaptoren mit transmembranösen Proteinen wie etwa Neurotransmitterrezeptoren, die innerhalb dieses Transportkomplexes zur Synapse transportiert werden (Maas *et al.* 2006, Setou *et al.* 2002). Da PSD-95 mit Neuroligin in der postsynaptischen Dichte (PSD) interagiert, stellte sich die Frage, ob NLG als Bestandteil dieses Dynein/PSD-95-Transportkomplexes mobilisiert wird. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde eine initiale Koimmunpräzipitation durchgeführt, deren Ergebnis Neuroligin 1 oder 3 im Komplex mit PSD-95 und Dynein vermuten ließ. Unterstützt wurde dies außerdem durch immunzytochemische Koloalisationsstudien. Diese Daten dienten als Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse.

3.1.1 Kofraktionierung der Dynein Intermediären Kette, PSD-95 und Neuroligin 1/3

Für eine erste Analyse der Interaktion von PSD-95, Dynein und Neuroligin wurde zunächst untersucht, ob diese Proteine in gleichen Zellfraktionen kosedimentieren. Hierfür wurden Gehirnextrakte differentiell zentrifugiert, um einzelne Organellfraktionen anzureichern (Saito *et al.*, 1997, vgl. 2.2.2.6). Von Interesse war hierbei die P3-Fraktion, welche mit Vesikeln, kleinen Zellorganellen und Proteinkomplexen angereichert ist und durch dreistufige Zentrifugation bei 1.000 x g, 10.000 x g und 100.000 x g gewonnen wird. Bei 1.000 x g (P1) pelletieren Zellkerne, Mitochondrien und große Zelltrümmer. Im Pellet der P2-Fraktion (10.000 x g Zentrifugation) präzipitieren kleine Mitochondrien, große Zellmembrantrümmer und große vesikuläre Zellorganellen. Die erhaltene P3-Fraktion wurde nun mit 2 M Saccharose/0,1% Triton-X-100 gelöst, auf einen Saccharosegradienten von 0,3 – 2 M geladen und über Nacht zentrifugiert. Hierdurch werden Moleküle aufgrund ihrer Schwebedichte getrennt. Die Proben der einzelnen Fraktionen unterschiedlicher Dichte wurden anschließend durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Im Dichtebereich von 1 M zeigten NLG1/3, PSD-95 und Dynein Intermediäre Kette (DIC) die stärkste Signalüberlappung (Abb. 3.1). Bei DIC handelt es sich um einen Bestandteil des Dynein-Motorkomplexes, welcher hier durch gegen DIC gerichtete Antikörper visualisiert werden konnte. Die Detektion von NSF (N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor) erfolgte, um in allen Fraktionen das Vorhandensein von Proteinen zu gewährleisten.

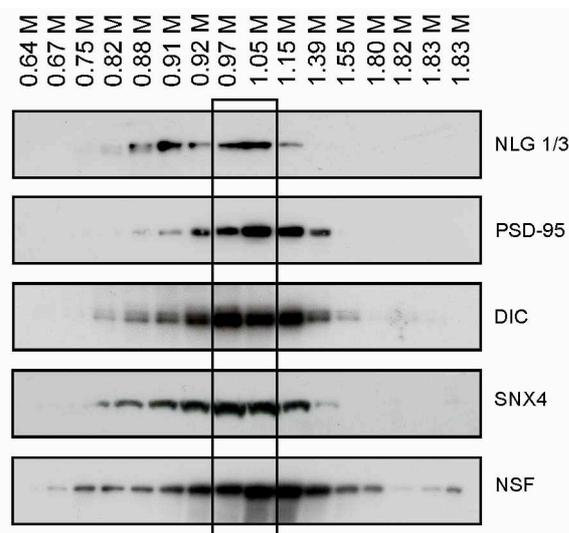


Abb. 3.1: Kofraktionierung von NLG, PSD-95 und Dynein.

Saccharosedichtegradientenzentrifugation mit durch differentielle Zentrifugation gewonnenem P3-Pellet. NLG1/3, PSD-95, DIC und SNX4 kosedimentierten. NSF diente als Kontrolle.

Dynein ist in endosomalen Sortierungs- und Transportprozessen involviert. Dies wird über die Bindung von der Dynein leichten Kette 1 (DLC) über das WW-Domänen enthaltende Protein KIBRA an SNX4 (*Sorting Nexin 4*) erreicht (Traer *et*

al., 2007, Driskell *et al.*, 2007). *Sorting Nexins* (SNX) umfassen eine Proteinfamilie, die in der Sortierung von Proteinen in Endozytoseprozessen involviert ist. Da SNX4 über KIBRA und DLC den Transport vom frühen Endosom zum Recycling-Endosom vermittelt, wurde auch ein gegen SNX4 gerichteter Antikörper zur Analyse des Kosedimentationsexperiments benutzt. Daraus ergab sich, dass SNX4 in gleichen Fraktionen mit PSD-95, NLG1/3 und Dynein kosedimentiert. Dies könnte auf einen SNX4, Dynein und PSD-95 vermittelten Endozytoseprozess von NLG1/3 hindeuten.

3.1.2 Koimmunpräzipitation der Dynein Intermediären Kette und PSD-95 mit Neuroligin 1

Im Rahmen von Vorarbeiten konnten in einer Immunpräzipitation mit DIC-spezifischen Antikörpern und P3-Extrakten PSD-95 und NLG kopräzipitiert werden, wobei aber nicht geklärt wurde, um welche spezifische NLG-Isoform es sich handelt (AG Kneussel, ZMNH, persönliche Mitteilung). Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde folgender Versuch durchgeführt.

Für die in Abbildung 3.2 dargestellte Immunpräzipitation wurden P3-Rattengehirnextrakte verwendet, welche mit Transportvesikeln angereichert sind (vgl. 3.1.1) und mit 0,5% Triton-X-100 versetzt wurden. Dadurch konnten Vesikelmembranen aufgelöst werden, wodurch die Anreicherungen von intakten Vesikeln im Präzipitat vermieden und die spezifische Interaktion von Proteinen in einem Komplex durch Protein-Protein-Wechselwirkungen gewährleistet werden können. Die Immunpräzipitation mit NLG1 spezifischen Antikörpern ergab eine Kopräzipitation von NLG1, PSD-95 und DIC. Unspezifische Maus-Immunglobuline dienten als Negativkontrolle und zeigten keine Präzipitation obiger Proteine. Auch die Detektion von KIF5C, einem anterograden Mikrotubuli-basierten Motor, war negativ (Abb. 3.2). Anhand dieser Immunpräzipitation konnte die spezifische Interaktion von NLG1 mit dem bereits bekannten PSD-95 und Dynein-Transportkomplex gezeigt werden.

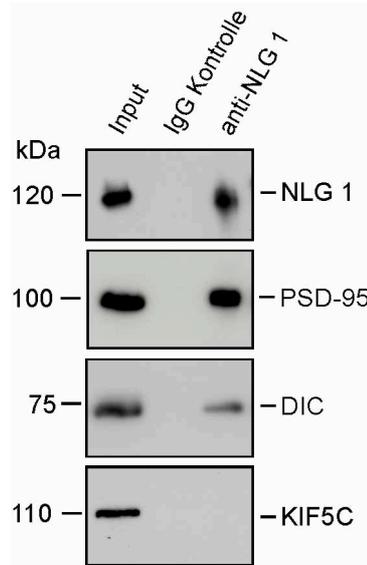


Abb. 3.2: Koimmunpräzipitation der Dynein Intermediären Kette und PSD-95 mit NLG1.

Die Immunpräzipitation von NLG1 mit spezifischen gegen NLG1 gerichteten Antikörpern, aber nicht mit unspezifischen Maus-Immunglobulinen (IgG) als Kontrolle erfolgte mit P3-Extrakten aus Rattengehirnen. Die Detektion mit gegen PSD-95 und DIC gerichteten Antikörpern zeigte eine Kopräzipitation dieser Proteine. Ein anterograde Motor (KIF5C) wurde nicht kopräzipitiert und diente als zusätzliche Kontrolle. Input: P3-Rattengehirnextrakt.

3.1.3 Koimmunpräzipitation von Neuroligin 1 und Dynein Intermediärer Kette mit Hilfe von Extrakten von PSD-95-mutierten Mäusen

Zur genaueren Untersuchung des retrograden Transportkomplexes wurde eine Immunpräzipitation mit gegen Dynein Intermediäre Kette (DIC) gerichteten Antikörpern und P3-Extrakten von adulten Wildtypmäusen und PSD-95-mutierten Tieren durchgeführt (Abb. 3.3 A). In den PSD-95-mutierten Mäusen sind die ersten beiden PDZ-Domänen noch funktionell, nur die dritte PDZ-Domäne über welche NLG mit PSD-95 interagiert, fehlt. Die deletierte PSD-95-Mutante lokalisiert nicht mehr in synaptischen Membranen oder postsynaptischen Dichten (Irie *et al.*, 1997, Migaud *et al.*, 1998).

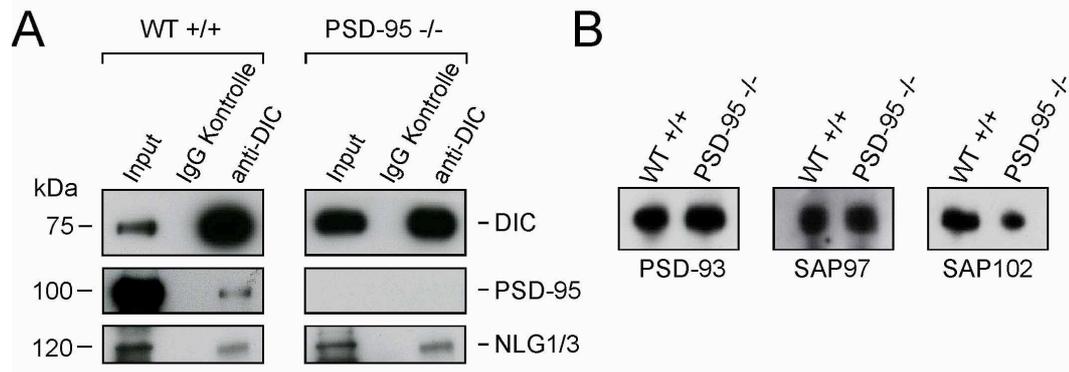


Abb. 3.3: Koimmunpräzipitation von PSD-95 und NLG1/3 mit DIC in PSD-95-mutierten Mäusen.

A P3-Extrakte von Wildtypmäußen und PSD-95-mutierten Mäusen wurden für die Immunpräzipitation mit gegen DIC gerichteten Antikörpern eingesetzt. Input: P3-Extrakt von PSD-95-mutierten Mäusen oder Wildtypen. Die Detektion von DIC und Neurologin 1/3 zeigte eine Kopräzipitation von NLG in DIC-Präzipitaten unabhängig vom Genotyp. PSD-95 wurde in PSD-95-mutierten Tieren nicht präzipitiert. **B** Sowohl in Wildtypmäußen als auch in PSD-95-mutierten Mäusen waren Mitglieder der MAGUK-Familie PSD-93, SAP97 und SAP102 in vesikelangereicherten Fraktionen (P3) detektierbar.

Aus Extrakten von Wildtypmäusen wurde im Gegensatz zu Extrakten von PSD-95-mutierten Mäusen PSD-95 präzipitiert, wohingegen NLG1/3 aus Extrakten beider Genotypen mit DIC kopräzipitiert werden konnte. Dies deutet daraufhin, dass PSD-95 kein essentieller Bestandteil des NLG-Transportkomplexes ist oder dass die PSD-95 Funktion von anderen Proteinen übernommen werden kann, um so das Fehlen von PSD-95 zu kompensieren. Da andere Mitglieder der sehr homologen MAGUK-Familie, zu der auch PSD-95 zählt, in der vesikelangereicherten Fraktion (P3) sowohl von Wildtypmäusen als auch von PSD-95-mutierten Tieren nachweisbar waren (Abb. 3.3 B), könnten diese eine potentielle Adaptorfunktion von PSD-95 übernehmen. Diese Hypothese konnte durch eine Immunpräzipitation mit DIC-spezifischen Antikörpern unterstützt werden, da im DIC-Präzipitat SAP97, ein Mitglied der MAGUK-Familie, kopräzipitierte (Abb. 3.4).

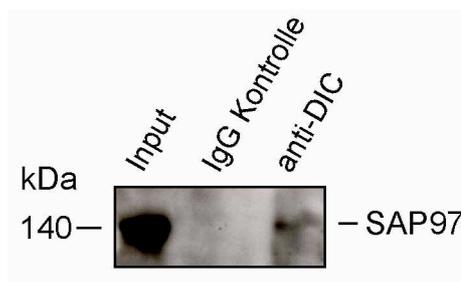


Abb. 3.4: Koimmunpräzipitation des PSD-95 Homologs SAP97 mit Dynein Intermediärer Kette. Durch Immunpräzipitation mit DIC-spezifischen Antikörpern und P3 vesikelangereicherten Gehirnextrakten von Wildtypmäusen konnte SAP97 kopräzipitiert werden.

3.1.4 Internalisierung von Neuroligin 1 in HEK293-Zellen und kultivierten hippocampalen Neuronen

Da Dynein eine Rolle bei endosomalen Sortierungs- und Transportprozessen zugeschrieben wird (Traer *et al.*, 2007), wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob Dynein eine Rolle bei Internalisierungsvorgängen von NLG1 in HEK293-Zellen und Primärkulturen hippocampaler Neurone innehält. Außerdem wurde die Interaktion von PSD-95 und NLG1 sowie deren Bedeutung bei NLG1-Internalisierungsprozessen analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit myc-NLG1 transient transfiziert. Das an der Zelloberfläche der HEK293-Zellen lokalisierte NLG1 wurde mittels einer Lebendzellfärbung am nächsten Tag durch einen gegen myc-gerichteten Antikörper markiert und bei 37°C für 2 h inkubiert. Daraufhin wurde myc-NLG1 an der Oberfläche mit einem CY5TM gekoppelten Sekundärantikörper (blau) immungefärbt. Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte die Inkubation mit einem CY3TM gekoppelten Sekundärantikörper (rot), um internalisiertes NLG1 zu visualisieren. Ein Modell zur Versuchsübersicht ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Unter Normalbedingungen (Kontrolle) wurde NLG1 sowohl in HEK293 ($54,5 \pm 0,88\%$ Internalisierung, $n_{\text{Zellen}}=608$, $n_{\text{Experiment}}=4$; Abb. 3.6 A) als auch in kultivierten hippocampalen Neuronen internalisiert ($16,45 \pm 1,74$ internalisierte Partikel/Soma, $n_{\text{Zellen}}=22$, $n_{\text{Experiment}}=3$; Abb. 3.6 B). Durch die Applikation von 350 mM Saccharose können Endozytosevorgänge inhibiert werden (Kittler *et al.*, 2000). Dies führte zu einem Rückgang der NLG1-Internalisierung ($0,18 \pm 0,07\%$ Internalisierung in HEK293-Zellen, $n_{\text{Zellen}}=384$, $n_{\text{Experiment}}=3$, $p<0,0001$; $1,00 \pm 0,19$ internalisierte Partikel/Soma in hippocampalen Primärkulturen, $n_{\text{Zellen}}=17$, $n_{\text{Experiment}}=3$, $p<0,0001$).

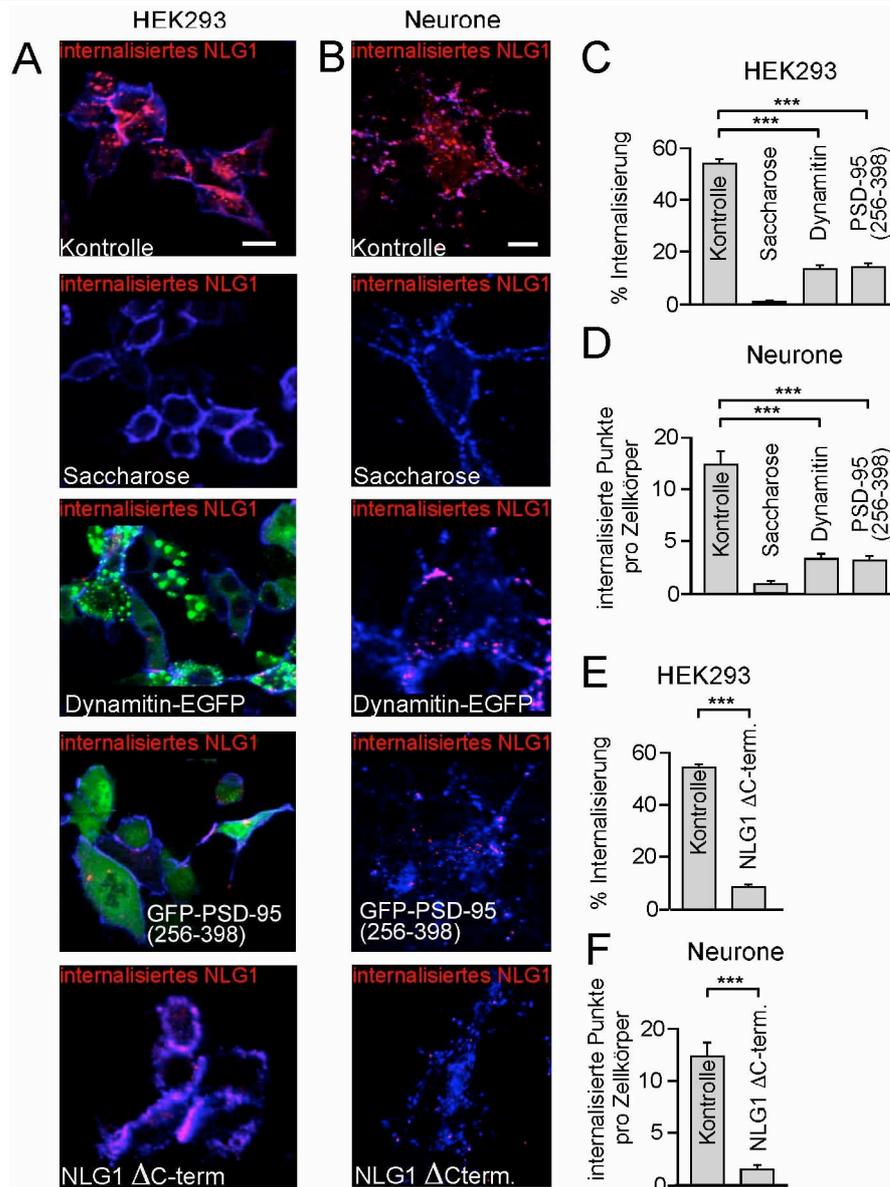


Abb. 3.6: Quantitative Analyse der myc-NLG1-Internalisierung in HEK293-Zellen und kultivierten hippocampalen Neuronen.

Die Analyse der NLG1-Internalisierung in HEK293-Zellen ist in **A** oder in kultivierten hippocampalen Neuronen (DIV10) in **B** dargestellt. In mit myc-NLG1 transfizierten HEK293-Zellen oder kultivierten hippocampalen Neuronen (DIV10) wurde an der Oberfläche lokalisiertes myc-NLG1 in blau visualisiert, internalisiertes NLG1 in rot (Kontrolle). Myc-NLG1-Internalisierung wurde durch die Anwesenheit von Saccharose verhindert. Störung des dyneinbasierten Transports durch Dynamitin-EGFP-Überexpression verringerte die myc-NLG1-Internalisierung. Dies ist ebenfalls durch die kompetitive Beeinträchtigung der NLG1-PSD-95 Interaktion durch PSD-95(256-398)-Expression oder durch das Fehlen einer PDZ-Bindedomäne in NLG1-Mutanten (NLG1ΔC-term.-Expression) zu erkennen. Im Fall der kultivierten hippocampalen DIV10 Neuronen ist der grüne Kanal zur besseren Übersicht nicht dargestellt worden. **C+E** Quantifizierung von internalisiertem myc-NLG1 in HEK293-Zellen, **D+F** Quantifizierung von internalisiertem myc-NLG1 in kultivierten hippocampalen Neuronen (DIV10). Größenbalken HEK293-Zellen: 20 μm , Neurone: 8 μm .

Die Verwendung von CY5TM gekoppelten Fab-Fragmenten als Sekundärantikörper diente dazu, eine eventuelle durch IgG-Sekundärantikörper induzierte artifizielle Internalisierung zu überprüfen (Abb. 3.7). Dies war nicht zu beobachten, da sich kein Unterschied bezüglich der NLG1-Internalisierung in HEK293-Zellen zeigte (Abb. 3.7 B; IgG-Sekundärantikörper: $90,13 \pm 1,16$ % Internalisierung, $n_{\text{Zellen}}=580$,

$n_{\text{Experiment}}=3$; Fab-Sekundärantikörper: $91,70 \pm 1,05$ % Internalisierung, $n_{\text{Zellen}}=612$, $n_{\text{Experiment}}=3$).

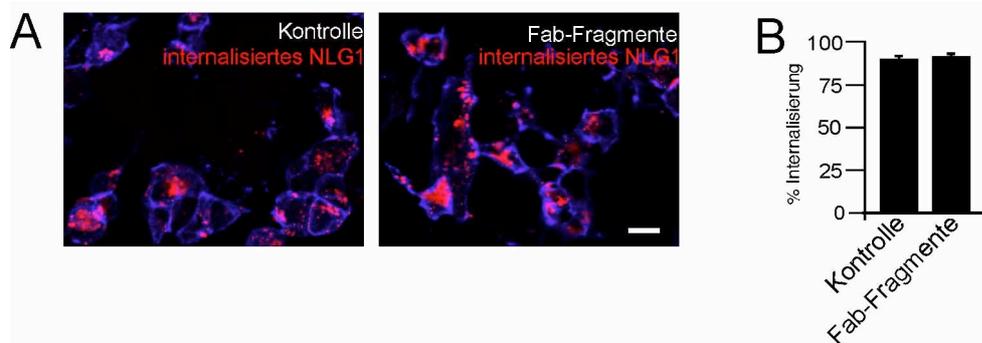


Abb. 3.7: Einfluss von Fab-Fragmenten als Sekundärantikörper auf die Internalisierung von myc-NLG1 in HEK293-Zellen.

A In mit myc-NLG1 transfizierten HEK293-Zellen wurde an der Oberfläche lokalisiertes myc-NLG1 entweder mit CY5TM gekoppelten Sekundärantikörpern (IgG) (Kontrolle) oder CY5TM gekoppelten Fab-Fragmenten als Sekundärantikörper visualisiert. Es zeigte sich kein Unterschied bezüglich der myc-NLG1-Internalisierung. **B** Quantifizierung von **A**, blau: an der Oberfläche lokalisiertes myc-NLG1; rot: internalisiertes myc-NLG1, Größenbalken: 20 μm .

Im Falle der NLG1-Internalisierung in HEK293-Zellen war anzunehmen, dass ein endogenes PDZ-domänenhaltiges Protein die Funktion von PSD-95 übernimmt, da unter Kontrollbedingungen NLG1 in HEK293-Zellen internalisiert werden konnte, ohne dass PSD-95 exprimiert wurde. Zur Überprüfung der Expression von PDZ-domänenhaltigen Proteinen in HEK293-Zellen wurde ein Zelllysate per Western Blot mit einem gegen pan-PDZ gerichteten Antikörper analysiert. Da diese Domäne ubiquitär verbreitet ist, zeigte der Western Blot die Expression diverser PDZ-domänenhaltiger Proteine in HEK293-Zellen (Abb. 3.8). Durch die Überexpression der PSD-95 PDZ3-Domäne konnte die Internalisierungsrate reduziert werden (Abb. 3.6), wodurch die funktionelle Bedeutung der PDZ-Domäne gezeigt werden konnte.

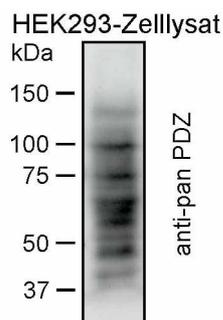


Abb. 3.8: HEK293-Zellen exprimieren PDZ-domänenhaltige Proteine.

Gezeigt ist eine Western Blotanalyse eines HEK293 Gesamtzelllysats nach einer Zentrifugation bei 1.000 x g. Die Detektion mit einem gegen pan-PDZ-Domänen gerichteten Antikörper zeigte die endogene Expression von verschiedenen Proteinen mit PDZ-Domänen.

Im Folgenden wurde die Oberflächenlokalisierung von myc-NLG1 analysiert. Hierzu wurden die Oberflächenproteine von HEK293-Zellen durch Biotinylierung markiert, anschließend mit Streptavidin gekoppelten *Beads* präzipitiert und über

Western Blot-Analysen sowie der Software ImageJ 1.38v analysiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion des Zelladhäsionsmoleküls pan-Cadherin.

Wurde NLG1 internalisiert, nahm dessen Oberflächenlokalisierung ab (Abb. 3.9 A+C: $0,56 \pm 0,25$ relative Intensität, $n=5$). Die Koexpression von Dynamitin-EGFP oder GFP-PSD-95(256-398) erhöhte die NLG1-Signale an der Oberfläche auf $1,52 \pm 0,28$ relative Intensität (Dynamitin-EGFP: $n=4$, $p=0,038$) oder auf $1,73 \pm 0,28$ relative Intensität (GFP-PSD-95(256-398): $n=4$, $p=0,018$). Die Lokalisationsanalyse einer NLG1-Mutante an der Zelloberfläche (NLG1 Δ C-term.; Abb. 3.9 B+D) zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der NLG1-Oberflächensignale (Kontrolle: $0,68 \pm 0,29$ relative Intensität, $n=4$; Mutante: $2,24 \pm 0,23$ relative Intensität, $n=4$, $p=0,005$).

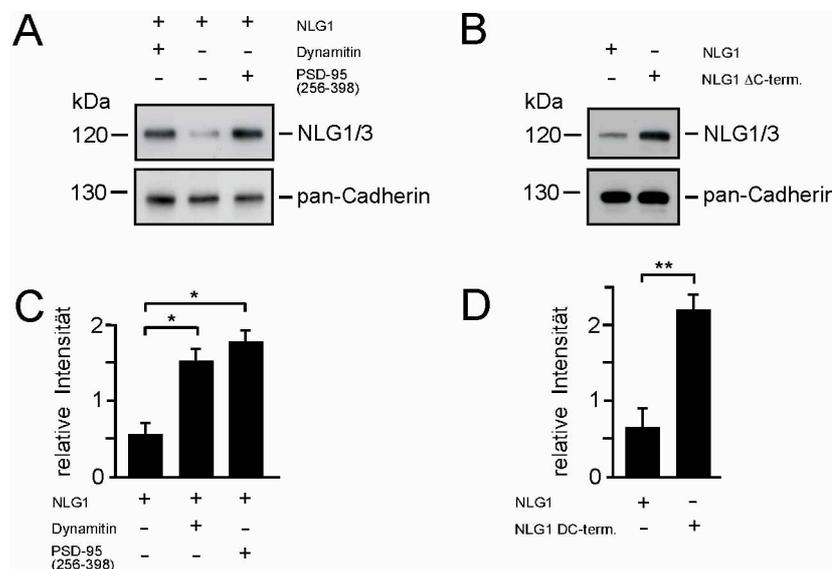


Abb. 3.9: Quantitative Analyse der NLG1 Oberflächenlokalisierung in HEK293-Zellen.

Die Oberflächenlokalisierung von myc-NLG1 wurde durch Biotinylierung und anschließender Streptavidin-Präzipitation analysiert. Dafür wurden mit pmyc-NLG1 transfizierte HEK293-Zellen mit pDynamitin-EGFP, PSD-95(256-398) kotransfiziert, biotinyliert, mittels Western Blot analysiert (A) und quantifiziert (C). Außerdem wurden HEK293-Zellen mit einer NLG1-Mutante ohne PDZ-Bindedomäne (pNLG1 Δ C-term.) transfiziert und wie in A und C analysiert (B+D). Blockade des dyneinbasierten Transports durch Dynamitinüberexpression, kompetitive Beeinträchtigung der NLG1-PSD-95 Interaktion durch PSD-95(256-398)-Expression oder das Fehlen einer PDZ-Bindedomäne in NLG1-Mutanten (NLG1 Δ C-term.-Expression) führten zu einer Anreicherung von NLG1 an der Zelloberfläche.

Zusammengefasst zeigen die Daten in Abbildung 3.6-9 durch zwei verschiedene Ansätze, dass NLG1 internalisiert wird. Die Internalisierung konnte durch die Expression von Dynamitin-EGFP, PSD-95(256-398) oder NLG1 Δ C-term. inhibiert werden, woraus geschlossen werden kann, dass sie Dynein abhängig ist und über die NLG1-PDZ-Bindedomäne vermittelt wird. Neben Dynein und der NLG1-PDZ-Bindedomäne ist die Bindung von PSD-95 oder dessen Homologen an die NLG1-PDZ-Bindedomäne außerdem für die NLG1-Internalisierung von Bedeutung. Dies weist auf eine Rolle von PSD-95 als Adaptor zwischen NLG1 und dem Dyneinmotorkomplex hin.

3.1.5 Retrograder Transport von Neuroligin 1

Zur Visualisierung der retrograden Bewegung von NLG1 wurden *Time-lapse* videomikroskopische Experimente an lebenden kultivierten hippocampalen Neuronen (*Days in vitro* 14, DIV14) durchgeführt. Hierzu wurden die Neurone mit pGFP-NLG1 transfiziert und am Tag darauf analysiert. Aktive Synapsen konnten durch eine Färbung mit FM4-64 visualisiert werden (Abb. 3.10 B). Hierbei wird der Farbstoff zusammen mit den durch ein Aktionspotential in den synaptischen Spalt ausgeschütteten Neurotransmittern von der präsynaptischen Seite aufgenommen und kennzeichnet so aktive präsynaptische Endigungen. Eine Bewegung in Richtung des Zellsomas (retrograd) konnte sowohl in Dendriten (Abb. 3.10 A) als auch in innervierten dendritischen Dornen (*Spines*) (Abb. 3.10 B) für GFP-NLG1-Partikel beobachtet werden. Dabei wurde eine maximale Geschwindigkeit der GFP-NLG1-Partikel von $0,11 \pm 0,02 \mu\text{m/s}$ ermittelt. Insgesamt bewegten sich GFP-NLG1-Partikel zu 52,6% in retrograde Richtung. Eine Fluoreszenzintensitätsmessung des *Spines* in Abbildung 3.10 B ergab eine Abnahme der Fluoreszenz innerhalb des *Spine*-Kopfes von 100% zum Zeitpunkt 0, auf 60,32% zum Zeitpunkt 10s und 72,88% zum Zeitpunkt 20s. Dies ist erklärbar mit der retrograden Mobilisierung eines GFP-NLG1-Partikels aus dem *Spine* heraus in Richtung des Dendritens. Allerdings führte die Entfernung des GFP-NLG1-Partikels nur zu einer Abnahme und nicht zum vollständigen Verlust der GFP-NLG1 Lokalisation.

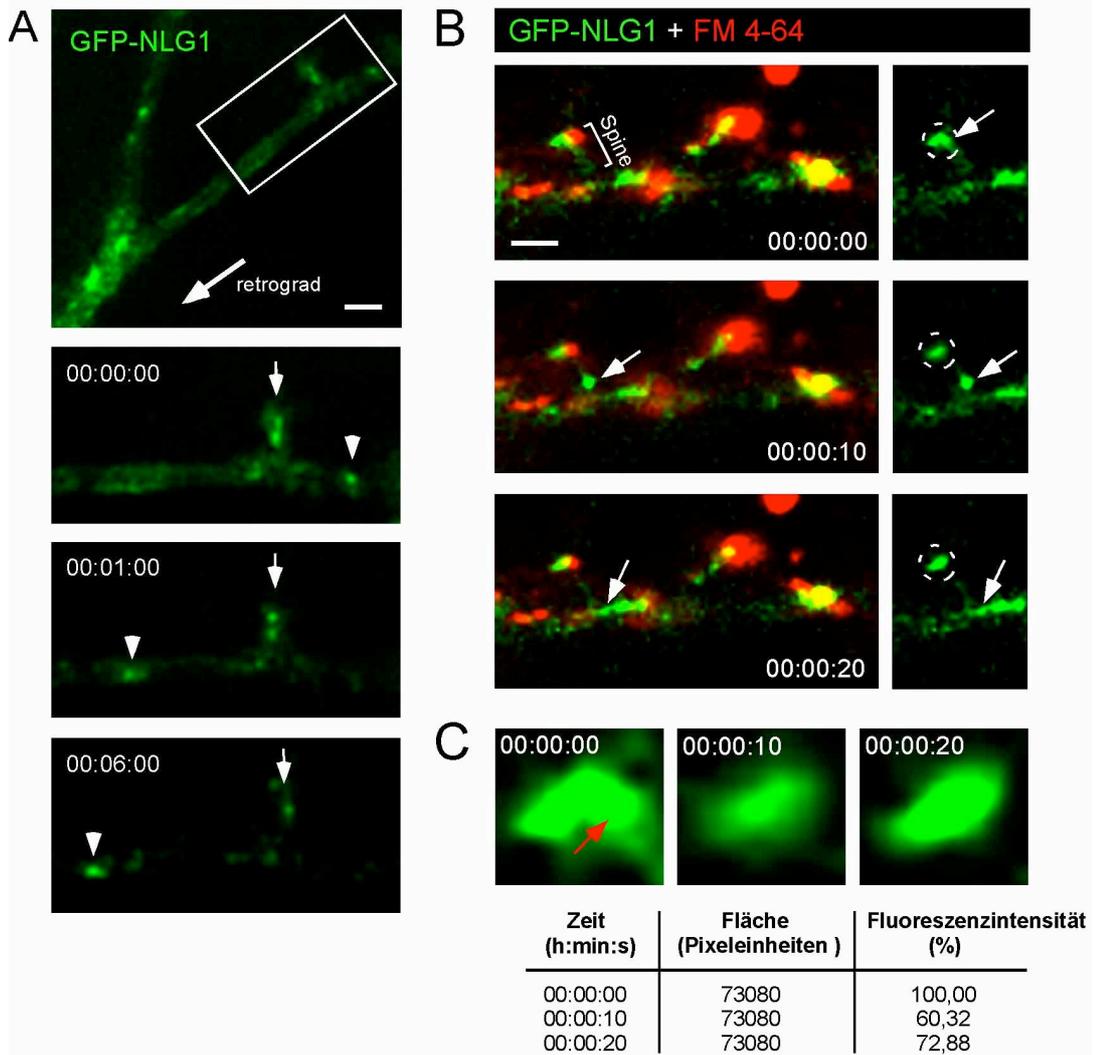


Abb. 3.10: Retrograde Bewegung von NLG1.

Time-lapse Videomikroskopie von mit pGFP-NLG1 transfizierten kultivierten hippocampalen Neuronen (DIV14). **A** Ein mobiles GFP-NLG1 Partikel bewegte sich retrograd in Richtung einer dendritischen Verzweigung (Pfeilkopf). Immobile GFP-NLG1 Partikel sind mit Pfeilen dargestellt. Größenbalken: 8 μm . **B** In rot sind aktive präsynaptische Endigungen durch Färbung mit FM4-64 dargestellt. Der grüne Kanal eines Spines (Klammer) ist vergrößert im rechten Teil der Abbildung hervorgehoben. Ein GFP-NLG1 Partikel bewegte sich retrograd aus einer aktiven Synapse heraus in Richtung Dendrit (Pfeil). Größenbalken: 1,5 μm . **C** Quantifizierung der Fluoreszenzintensität pro Fläche in einem Spine-Kopf (weiße Kreise) des im rechten Teil von **B** dargestellten Spines zeigte eine Abnahme der Signalintensität. Der rote Pfeil zum Zeitpunkt 0 markiert den mobilen GFP-NLG1 Partikel am Anfang seiner Bewegung.

3.1.6 Visualisierung des retrograden Kotransports von Neuroligin 1 und Dynein Intermediäre Kette

Zur Visualisierung des oben beschriebenen retrograden NLG1-Transportkomplexes wurden *Time-lapse* videomikroskopische Experimente an lebenden kultivierten hippocampalen Neuronen (DIV14) durchgeführt, die mit pGFP-NLG1 und pmRFP-DIC kotransfiziert wurden. Zuvor konnte in Vorarbeiten bereits der Kotransport von EGFP-PSD-95 und mRFP-DIC demonstriert werden (AG Kneussel, ZMNH, persönliche Mitteilung). Retrograd komigrierende Partikel von GFP-NLG1 und mRFP-DIC konnten in Dendriten und aus *Spines* heraus mit Maximalgeschwindigkeiten von $0,05 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$ identifiziert werden (Abb. 3.11 A, Pfeilköpfe; Abb. 3.11 B+C, Partikel 1, Pfeile). Wie in Abbildung 3.10 beobachtet, führte auch hier die Entfernung von GFP-NLG1 Partikeln nicht zum vollständigen Verlust des GFP-NLG1-Signals im *Spine*. Einzelne GFP-NLG1 Partikel können also retrograd durch mRFP-DIC transportiert werden und bestätigen dadurch funktional den retrograden Transportkomplex bestehend aus NLG1, PSD-95 und DIC (Abb. 3.1-3.9).

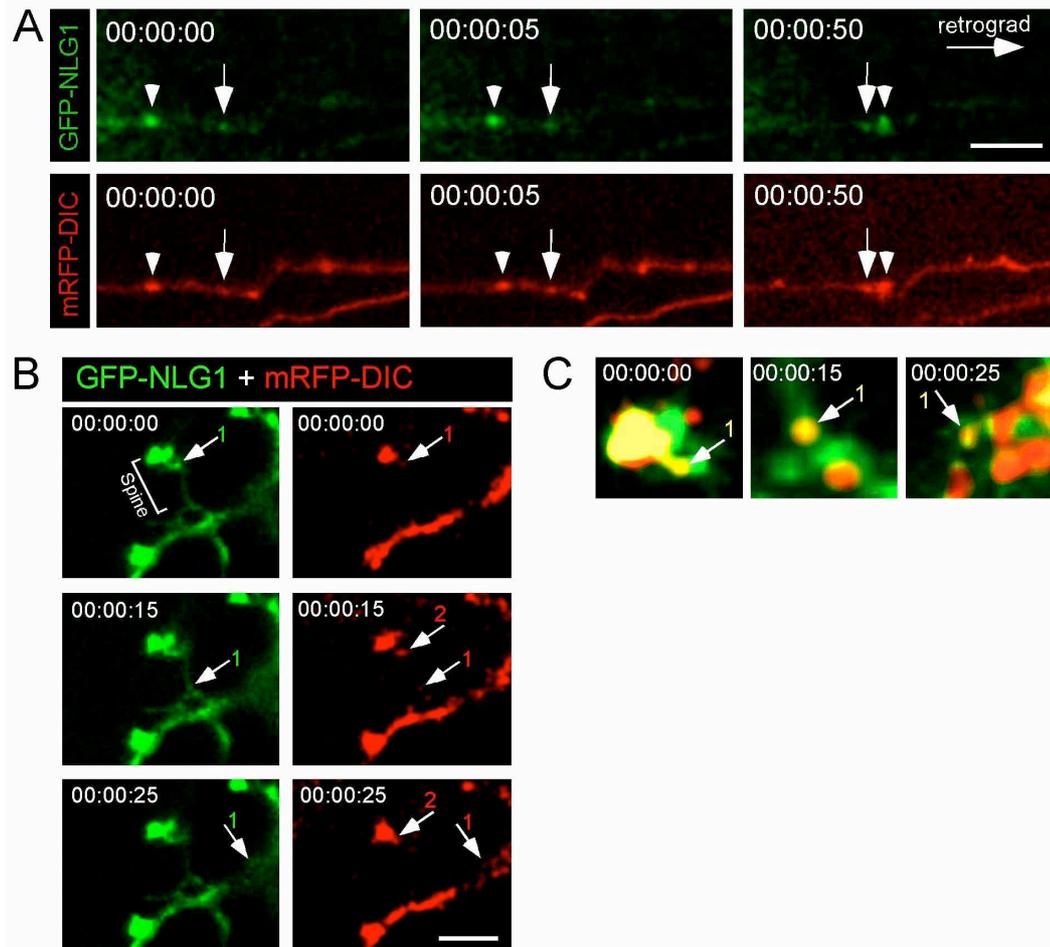


Abb. 3.11: Kotransport von GFP-NLG1 und mRFP-DIC in kultivierten hippocampalen Neuronen.

Time-lapse Video von mit pGFP-NLG1 und pmRFP-DIC kotransfizierten kultivierten hippocampalen Neuronen (DIV14). **A** Dargestellt sind die einzelnen Kanäle für GFP-NLG1 (grün) und mRFP-DIC (rot). Ein mobiles GFP-NLG1 Partikel wurde durch ein mRFP-DIC-Partikel retrograd entlang eines Dendriten kotransportiert (Pfeilköpfe). Ein immobiler Transportkomplex aus GFP-NLG1 und mRFP-DIC ist mit Pfeilen dargestellt. Größenbalken: 2,5 μm . **B** Analoges Experiment wie in **A**. Ein GFP-NLG1 Partikel (grün) wurde durch ein mRFP-DIC-Partikel (rot) aus einem *Spine* retrograd kotransportiert (1). Ein zweites mRFP-DIC-Partikel (2) erschien zum Zeitpunkt 15 s unabhängig von GFP-NLG1. Größenbalken: 1,5 μm . **C** In der Vergrößerung des Partikels 1 aus **B** ist der Transport des GFP-NLG1-mRFP-DIC Komplexes vom *Spine*-Kopf, durch den *Spine*-Hals zum Dendriten durch Überlagerung beider Kanäle dargestellt.

3.1.7 Analyse der Synapsenzahl in Dynamitin überexprimierenden Mäusen

Da NLG1 und PSD-95 als Komplex mit Dynein transportiert werden und NLG1 überdies auch von Dynein abhängig internalisiert wird, sollte im Folgenden der Einfluss einer Inhibition von Dynein-Transportprozessen *in vivo* auf Synapsen analysiert werden. Dafür konnte auf eine transgene Mauslinie aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holzbaur (University of Pennsylvania, USA) zurückgegriffen werden, welche Flagepitop-markiertes Dynamitin unter einer Thy1.2-Promotorkassette exprimiert. Dieses Promotorfragment führt zu einer mosaischen postnatalen Expression, die spezifisch in Neuronen stattfindet (LaMonte *et al.*, 2002, Caroni *et al.*, 1997). Der Dyneinmotorkomplex besitzt u.a. eine Multiproteinuntereinheit, Dynaktin, welche zur Prozessivität, Effizienz und *Cargo*-Bindung des Motors notwendig ist (Waterman-Storer *et al.*, 1995, Waterman-Storer *et al.*, 1997, King *et al.*, 2000). Dynamitin wiederum ist eine Untereinheit des Dynaktin-Komplexes und führt bei einer Überexpression zur Dysfunktion dieses Komplexes, welches in einer Inhibition des Dynein-basierten *Cargo*-Transports resultiert (Echeverri *et al.*, 1996, Burkhardt *et al.*, 1997). Da funktionelles Dynein eine wichtige Rolle für die neuronale Entwicklung innehält (Reddy *et al.*, 1997, Murphey *et al.*, 1999), ist die Verwendung eines Promotors, der ausschließlich postnatal exprimiert, essentiell. Unter der Thy1-Promotorkassette wird Dynamitin ab P12 exprimiert (LaMonte *et al.*, 2002).

Zunächst wurde die Expression von Dynamitin-Flag mit einer Flagfärbung und die Zellzahl in den Dynamitin überexprimierenden Mäusen mittels DAPI-Färbung in der AG Kneussel analysiert. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in AT-reiche Regionen der DNA interkaliert und diese dadurch visualisiert. Da die Expression von Dynamitin-Flag im Cerebellum weniger mosaisch ausfiel, wurde diese Gehirnregion untersucht (AG Kneussel, ZMNH, persönliche Mitteilung). In DAPI gefärbten Cryostatgehirnschnitten von transgenen und Wildtypmännern konnte kein Unterschied in der Zellzahl festgestellt werden (AG Kneussel, ZMNH, persönliche Mitteilung). Diese Voraussetzung war für die folgenden quantitativen Vergleiche inhibitorischer und exzitatorischer Synapsen zwischen transgenen und Wildtypmäusen essentiell.

Cryostatgehirnschnitte des Cerebellums von adulten Wildtyp und Dynamitin überexprimierenden Mäusen wurden bezüglich ihrer Zahl von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen analysiert (AG Kneussel, ZMNH, persönliche Mitteilung). In der Anzahl der inhibitorischen Synapsen, welche durch Immunfärbungen gegen GAD65/67 als präsynaptisches und Gephyrin als postsynaptisches inhibitorisches Markerprotein dargestellt wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Auch in der Analyse der Gesamtfluoreszenz einer definierten vermessenen Fläche (2500 μm^2) zeigten sich keine signifikanten Abweichungen zwischen Wildtyp und Dynamitin überexprimierenden Mäusen (AG Kneussel, ZMNH, persönliche Mitteilung).

Beim Vergleich von Immunfärbungen exzitatorischer Synapsen durch Markierung von präsynaptischen Glutamattransportern (VGlut-Färbung) und postsynaptischen AMPA-Rezeptoren (GluR1-Färbung) konnte hingegen festgestellt werden, dass die Anzahl der exzitatorischen Synapsen signifikant reduziert war. Allerdings waren die für die GluR1-Färbung erhaltenen Signalpunkte in transgenen Tieren größer und die Vermessung der Gesamtfluoreszenzsignale/2500 μm^2 zeigte keinen Unterschied (AG Kneussel, ZMNH, persönliche Mitteilung). Dies könnte auf vergrößerte Synapsen in Dynamitin überexprimierenden Mäusen hindeuten.

Im Folgenden wurden zytosolische Extrakte von Gehirnen transgener und Wildtypmäuse präpariert und per Detektion von NLG, PSD-95 und präsynaptischen Markerproteinen (VGlut, GAD65/67 oder Synapsin) im Western Blot analysiert. Bei Synapsin handelt es sich um ein präsynaptisches Markerprotein, welches eine Rolle bei der Neurotransmitterfreisetzung innehält. Diese Analyse diente dazu, Veränderungen in der Genexpression von einer veränderten Lokalisation dieser Proteine zu unterscheiden. Sowohl NLG als auch PSD-95 waren unverändert, bezogen auf die Ladekontrolle Aktin. Desweiteren war kein Unterschied hinsichtlich der VGlut, GAD65/67 oder Synapsin Proteinexpression zu erkennen. Die erhaltenen Werte der Quantifizierung sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

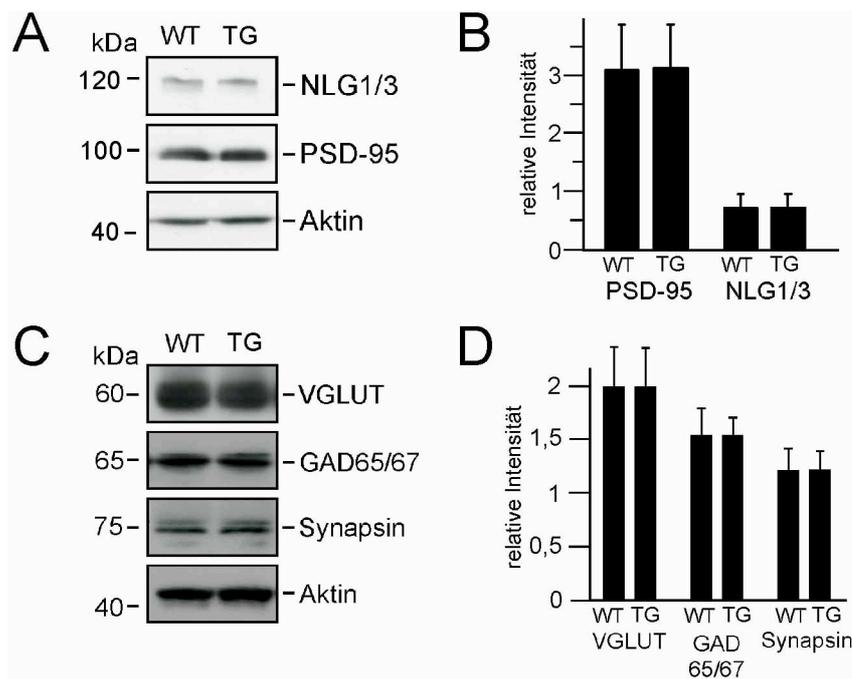


Abb. 3.12: Kontrolle der Proteinexpression synaptischer Proteine in zytosolischen Gehirnextrakten von Wildtyp und Dynamitin überexprimierenden Tieren.

A Analyse von NLG1/3 und PSD-95 Proteinexpression. **B** Quantifizierung von **A**. **C** Analyse von präsynaptischen Markerproteinen exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen. **D** Quantifizierung von **C**.

Signal/Aktin	relative Intensität	n (Experiment)	n (Gehirne)
WT _{PSD-95}	3,08 ± 0,78	9	3
TG _{PSD-95}	3,12 ± 0,74	9	3
WT _{NLG1/3}	0,70 ± 0,23	9	3
TG _{NLG1/3}	0,70 ± 0,39	9	3
WT _{VGlut}	2,00 ± 0,38	9	3
TG _{VGlut}	2,00 ± 0,36	9	3
WT _{GAD65/67}	1,52 ± 0,25	9	3
TG _{GAD65/67}	1,52 ± 0,18	9	3
WT _{Synapsin}	1,19 ± 0,21	9	3
TG _{Synapsin}	1,20 ± 0,18	9	3

Tabelle 3.1: Quantifizierung der zytosolischen Gehirnextrakte von Wildtyp und Dynamitin überexprimierenden Mäusen.

Die reduzierte Anzahl exzitatorischer Synapsen (AG Kneussel, ZMNH, persönliche Mitteilung) konnte im Rahmen dieser Arbeit auf ultrastruktureller Ebene analysiert und verifiziert werden. Dafür wurden in der Servicegruppe Morphologie des Zentrums für molekulare Neurobiologie (ZMNH) elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen adulter Dynamitin überexprimierender Mäuse angefertigt. Die Quantifizierung asymmetrischer (exzitatorischer) Synapsen ergab eine signifikant reduzierte exzitatorische Synapsenzahl für Dynein-Transport-defiziente Mäuse (Abb. 3.13 A+B; WT: $3,55 \pm 0,08$ asymmetrische Synapsen in 308 Regionen à $14,5 \mu\text{m}^2$, $n_{\text{Tiere}}=3$; TG: $3,17 \pm 0,12$ asymmetrische Synapsen in 326 Regionen à $14,5 \mu\text{m}^2$, $n_{\text{Tiere}}=3$). Die Anzahl der symmetrischen (inhibitorischen) Synapsen hingegen war unverändert (Abb. 3.13 C; WT: $0,08 \pm 0,02$ in 308 Regionen ($14,5 \mu\text{m}^2$), $n_{\text{Tiere}}=3$; TG: $0,12 \pm 0,02$ in 326 Regionen ($14,5 \mu\text{m}^2$), $n_{\text{Tiere}}=3$). Hiermit konnten die früheren immunhistochemisch gewonnenen Daten auf ultrastruktureller Ebene verifiziert werden.

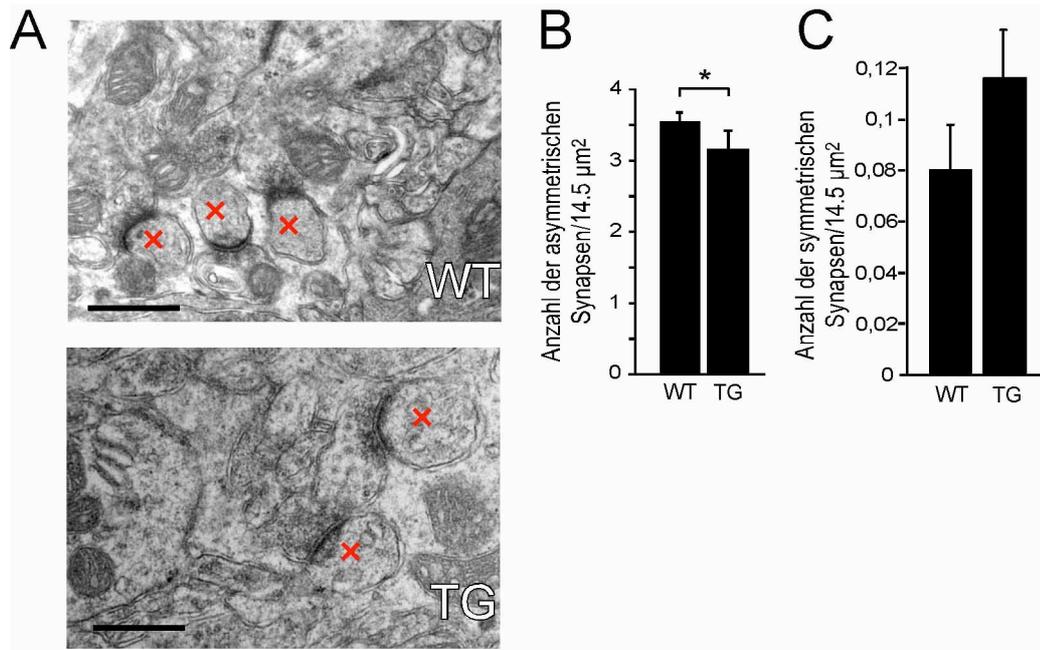


Abb. 3.13: Ultrastrukturelle Analyse der exzitatorischen und inhibitorischen Synapsenzahl in Wildtyp und Dynamitin überexprimierenden Mäusen.

A Elektronenmikroskopische Analyse von Cerebella-Gehirnschnitten 12 Monate alter Wildtyp und Dynamitin überexprimierender Mäuse. Größenbalken: 500 nm, rote Kreuze symbolisieren asymmetrische Synapsen. **B** Quantifizierung von **A**. Die Anzahl der asymmetrischen Synapsen nahm in transgenen Tieren ab. **C** Quantifizierung von inhibitorischen Synapsen.

3.1.8 Elektronenmikroskopische Untersuchung von PSD-Länge und Spine-Kopfgröße in Dynamitin überexprimierenden Mäusen

Durch biochemische Vorarbeiten in der AG Kneussel konnte in postsynaptischen Dichten transgener Dynamitin überexprimierender Mäuse eine Anreicherung von NLG und PSD-95 festgestellt werden. Andere transmembranöse Proteine wie N-Cadherin und die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR1 sowie submembranöse Proteine wie nNOS (neuronaler NO-Synthase) zeigten hingegen keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt). Da bekannt ist, dass die Spine-Kopfgröße proportional zum PSD-95-Gehalt ist (Gray *et al.*, 2006) und um weiterhin den Einfluss der PSD-95 und NLG-Anreicherung an postsynaptischen Dichten zu untersuchen, wurden in der Servicegruppe Morphologie des ZMNH EM-Aufnahmen der Dynamitin überexprimierenden Mäuse angefertigt. Diese wurden mit Hilfe des Programms MetaMorph 6.3r7 bezüglich PSD-Länge und Spine-Kopfgröße quantitativ ausgewertet (Abb. 3.14).

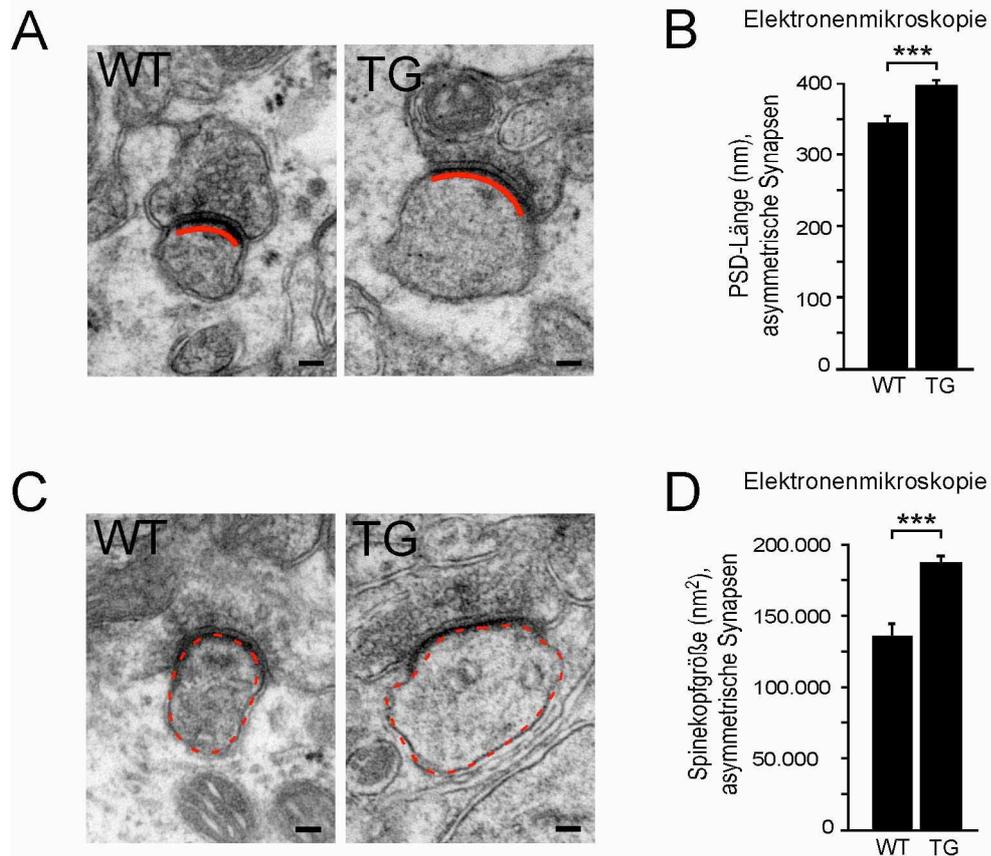


Abb. 3.14: Größere Postsynaptische Dichten und Spine-Köpfe in Dynamitin überexprimierenden Mäusen.

Elektronenmikroskopische Analyse von cerebellaren Schnitten von adulten Wildtyp und Dynamitin überexprimierenden Mäusen. **A+B** Erhöhte PSD-Längen an asymmetrischen Synapsen. Rot: vermessene PSDs. **C+D** Erhöhte Spine-Kopfgrößen an asymmetrischen Synapsen. Rot: vermessene Spine-Kopfgrößen. Größenbalken: 100 nm.

Postsynaptische Dichten von Dynamitin überexprimierenden Mäusen zeigten signifikant erhöhte PSD-Längen (Abb. 3.14 A+B; $398,01 \pm 8,03$ nm, $n_{\text{PSD}}=159$, $n_{\text{Tiere}}=3$, $p<0,001$) im Vergleich zu PSD-Längen von Wildtypmäusen ($347,24 \pm 10,48$ nm, $n_{\text{PSD}}=130$, $n_{\text{Tiere}}=3$). Desweiteren konnte in den transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtypen eine Vergrößerung der Spine-Köpfe festgestellt werden (Abb. 3.14 C+D; WT: $136.346,28 \pm 9.526,82$ nm², $n_{\text{Spine-Köpfe}}=102$, $n_{\text{Tiere}}=3$; TG: $187.543,21 \pm 5.995,25$ nm², $n_{\text{Spine-Köpfe}}=119$, $n_{\text{Tiere}}=3$, $p<0,001$). Zusammengefasst zeigen die Daten der Synapsenanalyse in Dynein-Transport-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen einen Einfluss auf die Struktur und Zahl (vgl. 3.1.7) von exzitatorischen Synapsen.

3.1.9 Analyse der Synapsenzahl in mit pDynamitin-EGFP transfizierten kultivierten hippocampalen Neuronen

Nach transgener Dynamitin Überexpression konnte im Vergleich zu Wildtypen eine Reduktion bezüglich der exzitatorischen Synapsenzahl bei gleichzeitigem Anstieg der PSD-Länge und Spine-Kopfgröße festgestellt werden. Im Folgenden wurden hippocampale Primärkulturen mit pDynamitin-EGFP transfiziert und die Synapsenzahl immunzytochemisch analysiert. Dies diente als Kontrollvor-

experiment für weitere elektrophysiologische Experimente (vgl. 3.1.10). Der Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Synapsenzahl sollte gewährleisten, dass der durch Dynamitin verursachte Effekt in beiden Systemen ähnlich ist.

In mit pDynamitin-EGFP transfizierten Neuronen konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion von exzitatorischen Synapsenzahlen im Vergleich zu mit pEGFP transfizierten Neuronen festgestellt werden (EGFP: $20,08 \pm 2,28$ Signalpunkt/50 μm Dendrit, $n_{\text{Experiment}}=3$, $n_{50 \mu\text{m Region}}=84$; Dynamitin-EGFP: $8,92 \pm 1,33$ Signalpunkte/50 μm Dendrit, $n_{\text{Experiment}}=3$, $n_{50 \mu\text{m Region}}=85$; $p < 0,0001$). Die Anzahl der exzitatorischen Synapsen wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung von präsynaptisch lokalisiertem Synaptophysin und postsynaptisch lokalisiertem PSD-95 visualisiert (Abb. 3.15). Somit konnten die *in vivo* Daten (vgl. 3.1.7) reproduziert werden, bei denen ebenfalls eine Reduktion von exzitatorischen Synapsenzahlen festgestellt werden konnte.

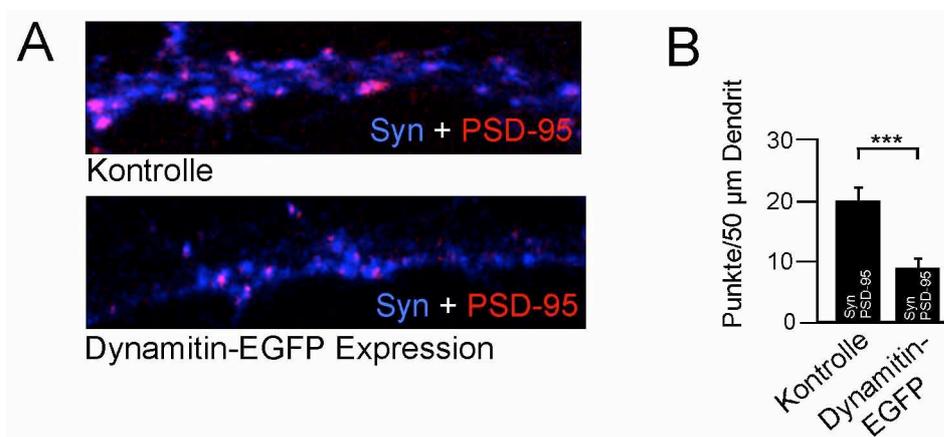


Abb. 3.15: Reduktion von Synapsenzahlen in mit pDynamitin-EGFP transfizierten hippocampalen Primärkulturen.

A Immunfluoreszenzfärbung von DIV10 hippocampalen Primärkulturen mit gegen Synaptophysin (blau) und PSD-95 (rot) gerichteten Antikörpern. Die Neurone wurden entweder mit EGFP (Kontrolle) oder Dynamitin-EGFP transfiziert (grüner Kanal ist nicht gezeigt). **B** Die Quantifizierung der erhaltenen Signalpunkte/50 μm Dendrit zeigte eine Reduktion in der Synapsenzahl in Dynamitin-EGFP exprimierenden Zellen.

3.1.10 Elektrophysiologische Registrierung von Membranströmen in mit pDynamitin-EGFP transfizierten kultivierten hippocampalen Neuronen

Aufgrund der beobachteten Effekte bezüglich Synapsenzahl und Struktur in Neuronen mit defizientem Dynein-Transport sollte die synaptische Transmission in diesen Zellen analysiert werden. Dazu wurden Membranströme an mit pDynamitin-EGFP transfizierten hippocampalen DIV10 Neuronen mit Hilfe der Ganzzellkonfiguration der *patch-clamp* Technik (Hamill *et al.*, 1981) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.R. Schwarz (ZMNH) elektrophysiologisch registriert. Kontrollmessungen des Ruhepotentials und der Aktionspotentialamplitude ergaben ähnliche Werte (vgl. Tabelle 3.2) für EGFP und Dynamitin-EGFP exprimierende

hippokampale Neurone. Somit konnten neurotoxische Effekte beim Messvorgang ausgeschlossen werden. Bei Messungen von *miniature excitatory postsynaptic currents* (mEPSCs) in EGFP (Abb. 3.16 A) oder Dynamitin-EGFP (Abb. 3.16 B) exprimierenden hippocampalen Neuronen war die mEPSC-Amplitude (Abb. 3.16 C, $p < 0,001$) signifikant reduziert und die *Inter-event Intervals* signifikant erhöht (Abb. 3.16 D, $p < 0,001$) (vgl. Tabelle 3.2).

Die in mit pDynamitin-EGFP transfizierten hippocampalen DIV10 Neuronen beobachtete Reduktion der exzitatorischen Synapsenzahl wirkt sich demnach auf die synaptische Transmission in Form einer reduzierten mEPSC-Amplitude und mEPSC-Frequenz aus.

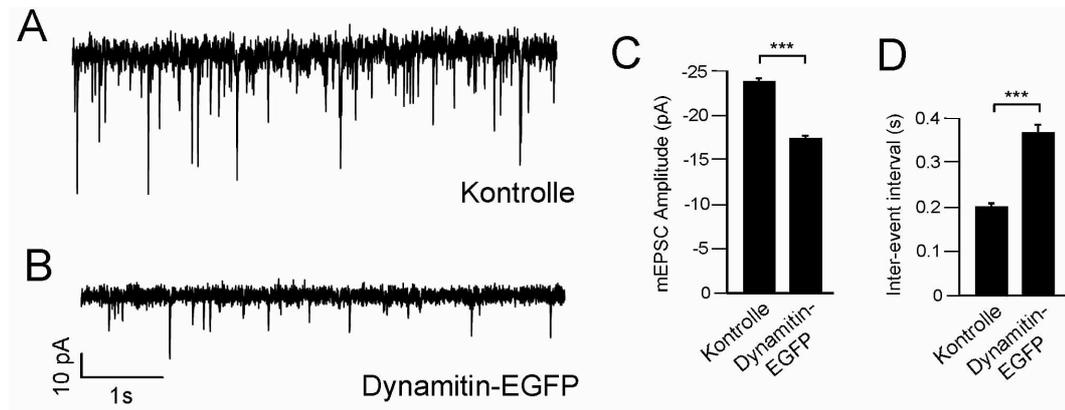


Abb. 3.16: Elektrophysiologische Analyse von mit pDynamitin-EGFP transfizierten DIV10 hippocampalen Primärkulturen.

Messungen der registrierten mEPSCs für EGFP exprimierende Kontrollzellen (A) oder Dynamitin-EGFP exprimierende Neurone (B). Größenbalken 10 pA; 1 s. C Die Quantifizierung der mEPSC Amplituden von EGFP (Kontrolle) und Dynamitin exprimierenden Neuronen ergab eine signifikante Reduktion der Amplitude in Dynamitin exprimierenden Neuronen. D Die Quantifizierung der *Inter-event Intervals* zeigt einen signifikanten Anstieg in Dynamitin exprimierenden Neuronen.

	Ruhepotential [mV]	Aktionspotential- Amplitude [mV]	n (Zellen)	n (Experimente)
EGFP	-57,1 \pm 1.2	76,8 \pm 3.0	11	8
Dynamitin-EGFP	-54,2 \pm 2.9	71,1 \pm 5.4	9	8
	EPSC-Amplitude [pA]	Inter-event interval [s]	n (Zellen)	n (Experimente)
EGFP	-24,2 \pm 0.36	0,20 \pm 0.01	11	8
Dynamitin-EGFP	-17,4 \pm 0.24	0,37 \pm 0.02	14	8

Tabelle 3.2: Ergebnisse der elektrophysiologischen Vermessung von Dynamitin über-exprimierenden hippocampalen Primärkulturen.

3.2 Anterograder Transport von Neuroligin 1

In biochemischen Vorarbeiten konnte der anterograde, in Dendriten angereicherte Mikrotubulomotor KIF21B als Interaktionspartner von NLG1/3 in einer Immunpräzipitation mit vesikelangereicherten Gehirnextrakten (P3) identifiziert werden (AG Kneussel, ZMNH, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass NLG1/3 innerhalb eines anterograden Transportkomplexes vorliegt. Der potentielle Transportkomplex wurde in der hier vorliegenden Arbeit weiter charakterisiert und funktional analysiert.

3.2.1 Anterograde Mobilisierung von Neuroligin 1

In *Time-lapse* Videomikroskopie-Experimenten mit GFP-NLG1 exprimierenden hippocampalen Primärkulturen bewegte sich NLG1 sowohl retrograd (vgl. 3.1.5, 3.1.6) als auch anterograd. Insgesamt wurden GFP-NLG1-Partikel zu 52,6% in retrograde Richtung (vgl. 3.1.5, 3.1.6) und zu 47,4% in anterograde Richtung transportiert. Als Maximalgeschwindigkeit von GFP-NLG1 wurde $0,11 \pm 0,02 \mu\text{m/s}$ ermittelt. Anterograder Transport von NLG1 konnte von DIV4 an beobachtet werden (Abb. 3.17). Dargestellt sind zwei kleine GFP-NLG1-Partikel, die innerhalb von 2 min in anterograder Richtung einer dendritischen Verzweigung transportiert wurden.

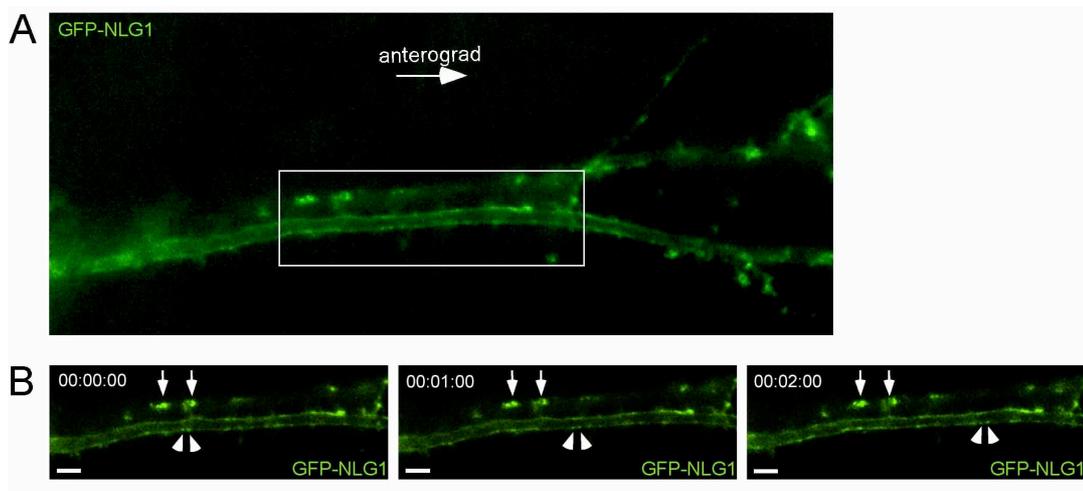


Abb. 3.17: Anterograder Transport von GFP-NLG1 in hippocampalen Primärkulturen.

A Dendrit eines GFP-NLG1 exprimierenden Neurons von DIV4 hippocampalen Primärkulturen. **B** Ausschnitt von **A** (weißer Kasten). Pfeile zeigen GFP-NLG1 immobile Partikel in einem Dendrit. Pfeilköpfe markieren zwei GFP-NLG1-Partikel, die in anterograde Richtung entlang eines weiteren Dendrits transportiert wurden. Größenbalken: $2,5 \mu\text{m}$.

Desweiteren konnte GFP-NLG1-Transport in *Spines* hinein beobachtet werden (Abb. 3.18 A). Gezeigt ist der Transport zweier GFP-NLG1-Partikel durch den *Spine*-Hals in den *Spine*-Kopf. Quantifizierungen der Fluoreszenzintensität des *Spine*-Kopfes (Abb. 3.18 B, weiße Kreise) ergaben eine Zunahme der Fluoreszenz von 100% als Ausgangswert zu 198,38% am Ende der Messung (2,05 min).

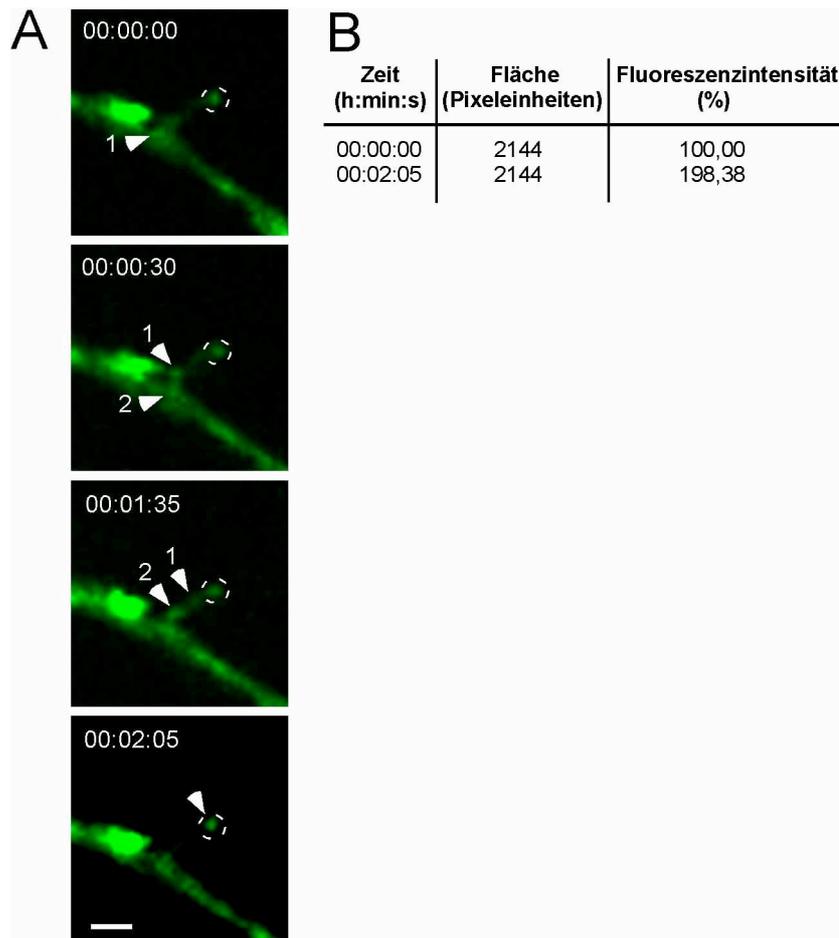


Abb. 3.18: Anterograder Transport von GFP-NLG1 in Spines.

A GFP-NLG1 exprimierende hippocampale Primärkulturen an DIV10. Zwei mit Pfeilköpfen markierte GFP-NLG1-Partikel wurden in einen *Spine* hineintransportiert. Größenbalken: 1,5 μm . **B** Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität pro Fläche des *Spine*-Kopfes in **A** (weiße Kreise) zeigt eine Zunahme der Signalintensität innerhalb von 2,05 min.

3.2.2 Koimmunpräzipitation von KIF21B mit Neuroligin 1

Die in Vorarbeiten der AG Kneussel beschriebene Interaktion von KIF21B mit NLG1/3 wurde im Folgenden genauer analysiert. Dazu wurden durch differentielle Zentrifugation (vgl. 2.2.2.6) mit Vesikeln angereicherte Gehirnextrakte (P3) hergestellt und für Koimmunpräzipitationsexperimente eingesetzt (Abb. 3.19). Durch Präzipitationen mit verschiedenen NLG-isoformspezifischen Antikörpern wurde die Spezifität der KIF21B-NLG Interaktion analysiert. KIF21B kopräzipitierte spezifisch mit NLG1 (Abb. 3.19 A). Dies konnte durch weitere Koimmunpräzipitationen bestätigt werden, da die Kopräzipitation mit NLG1/3-Antikörpern zwar positiv (Abb. 3.19 C), die Kopräzipitation mit NLG3 spezifischen Antikörpern hingegen negativ war (Abb. 3.19 B). Ein weiterer anterograder Mikrotubulomotor KIF5C kopräzipitierte nicht mit NLG und diente als Negativkontrolle. Als weitere Negativkontrolle dienten unspezifische Immunglobuline, welche weder NLG noch KIF21B oder KIF5C präzipitierten.

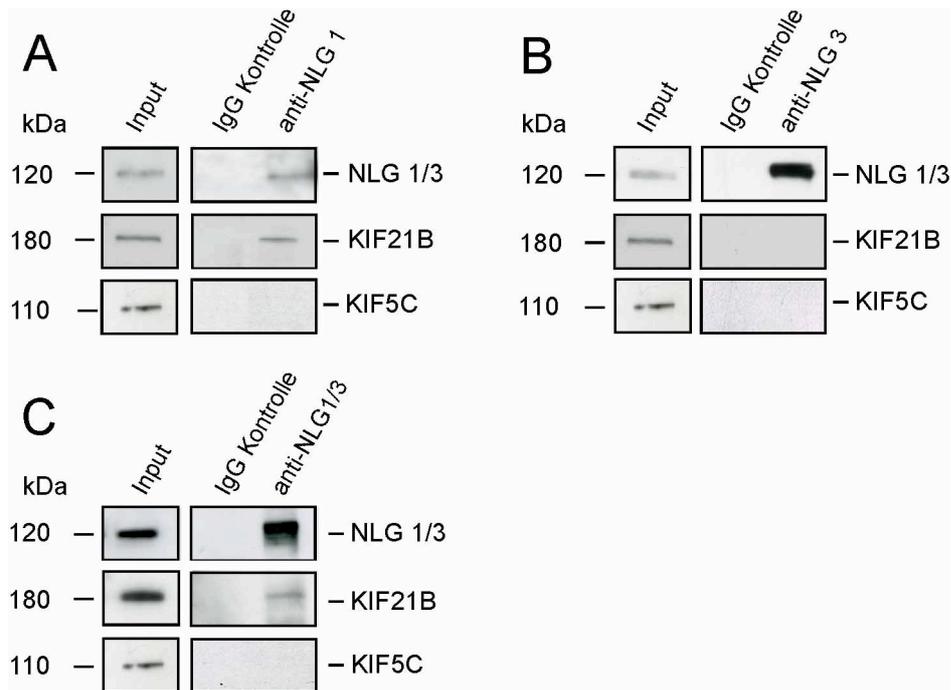


Abb. 3.19: Koimmunpräzipitation von KIF21B mit NLG1.

A Koimmunpräzipitation von KIF21B aber nicht KIF5C mit NLG1-spezifischen Antikörpern. **B** Weder KIF21B noch KIF5C kopräzipitierten mit NLG3. **C** KIF21B kopräzipitierte mit NLG1/3 spezifischen Antikörpern, KIF5C hingegen nicht. Unspezifische Immunglobuline (IgG) dienen als Negativkontrolle.

Umgekehrt konnte auch durch eine Präzipitation mit KIF21B-Antikörpern NLG1/3 kopräzipitiert werden (Abb. 3.20). In KIF21B-Immunpräzipitaten waren weder KIF5C noch PSD-95 detektierbar. Als Negativkontrolle dienen unspezifische Immunglobuline, welche weder NLG1/3 noch KIF5C oder PSD-95 kopräzipitierten. Im Gegensatz zum identifizierten retrograden NLG1-Transportkomplex, der das postsynaptische Gerüstprotein PSD-95 beinhaltet, ist dieser anterograde Transportkomplex anscheinend PSD-95 unabhängig.

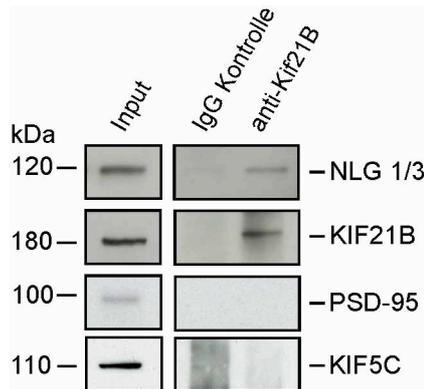


Abb. 3.20: Koimmunpräzipitation von NLG mit KIF21B.

Koimmunpräzipitation von NLG1/3 mit KIF21B-spezifischen Antikörpern. PSD-95 und KIF5C kopräzipitierten nicht mit KIF21B. Unspezifische Immunglobuline (IgG) dienen als Negativkontrolle.

3.2.3 Analyse der Bindestelle von Neuroligin1 und KIF21B

In HEK293-Zellen wurden KIF21B-Fragmente zusammen mit myc-NLG1 exprimiert, um die Bindung von NLG1 an KIF21B genauer zu analysieren. Dabei wurden zwei für die KIF21B-Fragmente EGFP-KIF21B(387-1212) und EGFP-KIF21B(1211-1640) kodierende Expressionsvektoren mittels PCR hergestellt und in HEK293-Zellen zusammen mit myc-NLG1 exprimiert. Das pEGFP-KIF21B(387-1212) Konstrukt kodiert einen Teil der *Neck*-Domäne des Proteins, welche AS 380-1279 von KIF21B umfasst. Zur Vereinfachung wird pEGFP-KIF21B(387-1212) im weiteren Verlauf pEGFP-KIF21B(Mitte) genannt. Das pEGFP-KIF21B(1211-1640) Konstrukt kodiert einen Teil der *Neck*-Domäne sowie die gesamte *Tail*-Domäne von KIF21B, welche AS 1280-1640 beinhaltet. Dieses Konstrukt wird im Folgenden pEGFP-KIF21B(Ende) genannt.

Durch eine Immunpräzipitation mit GFP-spezifischen Antikörpern war es möglich, die jeweiligen EGFP-Fusionsproteine zu präzipitieren (Abb. 3.21). Wurde myc-NLG1 ko-exprimiert, kopräzipitierte dies auch bei beiden KIF21B-Fragmentpräzipitaten. In Präzipitaten von unspezifischen Immunglobulinen als Negativkontrolle waren weder NLG noch die EGFP-Fusionsproteine zu detektieren.

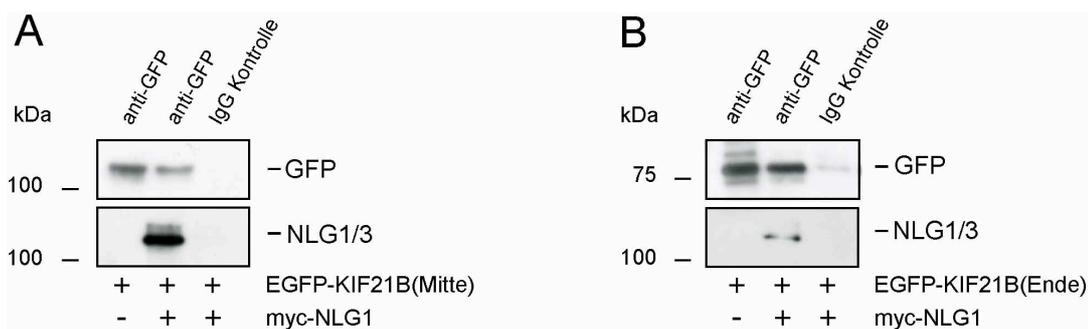


Abb. 3.21: NLG1 kopräzipitiert mit EGFP-KIF21B-Fragmenten in HEK293-Zellen.

A Durch Immunpräzipitation mit GFP-spezifischen Antikörpern präzipitierte das 117,4 kDa große Fusionsprotein EGFP-KIF21B(Mitte) zusammen mit myc-NLG1. In der GFP-Präzipitation mit HEK-Extrakten ohne myc-NLG1 zeigte sich keine Kopräzipitation von NLG1. Unspezifische Immunglobuline (IgG) präzipitierten weder EGFP-KIF21B(Mitte) noch myc-NLG1. **B** In GFP-Immunpräzipitationen kopräzipitierten das 76,8 kDa große Fusionsprotein EGFP-KIF21B(Ende) und myc-NLG1. In der GFP-Präzipitation mit HEK-Extrakten ohne myc-NLG1 zeigte sich keine Kopräzipitation von NLG1. Unspezifische Immunglobuline (IgG) präzipitierten weder EGFP-KIF21B(Ende) noch myc-NLG1.

3.2.4 Einfluss von KIF21B-Fragmenten auf die NLG1-Zelloberflächenlokalisation

Zur Analyse der Zelloberflächenlokalisation von NLG1 wurden HEK293-Zellen mit pmyc-NLG1 und pEGFP-N1 (Vektorkontrolle) oder pmyc-NLG1 und pEGFP-KIF21B(Ende)/pEGFP-KIF21B(Mitte) transfiziert. Die Zelloberflächenproteine wurden biotinyliert und die Zellen anschließend lysiert. Die in den HEK293-Extrakten enthaltenen biotinylierten Proteine wurden mit Streptavidin-gekoppelten *Beads* präzipitiert und per Western Blot analysiert (Abb. 3. 22). Als Ladekontrolle und Standard für Quantifizierungen diente das transmembrane Zelladhäsionsprotein Cadherin, welches durch die Detektion mit

einem gegen pan-Cadherin gerichteten Antikörper visualisiert wurde. Cadherin wurde bei gleichzeitiger KIF21B-Fragmentexpression unverändert detektiert. Im Gegensatz dazu reduzierte die Koexpression von myc-NLG1 mit EGFP-KIF21B(Mitte) oder EGFP-KIF21B(Ende) die NLG-Oberflächenlokalisation signifikant (Abb. 3.22 A+B; n=3, p<0,03). Dabei nahm die Lokalisation von NLG1 an der Oberfläche bei gleichzeitiger Expression von EGFP-KIF21B(Ende) stärker ab als bei gleichzeitiger Expression von EGFP-KIF21B(Mitte) (Vektorkontrolle: $1,30 \pm 0,07$ relative Intensität; EGFP-KIF21B(Ende): $0,50 \pm 0,23$ relative Intensität; EGFP-KIF21B(Mitte): $0,88 \pm 0,07$ relative Intensität). Die Koexpression von EGFP-KIF21B(Mitte) bewirkte also eine Reduktion der NLG1-Oberflächenlokalisation um 32,31%, die Koexpression von EGFP-KIF21B(Ende) sogar eine Reduktion um 61,54%.

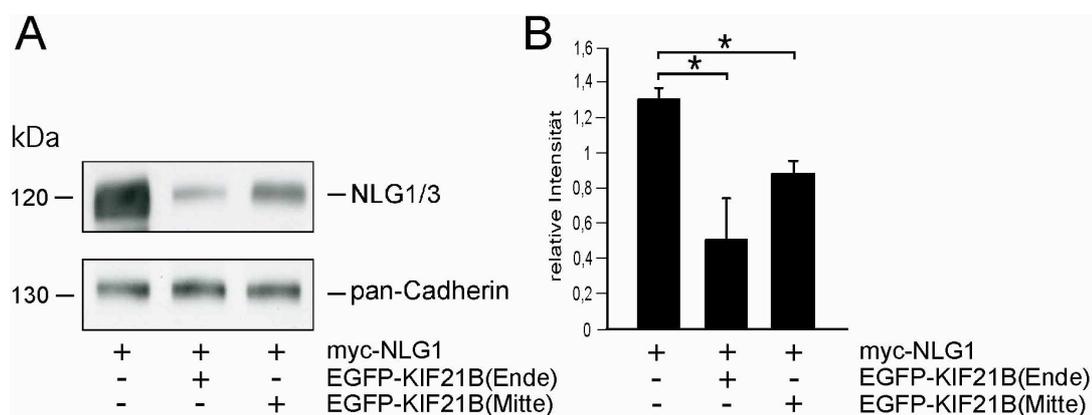


Abb. 3.22: Quantitative Analyse der NLG1 Oberflächenlokalisation in HEK293-Zellen.

A Die Zelloberflächenlokalisation von myc-NLG1 wurde durch Biotinylierung und anschließender Streptavidin-Präzipitation analysiert. Koexpression von myc-NLG1 und EGFP-KIF21B(Ende) oder EGFP-KIF21B(Mitte) verminderten die Lokalisation von myc-NLG an der Oberfläche. Die Detektion gegen pan-Cadherin diente als Ladekontrolle. **B** Quantifizierung von **A**.

3.2.5 Kolokalisation von KIF21B und Neuroligin 1

Zur Analyse der KIF21B Lokalisation in hippocampalen Primärkulturen wurden diese an DIV9 fixiert und mit einem gegen KIF21B gerichteten Antikörper immunzytochemisch gefärbt. Die Spezifität des Antikörpers für immunzytochemische Experimente wurde durch gleichzeitige Zugabe des für die Antikörperherstellung verwendeten Peptids überprüft. Ist das immunzytochemisch erhaltene Signal für den Antikörper spezifisch, so sollte nach Inkubation mit dem Immunogen kein Signal mehr zu detektieren sein. Dies konnte bei immunzytochemischen Färbungen und gleichzeitiger Immunogenapplikation in hippocampalen Primärkulturen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt) und diente somit als Spezifitätskontrolle.

Eine immunzytochemische Färbung von DIV9 hippocampalen Neuronen mit Antikörpern spezifisch für KIF21B und SV2, einem Markerprotein für Präsynapsen, diente zur Untersuchung der KIF21B-Lokalisation (Abb. 3.23). KIF21B war in bestimmten dendritischen Bereichen stark angereichert sowie in Form von kleinen zytosolischen Signalkanpunkten in Soma und Dendriten verteilt. Die starke Anreicherung von KIF21B-

Signalen könnte auf eine Lokalisation in Wachstumskegeln deuten. Die gleichzeitige SV2 und KIF21B Immunfärbung zeigte in der Überlagerung beider Signale wenig kolokalisierende (gelbe) Signalpunkte. KIF21B war demnach zu einem geringen Anteil synaptisch lokalisiert.

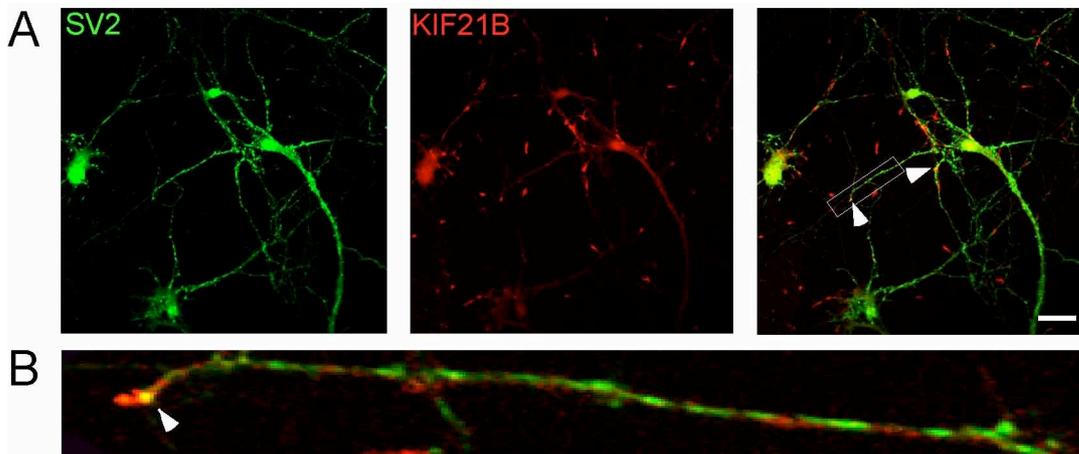


Abb. 3.23: Immunzytochemische Analyse der KIF21B-Lokalisation in hippocampalen Primärkulturen.

A Hippokampale Neurone wurden an DIV9 mit SV2 und KIF21B spezifischen Antikörpern immunzytochemisch gefärbt. Darstellung des SV2 Signals (grün), Darstellung des KIF21B Signals (rot). Überlagerung des grünen (SV2) und roten Signals (KIF21B). Pfeilköpfe zeigen auf kolokalisierende Signale (gelb). Größenbalken: 18 μm . **B** Vergrößerung eines Ausschnitts von **A** (weißer Kasten). Der Pfeilkopf markiert einen kolokalisierenden Signalpunkt (gelb).

Desweiteren wurden DIV7 hippocampale Neurone mit GFP-NLG1 transfiziert und an DIV9 mit KIF21B spezifischen Antikörpern immunzytochemisch gefärbt (Abb. 3.24). Auch hier zeigten sich die starken Anreicherungen in bestimmten dendritischen Bereichen aber auch die kleinen zytosolischen Signalpunkte von KIF21B. GFP-NLG1 ist somatodendritisch und in *Spines* lokalisiert. Eine geringe Anzahl von großen und kleineren mit KIF21B kolokalisierenden Signalpunkten (gelb) konnte beobachtet werden.

Die immunzytochemisch gewonnenen Daten ergeben, dass KIF21B nur zu einem geringen Anteil mit NLG1 kolokalisiert und an Synapsen vorzufinden ist (SV2-Immunfärbung). Desweiteren werden die mit Hilfe der *Time-lapse* Videomikroskopie gewonnenen Daten unterstützt, insofern als dass NLG nur zu einem geringen Prozentteil (<1%) mobilisiert wird. Dies wird deutlich, da an DIV9 nur wenige GFP-NLG1-Signalpunkte mit KIF21B kolokalisiert waren.

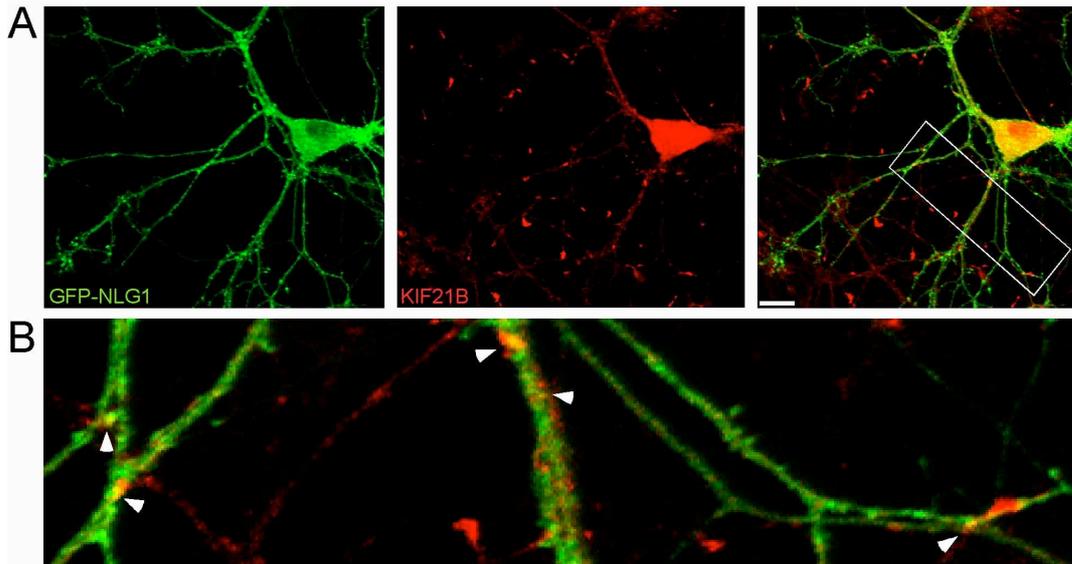


Abb. 3.24: Immunzytochemische Analyse der KIF21B und GFP-NLG1 Kolokalisation.

A Mit GFP-NLG1 transizierte hippocampale Primärkulturen wurden an DIV9 mit KIF21B spezifischen Antikörpern immunzytochemisch gefärbt. Darstellung der GFP-NLG1 Autofluoreszenz (grün), Darstellung des KIF21B Signals (rot). Überlagerung des grünen (GFP-NLG1) und roten Signals (KIF21B). Größenbalken: 14 μm **B** Vergrößerung von **A** (weißer Kasten). Pfeilköpfe zeigen auf kolocalisierende Signale (gelb).

3.2.6 Inhibition der KIF21B-Expression und Einfluss auf Neuroligin 1

Zur funktionellen Analyse der KIF21B und NLG1 Interaktion wurde die Expression von KIF21B mit Hilfe der *antisense*-Technologie inhibiert und der Einfluss des fehlenden anterograden Motors auf NLG beobachtet. In der *antisense*-Technologie werden zur kodierenden mRNA komplementäre Oligonukleotide durch Endozytose in die Zelle aufgenommen (Juliano *et al.*, 2008) und bilden mit der mRNA RNA-DNA-Hybride wodurch die Translation blockiert wird. Die Inhibition der Translation basiert zum einen auf der sterischen Blockade der mRNA und zum anderen auf der Eigenschaft der Oligonukleotide die RNase H zu aktivieren, welche die RNA-DNA-Heteroduplex spaltet und degradiert. Bei den verwendeten Oligonukleotiden handelte es sich um 5' modifizierte PTO (Phosphorothioat)-Oligonukleotide, welche aufgrund der Modifizierung eine erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen besitzen (Stein *et al.*, 1991).

Hippokampale Primärkulturen wurden von DIV3-DIV7 mit *antisense*- oder *sense*-Oligonukleotiden behandelt. Dabei wurde ein Gemisch von zwei Sequenzen verwendet, die entweder das Startkodon oder einen Teil der 3'UTR umfassen (vgl. Tabelle 2.2). Die Zelllysate wurden mit Aktin und KIF21B spezifischen Antikörpern per Western Blot analysiert, wobei die Detektion von Aktin als Standard für die Quantifizierung der KIF21B-Expression diente. Nach viertägiger *antisense*-Behandlung war die KIF21B-Expression reduziert (*sense*: $1,29 \pm 0,26$ relative Intensität; *antisense*: $0,47 \pm 0,11$ relative Intensität; $n=4$; $p=0,026$). Dies entspricht einem Rückgang der Expression auf 36,43% (Abb. 3.25).

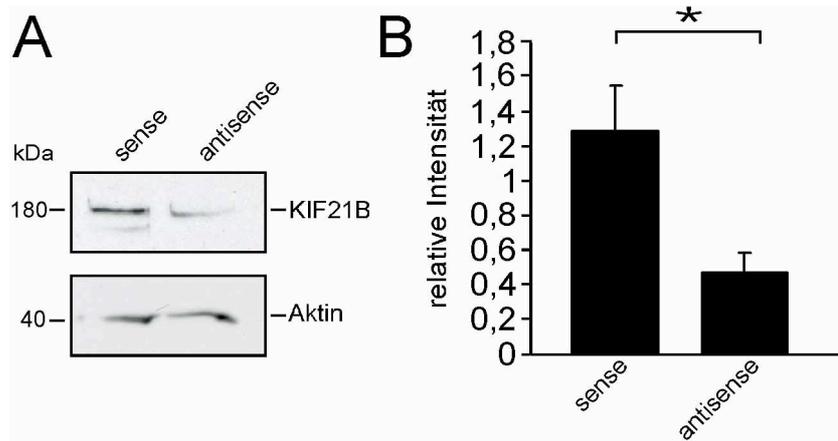


Abb. 3.25: Inhibition der KIF21B-Expression in hippocampalen Primärkulturen.

A Kultivierte hippocampale Neurone wurden von DIV3-DIV7 mit sense (Kontrolle) und antisense PTO-modifizierten Oligonukleotiden behandelt, lysiert und per Western Blot analysiert. **B** Quantifizierung von **A**.

Die Reduktion der KIF21B-Expression beeinflusst NLG. Dies konnte in einem Experiment zur Analyse der Zelloberflächenlokalisation von NLG beobachtet werden. Hierzu wurden hippocampale Primärkulturen wie oben beschrieben mit *antisense*- oder *sense*-Oligonukleotiden behandelt. Anschließend wurden Oberflächenproteine biotinyliert und die Zellen lysiert. Die biotinylierten Zellextrakte mit gleicher Proteinkonzentration wurden mit Streptavidin-gekoppelten *Beads* präzipitiert und per Western Blot analysiert (Abb. 3.26). Im Gesamtzellextrakt zeigte sich kein Unterschied zwischen NLG und pan-Cadherin (Abb. 3.26 A+C: *sense*: $1,26 \pm 0,20$ relative Intensität; *antisense*: $1,18 \pm 0,10$ relative Intensität; $n=4$). Die Expression von NLG scheint also nicht beeinflusst. Vielmehr war der Transport zur Oberfläche um 47,16% signifikant reduziert (Abb. 3.26 B+D: *sense*: $1,23 \pm 0,05$ relative Intensität; *antisense*: $0,65 \pm 0,10$ relative Intensität; $n=4$, $p=0,005$). Als Ladekontrolle diente das Zelladhäsionsmolekül pan-Cadherin, welches von der reduzierten KIF21B-Expression unverändert detektiert werden konnte.

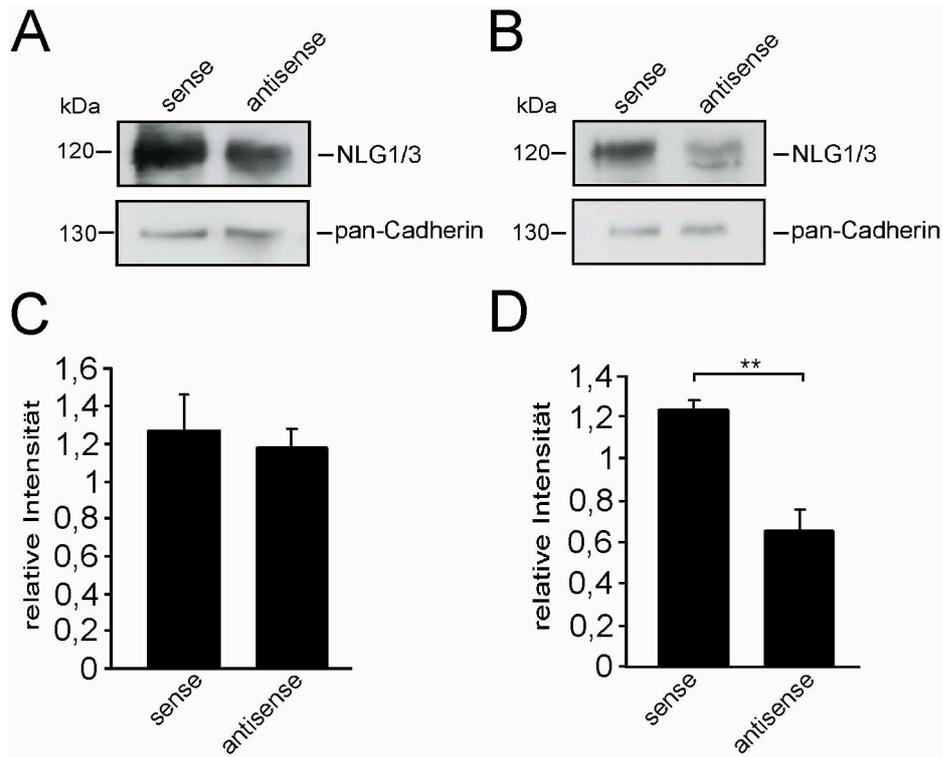


Abb. 3.26: Analyse der NLG Oberflächenlokalisierung bei gleichzeitiger Inhibition der KIF21B-Expression. Hippokampale Primärkulturen wurden von DIV3-DIV7 mit KIF21B spezifischen *antisense*-Oligonukleotiden behandelt. Die Zelloberflächenlokalisierung von NLG1/3 wurde durch Biotinylierung und anschließender Streptavidin-Präzipitation analysiert. **A** Die Expression von NLG oder pan-Cadherin in Gesamtzellextrakten war unbeeinflusst. **B** Die Detektion mit NLG1/3 spezifischen Antikörpern zeigte eine signifikante Reduktion von NLG an der Oberfläche. **C** Quantifizierung von **A**. **D** Quantifizierung von **B**.

3.3 Einfluss der synaptischen Aktivität auf Neuroligin 1

Unter synaptischer Plastizität versteht man die Fähigkeit von Synapsen auf veränderte Einflüsse der Umwelt in Form einer veränderten synaptischen Transmission zu reagieren. Diese veränderte synaptische Transmission kann in einer Potenzierung oder Depression der jeweiligen Synapse ausgedrückt werden. (Bliss *et al.*, 1973, Neves *et al.*, 2008). Eine Form der synaptischen Plastizität ist die als Modell für Lernmechanismen und Gedächtnisbildung im Hippokampus herangezogene Induktion von *Long-term potentiation* (LTP) oder *Long-term depression* (LTD). Darunter versteht man die aktivitätsabhängige Stärkung (LTP) oder Schwächung (LTD) auf morphologischer und physiologischer Ebene von Synapsen über einen längeren Zeitraum.

NLG bildet zusammen mit dem präsynaptischen Interaktionspartner Neurexin einen transsynaptischen Komplex, dem eine wichtige Rolle in der Synaptogenese und Synapsenreifung sowie bei der Verankerung von post- und präsynaptischen Proteinen zufällt (Dean *et al.*, 2006). Da NLG durch seine Lokalisation und Funktion an der Synapse ein interessanter Kandidat für die Umsetzung von Lern- und/oder Gedächtnisprozessen ist, wurde

im folgenden Teil der Arbeit der Frage nachgegangen, ob und inwiefern NLG durch LTP- oder LTD-Prozesse beeinflusst wird.

3.3.1 Analyse von Neuroligin 1 nach LTD-Induktion

LTD wurde chemisch, durch eine 5 minütige Inkubation mit dem metabotropen Glutamatrezeptor-Agonisten DHPG ((RS)-3,5-Dihydroxyphenylglyzin, Palmer *et al.*, 1997, Huber *et al.*, 2001) und anschließender einstündiger Inkubation bei 37°C in DIV10 hippokampalen Primärkulturen induziert (vgl. 2.2.2.10). Anschließend folgte eine Markierung der Oberflächenproteine mit Biotin (s.o.) und eine Analyse mit NLG und pan-Cadherin spezifischen Antikörpern per Western Blot.

Im Gesamtzellextrakt zeigte sich kein Unterschied zwischen NLG und pan-Cadherin (Abb. 3.27 A+B: H₂O-Kontrolle: $1,07 \pm 0,22$ relative Intensität; DHPG: $1,01 \pm 0,21$ relative Intensität; n=4), d.h., dass weder die Expression von NLG noch die pan-Cadherin-Expression beeinflusst zu sein scheint. Im Gegensatz dazu war NLG1/3 an der Oberfläche nach der LTD-Induktion um 65,79% signifikant reduziert (Abb. 3.27 C+D: H₂O-Kontrolle: $1,14 \pm 0,30$ relative Intensität; DHPG: $0,39 \pm 0,08$ relative Intensität; n=6, p=0,04), pan-Cadherin als Ladekontrolle hingegen nicht.

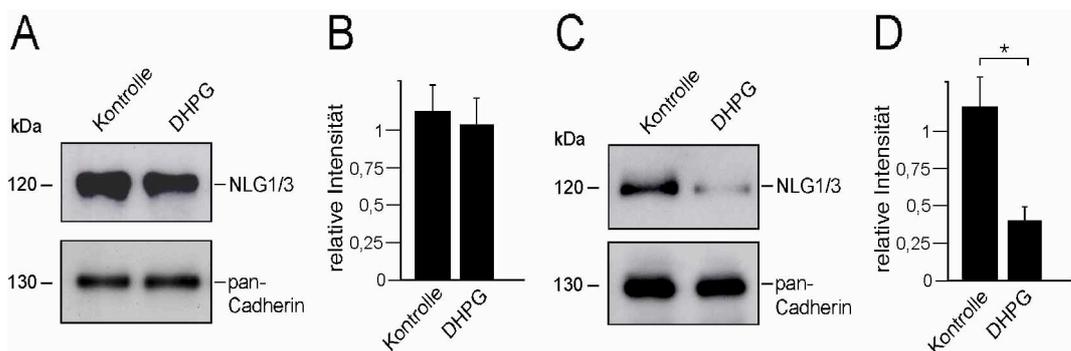


Abb. 3.27: Analyse der NLG-Oberflächenlokalisation nach LTD-Induktion.

A Hippokampale Primärkulturen wurden 5 min mit 50 μ M (RS)-3,5-Dihydroxyphenylglyzin oder H₂O als Kontrolle behandelt. Die Oberflächenlokalisation von NLG1/3 wurde durch Biotinylierung und anschließende Streptavidin-Präzipitation analysiert. **A** Die Expression von NLG oder pan-Cadherin in Gesamtzellextrakten war unbeeinflusst. **B** Quantifizierung von **A**. **C** Detektion mit NLG1/3 spezifischen Antikörpern zeigte eine signifikante Reduktion von NLG an der Oberfläche. **D** Quantifizierung von **C**.

Im Folgenden wurde LTD mittels DHPG-Applikation an GFP-NLG1 exprimierenden DIV10 hippokampalen Primärkulturen induziert und diese in der einstündigen Inkubation (s.o.) mittels *Time-lapse* Videomikroskopie analysiert. (Abb. 3.28). Dabei wurden die mobilen GFP-NLG1-Signale pro Zelle und pro 10 min quantifiziert (H₂O-Kontrolle: $0,48 \pm 0,09$ mobile Signale; n_{Experiment}=9, n_{Filme}=63; DHPG: $1,24 \pm 0,25$ mobile Signale; n_{Experiment}=5, n_{Filme}=33, p<0,001). Die mit DHPG behandelten Neurone zeigten eine 2,6-fach signifikant erhöhte Mobilität der GFP-NLG1-Signale. Zusammen mit den Daten des Biotinylierungsexperiments zur Analyse der Zelloberflächenlokalisation von NLG (Abb.

3.27) lassen die mit Hilfe der *Time-lapse* Videomikroskopie gewonnenen Daten auf einen erhöhten NLG-Turnover schließen, sofern chemisch LTD induziert wird.

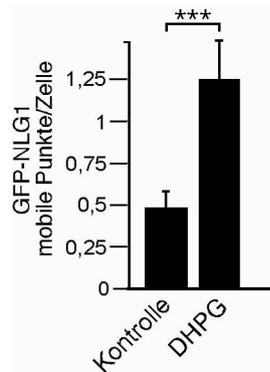


Abb. 3.28: Analyse der GFP-NLG1 mobilen Punkte pro Zelle nach LTD-Induktion.

Time-lapse Videomikroskopie wurde an mit pGFP-NLG1 transfizierten DIV10 hippocampalen Primärkulturen durchgeführt und die Mobilität der GFP-NLG1 Signalpunkte pro Zelle nach LTD-Induktion mittels DHPG-Applikation analysiert. Als Kontrolle diente Wasser. Dargestellt ist die Quantifizierung des Experiments.

3.3.2 Analyse der Mikrotubuliabhängigkeit während der LTD-Induktion auf Neuroligin 1

Nach chemischer LTD-Induktion mit Hilfe des metabotropen Glutamatrezeptor-Agonisten DHPG konnte eine erhöhte Mobilisierung und eine reduzierte Zelloberflächenlokalisation von NLG1 beobachtet werden (vgl. 3.3.1). Im Folgenden sollte analysiert werden, ob dieser erhöhte NLG-Turnover von Mikrotubuli abhängig ist. Dazu wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem sequentiell erst LTD induziert und dann die Mikrotubuli depolymerisiert wurden. Bei einem weiteren Experiment wurden die Mikrotubuli bereits während der LTD-Induktion depolymerisiert. Da sich Mikrotubuli-basierte Motorproteine nur entlang eines intakten Mikrotubuli-Zytoskeletts bewegen können (Lafont *et al.*, 1994), kann somit indirekt ein Hinweis auf eine Motorproteinabhängigkeit erhalten werden. Zur Störung der Mikrotubuli wurde Nocodazol verwendet, welches zur Depolymerisation der Mikrotubuli führt (Samson *et al.*, 1979).

Wurde sequentiell erst LTD und nach einstündiger Inkubation (s.o.) eine weitere Stunde die Depolymerisation von Mikrotubuli (Nocodazol) in DIV10 hippocampalen Primärkulturen induziert, zeigte sich eine reduzierte Zelloberflächenlokalisation von NLG. Dies wurde durch eine Markierung der Oberflächenproteine mit Biotin (s.o.) und durch eine Analyse mit NLG und pan-Cadherin spezifischen Antikörpern mittels Western Blot Analyse beobachtet.

Im Gesamtzellextrakt zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich NLG oder pan-Cadherin zwischen den einzelnen Versuchsansätzen (Abb. 3.29 A+C: DMSO-Kontrolle: $0,55 \pm 0,23$ relative Intensität; DHPG/Nocodazol: $0,74 \pm 0,27$ relative Intensität; $n=4$). Im Gegensatz dazu war NLG1/3 an der Oberfläche nach sequentieller DHPG/Nocodazol-Behandlung um 48,85% signifikant reduziert (Abb. 3.29 B+D: DMSO-Kontrolle: $1,31 \pm 0,08$ relative Intensität; DHPG/Nocodazol: $0,67 \pm 0,05$ relative Intensität; $n=3$, $p=0,002$). Die Detektion gegen pan-Cadherin diente als Ladekontrolle und Standard bei der Quantifizierung

und war nicht beeinflusst. Im Vergleich zu Abb. 3.27 konnte auch hier eine Reduktion von NLG an der Zelloberfläche festgestellt werden. Die Zerstörung der Mikrotubuli mit Hilfe der Nocodazolbehandlung hat demnach nach der Etablierung von LTD keinen Effekt mehr auf die Lokalisation von NLG an der Oberfläche.

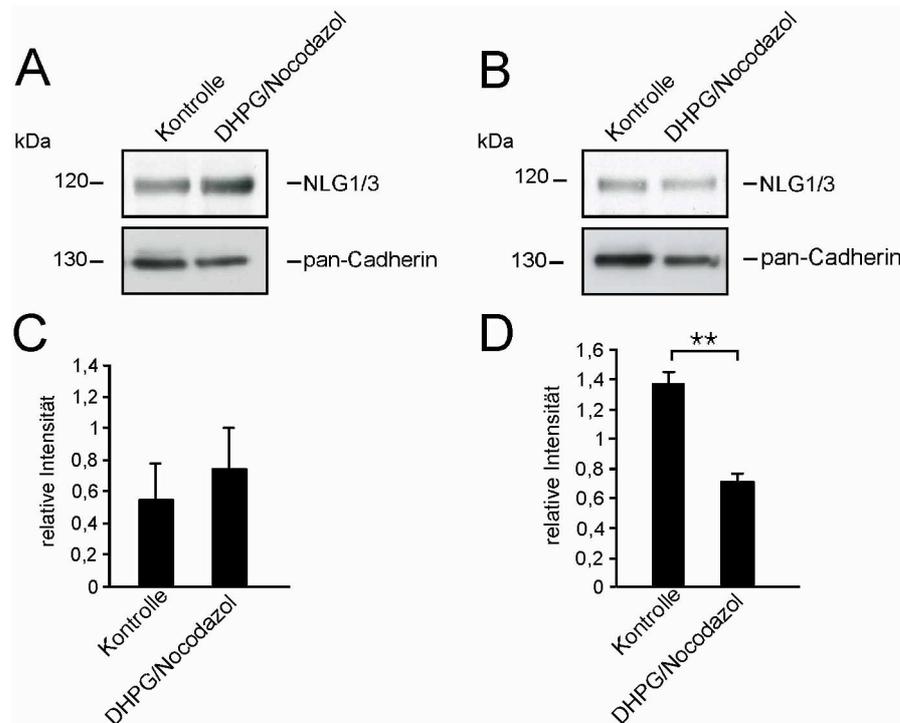


Abb. 3.29: Analyse der NLG Oberflächenlokalisation nach DHPG- und anschließender Nocodazolbehandlung.

Sequentielle Behandlung von DIV10 hippocampalen Primärkulturen mit DHPG und Nocodazol. Die einstündige Nocodazolbehandlung schloss sich der einstündigen Inkubation bei 37°C nach DHPG-Applikation an. Als Kontrollbehandlung diente Dimethylsulfoxid (DMSO). **A** Der Gesamtzellextrakt nach Biotinylierung der Oberflächenproteine zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Expression von NLG und pan-Cadherin im Western Blot. **B** Mit Streptavidin präzipitierte biotinylierte Oberflächenproteine wurden bezüglich NLG und pan-Cadherin per Western Blot analysiert. Die NLG-Oberflächenlokalisation war signifikant reduziert. **C** Quantifizierung von **A**. **D** Quantifizierung von **B**.

Bei einem zweiten Experiment wurden gleichzeitig DHPG und Nocodazol auf DIV10 hippocampalen Primärkulturen appliziert. DMSO diente als Kontrollbehandlung. Anschließend wurden die Zellen biotinyliert, mit Streptavidin-gekoppelten *Beads* präzipitiert und im Western Blot bezüglich der NLG-Zelloberflächenlokalisation analysiert. Die Gesamtzellextrakte vor der Streptavidinpräzipitation zeigten keinen Unterschied zwischen DMSO-Kontrolle und DHPG+Nocodazol-Behandlung hinsichtlich der Oberflächenexpression von NLG bzw. pan-Cadherin (Abb. 3.30 A+C: DMSO-Kontrolle: $1,08 \pm 0,19$ relative Intensität; DHPG+Nocodazol: $1,10 \pm 0,17$ relative Intensität; $n=5$). Auch nach der Streptavidinpräzipitation war NLG nicht signifikant verändert (Abb. 3.30 B+D: DMSO-Kontrolle: $0,65 \pm 0,06$ relative Intensität; DHPG+Nocodazol: $0,82 \pm 0,05$ relative Intensität; $n=4$). Im Vergleich zu dem durch die LTD-Induktion hervorgerufenen Rückgang von NLG an der Zelloberfläche (Abb. 3.29, 3.27), zeigte sich dieser Effekt hier nicht, wenn gleichzeitig Mikrotubuli zerstört wurden. Dies deutet auf eine mögliche Rolle von Mikrotubuli-basierten

Transportprozessen bei dem durch LTD-Induktion hervorgerufenen erhöhten NLG-*Turnover* hin.

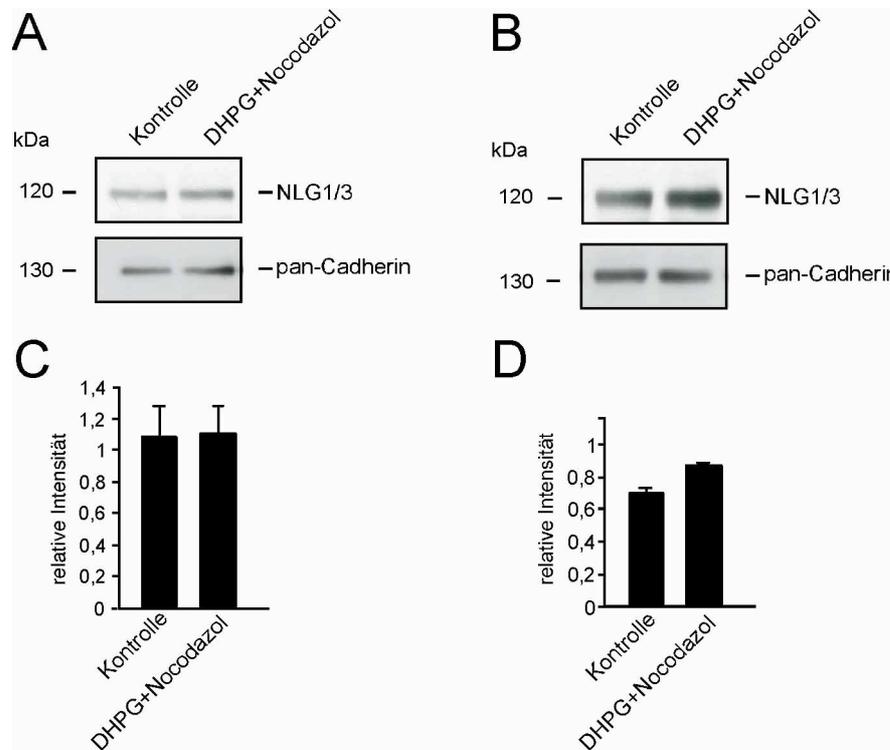


Abb. 3.30: Analyse der NLG Oberflächenlokalisierung nach gleichzeitiger Applikation von DHPG und Nocodazol.

Gleichzeitige Behandlung von DIV10 hippocampalen Primärkulturen mit DHPG und Nocodazol. Als Kontrollbehandlung diente Dimethylsulfoxid (DMSO). Mit Streptavidin präzipitierte biotinylierte Zelloberflächenproteine wurden bezüglich NLG und pan-Cadherin per Western Blot analysiert. **A** Gesamtzellextrakt nach Biotinylierung der Oberflächenproteine. **B** Im Streptavidinpräzipitat zeigte sich bei gleichzeitiger Behandlung von DIV10 hippocampalen Primärkulturen mit DHPG und Nocodazol keine Reduktion der NLG-Oberflächenlokalisierung. **C** Quantifizierung von **A**. **D** Quantifizierung von **B**.

3.3.3 Analyse von Neuroligin 1 nach LTP-Induktion

Da die Induktion einer langanhaltenden, aktivitätsabhängigen Schwächung von Synapsen (LTD, vgl. 3.3.1) einen erhöhten NLG-*Turnover* zur Folge hat und zu einer reduzierten Lokalisation von NLG an der Zelloberfläche führt, wurde nun NLG nach langanhaltender, aktivitätsabhängiger Stärkung der Synapsen (LTP) analysiert. Für die chemische Induktion von LTP wurden DIV10 hippocampale Primärkulturen vor Biotinylierung der Zelloberflächenproteine (s.o.) mit 50 μ M Forskolin und 0,1 μ M Rolipram behandelt (Otmakhov *et al.*, 2003). Als Kontrollbehandlung diente das Lösungsmittel DMSO. Die Forskolinapplikation führt zu einem erhöhten cAMP-Spiegel durch die Aktivierung der Adenylcyclase. Auch die Applikation von Rolipram erhöht durch die Inhibition der Phosphodiesterase 4 den cAMP-Spiegel. Durch einen erhöhten cAMP-Spiegel werden Signalkaskaden u.a. für die Neusynthese von Proteinen aktiviert, welche für eine

Konsolidierung des Langzeitgedächtnis notwendig sind (Davis *et al.*, 1984, Otmakhov *et al.*, 2003).

Die Gesamtextrakte zeigten keine veränderte NLG-Expression (Abb. 3.31 A+B: DMSO-Kontrolle: $0,75 \pm 0,09$ relative Intensität; Forskolin/Rolipram: $0,74 \pm 0,11$ relative Intensität; $n=6$). Nach der Streptavidinpräzipitation lag NLG jedoch an der Zelloberfläche signifikant erhöht vor (Abb. 3.31 C+D: DMSO-Kontrolle: $0,51 \pm 0,10$ relative Intensität; Forskolin/Rolipram: $1,02 \pm 0,11$ relative Intensität; $n=6$, $p=0,0099$). Die Induktion von LTP erhöht demnach die Insertion von NLG in die Zelloberflächenmembran.

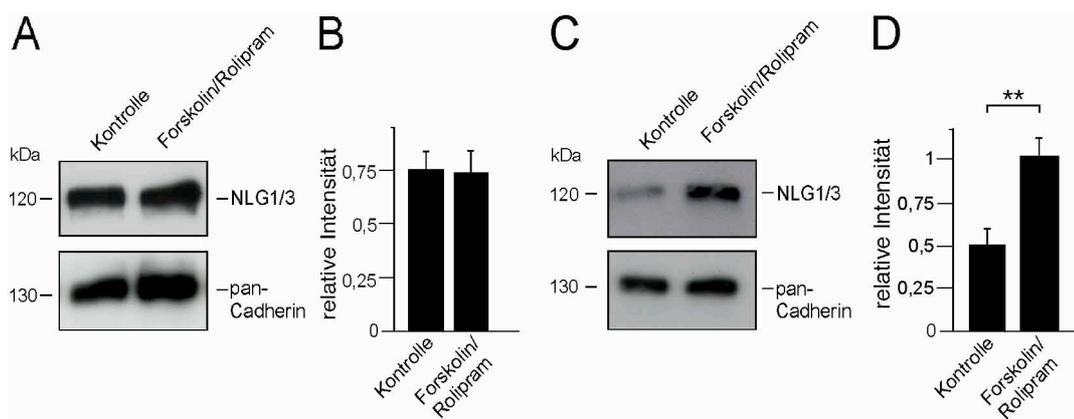


Abb. 3.31: Quantitative Analyse der NLG Oberflächenlokalisierung nach LTP-Induktion in hippocampalen Primärkulturen.

DIV10 Neurone wurden vor der Biotinylierung der Zelloberflächenproteine mit Forskolin und Rolipram behandelt, um chemisch LTP zu induzieren. Die Oberflächenlokalisierung von NLG1/3 wurde durch Biotinylierung und anschließende Streptavidin-Präzipitation analysiert. **A** Die Expression von NLG oder pan-Cadherin in Gesamtzellextrakten war unbeeinflusst. **B** Quantifizierung von **A**. **C** Die Detektion mit NLG1/3 spezifischen Antikörpern zeigte eine signifikante Anreicherung von NLG an der Oberfläche. **D** Quantifizierung von **C**.

Im Folgenden wurden Synaptosomen von DIV11 kultivierten kortikalen Neuronen nach Forskolin- und Rolipram-Applikation (LTP-Induktion) aufgereinigt (vgl. 2.2.2.8), mittels Western Blot analysiert und quantifiziert. Synaptosomen sind artifizielle, durch differentielle Zentrifugation aus Zellextrakten hergestellte geschlossene Partikel, welche sowohl präsynaptische Komponenten als auch postsynaptische Komponenten beinhalten (Whittaker *et al.*, 1993). Die Detektion von Aktin mit spezifischen Antikörpern diente als Standard für die Quantifizierung der synaptischen Proteine (vgl. 3.32 B). Die Kontrollbehandlung erfolgte mit dem Lösungsmittel DMSO.

Als Reinheitskontrolle der Synaptosomenaufreinigung diente die Detektion des nukleär lokalisierten, neuronspezifischen Proteins NeuN. Da für NeuN kein Signal nachweisbar war, konnte eine Verunreinigung mit neuronalen, nukleären Membranen ausgeschlossen werden. Der präsynaptische Einfluss der LTP-Induktion wurde in den aufgereinigten Synaptosomen mit Antikörpern analysiert, welche spezifisch die präsynaptisch lokalisierten Proteine Synapsin oder VGlut detektieren. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen DMSO oder Forskolin/Rolipram behandelten Synaptosomen (Abb. 3.32: DMSO-Kontrolle_{Synapsin}: $0,97 \pm 0,22$ relative Intensität; Forskolin/Rolipram_{Synapsin}: $0,93 \pm 0,13$ relative Intensität; $n=3$;

DMSO-Kontrolle_{VGlut}: $0,72 \pm 0,34$ relative Intensität; Forskolin/Rolipram_{VGlut}: $0,67 \pm 0,20$ relative Intensität; n=3).

Die Quantifizierung der postsynaptischen Proteine NLG1/3 und PSD-95 zeigte eine signifikante Zunahme dieser Proteine in den aufgereinigten Synaptosomen nach der LTP-Induktion (Abb. 3.32: DMSO-Kontrolle_{NLG1/3}: $1,36 \pm 0,25$ relative Intensität; Forskolin/Rolipram_{NLG1/3}: $1,93 \pm 0,33$ relative Intensität; p=0,04, n=4; DMSO-Kontrolle_{PSD-95}: $0,94 \pm 0,07$ relative Intensität; Forskolin/Rolipram_{PSD-95}: $1,19 \pm 0,08$ relative Intensität; p=0,05; n=4). Dabei war NLG1/3 1,42 fach und PSD-95 1,27 fach erhöht.

Außerdem waren in Forskolin/Rolipram-behandelten Synaptosomen die KIF21B-Signale signifikant 1,93 fach erhöht (DMSO-Kontrolle_{KIF21B}: $0,29 \pm 0,05$ relative Intensität; Forskolin/Rolipram_{KIF21B}: $0,56 \pm 0,08$ relative Intensität; p=0,04; n=3).

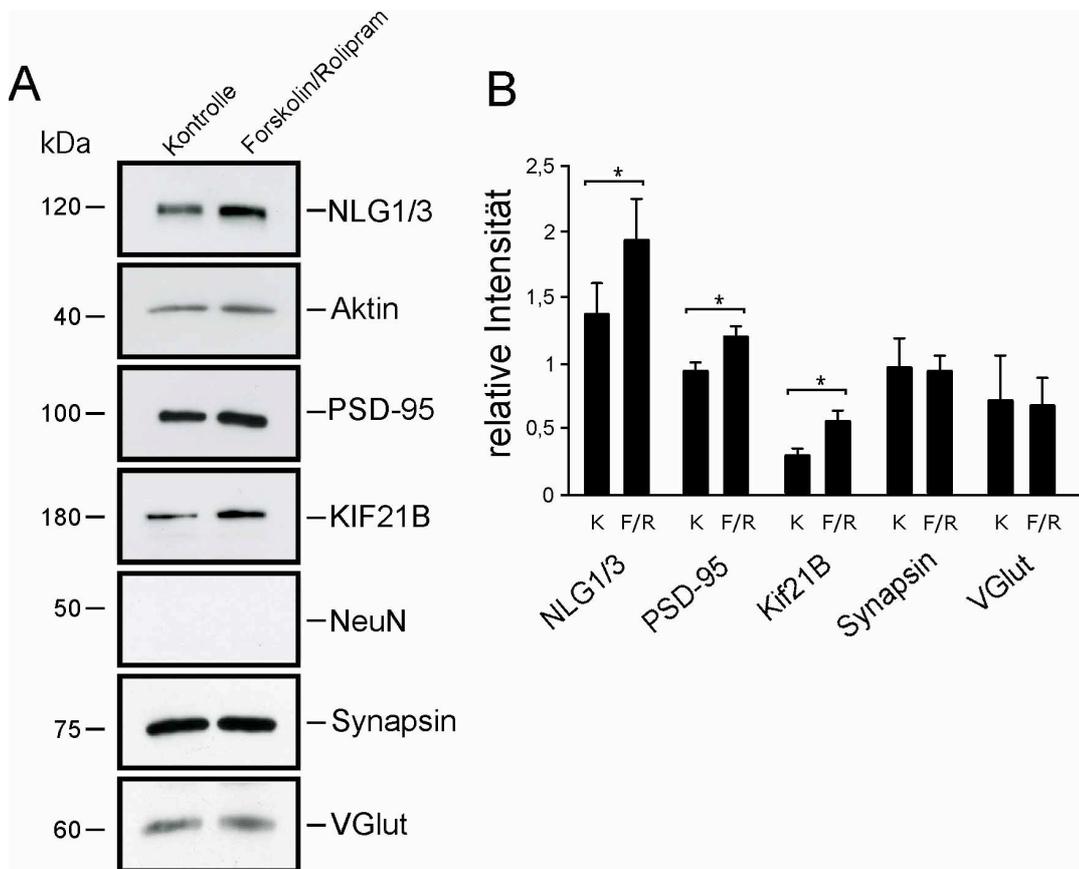


Abb. 3.32: Proteinlokalisierung in aufgereinigten Synaptosomen nach LTP-Induktion.

A Western Blot-Analyse verschiedener synaptischer Proteine. Die Detektion mit Antikörpern spezifisch für NeuN (Kernprotein) diente als Reinheitskontrolle. **B** Quantifizierung von **A**. K=Kontrolle (DMSO-Behandlung), F/R=Forskolin- und Roliprambehandlung.

Zusammengefasst zeigen die Experimente, dass NLG1/3 durch eine LTP-Induktion beeinflusst wird, da sich die Lokalisation an der Zelloberfläche und an der Synapse signifikant erhöht.

3.3.4 Analyse von Neuroligin 1 nach LTP-Induktion und gleichzeitiger Inhibition der KIF21B-Expression

Durch die vorherigen Experimente konnte der Einfluss der synaptischen Potenzierung auf NLG gezeigt werden (vgl. 3.3.3). Da NLG1 mit KIF21B interagiert (vgl. 3.2), wurden im folgenden Versuch diese beiden Beobachtungen zu NLG kombiniert, indem die KIF21B-Expression mit Hilfe der *antisense*-Technologie inhibiert und gleichzeitig der Effekt der synaptischen Potenzierung analysiert wurde. Als Kontrolle der LTP-Induktion diente DMSO, als Kontrolle der inhibierten KIF21B-Expression dienten *sense*-Oligonukleotide. Von DIV3 bis zur Induktion von LTP an DIV7 erfolgte die Applikation von *sense*- und *antisense*-Oligonukleotiden. Nach der Induktion von LTP an DIV7 in hippocampalen Primärkulturen wurden die Zelloberflächenproteine biotinyliert und mit Streptavidin-gekoppelten *Beads* präzipitiert. Anschließend erfolgte die Analyse von NLG und pan-Cadherin im Western Blot, wobei die Detektion mit pan-Cadherin spezifischen Antikörpern als Kontrolle und Standard der Quantifizierung diente (Abb. 3.33).

Die Gesamtextrakte zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der NLG-Detektion in *sense*- und *antisense*- sowie DMSO- und Forskolin/Rolipram-behandelten Zellen (Abb. 3.33 A+C: DMSO-Kontrolle_{*sense*}: $0,82 \pm 0,21$ relative Intensität; Forskolin/Rolipram_{*sense*}: $0,86 \pm 0,20$ relative Intensität; DMSO-Kontrolle_{*antisense*}: $0,89 \pm 0,20$ relative Intensität; Forskolin/Rolipram_{*antisense*}: $0,88 \pm 0,13$ relative Intensität; n=4). Die im Streptavidinpräzipitat detektierten NLG-Signale ließen jedoch eine signifikant erhöhte relative Intensität erkennen (vgl. Abb. 3.31, Abb. 3.33), sofern die Neurone mit *sense*-Oligonukleotiden und Forskolin/Rolipram behandelt wurden. Ein Vergleich der durch Forskolin/Rolipram-Behandlung gewonnenen NLG-Signale zwischen *sense* und *antisense*-Oligonukleotid behandelten Zellen ließ eine signifikante Reduktion im NLG-Signal bei *antisense*-Oligonukleotid behandelten Zellen erkennen (Abb. 3.33 B+D: DMSO-Kontrolle_{*sense*} und DMSO-Kontrolle_{*antisense*} wurden auf 1 normalisiert; Forskolin/Rolipram_{*sense*}: 2,26 relative Intensität; Forskolin/Rolipram_{*antisense*}: 1,04 relative Intensität; n=6, $p_{\text{sense}}=0,036$, $p_{\text{Forskolin/Rolipram}}=0,043$).

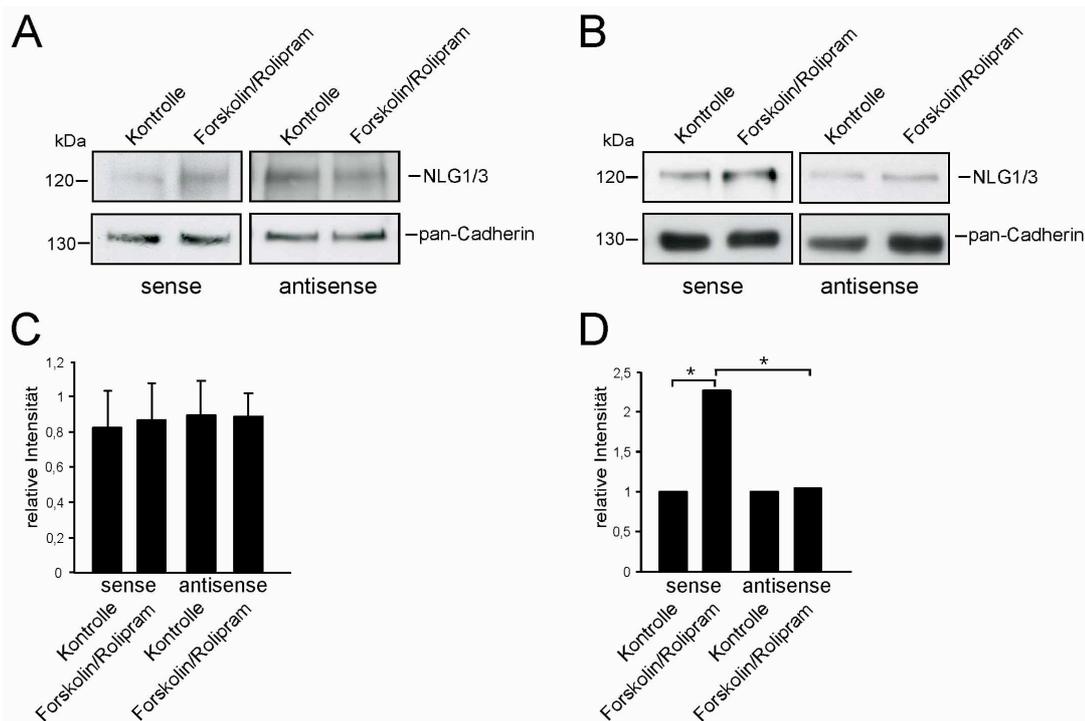


Abb. 3.33: Analyse der NLG Zelloberflächenlokalisierung bei inhibierter KIF21B-Expression und gleichzeitiger LTP-Induktion.

Die Behandlung der hippocampalen Primärkulturen mit *sense*- und *antisense*-Oligonukleotiden erfolgte ab DIV3. An DIV7 wurde chemisch LTP induziert. Die mit Streptavidin präzipitierten biotinylierten Zelloberflächenproteine wurden per Western Blot hinsichtlich NLG1/3 und pan-Cadherin analysiert. Kontrolle=DMSO. **A** Gesamtzellextrakt der biotinylierten Proteine. **B** Die Detektion von NLG zeigte in mit *sense*-Oligonukleotiden behandelten Neuronen nach der LTP-Induktion eine signifikant erhöhte Lokalisation an der Zelloberfläche. Diese war hingegen in mit *antisense*-Oligonukleotiden behandelten Neuronen signifikant reduziert. **C** Quantifizierung von **A**. **D** Quantifizierung von **B**.

Zusammengefasst konnte durch dieses Experiment ein funktioneller Zusammenhang zwischen der KIF21B-Expression und der durch LTP-Induktion hervorgerufenen erhöhten Zelloberflächenlokalisierung von NLG festgestellt werden. Dies konnte gezeigt werden, indem die KIF21B-Expression mit Hilfe der *antisense*-Technologie inhibiert, und gleichzeitig der Effekt der synaptischen Potenzierung analysiert wurde. In Neuronen mit inhibierter KIF21B-Expression konnte, im Gegensatz zu KIF21B exprimierenden Neuronen, keine erhöhte NLG-Zelloberflächenlokalisierung nach LTP-Induktion festgestellt werden.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mobilität und der Transport des Zelladhäsionsmoleküls Neuroligin (NLG) untersucht. Das postsynaptische NLG bildet zusammen mit dem präsynaptischen Neurexin (NRX) einen heterophilen Komplex, welcher die prä- und postsynaptische Seite miteinander verbinden und stabilisieren kann. Beide Interaktionspartner sind über die Bindung ihrer jeweiligen PDZ-Bindedomäne mit dem präsynaptischen CASK (*Ca²⁺/Calmodulin-dependent serine protein kinase*) im Fall von NRX und mit dem postsynaptischen Gerüstprotein PSD-95 im Fall von NLG in der Synapse verankert (Hata *et al.*, 1996, Irie *et al.*, 1997). NLG kann *in vitro* die Synapsenbildung induzieren (Scheiffele *et al.*, 2000). Außerdem trägt NLG zur Kommunikation von Prä- und Postsynapse durch retrograde Signalwege bei (Futai *et al.*, 2007) und ist in synaptischen Reifungs- sowie Spezifitätsprozessen involviert (Varoqueaux *et al.*, 2006).

Für die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion von Neuronen werden Zellorganellen, Proteine oder mRNAs entlang von Aktinfilamenten bzw. Mikrotubuli mit Hilfe von spezifischen Motorproteinen transportiert. Auf diese Weise wird die gesamte Zelle mit den entsprechenden Komponenten versorgt. Da NLG eine wichtige Rolle an der Synapse innehat, war ein Ziel dieser Arbeit die zugrundeliegenden Transport- und Regulationsmechanismen genauer zu erforschen.

4.1 Anterograder und retrograder Transport von NLG1

Mittels *Time-lapse* Videomikroskopie konnte in mit pGFP-NLG1 transfizierten Neuronen (DIV14) sowohl retrograde (52,6%) als auch anterograde (47,4%) Mobilität von NLG1-Fusionsproteinen beobachtet werden. GFP-NLG1 wurde mit einer Maximalgeschwindigkeit von $0,11 \pm 0,02 \mu\text{m/s}$ transportiert. Dabei zeigte sich, dass NLG1 ab DIV4 in anterograde Richtung entlang von Dendriten und in *Spines* hinein transportiert wurde (vgl. 3.1.5, 3.2.1). Somit konnten mobile NLG1-Cluster sowohl in einer Zeit, in der die Synaptogenese startet (DIV4), als auch zu einem späteren Zeitpunkt, bei dem die Synapsenbildung schon relativ fortgeschritten ist (DIV14), beobachtet werden (de Lima *et al.*, 1997).

In einer Studie an DIV6 alten kultivierten Neuronen konnten zwei verschiedene Populationen von PSD-95-Transportpaketen hinsichtlich der An- und Abwesenheit von NLG1 identifiziert werden (Gerrow *et al.*, 2006). Die NLG1 positiven PSD-95-Transportpakete wurden über eine kürzere Strecke und langsamer transportiert als PSD-95-Transportpakete ohne NLG1 ($0,008 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ im Vergleich zu $0,014 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$). NLG1 verlangsamte demnach den Transport von PSD-95-Transportpaketen in dieser Studie. Insgesamt waren nur ca. 3% der PSD-95/NLG1-Cluster mobil. Die bei Gerrow *et al.* gemessene Geschwindigkeit für NLG1/PSD-95-Cluster ist mit $0,008 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ etwas langsamer verglichen mit der in dieser Arbeit festgestellten Geschwindigkeit ($0,11 \pm 0,02 \mu\text{m/s}$), welche jedoch zu einem späteren Zeitpunkt (DIV14) und ohne PSD-95-Kotransport zu untersuchen, ermittelt wurde.

Der Anteil an mobilen NLG-Partikeln ist mit ca. 3% im vergleichbaren Rahmen wie der in dieser Arbeit ermittelte Anteil von ca. 1 %. Im Gegensatz dazu sind an DIV4 in kortikalen Neuronen drei NLG1-Transporttypen zu erkennen: immobile sowie mobile NLG1-*Cluster*, wobei die mobilen *Cluster* mit oder ohne assoziierter NR1-Untereinheit des NMDAR vorliegen (Barrow *et al.* 2009). Barrow *et al.* konnten 11% mobile NLG1-*Cluster* mit einer Geschwindigkeit von $0,248 \pm 0,047 \mu\text{m/s}$ für NLG1 allein und $0,142 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$ für NLG1/NR1-*Cluster* beobachten. Die Assoziation von NLG1 mit NR1 verlangsamte die NLG1-Mobilität in Richtung der NR1-Mobilität ($0,142 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$). PSD-95-*Cluster* werden im Gegensatz zu Gerrow *et al.* NLG1-unabhängig und später als NLG1 zu entstehenden Synapsen anterograd transportiert. Die Geschwindigkeit von NLG1-Partikeln ist vergleichbar mit der in dieser Arbeit festgestellten Geschwindigkeit ($0,11 \pm 0,02 \mu\text{m/s}$) und lässt vermuten, dass NLG1 ohne assoziiertes PSD-95 ($0,008 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$, Gerrow *et al.*, 2006) transportiert wird. Retrograde mobile NLG1-*Cluster* konnten weder bei Gerrow noch bei Barrow *et al.* beobachtet werden. Dies könnte mit dem Alter und der Differenzierung der untersuchten Neurone zusammenhängen, da in dieser Arbeit ausdifferenzierte Neurone (DIV14) im Gegensatz zu Gerrow oder Barrow *et al.* (DIV4-6) analysiert wurden.

Zusätzlich zum Langstreckentransport in Dendriten konnte an DIV14 im Rahmen dieser Arbeit eine Rekrutierung von NLG1 in und aus *Spines* heraus beobachtet werden. Dabei variierte die Transportgeschwindigkeit innerhalb von *Spines* zwischen 20 und 120 s. In diesem Zusammenhang konnte nicht beobachtet werden, dass die retrograde NLG1-Rekrutierung zu einem vollständigen Verlust des GFP-NLG1-Signals an der *Spine*-Spitze führte. Synaptisches NLG1 wird also nicht vollständig abtransportiert. Demnach ist NLG1 nicht nur zu einem frühen Zeitpunkt, also während der Synaptogenese mobil (Barrow *et al.* 2009), sondern zum Teil auch in Dendriten und *Spines* adulter Neurone.

Aufgrund der schnellen Mobilisierung von NLG1 im $\mu\text{m/s}$ -Bereich ist davon auszugehen, dass der in dieser Arbeit beobachtete NLG-Transport auf aktiven intrazellulären Transportmechanismen basiert. Weiterhin kann eine auf Diffusion beruhende Bewegung ausgeschlossen werden, da eine Brown'sche Bewegung für NLG1-EGFP bei der hohen zeitlichen Auflösung mit Hilfe der *Time-lapse* Videomikroskopie nicht beobachtbar war. Diffusion ist eine passive Bewegung entlang eines Konzentrationsgradienten. Für den aktiven Transport wird chemische Energie genutzt, um entgegen eines Konzentrationsgradienten die Zelle schnell und über weite Entfernungen gerichtet mit ihren benötigten Komponenten zu versorgen. Da der aktive Transport von Zellorganellen, Proteinen oder mRNAs entlang der Zytoskelettstrukturen mit Hilfe von Motorproteinen verläuft (vgl. 1.6, Hirokawa *et al.* 2005, Bridgman *et al.*, 2003), wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die zugrundeliegenden NLG-Transportkomplexe charakterisiert.

4.2 Mikrotubuli-vermittelter Transport

Ein weiterer Hinweis für aktiven NLG1-Transport konnte durch immunzytochemische Färbungen an DIV9 Neuronenkulturen erhalten werden. Der anterograde Mikrotubuli-Motor KIF21B kolokalisiert mit NLG1 in Dendriten und an dendritischen Gabelungen (vgl. 3.2.5). Bei den kolokalisierenden Signalen handelte es sich vor allem um Transportkomplexe, welche in geringem Maß an Synapsen anzutreffen waren. Dies konnte durch eine koimmunzytochemische Färbung von KIF21B und einem präsynaptischen Markerprotein SV2 verdeutlicht werden. Die Kolokalisation war gering, was zu der geringen NLG1-Mobilität in diesem Alter (1%) passt, und Vermutungen nahelegt, dass KIF21B weitere NLG-unabhängige Funktionen in DIV9 Neuronen wahrnimmt. Unterstützt werden solche Vermutungen durch die Ansammlung von KIF21B in bestimmten Bereichen des Neurons, bei denen es sich um Wachstumskegel handeln könnte. KIF21B könnte demnach nicht nur für den Transport von NLG1 sondern zusätzlich auch für den Transport anderer *Cargoes* verantwortlich sein.

Auch der retrograde Mikrotubuli-Motor Dynein Schwere Kette (DHC) kolokalisiert mit NLG (Behrend, 2006) in immunzytochemischen Färbungen. Zusammen mit den in dieser Arbeit erhaltenen *Time-lapse* Videomikroskopiedaten (vgl. 3.1.5, 3.1.6), bei denen ein Kotransport von Dynein intermediärer Kette und NLG1 entlang von Dendriten und aus Spines heraus festgestellt werden konnte, zeigte sich, dass NLG1 nicht nur anterograd, sondern auch retrograd mit Hilfe von Mikrotubuli-spezifischen Motorproteinen in der Zelle transportiert wird.

Für Kinesin-Motorproteine ist eine Geschwindigkeit von 0,2-1,5 $\mu\text{m/s}$ und für Dynein-Motorproteine eine Geschwindigkeit von 1-2 $\mu\text{m/s}$ beschrieben (Paschal *et al.* 1987, Hirokawa *et al.* 1998, Ma *et al.* 2002). Damit liegen die hier ermittelten Geschwindigkeiten des NLG1-Transportkomplexes etwas unter den veröffentlichten durchschnittlichen Geschwindigkeiten. Allerdings ist die Geschwindigkeit des Motors abhängig vom jeweiligen *Cargo*. So zeigen Gerrow *et al.* einen noch langsameren Transport ($0,008 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$, Gerrow *et al.*, 2006) für NLG1/PSD-95-Transportkomplexe. Hingegen zeigen KIF17-Motorproteine im Komplex mit der NR2B-Untereinheit des NMDAR Geschwindigkeiten von $0,76 \mu\text{m/s}$ (Guillaud *et al.*, 2003). Das präsynaptische Gerüstprotein Bassoon wird zusammen mit Dynein mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von $0,67 \mu\text{m/s}$ und der an inhibitorischen Synapsen involvierte Gephyrin-Dynein-Transportkomplex mit einer Geschwindigkeit von $1,3 \mu\text{m/s}$ transportiert (Maas *et al.*, 2006, Fejtova *et al.*, 2009).

Die Ursache für die beobachteten Unterschiede bezüglich der Transportgeschwindigkeiten können auf eine Reihe von Parametern zurückgeführt werden: beispielsweise kann die Anzahl der involvierten Motoren an einem Transportkomplex variieren. Die Bindung mehrerer Motoren an ein *Cargo* kann zu einem längeren Transport entlang der Mikrotubuli führen, d.h. die Prozessivität eines Motors erhöhen (Vershinin *et al.*, 2007). Da für die Detektion von GFP als distinkten Punkt etwa 10-20 GFP-Moleküle in einem *Cluster* benötigt werden (Niswender *et al.*, 1995), könnten in den GFP-NLG1-Transportpartikeln mehr als 10 NLG-Moleküle vorhanden und dementsprechend mehrere Motorproteine gebunden sein. Andere Studien

berichten hingegen, dass multiple Kinesin 1-Motorproteine an ein Cargo binden können, dabei über die Anzahl der gebundenen Motorproteine aber nicht die Transporteigenschaften beeinflussen (Shubeita *et al.*, 2008). Zusätzlich können unterschiedliche Motorproteine an einen gemeinsamen Transportkomplex binden und um die Transportrichtung und Zytoskelett-affinität konkurrieren (*Tug-of-war*) oder sich in ihrer Prozessivität unterstützen (Kural *et al.*, 2005, Ali *et al.*, 2007, Ross *et al.*, 2008). Da die NLG-Bewegung nicht linear, sondern auch mit kurzen Unterbrechungen stattfindet, könnte dies auf eine kompetitive Bindung verschiedener Motorproteine hindeuten. Die Motoren werden außerdem über verschiedene andere Faktoren moduliert, um so den Nettotransport zu bestimmen. Motorproteine können etwa über ihren Phosphorylierungsstatus oder über die Assoziation mit zusätzlichen Faktoren in ihrer Aktivität reguliert werden (Mallik *et al.*, 2004). So kann die ATPase-Funktion von Kinesin 1 durch Phosphorylierung von Kinesin selbst oder von akzessorischen Proteinen reguliert werden (McIlvain *et al.*, 1994, Haimo *et al.*, 1995). Desweiteren wirkt das Protein Huntingtin je nach Phosphorylierungsstatus als regulatorischer Schalter für Kinesin- oder Dynein-vermittelten Transport (Colin *et al.*, 2008). Außerdem kann die Prozessivität von Dynein über einen assoziierten Multiproteinkomplex (Dynaktin) erhöht werden, der zusätzlich auch in der *Cargo*-Bindung involviert sein kann (Waterman-Storer *et al.*, 1997, Schroer *et al.*, 2004). Inwiefern Dynaktin an der Bindung der NLG1-Transportpartikel beteiligt ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Da schlussendlich auch die Affinität zwischen *Cargo* und Motorprotein, also die Zeit welche *Cargo* und Motorprotein miteinander assoziiert vorliegen, sowie Mikrotubuli-Bindeproteine wie Tau und posttranslationale Modifizierungen der Mikrotubuli-Bindeproteine und der Mikrotubuli selbst die Transportparameter beeinflussen, ergibt sich ein komplexes Bild der Regulation des Transports (Westermann *et al.*, 2003, Ikegami *et al.*, 2007, Hammond *et al.*, 2008, Dixit *et al.*, 2008, Maas *et al.*, 2009). Inwieweit Mikrotubuli-Bindeproteine und ihre posttranslationale Modifizierungen sowie posttranslationale Modifizierungen der Mikrotubuli den Transport von NLG beeinflussen, ist noch ungeklärt.

In Ausnahmen wurde nach der Expression von autofluoreszierenden Fusionsproteinen eine Multimerisierung des autofluoreszierenden Proteins und durch die Überexpression verursachte Sekundäreffekte beschrieben (Terry *et al.*, 1995). Zur weiteren Überprüfung der endogenen Interaktion zwischen NLG1 mit Dynein und KIF21B in intrazellulären Transportwegen wurden deshalb aus Gehirnextrakten mit Vesikeln angereicherte Fraktionen aufgereinigt und für Koimmunpräzipitationsexperimente eingesetzt (vgl. 2.2.2.6, 2.2.2.7, Saito *et al.*, 1997). Anhand dieser Immunpräzipitation konnte NLG1 zusammen mit dem bekannten PSD-95/Dynein intermediäre Kette (DIC)-Komplex kopräzipitiert werden (vgl. 3.1.2, AG Kneussel, ZMNH, persönliche Mitteilung). Da eine Immunpräzipitation aus Vesikeln angereicherten Gehirnextrakten von PSD-95-mutierten Tieren ebenfalls NLG1 kopräzipitierte, deutet diese Beobachtung darauf hin, dass die Funktion von PSD-95 entweder durch andere MAGUK-Proteine übernommen wird oder dieses Protein nicht essentiell im Transportkomplex mit NLG1 und DIC ist. In den PSD-95-mutierten Mäusen (Migaud *et al.*, 1998) sind die ersten beiden PDZ-Domänen noch funktionell, nur die dritte PDZ-Domäne, über welche NLG mit PSD-95 interagiert, fehlt (Irie *et al.*, 1997, Migaud *et al.*, 1998). Die

MAGUK-Proteinfamilie ist sehr homolog und beinhaltet drei charakteristische Domänen: drei PDZ-Domänen, eine SH3- und eine GK-Domäne (vgl. 1.5, Kim *et al.*, 2004). Da in den PSD-95-mutierten Mäusen nur die dritte PDZ-Domäne fehlt, könnte über eine Dimerisierung zwischen PSD-95 und beispielsweise SAP97 über die SH3-Domäne (Cai *et al.*, 2006) die Bindung von NLG1 an die dritte PDZ-Domäne von SAP97 stattfinden und somit NLG immer noch im Transportkomplex mit mutierten PSD-95/SAP97/DIC assoziiert vorliegen. Alternativ könnte eine Dimerisierung über die noch vorhandenen PDZ-Domänen vermittelt werden (Feng *et al.*, 2009) oder das mutierte PSD-95 im Transportkomplex mit DIC gegen ein anderes MAGUK-Protein ausgetauscht werden. Da eine DIC-Immünpräzipitation SAP97 kopräzipitierte (vgl. 3.1.3), könnte dies auf eine kompensatorische Rolle von SAP97 bezüglich des retrograden NLG1-Transportkomplexes deuten.

In HEK293-Zellen wurden zwei KIF21B-Fragmente hinsichtlich ihrer Interaktion mit NLG1 analysiert (vgl. 3.2.3). Sowohl das die *Neck*-Domäne umfassende EGFP-KIF21B(387-1212)-Fusionsprotein als auch das einen Teil der *Neck*-Domäne und die gesamte *Tail*-Domäne beinhaltende EGFP-KIF21B(1211-1640)-Fusionsprotein konnten NLG1 in Immunpräzipitationen kopräzipitieren. Dies könnte auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. Einmal könnte die Bindung von NLG1 an KIF21B über zusätzliche Proteine geschehen, welche KIF21B an mehreren Punkten über eine *Neck*- und *Tail*-Assoziation binden. Dergleiche Mechanismus könnte auch durch eine direkte Interaktion von NLG angewendet werden. Zusätzlich könnten sich die Fusionsproteine in ihrer Faltung von der Struktur des vollständigen Proteins *in vivo* unterscheiden und beispielsweise eine Konformation annehmen, welche der *in vivo* ähnelt, wobei die Bindungsstelle aber nicht mit der *in vivo* übereinstimmt. Weitere Analysen bezüglich der genauen Bindungsstelle zwischen NLG1 und KIF21B sind zur Klärung dieser Annahme notwendig.

Durch Immunpräzipitationen aus Vesikeln angereicherten Fraktionen von Gehirnexttrakten (Saito *et al.*, 1997) konnte weiterhin die spezifische Interaktion von NLG1, aber nicht NLG3, mit KIF21B gezeigt werden. KIF5 kopräzipitierte weder mit NLG1 noch mit KIF21B und diente somit als Spezifitätskontrolle der Interaktion (vgl. 3.2.2). Im Gegensatz zum retrograden NLG1-Transportkomplex, konnte im anterograden Transportkomplex keine Koimmunpräzipitation zwischen KIF21B und PSD-95 festgestellt werden. Dies stimmt mit den *Time-lapse* Videomikroskopiedaten von Barrow *et al.* überein, welche zeigen, dass PSD-95-Cluster im Gegensatz zu einer anderen Studie von Gerrow *et al.* NLG1-unabhängig und später als NLG1 zu entstehenden Synapsen anterograd transportiert werden (s.o., Gerrow *et al.*, 2006, Barrow *et al.*, 2009). Weiterhin zeigen Dresbach *et al.*, dass NLG1 unabhängig von PSD-95 zur Synapse transportiert wird (Dresbach *et al.*, 2004).

Somit konnten die durch immunzytochemische Experimente sowie durch *Time-lapse* Videomikroskopie gewonnenen Daten bezüglich eines retrograden NLG1/PSD-95/Dynein-Transportkomplexes und eines anterograden NLG1/KIF21B-Transportkomplexes durch Immunpräzipitationsexperimente bestätigt werden. Je nach Transportrichtung könnte es sich dabei um zwei distinkte Transportkomplexe handeln, welche sich durch die An- oder

Abwesenheit von PSD-95 unterscheiden. Die Anwesenheit und/oder Regulation durch andere Proteine ist aber nicht ausgeschlossen und müsste weiter analysiert werden.

Im Gegensatz zu distalen Dendriten besitzen die Mikrotubuli in proximalen Dendriten eine gemischte Polarität hinsichtlich der Ausrichtung ihrer Plus- und Minus-Enden (vgl. 1.6, Baas *et al.*, 1988). Eine potentielle Funktion des Dynein-vermittelten Transports von NLG1/PSD-95-Komplexen könnte demnach in proximalen Dendriten der Transport in anterograde Richtung sein. Der Kcotransport von NLG1 mit Dynein ist ausschließlich in retrograde Richtung beobachtet worden (vgl. 3.1.6), wodurch sich die eben genannte Möglichkeit ausschließt.

Motorproteine können entweder direkt oder indirekt über verschiedene akzessorische Proteine (Adaptoren) an ihr *Cargo* binden. In eukaryotischen Zellen werden 14 Kinesin-Familien mit 45 Mitgliedern, aber nur zwei zytoplasmatische Dyneine, als Motoren entlang von Mikrotubuli genutzt. Im Menschen sind 40 Myosin-Gene beschrieben, welche in 12 Klassen unterteilt werden und verschiedene *Cargoes* entlang des Aktinzytoskeletts transportieren. Nicht alle Kinesine oder Myosine werden in allen Zelltypen exprimiert. Als retrograde Motoren dienen Dyneine und die C-Kinesine sowie entlang des Aktinzytoskeletts Myosin VI (Bridgman *et al.*, 2003, Hirokawa *et al.*, 2005). Damit stehen dem retrograden im Vergleich zum anterograden Transport weniger Motoren zur Verfügung. Aber selbst für den anterograden Transport sind die existierenden Motorproteine nicht ausreichend, um die Zelle spezifisch mit ihren benötigten Komponenten zu versorgen. Durch den Einsatz von Adaptorproteinen, welche zwischen dem Motor und dem *Cargo* positioniert sind, können die Möglichkeiten der spezifischen Motor-*Cargo*-Interaktion erweitert werden (Hirokawa *et al.*, 2005, Kneussel *et al.*, 2005). Zusätzlich können die Motoren durch die Adaptoren hinsichtlich ihrer Direktion in der Zelle beeinflusst werden. So vermitteln JIP-Proteine (*c-jun N-terminal kinase (JNK)-interacting proteins*) über die Interaktion mit der KLC (*Kinesin light chain*) die axonale Lokalisation von KIF5, während die Bindung zwischen der C-terminalen *Tail*-Domäne und GRIP1 (*Glutamat receptor interacting protein 1*) KIF5 in Dendriten dirigiert (Verhey *et al.*, 2001, Setou *et al.*, 2002). PSD-95 könnte im retrograden NLG1-Transportkomplex eine Adaptorfunktion übernehmen und somit die Spezifität vermitteln. Ein anderes synaptisches Protein, welches retrograd mittels eines Adaptors transportiert wird, ist der an inhibitorischen Synapsen vorliegende Glyzinrezeptor, welcher mit dem Gerüstprotein Gephyrin als Adaptor in einem Komplex mit Dynein mobilisiert wird (Maas *et al.*, 2006). Die Rolle der Adaptoren kann demnach neben Transportfunktionen auch in Gerüst- und Verankerungsfunktionen des Transportguts liegen. Das präsynaptische Gerüstprotein Bassoon wird hingegen ohne eine Adaptorvermittlung direkt an Dynein gebunden und transportiert (Fejtova *et al.*, 2009).

Der anterograde Transport synaptischer Proteine kann ebenso mit und ohne Adaptoren vermittelt werden. So ist etwa der NMDAR in einem Komplex von mLin10, mLin2, mLin7 und KIF17 sowie der AMPAR in einem Komplex mit GRIP1 und KIF5 beschrieben (Setou *et al.*, 2000, Setou *et al.*, 2002). Eine inhibierte Interaktion zwischen KIF5 und GRIP1 verhindert den Transport des postsynaptischen EphB2 (Ephrin B receptor 2). Außerdem

bindet das präsynaptische Protein SNAP25 (*Synaptosome-associated protein of 25 kDa*) direkt an KIF5 (Diefenbach *et al.*, 2002). Der Transport des prä- und postsynaptischen Zelladhäsionsmoleküls N-Cadherin (*Neuronal Cadherin*) kann beispielsweise durch KIF3 oder in einem GRIP1/KIF5-Transportkomplex mobilisiert werden (Teng *et al.*, 2005, Schurek, 2006). Diese Vielfalt an Beispielen in Neuronen verdeutlicht die Möglichkeiten zur Spezifitätsvermittlung bezüglich des retrograden und anterograden Transports und unterstützt die Annahme, dass PSD-95 neben seiner Funktion der NLG1-Verankerung und der Vermittlung der Kommunikation mit anderen Proteinen in der postsynaptischen Dichte auch als Adaptor die retrograde Mobilisierung von NLG1 reguliert.

4.3 Einfluss der Motorinhibition auf NLG1

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss eines inhibierten NLG1-Transportkomplexes hinsichtlich der NLG1 Lokalisation und der synaptischen Funktion analysiert, um so den identifizierten anterograden NLG1/KIF21B-Transportkomplex sowie den retrograden NLG1/PSD-95/DIC-Transportkomplex funktionell zu charakterisieren.

In HEK293-Zellen, welche durch Transfektion NLG1 und dominant-negative KIF21B-Fragmente exprimierten, konnte eine verringerte Oberflächenlokalisation von NLG1 festgestellt werden, wobei das einen Teil der *Neck*-Domäne und die gesamte *Tail*-Domäne umfassende KIF21B-Fragment die NLG1-Lokalisation an der Plasmamembran stärker reduzierte als das die *Neck*-Domäne beinhaltende KIF21B-Fragment (vgl. 3.2.4). Eine Inhibition der KIF21B-Expression in kultivierten hippokampalen Neuronen mit Hilfe der *antisense*-Technologie reduzierte die NLG1-Lokalisation (vgl. 3.2.6) ebenfalls. Diese Daten deuten daraufhin, dass NLG1 durch einen KIF21B vermittelten Transportprozess zur Plasmamembran geliefert wird, um dort in der Synapse verankert zu werden und einen transsynaptischen Komplex mit dem präsynaptischen Neurexin auszubilden. Es existieren verschiedene Möglichkeiten ein transmembranes Protein wie NLG für die korrekte Funktion des Proteins in der Synapse zu verankern. Einmal könnte die Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix oder mit präsynaptischen Bindepartnern, im Fall von NLG das präsynaptische NRX, NLG immobilisieren. Zweitens könnte die Zusammensetzung der Plasmamembran durch eine spezifische Lipid- oder Proteinkomposition, wie etwa in *Lipid rafts* (Simons *et al.*, 1997), die Konzentration von NLG regulieren. Schlussendlich könnte die Verankerung durch die Bindung mit intrazellulären Gerüstproteinen und deren Bindung an das Zytoskelett sowie durch eine direkte Bindung des Transmembranproteins an das Zytoskelett zur Konzentration und einer eingeschränkten lateralen Diffusion des Proteins an der Synapse beitragen (Choquet *et al.*, 2003). Da NLG an PSD-95 bindet, könnte diese Interaktion zur Verankerung von NLG an der Synapse führen, nachdem es dorthin transportiert wurde. Ist der anterograde Transport gestört, wird die synaptische Plasmamembran mit weniger NLG versorgt, wie dies in den oben genannten Experimenten zu beobachten war.

Zusätzlich zum NLG1-Transport entlang von Mikrotubuli besteht die Möglichkeit eines anterograden NLG1-Transports durch Myosin-Motorproteine entlang von Aktin-

zytoskelettstrukturen. Das Aktinzytoskelett bildet unter der Plasmamembran, dem sogenannten Zellkortex, und in dendritischen *Spines* die hauptsächliche Zytoskelettstruktur und vermittelt im Vergleich zum Mikrotubuli-basierten Transport den Transport über Kurzstrecken (Goode *et al.*, 2000, Bridgman *et al.*, 2003). Für die NLG1-Lokalisation an Synapsen bzw. in *Spines* könnte ein Motorwechsel des NLG1-Transportguts unterhalb der *Spines* von Mikrotubuli auf Aktinfilamente stattfinden, um so den weiteren Kurzstreckentransport in dieses Kompartiment zu gewährleisten. Ein Beispiel für eine solche Koordination und Kooperation verschiedener Motorproteine konnte etwa durch die Interaktion zwischen Myosin Va und Kinesin bestätigt werden (Huang *et al.*, 1999, Bridgman *et al.*, 2003). Der Motorwechsel von NLG1-*Cargoes* könnte beispielsweise über die Interaktion mit dem aus Hrs/Actinin-4/BERP/Myosin V bestehenden CART (*cytoskeleton-associated recycling or transport*)-Proteinkomplex vermittelt werden. Dieser Komplex ist in Rezeptor-Recycling-Prozessen zur Plasmamembran involviert und könnte somit NLG1-*Cargoes* entlang von Aktinfilamenten durch das anterograde Motorprotein Myosin V transportieren (El-Husseini *et al.*, 1999, El-Husseini *et al.*, 2000, Yan *et al.*, 2005). Alternativ könnte NLG1 unterhalb des *Spines* exozytiert werden, um dann lateral in den *Spine* zu diffundieren oder aber durch die Interaktion mit dem PSD-95/GKAP/DLC/Myosin V-Komplex entlang von Aktinfilamenten transportiert zu werden (Naisbitt *et al.*, 2000). Die Dynein leichte Kette (DLC) ist eine Untereinheit sowohl des Dynein-Motorkomplexes als auch eine Untereinheit von Myosin V (Espindola *et al.*, 2000, Hodi *et al.*, 2006). Der retrograde NLG1-Transport entlang von Aktinfilamenten könnte eventuell über das retrograde Motorprotein Myosin VI vermittelt werden. Der Transport von NLG1 entlang von Aktinfilamenten durch die oben genannten Komplexe bedarf noch weiterer Analysen.

Ein funktioneller Komplex bestehend aus NLG1, PSD-95 und Dynein ist für die Internalisierung von NLG1 essentiell. Dies konnte mit Hilfe von Analysen zur Internalisierung von NLG1 in HEK293-Zellen und in kultivierten hippocampalen Neuronen demonstriert werden (vgl. 3.1.4). Unter basalen Bedingungen konnte innerhalb von ein bis zwei Stunden die Internalisierung von NLG1 beobachtet werden. Die Inhibition von Dynein-basierten Transportprozessen mit Hilfe der Dynamitin-Überexpression, führte zu einer drastischen Reduktion der NLG1-Internalisierung. Wurde die Interaktion zwischen NLG1 und PSD-95 durch die Überexpression eines dominant-negativen Peptids, welches die Bindungsstelle zwischen NLG1 und PSD-95 umfasst (3. PDZ-Domäne von PSD-95), oder durch die Überexpression einer NLG1-Mutante ohne PDZ-Bindedomäne gestört, konnte eine Reduktion der NLG1-Internalisierung, d.h. ein Anstieg in der Plasmamembranlokalisation von NLG1, beobachtet werden. Da NLG1 in HEK293-Zellen auch ohne die gleichzeitige Expression von PSD-95 internalisiert wurde, ist anzunehmen, dass endogene PDZ-Domänen enthaltende Proteine die Funktion von PSD-95 übernehmen können. In einem *Yeast-2-hybrid Screen* konnten 13 verschiedene synaptische Proteine identifiziert werden, welche an das PDZ-Bindemotif von NLG1 binden konnten (Meyer *et al.*, 2004). Unter diesen Proteinen waren u.a. weitere MAGUK-Familienmitglieder wie SAP102 oder PSD-93, andere Gerüstproteine wie Shank 1 und 3, sowie kleine GTPase aktivierende Proteine (GAP), wobei letztere auch in HEK293-Zellen vorhanden sind. Die Anzahl dieser vielfältigen potentiellen

Interaktoren mit dem NLG1-PDZ-Bindemotif geben einen Hinweis für eventuelle kompensatorische Proteininteraktionen in HEK293-Zellen, welche diverse PDZ-Domänen enthaltende Proteine exprimieren (Abb. 3.8).

Ein funktioneller Transport durch Dynein ist für die Synapsenzahl und Synapsenmorphologie von Bedeutung. In immunzytochemischen Analysen hippokampaler Neurone, deren Dynein-Transport durch eine Dynamitin-Überexpression inhibiert war, konnte eine reduzierte exzitatorische Synapsenzahl beobachtet werden (vgl. 3.1.9). Dies wurde in ultrastrukturellen Untersuchungen von transgenen Tieren, welche Dynamitin überexprimieren (LaMonte *et al.*, 2002), sowie in immunhistochemischen Analysen dieser Tiere bestätigt (vgl. 3.1.7, AG Kneussel, ZMNH, persönliche Kommunikation). Weitere ultrastrukturelle Analysen dieser Mauslinie ergaben vergrößerte *Spines*, welche sich durch eine vergrößerte Länge der postsynaptischen Dichte sowie durch einen Anstieg in der *Spine*-Kopfgröße auszeichneten (vgl. 3.1.8). Aufgereinigte postsynaptische Dichten (PSD) der Dynamitin-überexprimierenden Mäuse zeigten weiterhin eine Anreicherung von PSD-95 und NLG (Behrend, 2006). Durch den inhibierten Dynein-Transport werden demnach synaptische Proteine wie NLG und PSD-95 angereichert und nicht mehr abtransportiert, was in einer Vergrößerung der *Spines* resultiert. Dies stimmt mit Beobachtungen von Nikonenko *et al.* überein. Hierbei ergaben ultrastrukturelle Analysen vergrößerte *Spines*, d.h. einen Anstieg hinsichtlich des *Spine*-Volumens und der PSD-Länge aufgrund einer PSD-95-Überexpression (Nikonenko *et al.*, 2008). Nikonenko *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass die vergrößerten *Spines* bis zu sieben präsynaptische Endigungen kontaktierten und dass trotz dieser Beobachtung eine Reduktion der *Spine*-Dichte zu erkennen war, womit die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Reduktion der exzitatorischen Synapsenzahl bei einer gleichzeitigen *Spine*-Vergrößerung unterstützt wird. Weiterhin konnte eine erhöhte *Spine*-Kopfgröße in transgenen, NLG1 überexprimierenden Mäusen gezeigt werden, wobei in dieser Studie allerdings die PSD-Länge unverändert vorlag (Dahlhaus *et al.*, 2009). Ein funktionierender retrograder Transport von NLG1/PSD-95 durch Dynein ist demnach für die Regulation der Synapsengröße und Synapsenzahl mit verantwortlich.

Die elektrophysiologische Registrierung von Membranströmen in Dynamitin überexprimierenden, kultivierten hippokampalen Neuronen zeigte eine Reduktion der mEPSC (*miniature excitatory postsynaptic current*)-Amplitude und mEPSC-Frequenz (vgl. 3.1.10). Die durch die Inhibition von Dynein-Transportprozessen reduzierte synaptische Transmission unterstützt die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete reduzierte Synapsenzahl, kontrastiert hingegen mit den vergrößerten *Spines*, da angenommen wird, dass eine vergrößerte PSD durch eine erhöhte Anzahl von Glutamatrezeptoren die synaptische Transmission stärkt (Harris *et al.*, 1989, Nusser *et al.*, 1998, Knott *et al.*, 2006, Knott *et al.*, 2008). Die Überexpression von PSD-95 oder NLG1 allein führte zu einer verstärkten Glutamatrezeptor-Aktivität (El-Husseini *et al.*, 2000, Chubykin *et al.*, 2007). Der Effekt auf die synaptische Transmission bei gleichzeitiger Überexpression von PSD-95 und NLG1 wurde allerdings noch nicht analysiert. Eventuell liegen die Glutamatrezeptoren in der PSD von Dynamitin überexprimierenden Tieren höher konzentriert vor, sind aber nicht funktional. Da eine Überexpression von NLG1 und PSD-95 retrograd die präsynaptische Neurotransmitter-

ausschüttung erhöht, könnten weiterhin sekundäre homeostatische Mechanismen aktiviert werden, um einer Exzitotoxizität entgegen zu wirken (Turrigiano *et al.*, 2004, Futai *et al.*, 2007). Diese Annahme wurde durch Beobachtungen in den Dynamitin überexprimierenden Tieren unterstützt, welche keine Anzeichen von Exzitotoxizität im Gehirn zeigen (LaMonte *et al.*, 2002). Anscheinend ist der Verlust der Synapsen dominant in der Wirkung gegenüber der beobachteten *Spine*-Vergrößerung, da die elektrophysiologischen Ergebnisse eine Reduktion der synaptischen Transmission erkennen ließen.

4.4 Einfluss von synaptischer Aktivität auf den NLG-Transport

Synaptische Proteine werden durch neuronale Aktivität in ihrer Konzentration, Modifizierung, Verankerung und damit in ihrer Funktion, Lokalisation und Mobilität reguliert, um so auf veränderte Umwelteinflüsse reagieren zu können (Neves *et al.*, 2008, Derkach *et al.*, 2007, Lau *et al.*, 2007, Kennedy *et al.*, 2006). Eine aktivitätsabhängige Veränderung in der Stärke der synaptischen Transmission wird als synaptische Plastizität bezeichnet. Hierbei kann die veränderte synaptische Transmission entweder zu einer langanhaltenden Potenzierung oder Depression der jeweiligen Synapse führen (vgl. 1.3, LTP, LTD). Diese Möglichkeiten der Plastizität werden als Grundlage für Lern- und Gedächtnisleistungen diskutiert (Bliss *et al.*, 1973, Feldman *et al.*, 2009). Da NLG durch seine Lokalisation und Funktion an der Synapse ein interessanter Kandidat für die Umsetzung dieser plastischen Veränderungen ist, wurde die Regulation von NLG und dessen Transport in weiteren Experimenten analysiert.

Die chemische Induktion von LTP in hippokampalen Primärkulturen führte zu einer erhöhten NLG-Anreicherung in der Plasmamembran (vgl. 3.3.3, Otmakhov *et al.*, 2003). Zur Überprüfung der NLG-Anreicherung hinsichtlich der synaptischen Lokalisation wurden Synaptosomen von kultivierten kortikalen Neuronen nach einer LTP-Induktion aufgereinigt und bezüglich der Konzentration von NLG und anderen synaptischen Proteinen an synaptischen Membranen analysiert. Hierbei zeigte sich eine durch die LTP-Induktion hervorgerufene Zunahme von PSD-95 und NLG in synaptischen Membranen. Die analysierten präsynaptischen Proteine schienen nicht betroffen (vgl. 3.3.3). Der beobachtete Anstieg von PSD-95 stimmt mit anderen Studien überein, welche PSD-95 eine Rolle in der Vermittlung und Regulation der synaptischen Stärke zusprechen. So wird die Expression von PSD-95 durch neuronale Depolarisierung hochreguliert. Weiterhin wird während der Langzeitpotenzierung u.a. die AMPAR-Insertion in die Plasmamembran und AMPAR-abhängige mEPSCs durch eine PSD-95 Überexpression hochreguliert (El-Husseini *et al.*, 2002, Ehrlich *et al.*, 2004, Bao *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2007). Zusätzlich zu dieser Funktion kann PSD-95 im Komplex mit NLG1 retrograd die Neurotransmitterausschüttung erhöhen und dadurch in Plastizitätsprozessen mitwirken (Futai *et al.*, 2007). Dies deutet ebenso auf eine Rolle von NLG während der synaptischen Potenzierung hin. Eine Überexpression von NLG1 erhöht die Anzahl exzitatorischer Synapsen und führt zu einem Anstieg der exzitatorischen mEPSCs über CaMKII (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*)-abhängige Signalwege, welche in der späten Phase der LTP-Expression involviert sind (Prange *et al.*, 2004, Malenka *et al.*, 2004, Chih *et al.*, 2005, Chubykin *et al.*, 2007, Lee *et al.*,

2009). Außerdem konnte in der Amygdala gezeigt werden, dass eine akute Inhibition der NLG1-Expression NMDAR-Ströme reduziert und die Ausbildung von LTP sowie die Speicherung von Erinnerungen bezüglich der assoziativen Angst unterdrückt (Kim *et al.*, 2008).

Da NLG1 durch KIF21B transportiert wird (vgl. 3.2), wurde der Einfluss der synaptischen Potenzierung auf den NLG1/KIF21B-Transport analysiert. Die chemische LTP-Induktion bei gleichzeitiger inhibierter KIF21B-Expression in hippocampalen Primärkulturen ergab im Gegensatz zu Kontrollzellen keine erhöhte Lokalisation von NLG in der Plasmamembran. Der Anstieg von synaptischen NLG nach einer synaptischen Potenzierung wird demnach durch den anterograden Transport von NLG mit dem Mikrotubuli-Motor KIF21B reguliert.

Für weitere Untersuchungen bezüglich der Rolle von NLG bei synaptischen Plastizitätsprozessen wurde LTD chemisch mit Hilfe des mGluR-Agonisten DHPG ((RS)-3,5-Dihydroxyphenylglyzin) in hippocampalen Primärkulturen induziert (vgl. 3.3.1, Palmer *et al.*, 1997, Huber *et al.*, 2001, Snyder *et al.*, 2001). Die Schwächung der synaptischen Transmission ergab eine reduzierte Lokalisation von NLG1 in der Plasmamembran und eine erhöhte Mobilität von NLG1. Letzteres konnte mit Hilfe von *Time-lapse* Studien nach der DHPG-Behandlung ermittelt werden (vgl. 3.3.1). Im Gegensatz dazu wird ein anderes Zelladhäsionsmolekül, N-Cadherin, durch eine LTD-Induktion über NMDAR in der Plasmamembran akkumuliert, während AMPAR verstärkt internalisiert werden (Tai *et al.*, 2007). Ob dieser Unterschied durch eine Aktivierung verschiedener Signalwege (mGluR-LTD \Leftrightarrow NMDAR-LTD), welche sich nicht in ihrem Effekt in Bezug auf AMPAR unterscheiden, zu erklären ist, muss geprüft werden.

Die durch DHPG-induzierte erhöhte NLG1-Internalisierung lässt auf einen Dynein-abhängigen Transport schließen, da gezeigt werden konnte, dass Dynein für die Internalisierung von NLG1 und für den Transport von NLG1 aus dem *Spine* notwendig ist (vgl. 3.1.4, 3.1.6). Dies konnte durch weitere Analysen hinsichtlich der Mikrotubuli-abhängigkeit bestätigt werden (vgl. 3.3.2). Hierfür wurden die Mikrotubuli während oder nach der chemischen LTD-Induktion depolymerisiert und die NLG1-Lokalisation in der Plasmamembran beobachtet (vgl. 3.3.2). Die Depolymerisation der Mikrotubuli bei einer gleichzeitigen LTD-Induktion zeigte keinen Rückgang der NLG1-Lokalisation in der Plasmamembran. Durch diese Behandlung konnte keine Dynein-abhängige Internalisierung von NLG1 mehr stattfinden, da die Mikrotubuli depolymerisiert waren.

Neben Dynein ist die NLG1-Internalisierung durch PSD-95 reguliert (vgl. 3.1.4.). Demnach könnte PSD-95 ebenfalls in der aktivitätsabhängigen retrograden Mobilisierung von NLG1 involviert sein. Da NLG1/PSD-95/Dynein-Komplexe retrograd transportiert werden (vgl. 3.1), könnte sich dieser Komplex schon direkt an der Synapse ausbilden und die Internalisierung von NLG1 vermitteln. Als Antwort auf LTD-induzierende Stimuli ist PSD-95 mit Endozytoseprozessen von AMPAR involviert (Kim *et al.*, 2007, Xu *et al.*, 2008). Eventuell übernimmt PSD-95 eine ähnliche Funktion hinsichtlich der NLG-Internalisierung.

Die Aktinfilamente bilden in der Prä- und Postsynapse die hauptsächliche Zytoskelettstruktur und sind mit der strukturellen Plastizität an Synapsen, etwa mit dem *Spine*-Wachstum nach

einer LTP-Induktion assoziiert (vgl. 1.3, Alvarez *et al.*, 2007). Sowohl das Aktin-Motorprotein Myosin Va als auch Myosin Vb sind mit dem Ca^{2+} -abhängigen Transport von AMPAR in Recycling-Endosomen zu Synapsen und mit dem Anstieg der AMPAR-Konzentration in der synaptischen Plasmamembran während der synaptischen Potenzierung in Verbindung gebracht worden (Park *et al.*, 2004, Correia *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2008). Eventuell können diese Motoren ebenfalls NLG1-enthaltende Vesikel durch einen Motorwechsel (s.o.) als Antwort auf LTP-induzierende Stimuli transportieren. Alternativ könnte dieser Transport aber unabhängig vom Aktinfilament erfolgen, da gezeigt werden konnte, dass Mikrotubuli in *Spines* lokalisiert werden, wobei diese Lokalisation in *Spines* durch neuronale Aktivität verstärkt wurde und eine pharmakologische Zerstörung der dynamischen Mikrotubuli die Ausbildung von LTP verschlechterte (Hu *et al.*, 2008, Jaworski *et al.*, 2009). Weiterhin zeigten diese Studien, dass Proteine, welche am Plus-Ende der Mikrotubuli binden, mit Aktin-Bindeproteinen interagieren und dadurch die Aktinfilamente regulieren (Jaworski *et al.*, 2009). Das Eindringen der Mikrotubuli in *Spines* könnte die Versorgung dieses Kompartiments mit Organellen, Proteinen und mRNAs vereinfachen. Diese Möglichkeit des NLG-Transports wird unterstützt durch Proteomanalysen von aufgereinigten Synaptosomen, welche u.a. Kinesin, Dynein und Dynaktin in den Synaptosomen identifizieren konnten (Schrimpf *et al.*, 2005). Das Vorhandensein der Mikrotubuli-Motorproteine an Synapsen lässt einen NLG1-Transportmechanismus ohne Motorwechsel vermuten.

Die neuronale Aktivität beeinflusst ebenfalls Mikrotubuli-Motoren wie Dynein, welches bei einer Depolarisierung der Zelle in seiner Mobilität reduziert wird (Lardong *et al.*, 2009). Der anterograde Mikrotubuli-Motor KIF17 wird aktivitätsabhängig durch CaMKII phosphoryliert, wodurch das *Cargo* entladen wird (Guillaud *et al.*, 2007). Aktivitätsabhängige Modifizierungen können demnach u.a. auf der Motor-Ebene stattfinden, um so spezifisch die Zelle mit benötigten Komponenten zu versorgen. Inwiefern NLG1-Transportkomplexe durch neuronale Aktivität modifiziert werden, bedarf weiterer Analysen. Ein mögliches Szenario wäre der vermehrte aktivitätsabhängige NLG1-Transport entlang der Mikrotubuli in *Spines* hinein, wo NLG1 durch seine Fähigkeiten, andere synaptische Proteine zu rekrutieren, zu der Ausbildung der strukturellen Plastizität beiträgt und somit in Lernprozesse involviert ist (Graf *et al.*, 2004, Chih *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2008). Ebenso könnte ein vermehrter Transport aus *Spines* entlang der Mikrotubuli als Antwort auf LTD-induzierende Stimuli auftreten. Eine erhöhte Mobilität konnte beispielsweise im Transport des Adaptor- und Gerüstproteins Gephyrin als Antwort auf eine erhöhte neuronale Aktivität festgestellt werden (Maas *et al.*, 2006). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf eine dynamische Rolle des NLG1-Transports durch Mikrotubuli-Motoren bei der Ausbildung von LTD und LTP hin.

4.5 Funktion des NLG-Transports

Dem NLG1-Transport können diverse mögliche Funktionen zugeschrieben werden. Der anterograde Transport dient möglicherweise primär der Versorgung von bestehenden Synapsen mit NLG1 im Rahmen eines normalen Protein-*Turnovers* oder in einer vermehrten Versorgung aufgrund der Synapsenvergrößerung und Synapsenneubildung während der synaptischen Potenzierung. Während der Synaptogenese könnte der NLG1-Transport für die Ausbildung von neuen Synapsen an spezifischen Orten des Neurons dienen. Hierfür sprechen die *in vitro* synaptogenetischen Daten sowie der frühe beobachtete Transport von NLG1 im Komplex mit NMDAR (Scheiffele *et al.*, 2000, Barrow *et al.*, 2009).

Die Bildung von Synapsen in Vertebraten beginnt im Embryo und dauert bis ins adulte Alter an, wo die Neubildung von Synapsen mit Lern- und Gedächtnisprozessen assoziiert ist (Waites *et al.*, 2005). Während der Entwicklung ist die Synapsenbildung genau mit der Differenzierung der Neuronen gekoppelt und wird durch diverse Signalwege reguliert. Es lassen sich distinkte Schritte unterscheiden wie: 1.) initiale Kontaktausbildung zwischen Prä- und Postsynapse, 2.) Induktion der Prä- und Postsynapse durch die Rekrutierung von synaptischen Proteinen, 3.) Stabilisierung und Reifung des synaptischen Kontakts und 4.) Eliminierung von Synapsen. Einige Studien zeigen, dass die präsynaptische Differenzierung der Induktion der Postsynapse voranschreitet (Friedman *et al.*, 2000, Bresler *et al.*, 2001), jedoch lassen andere Studien postsynaptische Akkumulationen vor präsynaptischen Proteinrekrutierungen erkennen (Washbourne *et al.*, 2002). Demnach wird die zeitliche Abfolge noch kontrovers diskutiert, wobei auch ein paralleler Verlauf möglich wäre (Garner *et al.*, 2006).

Die im Rahmen dieser Arbeit an DIV14 und bei Gerrow *et al.* an DIV6 beobachtete geringere NLG1-Mobilität im Vergleich zu einer an DIV4 beobachteten höheren Mobilität (Gerrow *et al.*, 2006, Barrow *et al.*, 2009) könnte als ein Zeichen für eine vermehrte Synaptogenese an Orten mit immobilen NLG1-Partikeln interpretiert werden. Da Gerrow *et al.* an stationären NLG1-Partikeln innerhalb einer Stunde Synaptophysin-positive axonale Vesikel beobachten konnten, wird diese Vermutung bezüglich der synaptogenetische Eigenschaft von NLG1 unterstützt (Scheiffele *et al.*, 2000, Gerrow *et al.*, 2006). *In vivo* Daten von NLG1-3 defizienten Tieren deuten hingegen aufgrund einer unveränderten Synapsenmorphologie und Synapsenzahl auf NLG-Funktionen, welche sich auf die synaptische Reifung und Spezialisierung konzentrieren (Varoqueaux *et al.*, 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass NLG1 zu einem späteren Zeitpunkt, bei dem die Synapsenbildung relativ weit fortgeschritten ist, dynamisch ist, und zusätzlich einer Regulation während der synaptischen Potenzierung oder Depression unterliegt, wodurch es Funktionen hinsichtlich der Synapsenreifung und -spezialisierung übernehmen könnte.

Der durch KIF21B-vermittelte NLG1 Transport könnte dem Mechanismus anderer transmembraner synaptischer Proteine folgen, welche vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert werden, wo sie exozytiert werden. Dabei ist der genaue Ort der Exozytose nicht klar. Die transmembranen Proteine könnten extrasynaptisch exozytiert

werden und dann lateral in die Synapse hineindiffundieren, wo sie durch Interaktionen mit Zytoskelettstrukturen, Gerüstproteinen und der extrazellulären Matrix verankert werden, aber gleichzeitig einem kontinuierlichen Zyklus von Insertion und Entfernung aus der Synapse unterliegen (Choquet *et al.*, 2003, Kennedy *et al.*, 2006). Transmembrane Proteine können aus der Synapse entfernt werden, indem sie an perisynaptischen Orten endozytiert werden, um im Lysosom degradiert zu werden. Alternativ können diese Proteine in Recycling-Endosomen unterhalb der Plasmamembran lagern, um so schnell die Synapse mit Material zu versorgen als Antwort auf distinkte physiologische Stimuli. So können Recycling-Endosomen mit AMPAR über Myosin V entlang des Aktinfilaments in *Spines* während der synaptischen Potenzierung transportiert werden (Park *et al.*, 2004, Correia *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2008). Da NLG durch LTP-induzierende Stimuli schnell vermehrt in die synaptische Membran inseriert werden konnte (vgl. 3.3.3), lässt dies auf ein Vorhandensein in Recycling-Endosomen schließen. Eine lokale Proteinsynthese, ein schnellerer Transport entlang von Mikrotubuli oder die NLG1-Rekrutierung von anderen nicht potenzierten Synapsen ist aber nicht ausgeschlossen. Hierbei könnte NLG durch KIF21B in die *Spines* entlang von Mikrotubuli, welche aktivitätsabhängig in den *Spines* lokalisiert sind, transportiert werden (Hu *et al.*, 2008, Jaworski *et al.*, 2009). Alternativ könnte dieser Transport über einen Motorwechsel auf beispielsweise Myosin V, einem Aktinfilament-abhängigen Motorprotein, vermittelt werden (s.o.).

Die Endozytose von synaptischen Transmembranproteinen ist auf endozytotischen Zonen im *Spine*-Kopf lokalisiert, welche neben der postsynaptischen Dichte lokalisiert sind (Blanpied *et al.*, 2002, Racz *et al.*, 2004, Kennedy *et al.*, 2006). Internalisierte Vesikel werden als erstes zum frühen Endosom transportiert, wo sie sortiert werden. Vesikel mit endozytierten Proteinen können nun entweder in Recycling-Endosomen oder in späte Endosomen transportiert werden. *Cargoes*, welche für die Degradation bestimmt sind, fusionieren anschließend mit Lysosomen (Soldati *et al.*, 2006). Verschiedene Motorproteine sind an diesen Transportprozessen beteiligt. Das retrograde Motorprotein Myosin VI transportiert beispielsweise Vesikel mit endozytierten AMPAR zum frühen Endosom (Osterweil *et al.*, 2005, Soldati *et al.*, 2006). Inwiefern NLG über Myosin VI zum frühen Endosom transportiert wird, müssen weitere Analysen zeigen. Die Beteiligung von Dyneinen während des zweiten Transportschrittes zwischen frühen Endosom und spätem bzw. Recycling-Endosom ist bereits beschrieben (Driskell *et al.*, 2007, Traer *et al.*, 2007, Soldati *et al.*, 2006). Auf dem Weg vom frühen Endosom zum Recycling-Endosom ist Dynein über die Bindung der Dynein leichten Kette (DLC) an das WW-Domänen enthaltende Protein KIBRA und SNX4 (*Sorting nexin 4*) assoziiert (Traer *et al.*, 2007). Die Familie der SNX-Proteine ist mit dem Transport und der Sortierung von Endosomen assoziiert (Griffin *et al.*, 2005, Traer *et al.*, 2007). Da der retrograde Transportkomplex bestehend aus NLG1, PSD-95 und Dynein Intermediäre Kette (DIC) mit SNX4 in gemeinsamen Fraktionen einer Saccharosedichtegradientenzentrifugation angereichert vorlag (vgl. 3.1.1), könnte dies ein Hinweis auf eine Lokalisation dieses Transportkomplexes in Recycling-Endosomen sein. Außerdem konnte NLG1 Dynein- und PSD-95-abhängig internalisiert werden (vgl. 3.1.4). Dynein vermittelt nicht nur die gezeigte Endozytose von NLG, sondern auch dessen retrograden Langstreckentransport, wobei sowohl

die Internalisierung als auch die retrograde Mobilität unter LTD-induzierenden Stimuli zunehmen (vgl. 3.3.1). Wohin NLG1 während der synaptischen Depression genau transportiert wird, zum Lysosom oder Recycling-Endosom, müssen zukünftige Studien zeigen. Die Degradation von Membran-assoziierten Proteinen wie PSD-95 hingegen findet durch das Ubiquitin-Proteasom-System statt (Colledge *et al.*, 2003, Ciechanover *et al.*, 2006). Beide Degradationsorganellen sind in geringem Maße in Dendriten lokalisiert, der Großteil befindet sich hingegen im Soma (Jadot *et al.*, 1999, Adori *et al.*, 2006). Der Dynein-Transport von NLG1/PSD-95-Komplexen könnte demnach ebenso zu Degradationsorganellen im Zellsoma führen. Ferner könnte der retrograde NLG1-Transportkomplex, zusätzlich zu seiner Funktion zur Entfernung von NLG aus der Synapse, dem Transport zu benachbarten Synapsen dienen, um diese mit NLG zu versorgen (Transzytose).

Der ungestörte Transport von NLG1 ist demnach für die Funktion von NLG an der Synapse unter basalen sowie unter Situationen der synaptischen Plastizität und Lernprozessen von Bedeutung (vgl. 3.1.7-10, 3.2.6, 3.3, Kim *et al.*, 2008).

4.6 Modell des Neuroligin-Transports

Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse führen zu folgendem Modell (Abb. 4.1). NLG1 wird mit dem anterograden Mikrotubuli-Motorprotein KIF21B in Dendriten zur Synapse transportiert. An der Synapse könnte NLG1 exozytiert werden und lateral in die Synapse hineindiffundieren. Die Endozytose von NLG1 erfolgt perisynaptisch und ist sowohl von Dynein als auch von PSD-95 abhängig. Im Gegensatz zum anterograden NLG1-Transport wird NLG1 in retrograde Richtung mit Hilfe des Dynein-Motorproteins in einem Komplex gemeinsam mit PSD-95 als Adaptor aus *Spines* und entlang der Dendriten transportiert. Dieser retrograde Transport könnte sowohl in Recycling-Endosomen als auch in Degradationsorganellen münden und führt so zu einer Entfernung von NLG1 aus der Synapse. Das Vorhandensein anderer Proteine sowohl im anterograden als auch retrograden Komplex ist nicht ausgeschlossen.

Der retrograde Transport ist unter dem Einfluss einer synaptischen Depression (LTD, Abb. 4.1.a) erhöht. Eine synaptische Potenzierung (LTP) führt zu einer erhöhten Insertion von NLG in die synaptische Plasmamembran (Abb. 4.1.c). Bei einer inhibierten KIF21B-Expression ist der beobachtete Anstieg von NLG unter LTP-Bedingungen in der synaptischen Plasmamembran inhibiert. Ein funktionaler NLG1-Transport zu und von der Synapse könnte demnach bei der Ausbildung des exzitatorischen/inhibitorischen Synapsenverhältnisses (E/I-Verhältnis), sowie der Ausbildung der strukturellen Plastizität und bei Lernprozessen von Bedeutung sein (Prange *et al.*, 2004, Levinson *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2008).

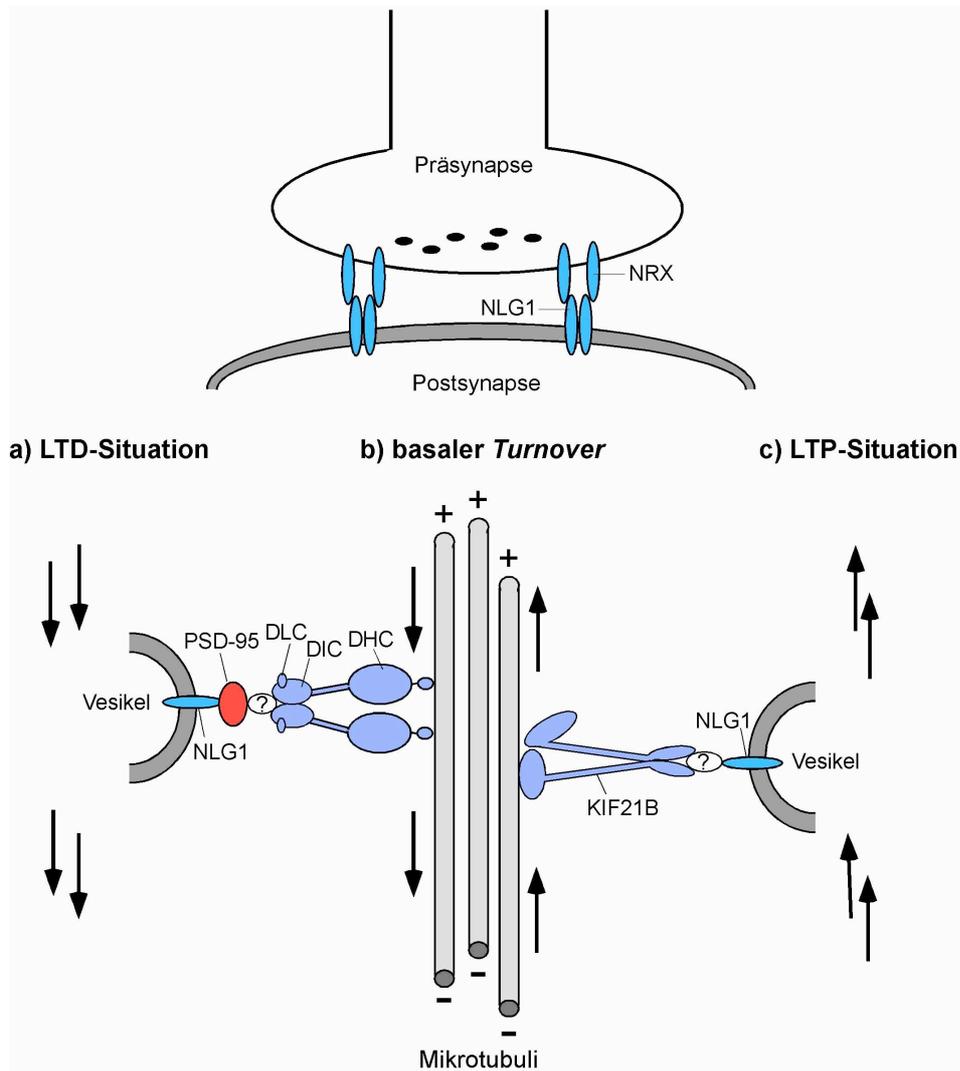


Abb. 4.1: Modell des NLG1-Transports in Dendriten.

NLG1 wird unter basalen Bedingungen über KIF21B zur Synapse und über den NLG1/PSD-95/Dynein-Komplex von der Synapse entlang von Mikrotubuli transportiert (b). Als Antwort auf LTD-induzierende Stimuli ist eine erhöhte Internalisierung und retrograde Mobilisierung von NLG zu beobachten (a). Als Antwort auf LTP-induzierende Stimuli ist eine erhöhte KIF21B-abhängige Insertion von NLG in die synaptische Membran zu beobachten (c). Das Fragezeichen drückt die Möglichkeit einer Interaktion mit zusätzlichen Komponenten im NLG1-Transportkomplex aus, welche aber nicht zwangsläufig existieren muss. DIC: Dynein intermediäre Kette, DLC: Dynein leichte Kette, DHC: Dynein schwere Kette, LTD: *Long-term synaptic depression*; LTP: *Long-term synaptic potentiation*; NRX: Neurexin.

4.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein retrograder und ein anterograder NLG1-Transportkomplex identifiziert und funktionell näher charakterisiert werden. Ferner wurden die NLG1-Transportkomplexe unter dem Einfluss der synaptischen Potenzierung oder Depression analysiert.

Als nächster Schritt könnte die Bindung zwischen KIF21B und NLG1 genauer kartiert und das Vorhandensein anderer, regulatorischer Proteine in diesem Komplex genauer bestimmt werden. Letzteres könnte über eine Immunpräzipitation und anschließende massenspektrometische Analyse erfolgen. Weiterhin müsste der Kotransport von KIF21B und NLG1 mit Hilfe der *Time-lapse* Videomikroskopie unter basalen und unter LTP-Bedingungen als weiterer Beweis für einen gemeinsamen Transportkomplex analysiert werden.

Zur Klärung der Frage, ob NLG1-Transportkomplexe nur entlang von Mikrotubuli in den *Spine* transportiert werden oder ob ein Motorwechsel auf Myosin-Motorproteine und ein Transport entlang von Aktinfilamenten stattfindet, könnte primär eine Immunpräzipitation mit Myosin V- oder Myosin VI-spezifischen Antikörpern durchgeführt und das Vorhandensein von NLG1 in diesen Präzipitaten mittels Immundetektion oder Massenspektrometrie überprüft werden.

Desweiteren sind die Start- und Zielpunkte des NLG1-Transports zu identifizieren. Wird das internalisierte NLG1 unter basalen und LTD-Bedingungen sofort im Lysosom degradiert oder im Recycling-Endosom aufbewahrt für eine schnelle Insertion unter LTP-Bedingungen? Hierfür könnten Endosomen aufgereinigt werden nach Kontroll-, LTD- oder LTP-Bedingungen und auf das Vorhandensein von NLG1 überprüft werden. Zusätzlich könnten immunzytochemische Färbungen mit Endosomen-Markerproteinen bei gleichzeitiger Expression von fluoreszenzmarkiertem NLG1 durchgeführt werden. Außerdem könnte photoaktivierbares EGFP als Markierung von NLG1 benutzt werden um nach der Aktivierung der Autofluoreszenz den Start- oder Zielpunkt des Transports zu visualisieren.

Bei gleichzeitiger Überexpression von PSD-95 und NLG1 könnte weiterhin der Einfluss auf die synaptische Transmission durch elektrophysiologische Messungen analysiert werden, um die beobachteten biochemischen Anreicherungen dieser Proteine an der PSD von Dynamitin-überexprimierenden Tieren und die beobachtete Reduktion der synaptischen Transmission in Dynamitin-überexprimierenden kultivierten Neuronen zu erklären. Desweiteren könnten akute Schnittkulturen der Dynamitin-überexprimierenden Tiere elektrophysiologisch vermessen werden, um so die erhaltenen *in vitro* Daten zu überprüfen.

Außerdem könnte in Kokulturversuchen mit HEK293-Zellen und primären hippocampalen Neuronen analysiert werden, ob eine Inhibition der Motorfunktion einen Einfluss auf die durch NLG hervorgerufenen synaptogenetischen Effekte besitzt.

Anhand der Dynamitin-überexprimierenden Tiere wäre weiterhin interessant zu analysieren, ob und inwiefern die Ausbildung von LTP oder LTD beeinträchtigt ist. Hierfür wären elektrophysiologische Analysen sowie Verhaltensexperimente notwendig.

Weiterhin könnten ultrastrukturelle Analysen hinsichtlich der Synapsenmorphologie oder Synapsenzahl in konditional KIF21B-defizienten oder KIF21B-überexprimierenden Tieren mit Verhaltensexperimente und Lerntests kombiniert werden.

5 Literaturverzeichnis

- Adori, C., P. Low, et al. (2006). "Subcellular distribution of components of the ubiquitin-proteasome system in non-diseased human and rat brain." J Histochem Cytochem **54**(2): 263-7.
- Ali, M. Y., E. B. Kremontsova, et al. (2007). "Myosin Va maneuvers through actin intersections and diffuses along microtubules." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(11): 4332-6.
- Allison, D. W., A. S. Chervin, et al. (2000). "Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules." J Neurosci **20**(12): 4545-54.
- Alvarez, V. A. and B. L. Sabatini (2007). "Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines." Annu Rev Neurosci **30**: 79-97.
- Asaki, C., N. Usuda, et al. (2003). "Localization of translational components at the ultramicroscopic level at postsynaptic sites of the rat brain." Brain Res **972**(1-2): 168-76.
- Baas, P. W., J. S. Deitch, et al. (1988). "Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 8335-9.
- Banke, T. G., D. Bowie, et al. (2000). "Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase." J Neurosci **20**(1): 89-102.
- Bao, J., H. Lin, et al. (2004). "Activity-dependent transcription regulation of PSD-95 by neuregulin-1 and Eos." Nat Neurosci **7**(11): 1250-8.
- Barria, A., V. Derkach, et al. (1997). "Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor." J Biol Chem **272**(52): 32727-30.
- Barrow, S. L., J. R. Constable, et al. (2009). "Neurologin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis." Neural Dev **4**: 17.
- Bats, C., L. Groc, et al. (2007). "The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking." Neuron **53**(5): 719-34.
- Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. (2001). Neuroscience: Exploring the brain. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.
- Becker, N., C. J. Wierenga, et al. (2008). "LTD induction causes morphological changes of presynaptic boutons and reduces their contacts with spines." Neuron **60**(4): 590-7.

- Behrend, B. (2006). Untersuchungen zum Transport postsynaptischer Proteine an erregenden Synapsen des Säugerhirns. Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Beique, J. C., D. T. Lin, et al. (2006). "Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(51): 19535-40.
- Bellone, C., C. Luscher, et al. (2008). "Mechanisms of synaptic depression triggered by metabotropic glutamate receptors." Cell Mol Life Sci **65**(18): 2913-23.
- Benke, T. A., A. Luthi, et al. (1998). "Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity." Nature **393**(6687): 793-7.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Blanpied, T. A., D. B. Scott, et al. (2002). "Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines." Neuron **36**(3): 435-49.
- Blasi, F., E. Bacchelli, et al. (2006). "Absence of coding mutations in the X-linked genes neuroligin 3 and neuroligin 4 in individuals with autism from the IMGSAC collection." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **141B**(3): 220-1.
- Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-56.
- Bolliger, M. F., K. Frei, et al. (2001). "Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression." Biochem J **356**(Pt 2): 581-8.
- Borgdorff, A. J. and D. Choquet (2002). "Regulation of AMPA receptor lateral movements." Nature **417**(6889): 649-53.
- Boucard, A. A., A. A. Chubykin, et al. (2005). "A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins." Neuron **48**(2): 229-36.
- Bramham, C. R. and D. G. Wells (2007). "Dendritic mRNA: transport, translation and function." Nat Rev Neurosci **8**(10): 776-89.
- Brenman, J. E., D. S. Chao, et al. (1996). "Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains." Cell **84**(5): 757-67.
- Bresler, T., Y. Ramati, et al. (2001). "The dynamics of SAP90/PSD-95 recruitment to new synaptic junctions." Mol Cell Neurosci **18**(2): 149-67.
- Bridgman, P. C. (2003). "Myosin-dependent transport in neurons." J Neurobiol **58**(2): 164-74.
- Brose, N. (1999). "Synaptic cell adhesion proteins and synaptogenesis in the mammalian central nervous system." Naturwissenschaften **86**(11): 516-24.

- Brown, S. S. (1999). "Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 63-80.
- Budreck, E. C. and P. Scheiffele (2007). "Neuroigin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses." Eur J Neurosci **26**(7): 1738-48.
- Burgess, S. A., M. L. Walker, et al. (2003). "Dynein structure and power stroke." Nature **421**(6924): 715-8.
- Burkhardt, J. K., C. J. Echeverri, et al. (1997). "Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution." J Cell Biol **139**(2): 469-84.
- Burnashev, N., H. Monyer, et al. (1992). "Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit." Neuron **8**(1): 189-98.
- Cai, C., H. Li, et al. (2006). "Interaction between SAP97 and PSD-95, two Maguk proteins involved in synaptic trafficking of AMPA receptors." J Biol Chem **281**(7): 4267-73.
- Carlisle, H. J., A. E. Fink, et al. (2008). "Opposing effects of PSD-93 and PSD-95 on long-term potentiation and spike-timing dependent plasticity." J Physiol.
- Carlisle, H. J. and M. B. Kennedy (2005). "Spine architecture and synaptic plasticity." Trends Neurosci **28**(4): 182-7.
- Caroni, P. (1997). "Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice." J Neurosci Methods **71**(1): 3-9.
- Carroll, R. C., E. C. Beattie, et al. (1999). "Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 14112-7.
- Carter, A. P., J. E. Garbarino, et al. (2008). "Structure and functional role of dynein's microtubule-binding domain." Science **322**(5908): 1691-5.
- Chen, C. and H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." Mol Cell Biol **7**(8): 2745-52.
- Chen, J., Y. Kanai, et al. (1992). "Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons." Nature **360**(6405): 674-7.
- Chen, L., D. M. Chetkovich, et al. (2000). "Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms." Nature **408**(6815): 936-43.
- Chen, X., L. Vinade, et al. (2005). "Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11551-6.
- Chih, B., H. Engelman, et al. (2005). "Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins." Science **307**(5713): 1324-8.
- Chih, B., L. Gollan, et al. (2006). "Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex." Neuron **51**(2): 171-8.

- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Choquet, D. and A. Triller (2003). "The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane." *Nat Rev Neurosci* **4**(4): 251-65.
- Christopherson, K. S., N. T. Sweeney, et al. (2003). "Lipid- and protein-mediated multimerization of PSD-95: implications for receptor clustering and assembly of synaptic protein networks." *J Cell Sci* **116**(Pt 15): 3213-9.
- Chubykin, A. A., D. Atasoy, et al. (2007). "Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2." *Neuron* **54**(6): 919-31.
- Ciechanover, A. (2006). "Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting." *Exp Biol Med (Maywood)* **231**(7): 1197-211.
- Cingolani, L. A. and Y. Goda (2008). "Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy." *Nat Rev Neurosci* **9**(5): 344-56.
- Colin, E., D. Zala, et al. (2008). "Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons." *EMBO J* **27**(15): 2124-34.
- Colledge, M., E. M. Snyder, et al. (2003). "Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression." *Neuron* **40**(3): 595-607.
- Conde, C. and A. Caceres (2009). "Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites." *Nat Rev Neurosci* **10**(5): 319-32.
- Correia, S. S., S. Bassani, et al. (2008). "Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation." *Nat Neurosci* **11**(4): 457-66.
- Coy, D. L., W. O. Hancock, et al. (1999). "Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain." *Nat Cell Biol* **1**(5): 288-92.
- Coy, D. L., M. Wagenbach, et al. (1999). "Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes." *J Biol Chem* **274**(6): 3667-71.
- Craig, A. M., E. R. Graf, et al. (2006). "How to build a central synapse: clues from cell culture." *Trends Neurosci* **29**(1): 8-20.
- Crouse, G. F., A. Frischauf, et al. (1983). "An integrated and simplified approach to cloning into plasmids and single-stranded phages." *Methods Enzymol* **101**: 78-89.
- Dahlhaus, R., R. M. Hines, et al. (2009). "Overexpression of the cell adhesion protein neuroligin-1 induces learning deficits and impairs synaptic plasticity by altering the ratio of excitation to inhibition in the hippocampus." *Hippocampus*.
- Dalva, M. B., M. A. Takasu, et al. (2000). "EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation." *Cell* **103**(6): 945-56.

- Davis, H. P. and L. R. Squire (1984). "Protein synthesis and memory: a review." Psychol Bull **96**(3): 518-59.
- de Lima, A. D., M. D. Merten, et al. (1997). "Neuritic differentiation and synaptogenesis in serum-free neuronal cultures of the rat cerebral cortex." J Comp Neurol **382**(2): 230-46.
- De Paola, V., A. Holtmaat, et al. (2006). "Cell type-specific structural plasticity of axonal branches and boutons in the adult neocortex." Neuron **49**(6): 861-75.
- Dean, C. and T. Dresbach (2006). "Neuroligins and neuroligins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function." Trends Neurosci **29**(1): 21-9.
- Derkach, V. A., M. C. Oh, et al. (2007). "Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **8**(2): 101-13.
- Desai, A. and T. J. Mitchison (1997). "Microtubule polymerization dynamics." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 83-117.
- Diefenbach, R. J., E. Diefenbach, et al. (2002). "The heavy chain of conventional kinesin interacts with the SNARE proteins SNAP25 and SNAP23." Biochemistry **41**(50): 14906-15.
- Dityatev, A. and M. Schachner (2006). "The extracellular matrix and synapses." Cell Tissue Res **326**(2): 647-54.
- Dixit, R., J. L. Ross, et al. (2008). "Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau." Science **319**(5866): 1086-9.
- Dresbach, T., A. Neeb, et al. (2004). "Synaptic targeting of neuroligin is independent of neuroligin and SAP90/PSD95 binding." Mol Cell Neurosci **27**(3): 227-35.
- Driskell, O. J., A. Mironov, et al. (2007). "Dynein is required for receptor sorting and the morphogenesis of early endosomes." Nat Cell Biol **9**(1): 113-20.
- Echeverri, C. J., B. M. Paschal, et al. (1996). "Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis." J Cell Biol **132**(4): 617-33.
- Ehlers, M. D. (2000). "Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting." Neuron **28**(2): 511-25.
- Ehlers, M. D. (2003). "Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system." Nat Neurosci **6**(3): 231-42.
- Ehrlich, I. and R. Malinow (2004). "Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity." J Neurosci **24**(4): 916-27.
- El-Husseini, A. E., S. E. Craven, et al. (2000). "Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic targeting, and ion channel clustering." J Cell Biol **148**(1): 159-72.

- El-Husseini, A. E., D. Kwasnicka, et al. (2000). "BERP, a novel ring finger protein, binds to alpha-actinin-4." Biochem Biophys Res Commun **267**(3): 906-11.
- El-Husseini, A. E., E. Schnell, et al. (2000). "PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses." Science **290**(5495): 1364-8.
- El-Husseini, A. E. and S. R. Vincent (1999). "Cloning and characterization of a novel RING finger protein that interacts with class V myosins." J Biol Chem **274**(28): 19771-7.
- El-Husseini, A. E., D. Schnell, et al. (2002). "Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95." Cell **108**(6): 849-63.
- Elias, G. M., L. Funke, et al. (2006). "Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins." Neuron **52**(2): 307-20.
- Endow, S. A. and K. W. Waligora (1998). "Determinants of kinesin motor polarity." Science **281**(5380): 1200-2.
- Engert, F. and T. Bonhoeffer (1999). "Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity." Nature **399**(6731): 66-70.
- Erickson, H. P. (2000). "Gamma-tubulin nucleation: template or protofilament?" Nat Cell Biol **2**(6): E93-6.
- Espindola, F. S., D. M. Suter, et al. (2000). "The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN." Cell Motil Cytoskeleton **47**(4): 269-81.
- Fabrichny, I. P., P. Leone, et al. (2007). "Structural analysis of the synaptic protein neuroligin and its beta-neurexin complex: determinants for folding and cell adhesion." Neuron **56**(6): 979-91.
- Fejtova, A., D. Davydova, et al. (2009). "Dynein light chain regulates axonal trafficking and synaptic levels of Bassoon." J Cell Biol **185**(2): 341-55.
- Feldman, D. (2009). "Synaptic Mechanisms for Plasticity in Neocortex." Annu Rev Neurosci.
- Feng, W. and M. Zhang (2009). "Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density." Nat Rev Neurosci **10**(2): 87-99.
- Ferreira, A., J. Niclas, et al. (1992). "Suppression of kinesin expression in cultured hippocampal neurons using antisense oligonucleotides." J Cell Biol **117**(3): 595-606.
- Friedman, H. V., T. Bresler, et al. (2000). "Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment." Neuron **27**(1): 57-69.
- Fu, Z., P. Washbourne, et al. (2003). "Functional excitatory synapses in HEK293 cells expressing neuroligin and glutamate receptors." J Neurophysiol **90**(6): 3950-7.

- Fukunaga, K., L. Stoppini, et al. (1993). "Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." J Biol Chem **268**(11): 7863-7.
- Futai, K., M. J. Kim, et al. (2007). "Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neurologin." Nat Neurosci **10**(2): 186-95.
- Gaffield, M. A. and W. J. Betz (2006). "Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes." Nat Protoc **1**(6): 2916-21.
- Garcia, E. P., S. Mehta, et al. (1998). "SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization." Neuron **21**(4): 727-39.
- Garner, C. C., C. L. Waites, et al. (2006). "Synapse development: still looking for the forest, still lost in the trees." Cell Tissue Res **326**(2): 249-62.
- Gee, M. A., J. E. Heuser, et al. (1997). "An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain." Nature **390**(6660): 636-9.
- Gennerich, A., A. P. Carter, et al. (2007). "Force-induced bidirectional stepping of cytoplasmic dynein." Cell **131**(5): 952-65.
- Gerrow, K., S. Romorini, et al. (2006). "A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development." Neuron **49**(4): 547-62.
- Goode, B. L., D. G. Drubin, et al. (2000). "Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 63-71.
- Graf, E. R., Y. Kang, et al. (2006). "Structure function and splice site analysis of the synaptogenic activity of the neurexin-1 beta LNS domain." J Neurosci **26**(16): 4256-65.
- Graf, E. R., X. Zhang, et al. (2004). "Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins." Cell **119**(7): 1013-26.
- Gray, N. W., R. M. Weimer, et al. (2006). "Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the neocortex in vivo." PLoS Biol **4**(11): e370.
- Griffin, C. T., J. Trejo, et al. (2005). "Genetic evidence for a mammalian retromer complex containing sorting nexins 1 and 2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 15173-7.
- Groc, L., M. Heine, et al. (2004). "Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors." Nat Neurosci **7**(7): 695-6.
- Grooms, S. Y., K. M. Noh, et al. (2006). "Activity bidirectionally regulates AMPA receptor mRNA abundance in dendrites of hippocampal neurons." J Neurosci **26**(32): 8339-51.
- Grosshans, D. R., D. A. Clayton, et al. (2002). "LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1." Nat Neurosci **5**(1): 27-33.
- Grutzendler, J., N. Kasthuri, et al. (2002). "Long-term dendritic spine stability in the adult cortex." Nature **420**(6917): 812-6.

- Guillaud, L., M. Setou, et al. (2003). "KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons." *J Neurosci* **23**(1): 131-40.
- Guillaud, L., R. Wong, et al. (2007). "Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: a molecular model of kinesin-cargo release." *Nat Cell Biol* **10**(1): 19-29.
- Gundelfinger, E. D. and S. tom Dieck (2000). "Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain." *Naturwissenschaften* **87**(12): 513-23.
- Haimo, L. T. (1995). "Regulation of kinesin-directed movements." *Trends Cell Biol* **5**(4): 165-8.
- Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* **391**(2): 85-100.
- Hammond, J. W., D. Cai, et al. (2008). "Tubulin modifications and their cellular functions." *Curr Opin Cell Biol* **20**(1): 71-6.
- Harney, S. C., D. E. Jane, et al. (2008). "Extrasynaptic NR2D-containing NMDARs are recruited to the synapse during LTP of NMDAR-EPSCs." *J Neurosci* **28**(45): 11685-94.
- Harris, K. M. and J. K. Stevens (1989). "Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics." *J Neurosci* **9**(8): 2982-97.
- Hata, Y., S. Butz, et al. (1996). "CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuexins." *J Neurosci* **16**(8): 2488-94.
- Hayashi, Y., S. H. Shi, et al. (2000). "Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction." *Science* **287**(5461): 2262-7.
- Heerssen, H. M., M. F. Pazyra, et al. (2004). "Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons." *Nat Neurosci* **7**(6): 596-604.
- Henningsen, U. and M. Schliwa (1997). "Reversal in the direction of movement of a molecular motor." *Nature* **389**(6646): 93-6.
- Hines, R. M., L. Wu, et al. (2008). "Synaptic imbalance, stereotypies, and impaired social interactions in mice with altered neuroligin 2 expression." *J Neurosci* **28**(24): 6055-67.
- Hirokawa, N. (1998). "Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport." *Science* **279**(5350): 519-26.
- Hirokawa, N. and Y. Noda (2008). "Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics." *Physiol Rev* **88**(3): 1089-118.

- Hirokawa, N., R. Sato-Yoshitake, et al. (1990). "Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo." J Cell Biol **111**(3): 1027-37.
- Hirokawa, N. and R. Takemura (2005). "Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons." Nat Rev Neurosci **6**(3): 201-14.
- Hodi, Z., A. L. Nemeth, et al. (2006). "Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein." Biochemistry **45**(41): 12582-95.
- Holtmaat, A., L. Wilbrecht, et al. (2006). "Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex." Nature **441**(7096): 979-83.
- Holzbaur, E. L. and R. B. Vallee (1994). "DYNEINS: molecular structure and cellular function." Annu Rev Cell Biol **10**: 339-72.
- Höök, P. and R. B. Vallee (2006). "The dynein family at a glance." J Cell Sci **119**(Pt 21): 4369-71.
- Hsueh, Y. P. and M. Sheng (1999). "Requirement of N-terminal cysteines of PSD-95 for PSD-95 multimerization and ternary complex formation, but not for binding to potassium channel Kv1.4." J Biol Chem **274**(1): 532-6.
- Hu, X., C. Viesselmann, et al. (2008). "Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines." J Neurosci **28**(49): 13094-105.
- Huang, J. D., S. T. Brady, et al. (1999). "Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors." Nature **397**(6716): 267-70.
- Huber, K. M., J. C. Roder, et al. (2001). "Chemical induction of mGluR5- and protein synthesis--dependent long-term depression in hippocampal area CA1." J Neurophysiol **86**(1): 321-5.
- Ichtchenko, K., Y. Hata, et al. (1995). "Neuroigin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins." Cell **81**(3): 435-43.
- Ichtchenko, K., T. Nguyen, et al. (1996). "Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins." J Biol Chem **271**(5): 2676-82.
- Iida, J., S. Hirabayashi, et al. (2004). "Synaptic scaffolding molecule is involved in the synaptic clustering of neuroligin." Mol Cell Neurosci **27**(4): 497-508.
- Ikegami, K., R. L. Heier, et al. (2007). "Loss of alpha-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3213-8.
- Inoue, A. and S. Okabe (2003). "The dynamic organization of postsynaptic proteins: translocating molecules regulate synaptic function." Curr Opin Neurobiol **13**(3): 332-40.

- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-8.
- Irie, M., Y. Hata, et al. (1997). "Binding of neuroligins to PSD-95." *Science* **277**(5331): 1511-5.
- Jacob, T. C., S. J. Moss, et al. (2008). "GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition." *Nat Rev Neurosci* **9**(5): 331-43.
- Jadot, M., L. Lin, et al. (1999). "Subcellular localization of mannose 6-phosphate glycoproteins in rat brain." *J Biol Chem* **274**(30): 21104-13.
- Jamain, S., H. Quach, et al. (2003). "Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism." *Nat Genet* **34**(1): 27-9.
- Jane, D. E., D. Lodge, et al. (2009). "Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential." *Neuropharmacology* **56**(1): 90-113.
- Jaworski, J., L. C. Kapitein, et al. (2009). "Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity." *Neuron* **61**(1): 85-100.
- Ju, W., W. Morishita, et al. (2004). "Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors." *Nat Neurosci* **7**(3): 244-53.
- Juliano, R., M. R. Alam, et al. (2008). "Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides." *Nucleic Acids Res* **36**(12): 4158-71.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell T. M. (2000). *Principles of neural science*. New York, McGraw-Hill.
- Kang, R., J. Wan, et al. (2008). "Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation." *Nature* **456**(7224): 904-9.
- Kardon, J. R., S. L. Reck-Peterson, et al. (2009). "Regulation of the processivity and intracellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* dynein by dynactin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(14): 5669-74.
- Karki, S. and E. L. Holzbaur (1995). "Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex." *J Biol Chem* **270**(48): 28806-11.
- Kennedy, M. J. and M. D. Ehlers (2006). "Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity." *Annu Rev Neurosci* **29**: 325-62.
- Kharazia, V. N. and R. J. Weinberg (1997). "Tangential synaptic distribution of NMDA and AMPA receptors in rat neocortex." *Neurosci Lett* **238**(1-2): 41-4.
- Kim, E., M. Niethammer, et al. (1995). "Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases." *Nature* **378**(6552): 85-8.
- Kim, E. and M. Sheng (2004). "PDZ domain proteins of synapses." *Nat Rev Neurosci* **5**(10): 771-81.

- Kim, J., S. Y. Jung, et al. (2008). "Neurologin-1 is required for normal expression of LTP and associative fear memory in the amygdala of adult animals." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(26): 9087-92.
- Kim, M. J., K. Futai, et al. (2007). "Synaptic accumulation of PSD-95 and synaptic function regulated by phosphorylation of serine-295 of PSD-95." Neuron **56**(3): 488-502.
- King, S. J. and T. A. Schroer (2000). "Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor." Nat Cell Biol **2**(1): 20-4.
- Kirsch, J., D. Langosch, et al. (1991). "The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin." J Biol Chem **266**(33): 22242-5.
- Kittler, J. T., P. Delmas, et al. (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): 7972-7.
- Kleckner, N. W. and R. Dingledine (1988). "Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes." Science **241**(4867): 835-7.
- Kneussel, M. (2005). "Postsynaptic scaffold proteins at non-synaptic sites. The role of postsynaptic scaffold proteins in motor-protein-receptor complexes." EMBO Rep **6**(1): 22-7.
- Kneussel, M., A. Hermann, et al. (1999). "Hydrophobic interactions mediate binding of the glycine receptor beta-subunit to gephyrin." J Neurochem **72**(3): 1323-6.
- Knott, G. and A. Holtmaat (2008). "Dendritic spine plasticity--current understanding from in vivo studies." Brain Res Rev **58**(2): 282-9.
- Knott, G. W., A. Holtmaat, et al. (2006). "Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo." Nat Neurosci **9**(9): 1117-24.
- Köhr, G. (2006). "NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution." Cell Tissue Res **326**(2): 439-46.
- Kon, T., K. Imamula, et al. (2009). "Helix sliding in the stalk coiled coil of dynein couples ATPase and microtubule binding." Nat Struct Mol Biol **16**(3): 325-33.
- Kon, T., M. Nishiura, et al. (2004). "Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein." Biochemistry **43**(35): 11266-74.
- Kornau, H. C., L. T. Schenker, et al. (1995). "Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95." Science **269**(5231): 1737-40.
- Kural, C., H. Kim, et al. (2005). "Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement?" Science **308**(5727): 1469-72.
- Kusumi, A., C. Nakada, et al. (2005). "Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules." Annu Rev Biophys Biomol Struct **34**: 351-78.

- Lafont, F., J. K. Burkhardt, et al. (1994). "Involvement of microtubule motors in basolateral and apical transport in kidney cells." *Nature* **372**(6508): 801-3.
- LaMonte, B. H., K. E. Wallace, et al. (2002). "Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration." *Neuron* **34**(5): 715-27.
- Langford, G. M. (2002). "Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport." *Traffic* **3**(12): 859-65.
- Lardong, K., C. Maas, et al. (2009). "Neuronal depolarization modifies motor protein mobility." *Neuroscience* **160**(1): 1-5.
- Lau, C. G. and R. S. Zukin (2007). "NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders." *Nat Rev Neurosci* **8**(6): 413-26.
- Lavezzari, G., J. McCallum, et al. (2003). "Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression." *Neuropharmacology* **45**(6): 729-37.
- Lee, S. J., Y. Escobedo-Lozoya, et al. (2009). "Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation." *Nature* **458**(7236): 299-304.
- Levinson, J. N., N. Chery, et al. (2005). "Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroligin-induced synaptic specificity." *J Biol Chem* **280**(17): 17312-9.
- Levinson, J. N. and A. El-Husseini (2007). "A crystal-clear interaction: relating neuroligin/neurexin complex structure to function at the synapse." *Neuron* **56**(6): 937-9.
- Li, R. and G. G. Gundersen (2008). "Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(11): 860-73.
- Lin, B., E. A. Kramar, et al. (2005). "Theta stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus." *J Neurosci* **25**(8): 2062-9.
- Loebrich, S., R. Bähring, et al. (2006). "Activated radixin is essential for GABAA receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton." *EMBO J* **25**(5): 987-99.
- Lynch, M. A. (2004). "Long-term potentiation and memory." *Physiol Rev* **84**(1): 87-136.
- Ma, S. and R. L. Chisholm (2002). "Cytoplasmic dynein-associated structures move bidirectionally in vivo." *J Cell Sci* **115**(Pt 7): 1453-60.
- Maas, C., D. Belgardt, et al. (2009). "Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(21): 8731-6.
- Maas, C., N. Tagnaouti, et al. (2006). "Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin." *J Cell Biol* **172**(3): 441-51.

- Malenka, R. C. and M. F. Bear (2004). "LTP and LTD: an embarrassment of riches." Neuron **44**(1): 5-21.
- Mallik, R., B. C. Carter, et al. (2004). "Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load." Nature **427**(6975): 649-52.
- Mallik, R. and S. P. Gross (2004). "Molecular motors: strategies to get along." Curr Biol **14**(22): R971-82.
- Man, H. Y., J. W. Lin, et al. (2000). "Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization." Neuron **25**(3): 649-62.
- Man, H. Y., Y. Sekine-Aizawa, et al. (2007). "Regulation of {alpha}-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3579-84.
- Marrs, G. S., S. H. Green, et al. (2001). "Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites." Nat Neurosci **4**(10): 1006-13.
- Marszalek, J. R., J. A. Weiner, et al. (1999). "Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B." J Cell Biol **145**(3): 469-79.
- Matsuzaki, M., G. C. Ellis-Davies, et al. (2001). "Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons." Nat Neurosci **4**(11): 1086-92.
- Matsuzaki, M., N. Honkura, et al. (2004). "Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines." Nature **429**(6993): 761-6.
- Mayford, M., D. Baranes, et al. (1996). "The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13250-5.
- McIlvain, J. M., Jr., J. K. Burkhardt, et al. (1994). "Regulation of kinesin activity by phosphorylation of kinesin-associated proteins." J Biol Chem **269**(29): 19176-82.
- Megias, M., Z. Emri, et al. (2001). "Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells." Neuroscience **102**(3): 527-40.
- Mermall, V., P. L. Post, et al. (1998). "Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction." Science **279**(5350): 527-33.
- Meyer, G., F. Varoqueaux, et al. (2004). "The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin." Neuropharmacology **47**(5): 724-33.
- Migaud, M., P. Charlesworth, et al. (1998). "Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein." Nature **396**(6710): 433-9.

- Mikami, A., S. H. Tynan, et al. (2002). "Molecular structure of cytoplasmic dynein 2 and its distribution in neuronal and ciliated cells." *J Cell Sci* **115**(Pt 24): 4801-8.
- Miki, H., M. Setou, et al. (2001). "All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7004-11.
- Missler, M., W. Zhang, et al. (2003). "Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis." *Nature* **423**(6943): 939-48.
- Mok, H., H. Shin, et al. (2002). "Association of the kinesin superfamily motor protein KIF1B α with postsynaptic density-95 (PSD-95), synapse-associated protein-97, and synaptic scaffolding molecule PSD-95/discs large/zona occludens-1 proteins." *J Neurosci* **22**(13): 5253-8.
- Montgomery, J. M., J. C. Selcher, et al. (2005). "Dynamamin-dependent NMDAR endocytosis during LTD and its dependence on synaptic state." *BMC Neurosci* **6**: 48.
- Morabito, M. A., M. Sheng, et al. (2004). "Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons." *J Neurosci* **24**(4): 865-76.
- Mulkey, R. M., S. Endo, et al. (1994). "Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression." *Nature* **369**(6480): 486-8.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-73.
- Murphey, R. K., P. C. Caruccio, et al. (1999). "Dynein-dynactin function and sensory axon growth during *Drosophila* metamorphosis: A role for retrograde motors." *Dev Biol* **209**(1): 86-97.
- Nägerl, U. V., N. Eberhorn, et al. (2004). "Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons." *Neuron* **44**(5): 759-67.
- Naisbitt, S., J. Valtschanoff, et al. (2000). "Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein." *J Neurosci* **20**(12): 4524-34.
- Nam, C. I. and L. Chen (2005). "Postsynaptic assembly induced by neurexin-neurologin interaction and neurotransmitter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(17): 6137-42.
- Neves, G., S. F. Cooke, et al. (2008). "Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality." *Nat Rev Neurosci* **9**(1): 65-75.
- Newpher, T. M. and M. D. Ehlers (2008). "Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains." *Neuron* **58**(4): 472-97.
- Nikonenko, I., B. Boda, et al. (2008). "PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling." *J Cell Biol* **183**(6): 1115-27.

- Niswender, K. D., S. M. Blackman, et al. (1995). "Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits." *J Microsc* **180**(Pt 2): 109-16.
- Nusser, Z., R. Lujan, et al. (1998). "Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus." *Neuron* **21**(3): 545-59.
- O'Brien, R. J., D. Xu, et al. (1999). "Synaptic clustering of AMPA receptors by the extracellular immediate-early gene product Narp." *Neuron* **23**(2): 309-23.
- Okamoto, K., T. Nagai, et al. (2004). "Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity." *Nat Neurosci* **7**(10): 1104-12.
- Osterweil, E., D. G. Wells, et al. (2005). "A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis." *J Cell Biol* **168**(2): 329-38.
- Otmakhov, N., L. Khibnik, et al. (2003). "Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent." *J Neurophysiol* **91**(5): 1955-62.
- Pal, A., F. Severin, et al. (2006). "Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease." *J Cell Biol* **172**(4): 605-18.
- Palazzo, A. F., H. L. Joseph, et al. (2001). "Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization." *Curr Biol* **11**(19): 1536-41.
- Palmer, M. J., A. J. Irving, et al. (1997). "The group I mGlu receptor agonist DHPG induces a novel form of LTD in the CA1 region of the hippocampus." *Neuropharmacology* **36**(11-12): 1517-32.
- Park, M., E. C. Penick, et al. (2004). "Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP." *Science* **305**(5692): 1972-5.
- Paschal, B. M. and R. B. Vallee (1987). "Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C." *Nature* **330**(6144): 181-3.
- Passafaro, M., V. Piech, et al. (2001). "Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons." *Nat Neurosci* **4**(9): 917-26.
- Passafaro, M., C. Sala, et al. (1999). "Microtubule binding by CRIPT and its potential role in the synaptic clustering of PSD-95." *Nat Neurosci* **2**(12): 1063-9.
- Peng, J., M. J. Kim, et al. (2004). "Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry." *J Biol Chem* **279**(20): 21003-11.
- Pereda, A., J. O'Brien, et al. (2003). "Connexin35 mediates electrical transmission at mixed synapses on Mauthner cells." *J Neurosci* **23**(20): 7489-503.
- Pereda, A., J. O'Brien, et al. (2003). "Short-range functional interaction between connexin35 and neighboring chemical synapses." *Cell Commun Adhes* **10**(4-6): 419-23.

- Plant, K., K. A. Pelkey, et al. (2006). "Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation." Nat Neurosci **9**(5): 602-4.
- Porter, M. E., R. Bower, et al. (1999). "Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*." Mol Biol Cell **10**(3): 693-712.
- Prange, O., T. P. Wong, et al. (2004). "A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(38): 13915-20.
- Racz, B., T. A. Blanpied, et al. (2004). "Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines." Nat Neurosci **7**(9): 917-8.
- Reck-Peterson, S. L. and R. D. Vale (2004). "Molecular dissection of the roles of nucleotide binding and hydrolysis in dynein's AAA domains in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14305.
- Reck-Peterson, S. L., A. Yildiz, et al. (2006). "Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior." Cell **126**(2): 335-48.
- Reddy, S., P. Jin, et al. (1997). "Mutant molecular motors disrupt neural circuits in *Drosophila*." J Neurobiol **33**(6): 711-23.
- Reissner, C., M. Klose, et al. (2008). "Mutational analysis of the neuroligin/neurexin complex reveals essential and regulatory components." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15124-9.
- Richardson, K. C., L. Jarett, et al. (1960). "Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy." Stain Technol **35**: 313-23.
- Rivera, C., J. Voipio, et al. (1999). "The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation." Nature **397**(6716): 251-5.
- Roberts, A. J., N. Numata, et al. (2009). "AAA+ Ring and linker swing mechanism in the dynein motor." Cell **136**(3): 485-95.
- Roche, K. W., R. J. O'Brien, et al. (1996). "Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit." Neuron **16**(6): 1179-88.
- Ross, J. L., M. Y. Ali, et al. (2008). "Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **20**(1): 41-7.
- Ross, J. L., K. Wallace, et al. (2006). "Processive bidirectional motion of dynein-dynactin complexes in vitro." Nat Cell Biol **8**(6): 562-70.
- Rubenstein, J. L. and M. M. Merzenich (2003). "Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems." Genes Brain Behav **2**(5): 255-67.
- Saglietti, L., C. Dequidt, et al. (2007). "Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation." Neuron **54**(3): 461-77.

- Saito, N., Y. Okada, et al. (1997). "KIFC2 is a novel neuron-specific C-terminal type kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles." Neuron **18**(3): 425-38.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson, F., J. A. Donoso, et al. (1979). "Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport." J Pharmacol Exp Ther **208**(3): 411-7.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sans, N., R. S. Petralia, et al. (2000). "A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses." J Neurosci **20**(3): 1260-71.
- Satoh, D., D. Sato, et al. (2008). "Spatial control of branching within dendritic arbors by dynein-dependent transport of Rab5-endosomes." Nat Cell Biol **10**(10): 1164-71.
- Scheiffele, P., J. Fan, et al. (2000). "Neuroigin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons." Cell **101**(6): 657-69.
- Schmitt, B., P. Knaus, et al. (1987). "The Mr 93,000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor complex is a peripheral membrane protein." Biochemistry **26**(3): 805-11.
- Schnell, E., M. Sizemore, et al. (2002). "Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13902-7.
- Schrimpf, S. P., V. Meskenaite, et al. (2005). "Proteomic analysis of synaptosomes using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry." Proteomics **5**(10): 2531-41.
- Schroer, T. A. (2004). "Dynactin." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 759-79.
- Schuman, E. M., J. L. Dynes, et al. (2006). "Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs." J Neurosci **26**(27): 7143-6.
- Schurek, B. (2006). Untersuchungen der Interaktion von GRIP1 mit dem postsynaptischen Protein N-Cadherin. Fachbereich Biologie, Universität Hamburg.
- Setou, M., T. Nakagawa, et al. (2000). "Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport." Science **288**(5472): 1796-802.
- Setou, M., D. H. Seog, et al. (2002). "Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites." Nature **417**(6884): 83-7.
- Sheng, M. and C. C. Hoogenraad (2007). "The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view." Annu Rev Biochem **76**: 823-47.
- Shi, S., Y. Hayashi, et al. (2001). "Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons." Cell **105**(3): 331-43.
- Shubeita, G. T., S. L. Tran, et al. (2008). "Consequences of motor copy number on the intracellular transport of kinesin-1-driven lipid droplets." Cell **135**(6): 1098-107.

- Sia, G. M., J. C. Beique, et al. (2007). "Interaction of the N-terminal domain of the AMPA receptor GluR4 subunit with the neuronal pentraxin NP1 mediates GluR4 synaptic recruitment." Neuron **55**(1): 87-102.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Snyder, E. M., B. D. Philpot, et al. (2001). "Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation." Nat Neurosci **4**(11): 1079-85.
- Soldati, T. and M. Schliwa (2006). "Powering membrane traffic in endocytosis and recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(12): 897-908.
- Song, J. Y., K. Ichtchenko, et al. (1999). "Neurologin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1100-5.
- Sorra, K. E. and K. M. Harris (2000). "Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines." Hippocampus **10**(5): 501-11.
- Stein, C. A., J. L. Tonkinson, et al. (1991). "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides--anti-sense inhibitors of gene expression?" Pharmacol Ther **52**(3): 365-84.
- Steiner, P., M. J. Higley, et al. (2008). "Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity." Neuron **60**(5): 788-802.
- Südhof, T. C. (2008). "Neurologins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease." Nature **455**(7215): 903-11.
- Swanson, G. T., S. K. Kamboj, et al. (1997). "Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition." J Neurosci **17**(1): 58-69.
- Tai, C. Y., S. P. Mysore, et al. (2007). "Activity-regulated N-cadherin endocytosis." Neuron **54**(5): 771-85.
- Tang, S. J. and E. M. Schuman (2002). "Protein synthesis in the dendrite." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1420): 521-9.
- Teng, J., T. Rai, et al. (2005). "The KIF3 motor transports N-cadherin and organizes the developing neuroepithelium." Nat Cell Biol **7**(5): 474-82.
- Terry, B. R., E. K. Matthews, et al. (1995). "Molecular characterisation of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation microscopy." Biochem Biophys Res Commun **217**(1): 21-7.
- Toba, S., T. M. Watanabe, et al. (2006). "Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(15): 5741-5.

- Tomita, S., V. Stein, et al. (2005). "Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs." Neuron **45**(2): 269-77.
- Trachtenberg, J. T., B. E. Chen, et al. (2002). "Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex." Nature **420**(6917): 788-94.
- Traer, C. J., A. C. Rutherford, et al. (2007). "SNX4 coordinates endosomal sorting of TfnR with dynein-mediated transport into the endocytic recycling compartment." Nat Cell Biol **9**(12): 1370-80.
- Tretter, V., T. C. Jacob, et al. (2008). "The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin." J Neurosci **28**(6): 1356-65.
- Triller, A. and D. Choquet (2005). "Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move!" Trends Neurosci **28**(3): 133-9.
- Turrigiano, G. G. and S. B. Nelson (2004). "Homeostatic plasticity in the developing nervous system." Nat Rev Neurosci **5**(2): 97-107.
- Vale, R. D. (2003). "The molecular motor toolbox for intracellular transport." Cell **112**(4): 467-80.
- Vallee, R. B., J. C. Williams, et al. (2004). "Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport." J Neurobiol **58**(2): 189-200.
- Valtschanoff, J. G. and R. J. Weinberg (2001). "Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density." J Neurosci **21**(4): 1211-7.
- Varoqueaux, F., G. Aramuni, et al. (2006). "Neuroligins determine synapse maturation and function." Neuron **51**(6): 741-54.
- Varoqueaux, F., S. Jamain, et al. (2004). "Neuroigin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses." Eur J Cell Biol **83**(9): 449-56.
- Verhey, K. J., D. Meyer, et al. (2001). "Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules." J Cell Biol **152**(5): 959-70.
- Vershinin, M., B. C. Carter, et al. (2007). "Multiple-motor based transport and its regulation by Tau." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 87-92.
- Visscher, K., M. J. Schnitzer, et al. (1999). "Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp." Nature **400**(6740): 184-9.
- Waites, C. L., A. M. Craig, et al. (2005). "Mechanisms of vertebrate synaptogenesis." Annu Rev Neurosci **28**: 251-74.
- Wang, Y. T. and D. J. Linden (2000). "Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis." Neuron **25**(3): 635-47.
- Wang, Z., J. G. Edwards, et al. (2008). "Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity." Cell **135**(3): 535-48.

- Wang, Z., S. Khan, et al. (1995). "Single cytoplasmic dynein molecule movements: characterization and comparison with kinesin." Biophys J **69**(5): 2011-23.
- Washbourne, P., J. E. Bennett, et al. (2002). "Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses." Nat Neurosci **5**(8): 751-9.
- Waterman-Storer, C. M., S. Karki, et al. (1995). "The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein centractin (Arp-1)." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1634-8.
- Waterman-Storer, C. M., S. B. Karki, et al. (1997). "The interaction between cytoplasmic dynein and dynactin is required for fast axonal transport." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 12180-5.
- Watt, A. J., P. J. Sjöstrom, et al. (2004). "A proportional but slower NMDA potentiation follows AMPA potentiation in LTP." Nat Neurosci **7**(5): 518-24.
- Wermter, A. K., I. Kamp-Becker, et al. (2008). "No evidence for involvement of genetic variants in the X-linked neuroligin genes NLGN3 and NLGN4X in probands with autism spectrum disorder on high functioning level." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **147B**(4): 535-7.
- Westermann, S. and K. Weber (2003). "Post-translational modifications regulate microtubule function." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(12): 938-47.
- Whittaker, V. P. (1993). "Thirty years of synaptosome research." J Neurocytol **22**(9): 735-42.
- Wong, R. W., M. Setou, et al. (2002). "Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14500-5.
- Xu, W., O. M. Schluter, et al. (2008). "Molecular dissociation of the role of PSD-95 in regulating synaptic strength and LTD." Neuron **57**(2): 248-62.
- Yan, J., G. Oliveira, et al. (2005). "Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients." Mol Psychiatry **10**(4): 329-32.
- Yan, Q., W. Sun, et al. (2005). "CART: an Hrs/actinin-4/BERP/myosin V protein complex required for efficient receptor recycling." Mol Biol Cell **16**(5): 2470-82.
- Yildiz, A., M. Tomishige, et al. (2004). "Kinesin walks hand-over-hand." Science **303**(5658): 676-8.
- Yoshii, A. and M. Constantine-Paton (2007). "BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation." Nat Neurosci **10**(6): 702-11.
- Zheng, Y., J. Wildonger, et al. (2008). "Dynein is required for polarized dendritic transport and uniform microtubule orientation in axons." Nat Cell Biol **10**(10): 1172-80.

6 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Matthias Kneussel für die Ermöglichung dieser Arbeit in seinem Labor. Vor allem danke ich für die ständige Verfügbarkeit und die offenen Diskussionsmöglichkeiten sowie für die exzellente Betreuung meines Projektes. Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Matthias Kneussel für die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Wiese für die Bereitschaft meine Arbeit als Zweitgutachter am Fachereich Biologie zu betreuen.

Für die ständige Hilfsbereitschaft, guten Ratschläge und freundschaftliche Atmosphäre im Labor möchte ich mich vor allem bei Corinna Lappe-Siefke und Yvonne Pechmann bedanken. Weiterhin danke ich Renate Erb, Kerstin Lardong, Verena Brucklacher-Waldert, Torben Hausrat, Laura Myllynen, Dorthe Belgardt, Thomas Löwe, Alexandra Segref, Kirsten Kuhlbrodt, Frank Heisler, Han Kyu Lee und Bardo Behrend.

Bei Dr. Michaela Schweizer und Prof. Dr. Jürgen Schwarz bedanke ich mich sehr für die Mitarbeit an diesem Projekt. Weiterhin ist allen Mitarbeitern des ZMNHs, vor allem Sabine Hoffmeister-Ullerich, für die freundschaftliche Atmosphäre im Institut zu danken.

Meiner Mutter und Clemens danke ich ganz besonders für ihre ständige und liebevolle Unterstützung und Aufmunterung. Mein besonderer Dank gilt weiterhin meiner Familie und meinen Freunden.