

## VII Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung zwischen dem neuronalen Zellerkennungsmolekül NCAM und G-Protein-aktivierten Kaliumkanälen (Kir3 Kanäle) untersucht. Diese Arbeit baute auf Untersuchungen auf, in denen gezeigt werden konnte, dass der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor bei NCAM-defizienten Mäusen (NCAM<sup>-/-</sup>) bezüglich seiner Agonisten Buspiron und 8-OH DPAT im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen hypersensitiviert ist. Weder die Affinität, noch die Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors weisen in den Gehirnen von NCAM<sup>-/-</sup>- gegenüber Wildtyp-Mäusen signifikante Unterschiede auf. Da auch der Serotonin-Metabolismus offensichtlich nicht gestört war, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass NCAM das Effektorsystem des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors, also die Kir3-Kanäle, beeinflusst. Die ersten Experimente zeigten, dass Kir3-vermittelte Ströme in Kulturen hippocampaler Neuronen von NCAM<sup>-/-</sup>- versus Wildtyp-Mäusen signifikante Unterschiede aufwiesen. So waren die Kir3-abhängigen, einwärts-gerichteten Ströme in Neuronen von NCAM<sup>-/-</sup>-Mäusen um etwa 240% im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöht, was mit anderen Worten einer Reduktion der Kir3-Ströme in Anwesenheit von NCAM um etwa 40% entspricht. Auch in heterologen Expressionssystemen inhibierte NCAM die Kir3-Kanäle. So führte die Koexpression von NCAM140 und NCAM180, jenen Isoformen mit einer intrazellulären Domäne, zu einer 80%igen Reduktion der neuronalen Kir3.1/3.2- und Kir3.1/3.3-vermittelten Ströme, welches in etwa der Größenordnung entspricht, wie sie in hippocampalen Neuronen beobachtet wurde. Interessanterweise reagierten nicht alle NCAM-Isoformen bzw. alle Kir3-Kanäle gleich: So zeigte die Koexpression der GPI-verankerten NCAM120-Isoform keinen Effekt auf die neuronalen Kir3-Ströme. Desweiteren wurde weder der herzspezifische Kir3.1/3.4-Kanal noch der aus der Kir2-Familie stammende Kir2.1-Kanal durch die Anwesenheit von NCAM140 oder NCAM180 beeinflusst. Durch Oberflächenbiotinylierung und Fluoreszenzmarkierung der Kir3-Kanäle konnte gezeigt werden, dass NCAM140 und NCAM180 die Oberflächenlokalisation des Kir3.1/3.2-Kanals, nicht aber des Kir3.1/3.4-Kanals, um ca. 50% reduzierten. Darüber hinaus wurden Einzelleitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit des Kir3-Kanals nicht durch NCAM beeinflusst, so dass die NCAM-abhängige Inhibition der Kir3-Ströme vermutlich auf eine reduzierte Membranlokalisation der K<sup>+</sup>-Kanäle zurückzuführen ist. Da weder die Proteinexpression noch die Internalisierung des Kir3.1/3.2-Kanals durch NCAM140 beeinflusst wurden, ist es naheliegend, dass NCAM den Transport des Kanals zur Membran verminderte. Als strukturelle Determinante für die NCAM-Sensitivität konnte der intrazelluläre NH<sub>2</sub>-Terminus der Kir3.2-Untereinheit

identifiziert werden. Die Inhibition durch NCAM140 konnte allerdings nicht auf ein bestimmtes Aminosäuremotiv innerhalb des NH<sub>2</sub>-Terminus eingegrenzt werden.

Ferner hatten weder die akute Stimulation von NCAM durch polyklonale NCAM-Antikörper noch der Einsatz von Kinase-Inhibitoren gegen die NCAM-vermittelten Signaltransduktionswege einen Effekt auf den Kir3-Transport zur Membran, wodurch ein klassisches „Outside-in Signaling“ von NCAM als möglicher Mechanismus unwahrscheinlich wurde. Auch waren die Kir3-Kanäle nicht direkt mit NCAM140 in der Membran assoziiert, womit ein weiterer Mechanismus für die NCAM-vermittelte Inhibition entfiel. Allerdings waren sowohl die NCAM-Isoformen als auch die Kir3-Kanäle mit detergenten-resistenten Mikrodomänen, auch lipid rafts genannt, assoziiert. Die Anwesenheit von NCAM140 in diesen Zellmembran „lipid-rafts“ scheint essentiell für seine Funktion als Oberflächen-Rezeptor zu sein. Diese Assoziation von NCAM140 mit „lipid-rafts“ wird über palmitoylierte intrazelluläre Cysteinreste vermittelt. Interessanterweise konnte die Inhibition der Kir3-Oberflächenlokalisation durch die Mutation der NCAM140-Palmitoylierungsstellen oder durch die Zerstörung von intrazellulären, nicht aber Oberflächen „lipid rafts“, aufgehoben werden. Diese Ergebnisse deuten auf einen völlig neuen „inside-out Signaling“-Mechanismus hin, mit der die maximale Zahl von aktivierbaren K<sup>+</sup>-Kanälen entweder über die Expression oder aber über die Palmitoylierung von NCAM140 bzw. NCAM180 reguliert werden kann. Eine mögliche physiologische Konsequenz dieses Regulationsmechanismus wäre, dass parallel zu einer Hochregulation der NCAM-Expression, zum Beispiel während der Ontogenese und der Festigung von synaptischen Kontakten, der elektrische Widerstand der Postsynapse aufgrund der reduzierten Anzahl von K<sup>+</sup>-Kanälen steigt und damit die Neurone bezüglich ihrer Transmission leichter erregbar werden. Die Ergebnisse zeigen damit zum ersten Mal auf molekularer Ebene auf, wie ein Zellerkennungsmolekül in die synaptischen Übertragungsprozesse eingreifen und damit so entscheidende Prozesse wie die synaptische Plastizität beeinflussen kann.