

Untersuchung der Funktion von Radixin bei der
synaptischen und extrasynaptischen Lokalisation von
GABA_A Rezeptoren im Nervensystem
von *Mus musculus* (Linnaeus, 1758)

Dissertation

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

vorgelegt von

Torben Johann Hausrat
aus Itzehoe

Hamburg

Juli 2011

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. M. KNEUSSEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. T. BURMESTER
Tag der Disputation: 20. August 2010

Hamburg, den 05. August 2010



A. Temming
Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| ZUSAMMENFASSUNG | 5 |
| 1 EINLEITUNG | 7 |
| 1.1 DAS ZENTRALNERVENSYSTEM DER SÄUGETIERE | 7 |
| 1.2 NEURONE | 9 |
| 1.2.1 EXZITATORISCHE SYNAPSEN | 12 |
| 1.2.2 INHIBITORISCHE SYNAPSEN | 15 |
| 1.2.3 ALPHA 5 ENTHALTENDE GABA _A -REZEPTOREN | 21 |
| 1.3 RADIXIN UND DIE ERM-PROTEINFAMILIE | 24 |
| 1.4 DIE FAMILIE DER RHOA-GTPASEN | 27 |
| 1.5 SYNAPTISCHE PLASTIZITÄT, LERNEN UND GEDÄCHTNIS | 30 |
| 1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT | 32 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 33 |
| 2.1 MATERIAL | 33 |
| 2.1.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME | 33 |
| 2.1.2 GERÄTE | 33 |
| 2.1.3 MEDIEN UND LÖSUNGEN | 34 |
| 2.1.4 TIERE | 38 |
| 2.1.5 ZELLINIEN | 38 |
| 2.1.6 BAKTERIENSTÄMME | 38 |
| 2.1.7 GRÖßENSTANDARDS | 39 |
| 2.1.8 REAKTIONSKOMPLETTAUSSTATTUNGEN | 39 |
| 2.1.9 ANTIKÖRPER | 40 |
| 2.1.10 VEKTOREN | 41 |
| 2.1.11 OLIGONUKLEOTIDE | 42 |
| 2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN | 42 |
| 2.2.1 TRANSFORMATION VON E. COLI | 42 |
| 2.2.2 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA | 43 |
| 2.2.3 BESTIMMUNG VON DNA-KONZENTRATION UND -REINHEIT | 43 |
| 2.2.4 FÄLLUNG VON DNA | 43 |
| 2.2.5 RESTRIKTIONSVERDAU VON PLASMID-DNA | 44 |
| 2.2.6 DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN | 44 |
| 2.2.7 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE | 44 |
| 2.2.8 AUFREINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN | 45 |
| 2.2.9 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN | 45 |
| 2.2.10 MUTAGENese UND POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) | 46 |
| 2.2.11 KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN | 46 |
| 2.2.12 DNA-SEQUENZIERUNG | 47 |
| 2.2.13 GENOTYPISIERUNG VON RADIXIN KNOCKOUT MÄUSEN MITTELS PCR | 47 |
| 2.3 PROTEINBIOCHEMIE | 49 |
| 2.3.1 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE | 49 |
| 2.3.2 WESTERN BLOT | 50 |
| 2.3.3 IMMUNDETEKTION | 50 |
| 2.3.4 PROTEINEXTRAKTE AUS TRANSFIZIERTEN HEK293TN-ZELLEN | 51 |
| 2.3.5 PROTEIN-EXPRESSION UND -EXTRAKTION AUS BAKTERIEN | 51 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 2.3.6 | GST-PULLDOWN | 52 |
| 2.3.7 | SYNAPTOSOMENPRÄPARATION | 53 |
| 2.4 | ZELLBIOLOGIE UND IMMUNZYTOCHEMIE | 54 |
| 2.4.1 | KULTUR VON HEK293TN-ZELLEN | 54 |
| 2.4.2 | PRÄPARATION UND KULTUR PRIMÄRER HIPPOKAMPALER NEURONE | 54 |
| 2.4.3 | IMMUNZYTOCHEMIE | 55 |
| 2.4.4 | TRANSFEKTION KULTIVierter ZELLEN | 56 |
| 2.4.5 | PHARMAKOLOGISCHE BEHANDLUNG VON PRIMÄREN HIPPOKAMPALEN NEURONEN | 57 |
| 2.4.6 | INDUKTION CHEMISCHER LTP UND LTD | 58 |
| 2.5 | VERHALTENSEXPERIMENTE | 59 |
| 2.5.1 | VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN | 59 |
| 2.5.2 | EXPERIMENTELLES DESIGN | 60 |
| 2.5.3 | AUFBAU UND ABLAUF DER VERHALTENSEXPERIMENTE | 61 |
| 2.6 | QUANTITATIVE ANALYSE UND STATISTIK | 69 |
| 2.6.1 | WESTERN BLOT SIGNALINTENSITÄTEN | 69 |
| 2.6.2 | IHC KOLOKALISATION UND CLUSTERGRÖßEN | 69 |
| 2.6.3 | VERHALTENSANALYSEN | 71 |
| 3 | ERGEBNISSE | 72 |
| 3.1 | LOKALISATION DER GABA _A R α5 UNTEREINHEIT NACH DER EXPRESSION VON RADIXIN MUTANTEN | 72 |
| 3.2 | EINFLUSS VON RHO-GTPASEN AUF DIE PHOSPHORYLIERUNG DER ERM-PROTEINE UND DIE LOKALISATION VON GABA _A R α5 | 74 |
| 3.3 | EINFLUSS DER PHOSPHORYLIERUNG VON RADIXIN AUF DESSEN LOKALISATION | 76 |
| 3.4 | EINFLUSS VON RHO-KINASEN AUF DIE SYNAPTISCHE LOKALISATION VON GABA _A R α5 | 80 |
| 3.5 | ANALYSE EINER RADIXIN <i>KNOCKOUT</i> MAUSLINIE HINSICHTLICH DER SYNAPTISCHEN LOKALISATION VON GABA _A R α5 | 83 |
| 3.6 | EINFLUSS NEURONALER AKTIVITÄT AUF DIE PHOSPHORYLIERUNG DER ERM-PROTEINE | 86 |
| 3.7 | VERHALTENSANALYSE EINER RADIXIN <i>KNOCKOUT</i> MAUSLINIE | 89 |
| 3.7.1 | VERHALTEN IM <i>OPEN FIELD</i> UND <i>ELEVATED PLUS MAZE</i> | 90 |
| 3.7.2 | MOTOR-KOORDINATION, BALANCE UND MOTOR-STÄRKE | 92 |
| 3.7.3 | VERHALTEN IM <i>MORRIS WATER MAZE</i> | 94 |
| 3.7.4 | VERHALTEN IM <i>TRACE FEAR CONDITIONING</i> | 100 |
| 4 | DISKUSSION | 103 |
| 4.1 | REGULATION UND EINFLUSS DER INTERAKTION VON RADIXIN MIT GABA _A R α5 AUF DESSEN SYNAPTISCHE LOKALISATION | 104 |
| 4.2 | <i>IN VIVO</i> ANALYSE DER FUNKTION VON RADIXIN BEZÜGLICH DER SYNAPTISCHEN LOKALISATION VON GABA _A R α5 | 110 |
| 4.3 | EINFLUSS NEURONALER AKTIVITÄT AUF DIE AKTIVIERUNG VON RADIXIN | 112 |
| 4.4 | AUSWIRKUNGEN AUF DAS VERHALTEN VON <i>MUS MUSCULUS</i> NACH DER DEPLETION VON RADIXIN | 115 |
| 4.5 | MODELL DER RADIXIN-ABHÄNGIGEN SYNAPTISCHEN BZW. EXTRASYNAPTISCHEN LOKALISATION VON GABA _A R α5 | 121 |
| 4.6 | AUSBlick | 124 |
| | LITERATURVERZEICHNIS | 126 |

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| ANHANG | 142 |
| A | ABBILDUNGSVERZEICHNIS |
| B | TABELLENVERZEICHNIS |
| C | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS |
| D | EINHEITEN |
| E | PRÄFIXE |
| F | WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG |
| G | PUBLIKATIONEN |
| H | DANKSAGUNG |

Zusammenfassung

Die schnelle synaptische Inhibition im Gehirn von Säugetieren wird hauptsächlich von GABA_A-Rezeptoren (GABA_AR) vermittelt. Die Bindung des Liganden GABA an den heteropentameren Rezeptor führt zur Öffnung dessen Ionenkanals und erhöht die Permeabilität der Plasmamembran für Chlorid-Ionen. Verschiedene Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors weisen im Gehirn zeitlich und räumlich unterschiedliche Expressionsmuster auf. GABA_AR, welche über die α 5-Untereinheit verfügen (GABA_AR α 5), werden vorwiegend im Hippokampus exprimiert und sind hauptsächlich an extrasynaptischen Bereichen der Plasmamembran lokalisiert. Hier vermitteln GABA_AR α 5 eine tonische (langsame) Inhibition. Die Depletion der α 5-Untereinheit in Mäusen führte zu einem verbesserten Lernen bei Hippokampus-abhängigen Verhaltensweisen.

Radixin gehört zur Familie der ERM-Proteine, deren Mitglieder über eine FERM-Domäne an die Plasmamembran sowie über eine F-Aktin-Bindestelle an das F-Aktin-Zytoskelett binden können. Die Aktivierung der ERM-Proteine erfolgt nach ihrer Bindung an die Plasmamembran über eine sich anschließende C-terminale Phosphorylierung, bei der kleine GTPasen eine Rolle spielen könnten. Kürzlich wurde eine direkte Interaktion von Radixin mit der α 5-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors beschrieben. Radixin scheint dabei für eine Verankerung von GABA_AR α 5 in extrasynaptischen Bereichen der Plasmamembran verantwortlich zu sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der molekulare Mechanismus sowie die physiologische Relevanz der Radixin vermittelten extrasynaptischen Verankerung von GABA_AR α 5 untersucht werden. Dafür sollte erstmalig das Verhalten einer Radixin *Knockout* Mauslinie hinsichtlich der Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung charakterisiert werden.

Durch die Verwendung von dominant negativen und konstitutiv aktiven RhoGTPasen sowie einem spezifischen Inhibitor gegen die Rho-abhängige Kinase (ROCK) konnte gezeigt werden, dass ein Mechanismus zur gezielten

Regulation der Bindung von Radixin an die $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_AR existiert. Dabei führte die Expression von dominant negativem RhoA zu einer verringerten Phosphorylierung von Radixin sowie zu einem Anstieg der synaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$. Mutationsstudien von Radixin zeigten, dass die Phosphorylierung eines C-terminalen Threoninrests für die Bindung von Radixin an GABA_AR $\alpha 5$ essentiell ist. Abhängig vom Phosphorylierungszustand Radixins wurde hierbei eine entweder vorwiegend synaptische oder extrasynaptische Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ beobachtet. Des Weiteren konnte die Bedeutung von Radixin für die Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ durch die Untersuchung einer Radixin *Knockout* Mauslinie bestätigt werden. Dabei führte die Depletion von Radixin zu einem Anstieg der synaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine chemische Induktion von Langzeitpotenzierung (LTP) Einfluss auf die Phosphorylierung von Radixin nimmt und damit die Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ beeinflussen kann.

Da LTP mit Lernen und der Gedächtnisbildung in Verbindung gebracht wird, wurden Verhaltensanalysen mit der Radixin *Knockout* Mauslinie durchgeführt. Hierbei konnte im Hippokampus-abhängigen *trace fear conditioning* sowie im *Morris water maze* ein verändertes Lernen der Radixin *Knockout* Mäuse im Vergleich zur wildtypischen Kontrollgruppe festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass über ein extrasynaptisches Ankerprotein neben dem Anteil von Neurotransmitter-Rezeptoren in extrasynaptischen Bereichen, auch der Anteil in synaptischen Bereichen der Plasmamembran gesteuert werden kann. Die Aktivierung von Radixin und die Bindung zu GABA_AR $\alpha 5$ scheint über RhoGTPasen und ROCK in Abhängigkeit neuronaler Aktivität reguliert zu sein. Dies könnte einen neuen Mechanismus für die Modulation der GABAergen synaptischen Plastizität darstellen und eine Rolle bei bestimmten Lernprozessen spielen.

1 Einleitung

1.1 Das Zentralnervensystem der Säugetiere

Das Nervensystem bezeichnet die Gesamtheit eines Organsystems, bestehend aus unterschiedlichen Nerven- und Gliazellen in einem Organismus, und dient der Erfassung, Weiterleitung, Auswertung und Speicherung von Informationen aus der Umwelt oder dem Organismus selbst. Anatomisch lässt sich das Nervensystem der Wirbeltiere in das periphere Nervensystem (PNS) und das Zentralnervensystem (ZNS) unterteilen, wobei sich diese Bereiche auf funktioneller Ebene durchaus überschneiden können. Das PNS wird durch alle peripheren Nerven außerhalb des Rückenmarks und des Gehirns gebildet und lässt sich funktionell weiter in das somatische Nervensystem und das autonome oder vegetative Nervensystem unterteilen. Ersteres ist für die bewusste Aufnahme von Reizen sowohl aus der Umwelt, als auch aus dem Organismus selbst verantwortlich, wobei Letzteres für die unbewusste Steuerung und Regulation wie Herzschlag, Atmung, Blutdruck, Verdauung und Stoffwechsel im Organismus zuständig ist. Das ZNS besteht aus dem Rückenmark und dem Gehirn, das bei Säugetieren in Medulla oblongata (Nachhirn), Pons (Brücke), Cerebellum (Kleinhirn), Mesencephalon (Mittelhirn), Diencephalon (Zwischenhirn) und Telencephalon (Großhirn) gegliedert ist (Kandel *et al.*, 2000).

Das Kleinhirn, welches unter anderem mit den Muskeln und den Gleichgewichtsorganen in Verbindung steht, bildet das Zentrum für Haltungs- und Bewegungskoordinationen. Den größten Abschnitt des Gehirns bildet das Großhirn, bestehend aus den zwei stark gefalteten und gewundenen Hemisphären, die über das Corpus callosum (Brücke) miteinander verbunden sind. Weitere Bestandteile der Hemisphären sind neben anderen die Großhirnrinde, welche die Integration von sensorischen und motorischen Informationen übernimmt und die Amygdala, welche an autonomen und endokrinen Reaktionen in Verbindung mit emotionalen Zuständen beteiligt ist. Jede Hemisphäre besitzt des Weiteren einen Hippokampus. In diesem Bereich fließen Informationen verschiedener sensorischer Systeme

zusammen, die hier verarbeitet und dann zurück zur Großhirnrinde geleitet werden (Kandel *et al.*, 2000). Damit stellt der Hippokampus ein sehr wichtiges Schaltzentrum dar, welches als essentiell für die Konsolidierung von Erinnerung angesehen wird und damit der Übertragung von Informationen des Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis dient (Wang & Morris 2010). Menschen, bei denen der Hippokampus entfernt oder zerstört wurde, sind nicht mehr in der Lage, neue Erinnerungen zu generieren, alte Erinnerungen bleiben aber meistens erhalten. Diese Form des Gedächtnisverlusts wird als anterograde Amnesie bezeichnet (Milner 1959). Der Hippokampus wird somit als eine Struktur verstanden, die Erinnerungen generiert, während die Gedächtnisinhalte in anderen Bereichen der Großhirnrinde gespeichert werden (Wang & Morris 2010).

Im Nervensystem lassen sich zwei Zelltypen grundlegend voneinander unterscheiden. Zum einen handelt es sich um Neurone, welche hauptsächlich auf die elektrische Signalweiterleitung spezialisiert sind und detailliert im nächsten Kapitel angesprochen werden, zum anderen um die Gliazellen. Das Nervensystem enthält, abhängig von der Region, 10 bis 50 mal mehr Gliazellen als Neurone. In der Vergangenheit wurde den Gliazellen, die sich in Mikroglia und Makroglia aufteilen, hauptsächlich eine unterstützende Funktion zugesprochen, nicht aber eine direkte Beteiligung an der neuronalen Signalweiterleitung. Makroglia lassen sich weiter in Oligodendrozyten und Schwann-Zellen unterteilen, die zum Beispiel die isolierende Myelinschicht der Axone von Neuronen produzieren, und in Astrozyten, die an der Nährstoffversorgung der Neurone und der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind (Kandel *et al.*, 2000). Jüngere Forschungen auf diesem Gebiet deuten allerdings darauf hin, dass auch Gliazellen eine funktionelle Rolle bei der eigentlichen Signaltransduktion spielen können. So konnte speziell für Astrozyten gezeigt werden, dass sie zwar selbst keine Neurotransmitter wie zum Beispiel GABA synthetisieren können, diese aber aus dem extrazellulären Raum über spezifische Transporter aufnehmen und auch wieder ausschütten können und so zur Modulation der Signalweiterleitung an der Synapse beitragen (Heja *et al.*, 2009).

1.2 Neurone

Neurone stellen die funktionelle Grundeinheit des Nervensystems dar. Das menschliche Gehirn besteht aus etwa 10^{11} Nervenzellen, die durch 10^{14} Synapsen miteinander verbunden werden und so ein sehr komplexes Netzwerk bilden, durch welches wir in der Lage sind, bewusst und unbewusst auf unterschiedlichste Reize aus unserer Umwelt zu reagieren (Squire *et al.*, 2008). Wie zum Beispiel im Fall der Motoneurone, welche die Verbindung zwischen dem Rückenmark und den Muskeln herstellen, müssen für die Signalübertragung oft sehr weite Strecken überbrückt werden. Daher weisen Neurone überwiegend eine stark polarisierte Morphologie auf. Auch wenn eine Vielzahl unterschiedlicher Neurone existieren, ist der Grundbauplan und Aufbau sehr einheitlich. Neurone bestehen aus einem Zellkörper (Soma), welcher den Zellkern und weitere Organellen für den Großteil der Proteinsynthese beinhaltet und mehreren, unterschiedlich langen Zellfortsätzen, den Neuriten. Diese unterteilen sich in der Regel in ein Axon, welches für die elektrische Signalweiterleitung verantwortlich ist, und mehrere Dendriten auf, die wiederum Signale von den Axonen anderer Neurone empfangen. Das Axon ist häufig lang und kann die Signale über weite Strecken an unterschiedliche Zielorte weiterleiten. Die Dendriten sind oft kürzer, aber stärker verzweigt und bilden einen sogenannten Dendritenbaum aus, der auf den Empfang von Signalen spezialisiert ist.

Ein Hauptcharakteristikum der Neurone ist ihre elektrische Erregbarkeit und ihre Fähigkeit, elektrische Signale über weite Strecken zu leiten (Siegel und Sapru, 2006). Diese Erregbarkeit beruht auf dem Vorhandensein eines Membranpotentials, was auf die unterschiedliche Ionenkonzentration an der Innen- und Außenseite der Plasmamembran zurückzuführen ist. Aufrechterhalten wird dieses Potential durch die Plasmamembran, die als semipermeable Barriere fungiert, und dem aktiven Transport von Ionen mittels Ionen-Pumpen über diese. Unter Ruhebedingungen liegt das Membranpotential bei ca. -65 mV und wird als Ruhepotential bezeichnet. Durch ein eingehendes chemisch oder elektrisch erzeugtes Signal kommt es zur Öffnung von spannungsabhängigen Ionenkanälen und damit zu einer lokalen Depolarisation des Membranpotentials. Falls ein bestimmter

Schwellenwert des Potentials überschritten wird, öffnen sich in benachbarten Bereichen ebenfalls spannungsabhängige Ionenkanäle, wodurch das Signal nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ in Form eines Aktionspotentials weitergeleitet wird. Anschließend wird das Ruhepotential durch den aktiven Transport von Ionen über die Plasmamembran wieder hergestellt (Kandel *et al.*, 2000).

Ein weiteres Hauptcharakteristikum der Neurone ist ihre Fähigkeit, die oben angesprochenen Signale an andere Neurone über spezielle Zell-Zell-Kontakte, die sogenannten Synapsen, weiterzuleiten, also miteinander zu kommunizieren. Dies wird als synaptische Transmission bezeichnet. Hierbei unterscheidet man zwischen der elektrischen und der chemischen synaptischen Transmission (Purves *et al.*, 2008).

Elektrische Synapsen bestehen aus einer direkten Verbindung zwischen dem Zytosol der präsynaptischen und der postsynaptischen Zelle, die als *Gap-junction* bezeichnet wird. Hierbei bilden sechs gleichförmige Proteine, genannt Connexine, auf beiden Seiten innerhalb der Plasmamembran einen Kanal, genannt Connexon. Diese Form der Signaltransmission ist mit $<0,1$ ms sehr schnell und erfolgt sowohl unidirektional, als auch bidirektional.

An der chemischen Synapse hingegen besteht keine direkte Verbindung zwischen der prä- und postsynaptischen Membran, vielmehr werden sie durch einen kleinen Zwischenraum von 20-50 nm Größe, den synaptischen Spalt, voneinander getrennt (Purves *et al.*, 2008). Die Struktur einer chemischen Synapse ist in Abbildung 1.1 vereinfacht dargestellt. Die präsynaptische Endigung enthält mehrere tausend Vesikel, die einen oder mehrere spezifische Neurotransmitter enthalten und charakteristisch für die unterschiedlichen Synapsen im Nervensystem sind. Bei der Signalübertragung führt ein eingehender elektrischer Reiz (Aktionspotential) an der präsynaptischen Endigung zur Depolarisation der Plasmamembran, was zu der Öffnung spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle in der präsynaptischen Plasmamembran führt.

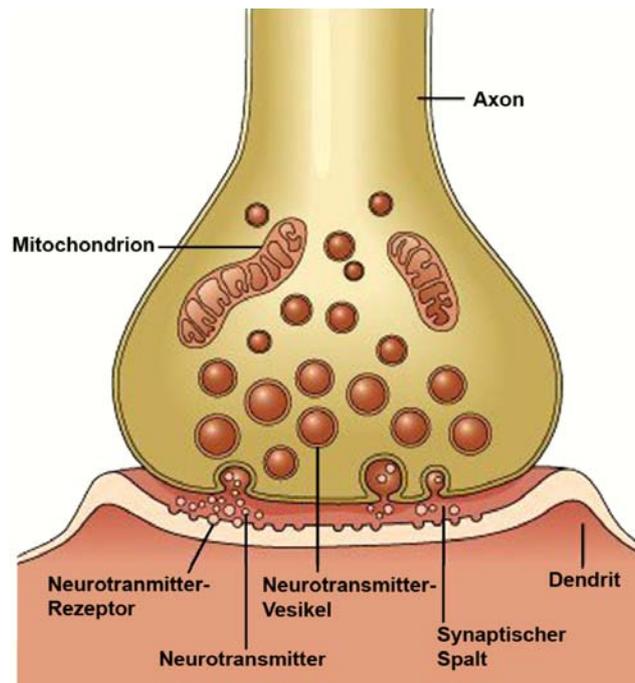


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einer chemischen Synapse. Die präsynaptische Endigung mit den Neurotransmitter-Vesikeln ist von der postsynaptischen Membran mit den Neurotransmitter-Rezeptoren durch den synaptischen Spalt getrennt. Ein eingehendes Aktionspotential über das Axon führt zur Fusion der Neurotransmitter-Vesikel mit der präsynaptischen Membran und dadurch zur Freisetzung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt. Über Diffusion gelangen Neurotransmitter zur postsynaptischen Membran, wo sie an Neurotransmitter-Rezeptoren binden können. Hierdurch können Ionenkanäle geöffnet werden, wodurch es zu einer Verschiebung des postsynaptischen Membranpotentials kommt. (Veränder nach „universe review“, 2010).

Aufgrund eines Konzentrationsgradienten von Ca^{2+} (extrazellulär: 10^{-3} M; intrazellulär: 10^{-7} M) kommt es zu einem Einstrom von Ca^{2+} in die präsynaptische Endigung und damit zu einer vorübergehenden Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dies wiederum führt in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration zur Fusion von Neurotransmitter-Vesikeln mit der präsynaptischen Plasmamembran und damit zu einer Ausschüttung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt. Nach der Exozytose diffundieren die Neurotransmitter in dem synaptischen Spalt und binden spezifisch an Neurotransmitter-Rezeptoren in der Plasmamembran des postsynaptischen Neurons. Die Bindung der Neurotransmitter an diese Rezeptoren führt zur Öffnung bzw. Schließung von Ionenkanälen, wodurch der Ionenfluss über die postsynaptische Plasmamembran moduliert wird. Diese Ionenkanäle werden als ligandenabhängige Kanäle bezeichnet, im Gegensatz zu spannungsabhängigen Kanälen, deren Öffnungszustand durch eine

unterschiedliche Spannung reguliert wird. Der veränderte Ionenfluss moduliert das Membranpotential des postsynaptischen Neurons, wobei die Wahrscheinlichkeit eines postsynaptischen Aktionspotentials erniedrigt bzw. erhöht wird. Das zuvor elektrische Signal wird bei der Übertragung in ein chemisches Signal umgewandelt, welches mit 0,3 ms im Vergleich zu der rein elektrischen Transmission zwar langsamer ist, aber vielfältigere Möglichkeiten zur Modulation der Signalübertragung, zum Beispiel der Signalstärke oder Signalspezifität bietet. Die synaptische Transmission im Nervensystem kann entweder erregend (exzitatorisch) oder hemmend (inhibitorisch) wirken. Dies hängt nicht vom Neurotransmitter des präsynaptischen Neurons ab, sondern von der Spezialisierung der postsynaptischen Membran, das heißt den dort vorhandenen Neurotransmitter-Rezeptoren und Ionenkanälen (Wehner und Gehring, 1995). In den nächsten Kapiteln wird der Aufbau und die Funktion der exzitatorischen bzw. inhibitorischen Synapse genauer erläutert.

1.2.1 Exzitatorische Synapsen

Exzitatorische Synapsen werden aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie oft auch als asymmetrische Synapsen bezeichnet. Die Präsynapse wird dabei von axonalen Erweiterungen gebildet. Im Elektronenmikroskop lassen sich innerhalb dieser einheitlich runde Neurotransmitter-Vesikel mit einem Durchmesser von etwa 50 nm erkennen. Die Postsynapse ist in der Regel auf dendritischen Zellfortsätzen (*Spines*) lokalisiert, die ebenfalls eine elektronendichte Struktur, die so genannte postsynaptische Dichte (PSD), besitzen. Beide Seiten weisen eine hohe Spezialisierung der Plasmamembran und des darunterliegenden Zytoskeletts auf (Gundelfinger & Tom Dieck 2000).

Einer der am häufigsten vorkommenden erregenden Neurotransmitter im ZNS neben Aspartat, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin ist Glutamat (Siegel und Sapru, 2006). Nach der Exozytose auf der Präsynapse bindet Glutamat an spezifische Glutamatrezeptoren in der Postsynapse. Letztere lassen sich in metabotrope und ionotrope Rezeptoren unterteilen. Die Transmitter-

Rezeptor-Bindung von metabotropen (G-Protein-gekoppelten) Rezeptoren führt zunächst zur Aktivierung eines trimären Guanosintriphosphat (GTP)-bindenden Proteins (G-Protein). Das aktivierte G-Protein führt dann entweder direkt zur Öffnung eines Ionenkanals oder verändert über Enzymregulation die Konzentration intrazellulärer sekundärer Botenstoffe wie zum Beispiel des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP), die dann ihrerseits den Öffnungszustand von Ionenkanälen beeinflussen (Wehner und Gehring, 1995). Die ionotropen Glutamatrezeptoren gliedern sich aufgrund ihrer Agonisten in AMPA-, NMDA- und Kainat-Rezeptoren. Im Gegensatz zu den metabotropen Glutamatrezeptoren sind die ionotropen Glutamatrezeptoren selbst Teil des Ionenkanals und vermitteln daher eine schnellere synaptische Transmission (Newpher & Ehlers 2009).

AMPA-Rezeptoren bestehen aus jeweils vier Untereinheiten, die Homo- oder Heterotetramere bilden und als GluR1 bis GluR4 bezeichnet werden. Unter anderen sind sie für die schnelle erregende Transmission im Gehirn verantwortlich (Greger *et al.*, 2007). Die Bindung von Glutamat führt zu der Öffnung des Ionenkanals und dem Einstrom von Na^+ sowie dem Ausstrom von K^+ , was zu einer Depolarisation des Neurons führt. AMPA-Rezeptoren reagieren oft als erstes auf präsynaptisch freigesetztes Glutamat, die Anzahl der Rezeptoren steht hierbei in einem direkten Zusammenhang zu der Stärke des postsynaptisch erzeugten Signals, welches die Wahrscheinlichkeit eines Aktionspotentials beeinflusst (Malinow & Malenka 2002).

NMDA-Rezeptoren sind ebenfalls Heterotetramere, bestehend aus zwei NR1-Untereinheiten, sowie aus zwei der vier unterschiedlichen NR2-Untereinheiten (Kohr 2006). Wie die AMPA-Rezeptoren sind sie für erregende postsynaptische Potentiale verantwortlich und besitzen drei individuelle Merkmale: (i) Der Rezeptor steuert die Öffnung eines Ionenkanals, der sowohl für Ca^{2+} , als auch für Na^+ und K^+ durchlässig ist. (ii) Für die Öffnung des Kanals wird extrazelluläres Glyzin als Co-Faktor benötigt. (iii) Außerdem hängt die Öffnung sowohl von der Bindung des Neurotransmitters, als auch von dem Potential der Plasmamembran ab. Es handelt sich also um eine Kombination aus einem ligandenabhängigen und spannungsabhängigen Kanal, der sich erst nach der erfolgten Depolarisation durch AMPA-Rezeptoren und der anschließenden Bindung von Glutamat öffnet. Die

Depolarisation führt hierbei zur Verdrängung eines Magnesium-Ions aus der Kanalpore und gibt diese für die oben genannten Ionen frei (Kandel *et al.*, 2000). Zusätzlich zu der Depolarisierung führt die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren durch den Einstrom von Ca^{2+} zur Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Enzymen, wie der Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase-II (CaMKII), was zu einer veränderten Genexpression und damit zu langanhaltenden Veränderungen in der Synapse führen kann (Bayer *et al.*, 2001). Diese Prozesse werden genauer in Kapitel 1.5 angesprochen.

Kainat-Rezeptoren sind im Vergleich zu AMPA- und NMDA-Rezeptoren insgesamt weniger gut charakterisiert. Fünf unterschiedliche Untereinheiten (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 und KA2) bilden sowohl Homo-, als auch Heterotetramere (Pinheiro & Mülle 2006). Der daraus gebildete Kanal ist durchlässig für Na^+ und K^+ und öffnet sich wie bei den AMPA-Rezeptoren nach der Bindung von Glutamat. Bislang wird vermutet, dass Kainat-Rezeptoren einen geringeren Einfluss auf die erregende synaptische Transmission sowie auf die Modulation der Synapse haben als AMPA- und NMDA-Rezeptoren.

Glutamat-Rezeptoren sind auf Dendriten und hier 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, welche unter anderem die PSD beinhalten. Diese stellt ein komplexes filamentöses Proteinnetzwerk direkt unterhalb der postsynaptischen Plasmamembran dar, durch das unter anderem Neurotransmitter-Rezeptoren an der Postsynapse konzentriert werden (Kim & Sheng 2004; Sheng & Hoogenraad 2007; Tada & Sheng 2006). Eines der am besten untersuchten Proteine innerhalb der PSD ist PSD-95 (*postsynaptic density protein-95*). Durch dessen Fähigkeit, einerseits Homodimere zu bilden und andererseits gleichzeitig an Zelladhäsionsmoleküle wie Neuroligin und den NMDA-Rezeptor zu binden, fungiert es als ein wichtiges Gerüstprotein innerhalb der PSD (Kim *et al.*, 1995; Kim & Sheng 2004; Niethammer *et al.*, 1996). Über Interaktionen mit GKAP (Guanylatkinase-assoziiertes Protein), Shank und Cortactin werden außerdem Verbindungen mit dem Filamentösen-(F)-Aktin-Zytoskelett hergestellt (Naisbitt *et al.*, 1999). Hinzu kommen Enzyme, wie die oben angesprochene CamKII, die für intrazelluläre Signalwege ein wichtige

Rolle spielen (Suzuki *et al.*, 1994). So entsteht auf der einen Seite ein stabiles Proteinnetzwerk, das eine lang anhaltende synaptische Transmission gewährleisten kann, auf der anderen Seite jedoch hoch dynamisch ist und in der Zusammensetzung moduliert werden kann.

1.2.2 Inhibitorische Synapsen

Die Struktur und der Aufbau der inhibitorischen Synapsen unterscheiden sich grundlegend von den exzitatorischen Synapsen, sodass sie auf Ebene der Elektronenmikroskopie meist anhand der Morphologie unterschieden werden können. Dabei weist der synaptische Spalt eine geringere Breite von ca. 20 nm auf und die Anzahl der Neurotransmitter-Vesikel ist geringer. Auch die elektronendichten Strukturen auf der Prä- und Postsynapse sind insgesamt weniger ausgeprägt und einander ähnlicher als bei den exzitatorischen Synapsen, weshalb sie oft auch als symmetrische Synapsen bezeichnet werden (Gray 1959). Innerhalb des Neurons sind inhibitorische Synapsen überwiegend direkt am Soma oder am Schaft von Dendriten lokalisiert (Nusser & Somogyi 1997).

Die schnelle synaptische Transmission von inhibitorischen Synapsen im ZNS wird hauptsächlich durch γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glyzin vermittelt. Beide Neurotransmitter binden an und aktivieren darauf unterschiedliche Neurotransmitter-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran, die permeabel für Cl⁻-Ionen sind (Moss & Smart 2001). Die Synthese von Glyzin erfolgt aus Serin durch eine Mitochondrien-spezifische Isoform der Serin-Transhydroxymethylase (Hyland 1999). Der Transport von Glyzin in präsynaptische Neurotransmitter-Vesikel erfolgt anschließend über einen vesikulären inhibitorischen Aminosäuretransporter (VIAAT) (Gasnier 2000). Nach der Endozytose wird es wieder über einen spezifischen Glyzintransporter aus dem synaptischen Spalt entfernt und kann recycelt werden. Bei den Glyzin-Rezeptoren handelt es sich um eine Klasse von heteropentameren ligandengesteuerten Ionenkanälen. Jede Untereinheit besitzt einen langen extrazellulären Amino-(N)-terminalen Abschnitt, vier

Transmembran-(TM)-Domänen mit einer größeren intrazellulären Schleife zwischen der Transmembrandomäne(TM)3 und TM4 und einem kurzen extrazellulären Carboxy-(C)-terminalen Abschnitt (Unwin 1998). Jeweils drei von vier bekannten α -Untereinheiten zusammen mit zwei β -Untereinheiten (bisher eine bekannte Isoform) bilden einen Rezeptor, wobei auch funktionelle Homomere aus fünf α -Untereinheiten beschrieben wurden (Betz *et al.*, 1999). Die Bindung von Glyzin an den Rezeptor führt zu der Öffnung des Kanals und im adulten Organismus zum Einstrom von Cl^- -Ionen, wodurch es zu einer Hyperpolarisierung des postsynaptischen Membranpotentials kommt. Damit wirkt der Glyzin-Rezeptor inhibierend und die Wahrscheinlichkeit eines Aktionspotentials wird herabgesetzt.

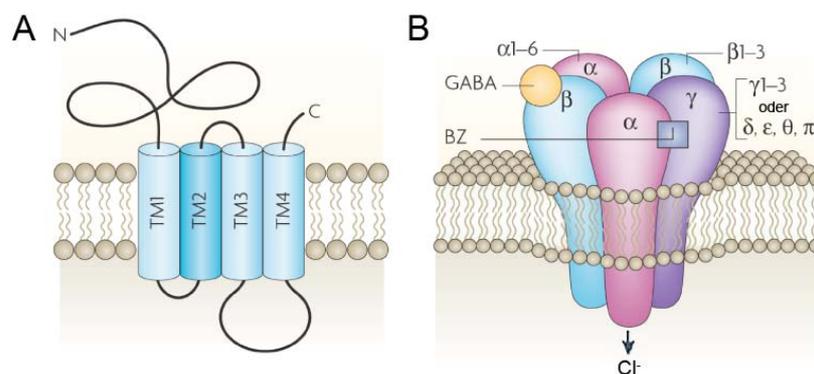


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus der GABA_A-Rezeptoren. (A) Rezeptoruntereinheiten bestehen aus vier hydrophoben Transmembrandomänen (TM1-TM4) Am extrazellulären N-Terminus binden sowohl der Agonist GABA, als auch allosterische Modulatoren wie Benzodiazepame (BZ). Zwischen der TM3 und TM4 befindet sich eine lange intrazelluläre Schleife, an welcher die Proteininteraktionen, aber auch posttranslationale Modifikationen des Rezeptors stattfinden. (B) Fünf Untereinheiten aus sieben Untereinheiten-Klassen (α , β , γ , δ , ϵ , θ , π) bilden einen heteropentameren Kanal, der durchlässig für Cl^- -Ionen ist. Die Bindestelle für Neurotransmitter befindet sich zwischen den α - und β -Untereinheiten und steuert die Öffnung des Kanals und den Einstrom der Ionen. Die BZ-Bindestelle liegt zwischen einer $\alpha(1,2,3$ oder $5)$ - und der γ -Untereinheit. Die Bindung von BZ führt zur Potenzierung des GABA_AR-vermittelten Ioneneinstroms. (Verändert nach Jacob *et al.*, 2008).

Die Synthese von GABA erfolgt aus Glutamat, das als ein Stoffwechselprodukt der Glukose im Zitratzyklus entsteht. Das Enzym Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD), welches spezifisch in GABAergen Neuronen exprimiert wird, katalysiert die Umwandlung von Glutamat zu GABA (Watanabe *et al.*, 2002). Nach der Synthese wird GABA wie Glyzin über VIAAT in Neurotransmitter-Vesikel transportiert und nach der Exozytose über spezifische GABA-Transporter (GAT) aus dem synaptischen Spalt entfernt. Daraufhin wird es entweder recycelt und steht für die erneute synaptische Transmission zur Verfügung oder wird über die Umwandlung zu Succinat dem Zitratzyklus zugeführt, wo es für die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) verwendet werden kann (Hyland 1999).

GABA-Rezeptoren (GABAR) können in zwei Klassen ionotroper GABA-Rezeptoren ($GABA_A$ R und $GABA_C$ R) und einer Klasse metabotroper GABA-Rezeptoren ($GABA_B$ R) unterteilt werden (Jacob *et al.*, 2008).

Generell kann in Abhängigkeit der Lokalisation der GABA-Rezeptoren zwischen einer schnellen sogenannten phasischen Inhibition und einer langsamen sogenannten tonischen Inhibition unterschieden werden. Erstere wird durch synaptisch lokalisierte Rezeptoren vermittelt, die aufgrund eines transienten (Millisekunden) Anstiegs der GABA-Konzentration durch die Exozytose des Neurotransmitters an der Synapse aktiviert werden. Letztere wird durch extrasynaptische Rezeptoren vermittelt, die aufgrund der extrazellulären GABA-Konzentration ständig aktiviert werden und so eine dauerhafte GABAergen Inhibition vermitteln (Cope *et al.*, 2005; Staley & Huguenard 2006).

$GABA_A$ R sind für die erste (frühe) Phase der synaptischen Inhibition in ZNS verantwortlich. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt und weist eine hohe Homologie zu den Glyzin-Rezeptoren auf. Bis heute sind insgesamt achtzehn $GABA_A$ R Untereinheiten bekannt, die sich in sieben Klassen mit mehreren Isoformen unterteilen: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ (1-3), θ und π . Damit ergibt sich theoretisch eine sehr große Diversität in der Zusammensetzung der $GABA_A$ -Rezeptoren, die meisten Rezeptoren setzen sich jedoch aus zwei α -Untereinheiten, zwei β -Untereinheiten und einer γ -Untereinheit zusammen (Jacob *et al.*, 2008). Die Bindestellen für den

endogenen Agonisten GABA werden durch die α - und eine β -Untereinheiten gebildet. Hinsichtlich der Zusammensetzung der Rezeptoren aus unterschiedlichen Untereinheiten zeigen GABA_AR große Unterschiede in ihren physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften sowie in der räumlichen und zeitlichen Expression innerhalb des Gehirns. Zum Beispiel sind Rezeptoren die aus α 1-, α 2-, α 3- oder α 5- zusammen mit β - und γ -Untereinheiten aufgebaut sind, sensitiv gegenüber Benzodiazepanen (Rudolph & Mohler 2004). Hierbei handelt es sich um pharmakologisch aktive Moleküle, die zwischen der α und γ Untereinheit an die Rezeptoren binden und physiologisch eine sedative und angstlösende Wirkung ausüben (Hagenbuch *et al.*, 2006). Bis auf α 5-Untereinheit-enthaltende Rezeptoren (siehe nachfolgendes Kapitel) sind GABA_AR aus den oben angesprochenen Untereinheiten hauptsächlich an Synapsen lokalisiert, wo sie für die phasische (schnelle) Inhibition im ZNS verantwortlich sind. Im Gegensatz hierzu sind Rezeptoren bestehend aus α 4, oder α 6 zusammen mit β und γ insensitiv gegenüber Benzodiazepanen und vermehrt extrasynaptisch lokalisiert, wo sie an der tonischen (langsamen) Inhibition beteiligt sind. Diese Form der tonischen inhibitorischen Transmission wird wahrscheinlich durch GABA_AR vermittelt, die außerhalb der Synapse in der Plasmamembran lokalisiert sind und nach Diffusion von GABA in extrasynaptische Bereiche aktiviert werden (Brunig *et al.*, 2002). Außerdem können Astrozyten hierbei eine Rolle spielen, da sie in der Lage sind, GABA über GAT aufzunehmen und unter Umständen auch wieder zu sezernieren, wodurch sie zur Modulation der Inhibition beitragen könnten (Hughes *et al.*, 2010; Lalo *et al.*, 2009). Zusätzlich zu den GABA_AR auf der Postsynapse existieren auch Arbeiten, die ihre Lokalisation auf der Präsynapse beschreiben. Diese GABA_AR scheinen an einer präsynaptischen Inhibition bzw. an der Endozytose von GABA-enthaltenden Neurotransmittervesikeln beteiligt zu sein (Draguhn *et al.*, 2008).

Zu beachten ist, dass GABA_AR in frühen Phasen der Entwicklung aufgrund einer hohen intrazellulären Cl⁻-Konzentration zuerst eine erregende synaptische Transmission vermitteln. Die Öffnung des Kanals führt hier zum Ausstrom von Cl⁻ und einer Depolarisierung der Plasmamembran,

wohingegen während späterer Entwicklungsphasen die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration sinkt und die Öffnung des Kanals zu einem Einstrom und damit zu einer Hyperpolarisierung der postsynaptischen Membran beiträgt. Die unterschiedliche Cl⁻-Konzentration lässt sich hierbei mit einer veränderten Expression von Ionen-Transportern erklären (Rivera *et al.*, 2005).

Die Zusammensetzung der Untereinheiten des GABA_AR wird nach der Translation am endoplasmatischen Retikulum festgelegt (Bollan *et al.*, 2003). Falsch gefaltete Rezeptoren werden ubiquityliert und über das Proteasom wieder degradiert (Arancibia-Carcamo *et al.*, 2009; Saliba *et al.*, 2007). Funktionelle heteropentamere Rezeptoren werden innerhalb von Vesikeln über einen Kinesin-vermittelten Transport entlang von Mikrotubuli zur Plasmamembran befördert (Smith *et al.*, 2006; Twelvetrees *et al.*, 2010). An der Plasmamembran erfolgt die Fusion der Vesikel und damit die Insertion des Rezeptors in extrasynaptischen Bereichen der Plasmamembran (Bogdanov *et al.*, 2006). Wie schon für die exzitatorische Synapse beschrieben, besitzt auch die inhibitorische Synapse ein der PSD vergleichbares Proteinnetzwerk unterhalb der Plasmamembran, das für die Bündelung und Konzentration von Proteinen an der Postsynapse zuständig ist (Arancibia-Carcamo & Moss 2006; Moss & Smart 2001). Jedoch ist diese Struktur im Vergleich zur PSD bisher weniger genau untersucht und sie zeigt überdies einen einfacheren Aufbau. Als essentielles Protein der inhibitorischen postsynaptischen Spezialisierung wird Gephyrin angesehen (Tyagarajan & Fritschy 2010). Dabei handelt es sich um ein Protein, welches zuerst als direkter Bindepartner von Glyzin-Rezeptoren identifiziert wurde (Meyer *et al.*, 1995; Pfeiffer *et al.*, 1982). RNA-Interferenz (RNAi) und Gen-*Knockout* Experimente von *Gphn* (codierendes Gen für Gephyrin) zeigten eine diffuse Verteilung von GABA_AR in der Plasmamembran, wobei der Gesamtanteil der Rezeptoren und dessen inhibitorische postsynaptische Potentiale nicht verändert zu sein schienen (Kneussel *et al.*, 1999; Levi *et al.*, 2004). Ferner führte die Depletion der γ 2-Untereinheit zu einem Verlust der Gephyrin Aggregate in der postsynaptischen Plasmamembran (Essrich *et al.*, 1998). Obwohl Gephyrin eine Funktion in der Bündelung von GABA_AR hat, zeigen bisher nur wenige Arbeiten eine direkte Interaktion zwischen Gephyrin und spezifischen GABA_AR Untereinheiten (Kirsch *et al.*, 1995; Tretter *et al.*,

2008). Ein mögliches Protein, welches sowohl an Gephyrin, als auch an die $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_AR binden kann, ist das GABA-Rezeptor-assoziierte Protein (GABARAP) (Wang *et al.*, 1999). Indem es die γ -Untereinheit mit Gephyrin verbindet, könnte es als Adaptorprotein fungieren. Jedoch hatte die Depletion von GABARAP keine Auswirkung auf die Formation von GABA_AR Clustern (Kneussel *et al.*, 2000) und könnte vielmehr an dem Transport des Rezeptors vom Soma zur Plasmamembran beteiligt sein (Wang & Olsen 2000). Außerdem bindet Collybistin, ein Guanosindiphosphat (GDP)/GTP Austauschfaktor, der über die Aktivierung von Rho-GTPasen (siehe Kapitel 1.4) an der Regulation des F-Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist, an Gephyrin (Kins *et al.*, 2000). Eine Verbindung von Gephyrin zu F-Aktin könnte über Mena und VASP (*mammalian enabled*; *vasodilator-stimulated phosphoprotein*) und Profilin vermittelt werden, die sowohl an Gephyrin als auch F-Aktin binden können (Giesemann *et al.*, 2003; Mammoto *et al.*, 1998). Wie oben angesprochen, führt die Depletion von Gephyrin zu einer Auflösung der GABA_AR Cluster. Interessanterweise sind hierbei aber nicht alle GABA_AR betroffen, vielmehr zeigten speziell $\alpha 1$ und $\alpha 5$ enthaltende GABA_AR keine Veränderung der Clustergrößen (Kneussel *et al.*, 2001), was die Möglichkeit von weiteren Proteinen für die Bündelung der Rezeptoren offen lässt. Auf die spezielle Rolle der $\alpha 5$ -Untereinheit wird detailliert in Kapitel 1.2.3 eingegangen.

GABA_B-R sind Heterodimere aus je einer BR1- und BR2-Untereinheit, die hauptsächlich für die zweite (späte) Phase der inhibitorischen Transmission im ZNS verantwortlich sind. Die Bindung des Agonisten GABA führt zu der Hyperpolarisierung der postsynaptischen Membran durch Öffnung von K⁺-Kanäle. Parallel dazu wird die Wahrscheinlichkeit für die Neurotransmitterausschüttung auf der Präsynapse durch Inhibition von Ca²⁺-Kanälen herabgesetzt, was eine länger andauernde Inhibition im Vergleich mit GABA_AR vermittelt (Couve *et al.*, 2000).

GABA_CR werden hauptsächlich in der Retina exprimiert und bestehen aus fünf ρ -Untereinheiten, die einen homomeren Kanal ausbilden, welcher permeabel für Cl⁻ ist. Dies führt wie bei den GABA_AR zu einer schnellen (frühen) Hyperpolarisierung der postsynaptischen Plasmamembran, wodurch

die Wahrscheinlichkeit eines Aktionspotentials herabgesetzt wird. Hierbei ist die vermittelte Inhibition der GABA_CR aufgrund der längeren Öffnungszeit des Kanals und der höheren Sensitivität zu GABA aber lang anhaltender als im Vergleich mit GABA_A-Rezeptoren (Bormann & Feigenspan 1995).

Das diffizile Gleichgewicht zwischen Erregung und Inhibition wird anhand vieler neurologischer und psychologischer Krankheiten, die auf eine veränderte GABAerge Inhibition zurückgeführt werden (Krystal *et al.*, 2006; Lewis & Gonzalez-Burgos 2006; Rudolph & Mohler 2004), deutlich. Ein Beispiel ist Epilepsie, ein Krankheitsbild, bei dem es durch spontane und synchrone Erregungsbildung im Gehirn zu Krampfanfällen kommt. Sowohl Mausmodelle für Epilepsie, als auch Patienten zeigten einen reduzierten Anteil von GABA_AR an der Synapse, woraus eine geringere Inhibition resultierte (Benarroch 2007; Coulter 2001). Hinzu kommen genetische Untersuchungen, die mehrere Mutationen für $\alpha 1$, $\gamma 2$ und δ in Patienten mit Epilepsie identifizierten (Baulac *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2006; Maljevic *et al.*, 2006). Weitere Krankheiten, die mit GABA_A-R in Verbindung gebracht werden, sind Drogenabhängigkeit, Angstzustände und Schizophrenie, eine psychische Störung, bei der das Denken, die Wahrnehmung und Gemütsregung gestört ist (Krystal *et al.*, 2006; Lewis & Gonzalez-Burgos 2006; Rudolph & Mohler 2004).

1.2.3 Alpha 5 enthaltende GABA_A-Rezeptoren

Im vorangegangenen Kapitel wurden vor allem synaptische GABA_AR angesprochen, die für die schnelle phasische Inhibition verantwortlich sind. Rezeptoren, welche die δ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ - und $\alpha 6$ -Untereinheit enthalten, sind hauptsächlich extrasynaptisch lokalisiert und wie es scheint, vor allem an der tonischen Inhibition beteiligt (Belelli *et al.*, 2009). Die Expression von GABA_AR $\alpha 5$ im Gehirn ist verhältnismäßig gering und auf bestimmte Hirnregionen beschränkt. Insgesamt verfügen nur ca. 5% aller GABA_AR im Gehirn über die $\alpha 5$ -Untereinheit. Im Gegensatz hierzu beinhalten 25% der GABA_AR im Hippokampus die $\alpha 5$ -Untereinheit. Diese sind vornehmlich in der CA1 und CA3 Region lokalisiert. Auch im olfaktorischen Bulbus ist die Expression mit

35% bezogen auf alle GABA_AR vergleichsweise hoch (Pirker *et al.*, 2000; Sur *et al.*, 1999).

Untersuchungen haben gezeigt, dass $\alpha 5$ -enthaltende GABA_AR tonische inhibitorische Ströme in der CA1 Region des Hippokampus erzeugen, die in einer GABA_AR $\alpha 5$ *Knockout* Maus signifikant reduziert sind (Caraiscos *et al.*, 2004). Alpha 5 enthaltende GABA_AR haben eine vergleichsweise hohe Sensitivität für GABA und zeigen eine langsamere Desensibilisierungskinetik gegenüber anderen GABA_A-R (Brickley *et al.*, 2001; Caraiscos *et al.*, 2004). In Übereinstimmung damit scheinen schon geringe Konzentrationen an GABA im extrazellulären Raum auszureichen, um den Rezeptor zu aktivieren und ein inhibitorischen Strom zu erzeugen (Glykys & Mody 2007). Die Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften von rekombinant exprimierten Rezeptoren aus $\alpha 5$ -, $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Untereinheiten waren ähnliche verglichen mit den Rezeptoren, die für die tonische Inhibition in der CA1 Region im Hippokampus verantwortlich sind. Massenspektroskopische Untersuchungen ergaben außerdem eine Assoziation von $\alpha 5$ mit weiteren α -, β - und γ - Untereinheiten, wobei $\beta 3$ am häufigsten zu finden war. Dies lässt darauf schließen, dass der überwiegende Teil der $\alpha 5$ -enthaltenden GABA_AR eine $\gamma 2$ - und $\beta 3$ -Untereinheit beinhalten (Burgard *et al.*, 1996; Ju *et al.*, 2009). Wie immunzytochemische Analysen zeigten, scheint $\alpha 5$ vorrangig, aber nicht ausschließlich an extrasynaptischen Bereichen lokalisiert zu sein. Etwa 10-15% der synaptischen GABA_AR sind auch positiv für $\alpha 5$ (Brunig *et al.*, 2002; Christie & de Blas 2002; Crestani *et al.*, 2002; Loeblich *et al.*, 2006). Dies könnte auf eine mögliche Beteiligung von $\alpha 5$ an der synaptischen (phasischen) Inhibition hinweisen. Die Verwendung eines spezifischen inversen (entgegengesetzt wirkenden) Agonisten gegen $\alpha 5$ ($\alpha 5 1A$) führte zu einer Verringerung von synaptischen GABAergen Strömen (Ali & Thomson 2008). Auch an langsamen GABAergen synaptischen Strömen scheint $\alpha 5$ beteiligt zu sein (Zarnowska *et al.*, 2009). Des Weiteren war die Amplitude von inhibitorischen postsynaptischen Strömen in hippocampalen Schnittkulturen von GABA_AR $\alpha 5$ *Knockout* Mäusen reduziert (Collinson *et al.*, 2002). Allerdings zeigte die Applikation eines anderen inversen Agonisten gegen $\alpha 5$ (L-655,708) keine Veränderungen der inhibitorischen

postsynaptischen Potentiale in der CA1 und CA3 Region des Hippokampus (Caraiscos *et al.*, 2004; Glykys *et al.*, 2008).

Insgesamt scheint GABA_AR α 5 in der Lage zu sein, die neuronale Erregbarkeit über die Modulation des Plasmamembranpotentials herabzusetzen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von α 5 im Hippokampus zu einer verringerten Erregbarkeit von sowohl einzelnen pyramidalen Neuronen als auch der gesamten Stärke der Netzwerkoszillation führt (Bonin *et al.*, 2007; Glykys & Mody 2006; Towers *et al.*, 2004). Diese Regulation der Erregbarkeit des gesamten Netzwerkes könnte eine Ursache für bekannte α 5-abhängige Hippokampus spezifischen Verhaltensweisen von Tiermodellen bezüglich Lernen und Gedächtnis sein. Für die GABA_AR α 5 *Knockout* Maus konnte eine verbessertes Lernen in der *working memory* Version des Hippokampus-abhängigen *Morris water maze* Test gezeigt werden. Ebenso in *trace fear conditioning* Experimenten zeigten diese Mäuse eine bessere Leistung. Dies konnte ebenfalls für transgene Mäuse beobachtet werden, die eine Punktmutation im Genlocus für α 5 (H105R) tragen, die zu einer verringerten Expression von α 5 führt (Collinson *et al.*, 2002; Crestani *et al.*, 2002). Außerdem sind unterschiedliche pharmakologisch wirkende Stoffe entwickelt worden, die zu einer spezifischen Inhibition von GABA_AR α 5 führen. Nach Applikation von L-655,708 konnte eine Verbesserung im *Probe Test* der *reference memory* Version sowie nach Applikation von α 5IA eine Verbesserung in der *working memory* Version des *Morris water maze* Tests beobachtet werden (Dawson *et al.*, 2006; Maubach 2003; McKay *et al.*, 2004; Quirk *et al.*, 1996). Die α 5-Untereinheit stellt damit ein Protein dar, das an Prozessen des Lernens und des Gedächtnises beteiligt sein könnte.

Die Idee, dass eine verringerte GABA_A-R Aktivität Lernen und Gedächtnis beeinflussen könnte, ist nicht neu. Sowohl Bicucullin, ein nicht selektiver Antagonist von GABA_AR, als auch ein nicht selektiver inverser Agonist der Benzodiazepam-Bindestelle führten zu einer Verbesserung von kognitiven Leistungen im Tiermodell (Brioni & McGaugh 1988). Jedoch zeigten beide Substanzen große Nebenwirkungen, die ihren klinischen Einsatz stark limitieren (Berntson *et al.*, 1996). Daher wäre ein genaues Verständnis der spezifischen Funktionen und Regulation der GABA_AR α 5 Untereinheit

insbesondere bezüglich der Funktion von GABA_AR α 5 beim Lernen und dem Gedächtnis hilfreich.

1.3 Radixin und die ERM-Proteinfamilie

Wie in Kapitel 1.2.2 erwähnt, stellt Gephyrin ein Hauptgerüstprotein der inhibitorischen Synapse dar. Die Analyse einer Gephyrin *Knockout* Maus zeigte jedoch keine Veränderung der Clustergrößen bezogen auf die α 1- und α 5-Untereinheit (Kneussel *et al.*, 2001). Da dies die Existenz weiterer Proteine für die Bündelung von α 1- und α 5-enhaltenden GABA_AR vermuten lässt, wurde 2006 von Loebrich *et al.* ein *Screening* mit der zytosolischen Schleife der GABA_AR α 5-Untereinheit durchgeführt und eine direkte Interaktion mit Radixin publiziert (Loebrich *et al.*, 2006). Radixin gehört zur Familie der ERM-Proteine, die sich aus den homologen Proteinen Ezrin, Radixin und Moesin zusammensetzt. Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie weisen einen ähnlichen Aufbau auf (vergleiche Abb. 1.3).

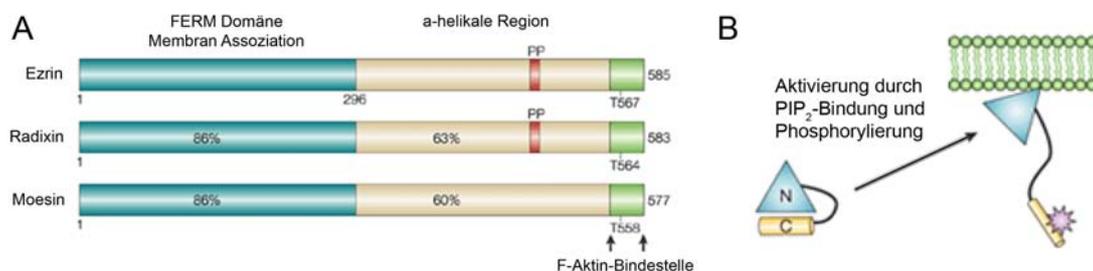


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus sowie der Aktivierung von ERM-Proteinen. (A) Die Aminosäuresequenz der ERM-Proteine (Ezrin, Radixin und Moesin) zeigt eine sehr hohe Homologie (Angabe der Aminosäurenübereinstimmungen in Prozent). Am N-Terminus befindet sich eine FERM-Domäne über welche eine Bindung an PIP₂, ein Lipid der Plasmamembran vermittelt werden kann. Die letzten 30 C-terminalen Aminosäuren beinhalten eine F-Aktin-Bindestelle und einen konservierten Threoninrest (T), der posttranslational phosphoryliert werden kann. Zwischen den N- und C-terminalen Bereichen befindet sich eine flexible α -helikale Struktur. Ezrin und Radixin weisen weiterhin eine Polyprolin Domäne (PP) auf, deren Funktion bisher unbekannt ist. (Die erste Aminosäure am N-Terminus ist mit 1 gekennzeichnet, wobei der C-Terminus am Ende durch die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Proteine gekennzeichnet ist.) (B) ERM-Proteine liegen in einer geschlossenen inaktiven oder einer offenen aktiven Konformationen vor. Eine intra- oder intermolekulare Interaktion des N- und C-Terminus führt zur Inaktivierung der Proteine. Die Bindung an PIP₂ und Phosphorylierung des konservierten Threonins führt hingegen zur Stabilisierung der offenen Konformation und Aktivierung der ERM-Proteine. (verändert nach Bretscher *et al.*, 2002).

Am N-Terminus befindet sich eine 4.1(F)ERM-Domäne, die neben den ERM-Proteinen auch in weiteren Proteinen, wie dem 4.1-Protein, vorkommt. Diese Domäne ist in der Lage, über eine direkte Interaktion mit Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP₂), einem Phospholipid der inneren Seite der Plasmamembran wechselzuwirken. Am C-terminus besitzen alle Mitglieder eine F-Aktin-Bindestelle, über die eine direkte Interaktion mit dem F-Aktin-Zytoskelett vermittelt wird. Eine α -helikale *coiled-coiled* Region verbindet die N- und C-terminalen Bereiche miteinander. Durch den molekularen Aufbau und die speziellen Eigenschaften sind die ERM-Proteine in der Lage, die Plasmamembran mit dem F-Aktin-Zytoskelett zu verknüpfen und so die Bildung von komplexen Membranstrukturen, wie den apikalen Mikrovilli von Epithelzellen zu ermöglichen (Bretscher *et al.*, 2002). Obwohl die Aminosäuresequenz der ERM-Proteine eine große Homologie aufweist (bezogen auf Ezrin 100%; Radixin 88%; Moesin: 85%), lässt vor allem die sehr unterschiedliche, gewebs- und entwicklungsspezifische Expression eine spezifische Funktion der jeweiligen Mitglieder vermuten. Ezrin wird hauptsächlich in Epithelzellen, Moesin in Endothelzellen und Radixin in Hepatozyten und Neuronen exprimiert (Fehon *et al.*, 2010; Loebrich *et al.*, 2006). Neben PIP₂ und F-Aktin wurden insbesondere für die FERM-Domäne weitere Interaktionspartner beschrieben. So können viele Membranproteine, wie CD44, ein Rezeptor für die extrazelluläre Matrixkomponente Hyaluronan und das intrazelluläre Adhäsionsmolekül 2 (ICAM2) direkt an die FERM-Domäne binden (Hamada *et al.*, 2003; Yonemura *et al.*, 1998). Daneben ist ein spezifischer Bereich der FERM-Domäne in der Lage, an die PDZ-Domäne von Gerüstproteinen, wie EBP50 und E3KARP zu binden, wobei letzteres eine Rolle bei der Regulation von zytosolischen Proteinkinasen spielt (Itoh *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2001). Durch diese Eigenschaften wird den ERM-Proteinen eine zentrale Rolle bei der Bildung von spezialisierten Mikromembrandomänen zugesprochen. ERM-Proteine scheinen damit an der Vermittlung von extrazellulären Signalen über die Plasmamembran ins Zellinnere verantwortlich zu sein.

Wichtig zu bemerken ist, dass die ERM-Proteine in zwei Konformationen vorliegen können (Gary & Bretscher 1993; 1995; Gautreau *et al.*, 2000): Einer geschlossenen, inaktiven Form, bei der N- und C-Termini durch

intramolekulare Kräfte verbunden sind und einer offenen, aktiven Form, die sich zu Homo- oder Heterooligomeren zusammenlagern und an PIP₂ sowie Aktin und weitere Interaktionspartner binden kann. Die Aktivierung der ERM-Proteine scheint über einen zweistufigen Prozess zu verlaufen (Fievet *et al.*, 2004). Zuerst erfolgt eine Rekrutierung an die Plasmamembran über die Bindung der ERM-Proteine an PIP₂-reiche Bereiche, wodurch es zu einer ersten Konformationsänderung kommt. Anschließend kommt es zur Phosphorylierung an einem konservierten Threonin-Rest (Ezrin: T576; Radixin: T564; Moesin T558) und damit zur eigentlichen Stabilisierung und Aktivierung der ERM-Proteine (Huang *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2001). Reguliert wird diese Aktivierung möglicherweise durch intra- und extrazelluläre Signalkaskaden, über die bisher aber nur wenig bekannt ist (Chambers & Bretscher 2005). Kontrovers wird die Rolle von Kinasen diskutiert, die für die Phosphorylierung von Radixin verantwortlich sein könnten. Hier kommen die Rho-Kinasen, aber auch die Protein-Kinase C (PKC) infrage (Matsui *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 2001). Zielmoleküle, die über ERM-Proteine aktiviert werden, können Rezeptoren wie CD44 sein. Als Aktivatoren werden unter anderen kleine Rho-GTPasen diskutiert (Ivetic & Ridley 2004), die genauer im Kapitel 1.4 angesprochen werden.

Die GABA_AR α 5-Untereinheit bindet innerhalb der Aminosäuren 342-357 die FERM-Domäne von Radixin (Loebrich *et al.*, 2006). Zumindest in Bezug auf α 1, α 3, β 2 und γ 2 ist diese Interaktion spezifisch für α 5. Die gleiche Arbeit zeigte eine Lokalisation der α 5-Untereinheit des GABA_AR und Radixin zu mehr als 90% an extrasynaptischen Bereichen. Sowohl die Depletion von Radixin in einer Radixin *Knockout* Maus, als auch die Deletion der F-Aktin-Bindestelle führte zu einer diffusen Verteilung der GABA_AR α 5-Untereinheit über die Plasmamembran. Hierbei schien der Gesamtanteil des Rezeptors in der Plasmamembran und auch die Amplitude der inhibitorischen postsynaptischen Potentiale nicht verändert (Loebrich *et al.*, 2006). Radixin könnte damit ein Protein für eine spezifische Regulation der Bündelung der GABA_AR α 5-Untereinheit darstellen.

1.4 Die Familie der RhoA-GTPasen

Da kleine Rho-GTPasen an wichtigen Funktionen im Nervensystem und vermutlich auch an der Aktivierung der ERM-Proteine beteiligt sind (Ivetic & Ridley 2004) wird ihre Funktion im Folgenden näher erläutert. Bei der Familie der Rho-GTPasen handelt es sich um kleine GTP-bindende Proteine mit einer Größe von ca. 21kDa. In Säugetieren sind bisher 22 Gene bekannt, die für Rho-GTPasen kodieren. Die prominentesten Mitglieder sind Rho und Rac mit jeweils drei Isoformen sowie Cdc42 (Aspenstrom *et al.*, 2004). Ihre Funktionen in der Zelle sind außerordentlich vielfältig und schließen die Regulation der DNA-Transkription, der Endozytose und Exozytose sowie des Zytoskeletts und damit der Zellmorphologie und Zellmigration mit ein. Mit einigen Ausnahmen (Riento *et al.*, 2005) besitzen alle Rho-GTPasen eine intrinsische GTPasen-Aktivität, welche die Umwandlung von GTP zu GDP katalysiert. In dem GTP-gebundenen Zustand befinden sich die GTPasen in einem aktiven Zustand und können mit ihren Zielproteinen interagieren und diese aktivieren. Nach der Hydrolyse von GTP zu GDP kommt es zu einer Konformationsänderung der GTPasen und damit zu einer Inaktivierung und reduzierten Affinität zu Zielproteinen (Etienne-Manneville & Hall 2002; Jaffe & Hall 2005; Nobes & Hall 1995). Der Kreislauf zwischen der aktiven und inaktiven Konformation wird über Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), GTPase-Aktivierungsproteinen (GAPs) und GDP-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) reguliert. GEFs katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und unterstützen so die Aktivierung der Rho-GTPasen (Schmidt & Hall 2002). Hingegen stimulieren GAPs die intrinsische GTPase-Aktivität, was zur Inaktivierung der GTPasen führt (Bernards 2003). Posttranslationale Modifikationen der Rho-GTPasen durch Farnesyl- oder Geranylgeranylreste führen aufgrund der hohen Affinität dieser Fettsäuren zur Plasmemembran zu einer Membranassoziation, was einen lokal begrenzten, definierten Wirkungsraum erzeugt (Lane & Beese 2006). Durch die Bindung von GDIs an die Fettsäurereste werden die Rho-GTPasen im Zytosol gehalten und können so nicht inaktiviert werden (Olofsson 1999). Die Phosphorylierung von RhoGDI durch PKC führt zu dessen Dissoziation von den Fettsäureresten und damit zu einer Membranrekrutierung und Aktivierung der Rho-GTPasen

(Mehta *et al.*, 2001). Eine schematische Übersicht des Rho-GTPase-Aktivierungskreislaufs ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

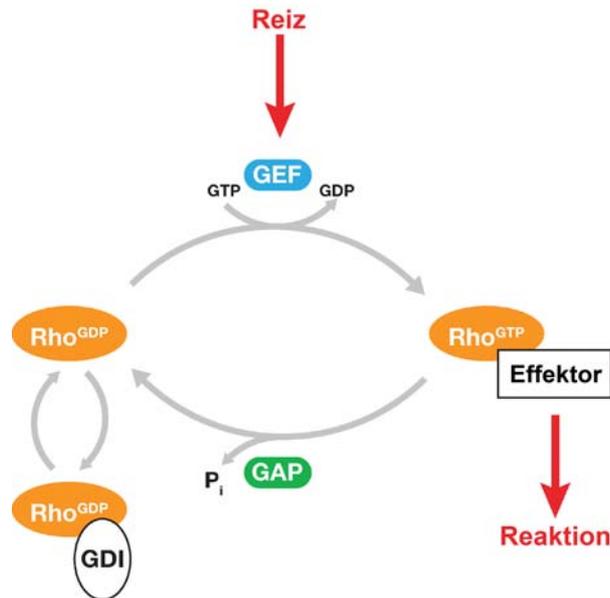


Abb. 1.4: Aktivierungskreislauf der Rho-GTPasen. RhoGTPasen können in einer GTP-gebundenen aktiven Form und einer GDP-gebundenen inaktiven Form vorliegen. Ein extrazellulärer oder intrazellulärer Reiz kann zur Aktivierung von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) führen, die den Austausch von GDP zu GTP katalysieren. In dieser Form können die Rho-GTPasen mit Effektorproteinen interagieren und diese aktivieren. GTPase-Aktivierungsproteine (GAPs) fördern die intrinsische GTPase-Aktivität der GTPasen, wodurch die Hydrolyse von GTP zu GDP beschleunigt wird. GDP-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) binden die GDP-gebundene Form der GTPasen und verhindern die Dissoziation von GDP. In dieser Form sind die GTPasen inaktiv und können nicht mit Effektorproteinen interagieren. (verändert nach Jaffe und Hall, 2005).

Speziell in Neuronen sind einige Funktionen der Rho-GTPasen bei der Entwicklung und Differenzierung bekannt, die vielfach auf eine durch die GTPasen vermittelte Veränderung der F-Aktin-Zytoskelettdynamik zurückzuführen sind. Zum Beispiel aktiviert Cdc42 regulatorische Proteine des F-Aktin-Zytoskeletts, wodurch es zur Polymerisierung von F-Aktin und der Bildung von Filopodien kommt (Chen *et al.*, 2006). Hierdurch kann der Neuritenauswuchs und die Axonbildung reguliert werden (Dent *et al.*, 2007). Dominant negatives Rac1 vermindert den Axonauswuchs, steuert im Vergleich zu Cdc42 aber scheinbar die Bildung von Lamellopodien (Tahirovic *et al.*, 2010). Des Weiteren führt die Überexpression von RhoA zu einer

Bildung von sogenannten *stress-fibres* (Chrzanowska-Wodnicka & Burridge 1996). Diese spielen bei der *Spine*-Bildung und deren Differenzierung in funktionelle erregende Synapsen eine wichtige Rolle (Luo 2002). Die Überexpression von konstitutiv aktivem RhoA führte hingegen zu einer reduzierten *Spine*-Dichte und *Spine*-Länge (Tashiro *et al.*, 2000), wobei nach Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1 eine geringere *Spine*-Größe, aber höhere *Spine*-Dichte beobachtet wurde (Nakayama & Luo 2000). Die Morphologie der *Spines* hat wiederum einen direkten Einfluss auf die synaptische Transmission (Harris & Kater 1994; Yuste & Tank 1996). Auch bei der inhibitorischen Synapse sind Prozesse bekannt, wo Rho-GTPasen eine Rolle spielen, diese sind aber weniger genau untersucht (Fallon 2000). Collybistin, ein gehirnspezifischer GEF, scheint an der inhibitorischen Synapse für die Bündelung von Gephyrin und GABA_AR mit einer bestimmten Untereinheiten-Zusammensetzung verantwortlich zu sein (Kins *et al.*, 2000). Außerdem lassen genetische Untersuchungen in *C. elegans* eine Beteiligung von Rac1 an dem Transport der Neurotransmitter-Vesikel in der Präsynapse vermuten (Locke *et al.*, 2009).

Wie oben erwähnt, werden vermutlich auch die ERM-Proteine über Rho-GTPasen reguliert (Ivetic & Ridley 2004). Die direkte Inhibition von RhoA durch das *Clostridium botulinum* Toxin führt zur Inaktivierung der ERM-Proteine und einer verringerten Anzahl der Mikrovilli (Yonemura *et al.*, 2002). Ferner führte die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren zu einer Aktivierung von RhoA, was wiederum die Phosphorylierung und Aktivierung von Moesin begünstigte (Jeon *et al.*, 2002). Inwieweit hierbei die RhoA-abhängige Kinase ROCK oder andere Kinasen die Phosphorylierung katalysieren, ist weiterhin unklar (Jeon *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 1998; Matsui *et al.*, 1999). Rac1 hingegen scheint zu einer Dephosphorylierung der ERM-Proteinen zu führen, wobei die beteiligten Proteinphosphatasen bisher nicht bekannt sind (Faure *et al.*, 2004). Offenbar können ERM-Proteine direkt mit RhoGDIs interagieren und diese so von RhoA lösen, was zu einer Aktivierung der RhoA-GTPasen führt (Takahashi *et al.*, 1998). Zumindest für RhoA und die ERM-Proteine würde sich so eine mögliche positive Rückkoppelungsschleife ergeben.

1.5 Synaptische Plastizität, Lernen und Gedächtnis

Eine aktivitätsabhängige Veränderung der Stärke der synaptischen Transmission wird als synaptische Plastizität bezeichnet. Unterschieden wird hierbei zwischen kurzfristigen Änderungen der Transmission im Millisekunden- bis Minuten-Bereich (Prozesse des Kurzzeitgedächtnisses) und lang anhaltenden Veränderungen, die über Stunden, Tage und auch Jahre anhalten können (Prozesse des Langzeitgedächtnisses) (Di Filippo *et al.*, 2009; Kasai *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2008). Zwei lang anhaltende Phänomene sind LTP (*long-term-potential*) und LTD (*long-term-depression*), die als zelluläre und molekulare Phänomene für Lernen und Gedächtnisbildung im Säugetiergehirn herangezogen werden (Bliss & Lomo 1973; Feldman 2009). LTP kann durch kurze, hochfrequente und LTD durch lange, niederfrequente Stimulation in hippokampalen Schnittkulturen induziert werden (Artola & Singer 1987; Mulkey & Malenka 1992). Hierbei führt die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zu einem Einstrom von Ca^{2+} und dadurch zu einer Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung der CamKII (Fukunaga *et al.*, 1993). CamKII phosphoryliert darauf die GluR1-Untereinheit der AMPA-Rezeptoren, wodurch dessen Leitfähigkeit erhöht wird (Barria *et al.*, 1997; Benke *et al.*, 1998). Weitere Signalkaskaden führen zu einer erhöhten Insertion von AMPA-Rezeptoren in die Plasmamembran der Postsynapse, wodurch es zu einer lang anhaltenden erregenden Transmission kommt (Banke *et al.*, 2000; Man *et al.*, 2007; Roche *et al.*, 1996). Morphologisch führen LTP und LTD zu einer Veränderung der Synapsenbildung und der *Spines* in Bezug auf ihre Form, Anzahl und Größe (Alvarez & Sabatini 2007; Feldman 2009). Übergeordnet existieren in Neuronen drei unterschiedliche Mechanismen, um die Anzahl der Neurotransmitter-Rezeptoren in der Synapse und damit deren Transmission zu regulieren (Choquet & Triller 2003; Kneussel & Loebrich 2007): (i) Rezeptoren können neu synthetisiert werden und in Transportvesikeln über einen Motorprotein-vermittelten Transport zur Plasmamembran gelangen, um dort in extrasynaptischen Bereichen der Plasmamembran zu inserieren. Dies wird als langsame vertikale Rekrutierung beschrieben. (ii) Durch Endozytose und Exozytose können Rezeptoren internalisiert und wieder recycelt werden. Dies wird als schnelle vertikale Rekrutierung beschrieben. (iii) Rezeptoren

können innerhalb der Plasmamembran an definierten Orten gebündelt, aber auch wieder gelöst werden und so zwischen extrasynaptischen und synaptischen Bereichen diffundieren. Dies wird als schnelle horizontale Rekrutierung beschrieben. Sehr gut dokumentiert ist die Rolle des Hippokampus bei der Erfassung und Speicherung von räumlicher Erinnerung und bei der Wahrnehmung von neuen Reizen aus der Umwelt (Kemp & Manahan-Vaughan 2007). Es wird angenommen, dass die Phänomene LTP und LTD an diesen Prozessen im Hippokampus beteiligt sind. Dieser Zusammenhang wurde als erstes durch Morris *et al.* gezeigt (Morris *et al.*, 1986). Mäuse, denen ein Antagonist für den NMDA-Rezeptor verabreicht wurde, zeigten kein LTP und ein vermindertes Lernen in der *reference memory* Version des *Morris water maze* Tests. Hingegen führte die Überexpression der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors in Mäusen zu einem verstärkten LTP und verbesserten Lerneigenschaften (Manahan-Vaughan & Braunewell 1999). Da das Gleichgewicht zwischen Erregung und Inhibition die Ausprägung von LTP bzw. LTD reguliert (Bear & Malenka 1994; Freund & Buzsaki 1996; Kullmann *et al.*, 1996), gibt es Hinweise, dass inhibitorische Neurotransmitterrezeptoren wie GABA_AR an LTP sowie Lernen und Gedächtnisbildung beteiligt sind (Caillard *et al.*, 1999; Gaiarsa *et al.*, 2002; Komatsu & Iwakiri 1993; Morishita & Sastry 1996). Speziell GABA_AR, welche die $\alpha 5$ -Untereinheit enthalten, scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. So zeigte eine $\alpha 5$ *Knockout* Maus eine bessere Leistung in der *working memory* Version des *Morris water maze* Tests (Collinson *et al.*, 2002) und in Übereinstimmung damit ergab die Analyse einer $\alpha 5$ -Mutante eine verbesserte Assoziation im *trace fear conditioning* (Crestani *et al.*, 2002; Yee *et al.*, 2004).

Die präzise Regulation der $\alpha 5$ -Untereinheiten enthaltenden GABA_AR in der inhibitorischen Synapse könnte somit einen wichtigen Faktor bei der Regulierung von LTP und LTD und den damit verbundenen Einflüssen auf Lernen und Gedächtnis darstellen. Die physiologische Funktion und Regulation von Radixin als ein neues Gerüstprotein von GABA_AR $\alpha 5$ könnte zu dem Verständnis dieser Prozesse beitragen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter-Rezeptoren im ZNS von Säugetieren ist der GABA_A-Rezeptor. Die Expression der α 5-Untereinheit enthaltenden GABA_A-Rezeptoren ist vornehmlich auf den Hippokampus beschränkt, wo ihnen eine wichtige Funktion hinsichtlich Lernen und Gedächtnis zugesprochen wird. Die Bündelung von synaptischen GABA_AR wird maßgeblich über das Gerüstprotein Gephyrin vermittelt. Die hauptsächlich extrasynaptisch lokalisierte α 5-Untereinheit scheint hingegen durch Radixin an der Plasmamembran verankert zu werden, allerdings ist hierüber bislang nur wenig bekannt.

Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die genaue Regulation der Interaktion von Radixin und der α 5-Untereinheit untersucht werden. Unter Verwendung von zellbiologischen und biochemischen Methoden sollten Erkenntnisse über mögliche Signalkaskaden, die eine Regulation der Interaktion erlauben und damit einen Einfluss auf die synaptische und extrasynaptische Lokalisation der α 5-Untereinheit nehmen könnten, gewonnen werden. Hierbei standen die Verwendung eines primären hippocampalen Zellkultursystems sowie einer Radixin *Knockout* Mauslinie im Vordergrund. Außerdem sollte auf Ebene des Verhaltens, insbesondere bezüglich Lernen und Gedächtnis, die Auswirkungen der Depletion von Radixin in *Mus musculus* erstmals charakterisiert werden. Die gewonnenen Resultate sollten zum besseren Verständnis der physiologischen Rolle von Radixin und der GABA_AR α 5-Untereinheit beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

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

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

2.1.2 Geräte

PCR-Maschine: T-1 Thermocycler (Biometra, Göttingen).

Gelkammern für Agarosegele: B2, B1A (Owl Separation Systems, Portsmouth, USA).

Photometer: Ultraspec 3000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), NanoDrop ND-1000 (PEQLAB, Erlangen).

UV-Illuminator: UVT2035 (Herolab, Wiesloch).

Gelkammern für PAGE: Mini-PROTEAN 3 Cell (Biorad, München).

Western Blot-Apparatur: Mini Trans-Blot Cell (Biorad, München).

Homogenisator: Potter S (B. Braun Melsungen AG, Melsungen).

Ultraschallgerät: Micro Ultrasonic Cell Disrupter KT 50 (Kontess, Vineland, USA).

Zentrifugen: TL-100 Ultracentrifuge; L7 Ultracentrifuge; J2-21 M/E (Beckman Coulter, Fullerton, USA); Eppendorf Zentrifuge 5417 C (Eppendorf, Hamburg).
Rotoren: TLA 100.3, JA-10, JA-14, JA-20, SW-40Ti (Beckman Coulter, Fullerton, USA).

Sterilbänke für Zellkulturarbeiten: SterilGARD Class II TypA/B3 (Baker Company, Sanford, USA).

Zellkulturinkubatoren: NUAIRE IR AUTOFLOW CO₂ (Zapf Instrumente, Sarstedt); Heraeus-Inkubator (Heraeus, Hanau); Hera-Cell Inkubator (Heraeus, Hanau).

Mikroskope: Inverses konfokales *Laser-scanning* Mikroskop Leica DM IRBE mit Leica Confocal Software 2.61 Build 1537 (Leica, Wetzlar); konfokales *Laser-scanning* Mikroskop Olympus Fluoview FV1000 mit Olympus Flouview Software Ver. 2.1b (Olympus, Hamburg); inverses Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL (Zeiss,).

Sequenzierer: ABI Prism, 377 DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt).

Taumelrollenmischer: RM5-35S (Fröbel Labortechnik, Lindau).

2.1.3 Medien und Lösungen

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

ACSF(+)

1 mM MgCl₂; 125 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 33 mM (D)-Glukose; 25 mM HEPES, pH 7,3 gelöst in H₂O

ACSF(-)

125 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 33 mM (D)-Glukose; 25 mM HEPES, pH 7,3 gelöst in H₂O

Blockierungspuffer (Immundetektion)

5% (w/v) Magermilchpulver oder 5% (w/v) Bovines Serumalbumin (BSA) in 1x TBST

Blockierungspuffer (Immunzytochemie)

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

D-MEM/F-12 complete (Zellkultur)

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

6x DNA-Ladepuffer

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

2x HBS

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

HEPES-Lysis-Puffer

130 mM HEPES; 0,2% Triton-X-100; 10 mM EGTA gelöst in H₂O, vor Gebrauch wurden 1 mM PMSF und *Complete Protease Inhibitor* (Roche, Mannheim) zugegeben

HEPES-Puffer

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

HEK293TN-Medium

500 ml D-MEM (+ 4500 mg/l (D)-Glukose, + GlutaMAX I, - Pyruvat);
5 ml Penizillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml); 50 ml FBS;
50 µg/ml G418

HEK Zelllysis-Puffer

1% Triton-X-100 gelöst in 1x PBS, vor Gebrauch wurden 1 mM PMSF
und *Complete Protease Inhibitor* (Roche, Mannheim) zugegeben

IP-Waschpuffer

50 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂

LB-Agar

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

LB-Medium

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

Neurobasalmedium

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

Paraformaldehyd-Lösung

4 g PFA; 4 g Sucrose; ad 1000 ml 1x PBS; die Lösung wurde auf 60 °C
erhitzt und tropfenweise 1 M NaOH zugegeben bis die Lösung klar
erschien; pH 7,2

1x PBS

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

PERM Zelllysis-Puffer

1% Triton-X-100; 50 mM NaF; 2 mM Na₃OV₄; 2 mM EDTA; 10 mM β-Glyzerinphosphat; 10 mM Natriumpyrophosphat; gelöst in 1x PBS; vor Gebrauch wurden 1 mM PMSF und *Complete Protease Inhibitor* (Roche, Mannheim) zugegeben

SDS-Laufpuffer (10x)

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

4x SDS-Probenpuffer

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

Sonifizierungs-Puffer

400 mM NaCl; 100 mM HEPES (pH 7,9); 10% (w/w) Glyzerin; gelöst in H₂O

Stripping-Puffer

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

Sucrose-Lösungen

1,2 M, 1 M oder 0,85 M Sucrose; 0,4 mM NaHCO₃; gelöst in H₂O

Sucrose-Puffer A

320 mM Sucrose; 1 mM NaHCO₃; 1 mM MgCl₂; 500 µM CaCl₂; 5 mM EDTA pH 8,0; gelöst in H₂O; vor Gebrauch wurden 1 µM PMSF und *Complete Protease Inhibitor* (Roche, Mannheim) zugegeben

Sucrose-Puffer B

320 mM Sucrose; 1 mM NaHCO₃; gelöst in H₂O

50x TAE

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

TBST (10x)

200 mM Tris (pH 7,5); 1,5 M NaCl; 2% (v/v) Tween-20; gelöst in H₂O

Western Blot-Puffer

20% (v/v) Methanol; 250 µM Tris; 192 µM Glyzin; ad 1000 ml H₂O, pH 8,4

2.1.4 Tiere

Es wurden Wildtyp-Ratten vom Stamm Wistar sowie Wildtyp-Mäuse der Stämme FVB x C57Bl/6J oder CBA x C57Bl/6J benutzt. Außerdem wurden homozygote (-/-) Radixin *Knockout* Mäuse benutzt, bei denen der *rdx* Genlokus durch homologe Rekombination entfernt wurde (Kikuchi *et al.*, 2002). Für die Kontrollen wurden Wildtyp-Wurfgeschwister verwendet. Die Tiere wurden von Prof. S. Tsukita (Universität von Kyoto, Kyoto, Japan) zur Verfügung gestellt.

Für die Verhaltensexperimente wurden diese Mäuse über sieben Generationen mit C57Bl/6J gekreuzt, um einen definierten genetischen Hintergrund zu erhalten.

2.1.5 Zelllinien

HEK293TN-Zelllinie humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC CRL-1537), ATCC (Manassas, USA)

2.1.6 Bakterienstämme

XL 1-Blue *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*
lac [F' *proAB lac^fZDM15Tn10Tet^r*] Stratagene (La Jolla, USA)

BI21-Codon-Plus®(DE3)-RIL *E.coli* B F⁻ *ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal*
λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]
Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA)

2.1.7 Größenstandards

| | |
|------------------|--|
| DNA-Standard | Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde) |
| Protein-Standard | Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) |

2.1.8 Reaktionskomplettausstattungen

ImmobilonWestern HRP Substrat (Millipore, Billerica, USA); QIAprep, Maxiprep Kit (Qiagen, Hilden); E.Z.N.A., Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab, Erlangen); E.Z.N.A., Cycle Pure Kit (Peqlab, Erlangen); E.Z.N.A., Gel Extraction Kit (Peqlab, Erlangen); Quick Ligation Kit (NewEngland Biolabs, Ipswich, USA); BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt); BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA); Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden); QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA); Quick Ligation Kit (NewEngland Biolabs, Ipswich, USA).

2.1.9 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden in der angegebenen Verdünnung für Immunzytochemie (ICC) oder Western Blot (WB) verwendet:

| Antikörper | Spezies | Verdünnung | Inkubationszeit und Temperatur | Referenz |
|--|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| α - β -Actin | Monoklonal, Maus | 1:3.500 (WB) | 1 h RT | SIGMA (Taufkirchen) |
| α -ERM | Polyklonal, Kaninchen | 1:1.000 (WB) | ÜN 4 °C | Cell Signaling (Danvers, USA) |
| α -GABA _A R α 1 | Polyklonal, Kaninchen | 1:1.000 (WB) | ÜN 4 °C | Serotec (Oxford, UK) |
| α -GABA _A R α 5 | Polyklonal, Kaninchen | 1:1.000 (WB), 1:50 (ICC) | ÜN 4 °C | Acris (Herford) |
| α -Gephyrin | Monoklonal, Maus | 1:250 (WB) | ÜN 4 °C | BD Bioscience (Kalifornien, USA) |
| α -myc | Polyklonal, Kaninchen | 1:4.000 (WB) | 1 h RT | SIGMA (Taufkirchen) |
| α -PERM | Polyklonal, Kaninchen | 1:2.000 (WB) | ÜN 4 °C | Cell Signaling (Danvers, USA) |
| α -PSD95 | Monoklonal, Maus | 1:2.000 (WB) | 1 h RT | ABR (Golden, USA) |
| α -Radixin | Monoklonal, Ratte | 1:500 (WB), 1:50 (ICC) | ÜN 4 °C | S. Tsukita (Kyoto, Japan) |
| α -SV2 | Monoklonal, Maus | 1:100 (ICC) | 1 h RT | Harvard, (Boston, USA) |
| α - α -Tubulin | Monoklonal, Maus | 1:10.000 (WB) | 1 h RT | SIGMA (Taufkirchen) |

Tab. 2.1: Verwendete Primärantikörper

| Antikörper | Spezies | Verdünnung | Inkubationszeit und Temperatur | Referenz |
|-------------------------|---------|---------------|--------------------------------|-------------------|
| α -Kaninchen-HRP | Ziege | 1:10.000 (WB) | 1 h RT | Dianova (Hamburg) |
| α -Maus-HRP | Ziege | 1:10.000 (WB) | 1 h RT | Dianova (Hamburg) |
| α -Ratte-HRP | Ziege | 1:10.000 (WB) | 1 h RT | Dianova (Hamburg) |
| α -Kaninchen-Cy3 | Esel | 1:500 (ICC) | 1 h RT | Dianova (Hamburg) |
| α -Ratte-Cy3 | Esel | 1:500 (ICC) | 1 h RT | Dianova (Hamburg) |
| α -Maus-Cy5 | Esel | 1:500 (ICC) | 1 h RT | Dianova (Hamburg) |

Tab. 2.2: Verwendete Sekundärantikörper

2.1.10 Vektoren

Die folgenden Vektoren wurden verwendet:

| Name | Herstellung/Herkunft | Verwendung |
|----------------------------|--|---|
| pEGFP-N3 | Clontech (Heidelberg) | Expression von eGFP in eukaryotischen Zellen |
| pEGFP-N2-Rdx-WT | Sven Loebrich (ZMNH, Hamburg) | Expression von eGFP-markiertem Radixin in eukaryotischen Zellen |
| pEGFP-N2-Rdx-T564A | Sven Loebrich (ZMNH, Hamburg) | Expression von eGFP-markiertem Radixin-T564A in eukaryotischen Zellen |
| pEGFP-N2-Rdx-T564D | Sven Loebrich (ZMNH, Hamburg) | Expression von eGFP-markiertem Radixin-T564D in eukaryotischen Zellen |
| pBK-CMV-Rdx-myc | Sven Loebrich (ZMNH, Hamburg) | Expression von myc-markiertem Radixin in eukaryotischen Zellen |
| pBK-CMV-RdxT564A-myc | Amplifikation von RdxT564A nach Mutagenese als <i>KpnI</i> - <i>SacI</i> Fragment. Zielvektor: pBK-CMV-Rdx-myc | Expression von myc-markiertem Radixin-T564A in eukaryotischen Zellen |
| pBK-CMV-RdxT564D-myc | Sven Loebrich (ZMNH, Hamburg) | Expression von myc-markiertem Radixin-T564D in eukaryotischen Zellen |
| pcDNA3.1-myc | Invitrogen (Karlsruhe) | Expression von myc in eukaryotischen Zellen |
| pEXV-RhoN19 | Eva Evers (Frankfurt) | Expression von RhoN19 in eukaryotischen Zellen |
| pEXV-RhoV14 | Eva Evers (Frankfurt) | Expression von RhoN19 in eukaryotischen Zellen |
| pEXV-RacV12 | Eva Evers (Frankfurt) | Expression von RhoN19 in eukaryotischen Zellen |
| pGEX-5X-1 | Promega (Madison, USA) | Expression von GST in bakteriellen Zellen |
| pGEX-5X-1- α 5 loop | Sven Loebrich (ZMNH, Hamburg) | Expression der GST-markierten intrazellulären Schleife der GABA _A R α 5 Untereinheit in bakteriellen Zellen |

Tab. 2.3: Verwendete Vektoren

2.1.11 Oligonukleotide

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

| Name | 5'-3'-Sequenz | Verwendung |
|----------------------------------|---------------------------------------|--|
| TH-RADIXIN-K10 (<i>Common</i>) | CAATTTAAGCCATGTAGAATA TCC | Genotypisierung von Radixin <i>Knockout</i> Mäusen |
| TH-RADIXIN-K17 (<i>Target</i>) | GGTTCCTCTTCCCATGAATTC | Genotypisierung von Radixin <i>Knockout</i> Mäusen |
| TH-RADIXIN-K18 (<i>Wild</i>) | GGAATTTTGGCAGTACATATT CAG | Genotypisierung von Radixin <i>Knockout</i> Mäusen |
| TH-RdxT564A-Mut-s | CCGTGATAAGTACAAGGCC TTCGGCAGATTTCG | Mutagenese von pBK-CMV-Rdx-myc zu RdxT564A |
| TH-RdxT564A-Mut-as | CGAATCTGCCGAAGGGCCTT GTACTTATCACGG | Mutagenese von pBK-CMV-Rdx-myc zu RdxT564A |
| MK-Radixin-WT-1s | GCTAATGACAGACTCTTACCA CAG | Sequenzierung von pBK-CMV-RdxT564A-myc |
| MK-Radixin-WT-2s | CGGGAGGTTTTGCATCAGAA GCAG | Sequenzierung von pBK-CMV-RdxT564A-myc |
| MK-Radixin-WT-3s | CCTCCACCTCCCCCTCCTCCA GTC | Sequenzierung von pBK-CMV-RdxT564A-myc |

Tab. 2.4: Verwendete Oligonukleotide

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von *E. coli*

Zur DNA-Gewinnung wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert, für die ektopische Expression von GST-Fusionsproteinen der *E. coli*-Stamm BI21-Codon-Plus®(DE3)-RIL. Die Transformation wurde nach einer Methode von Inoue (Inoue *et al.*, 1990) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 100 µl chemisch kompetente *E. coli*-Zellen mit 1,7 µl β-Mercaptoethanol (1:10) auf Eis unter gelegentlichem, vorsichtigem Schütteln für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe des Ligationsansatzes (2.2.9) oder 50 ng Plasmid-DNA und Inkubation für 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Die Zellen wurden dann mit 800 µl LB-Medium für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt.

Anschließend wurden die Zellen auf entsprechende Antibiotikum-enthaltende LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C oder für 72 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

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

2.2.3 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit

Eine qualitative und quantitative Überprüfung von DNA in wässriger Lösung erfolgte zum einen photometrisch mit einem Ultraspec 3000 Photometer (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) und zum anderen durch gelelektrophoretische Auftrennung (2.2.7) durch einen Intensitätsvergleich zwischen den Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Fragmenten und denen des Größenmarkers Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde). Die Konzentration der Markerfragmente wird vom Hersteller angegeben.

2.2.4 Fällung von DNA

Um DNA in einer wässrigen Lösung zu konzentrieren, wurde diese mit 2,5-fachem Volumen Ethanol und 10% (v/v) 3 M NaAc (pH 5,5) versetzt. Hierdurch wird Nukleinsäuren die Hydrathülle entzogen, woraufhin sie

ausfallen. Danach wurde das DNA-Präzipitat für 10 min bei 20.000 x g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das DNA Pellet wurde mit einfachem Volumen 70% Ethanol gewaschen, nach kurzer Zentrifugation getrocknet und in einer adäquaten Menge TE-Puffer, frisch supplementiert mit RNase H (Roche, Mannheim), aufgenommen.

2.2.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

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

2.2.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Verhinderung einer Religation der mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen Vektoren (2.2.5) wurden die 5'-Phosphatgruppen der DNA-Fragmente mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) (NewEngland Biolabs, Ipswich, USA) entfernt. Dazu wurden abhängig vom Volumen des Reaktionsansatzes jeweils 0,5 bis 1 µl CIP (10 U/µl) verwendet und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Produkte der PCR-Genotypisierung von wildtypischen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Radixin *Knockout* Mäusen (2.2.13) sowie von DNA-Fragmenten wurden in 0,8 bis 1,5%igen, Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern

aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TAE durch Aufkochen gelöst und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Die DNA wurde entsprechend in DNA-Ladepuffer aufgenommen, auf das Gel aufgetragen, bei etwa 7-10 V pro cm Gellänge elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Der Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde) wurde als Größenmarker und zur Bestimmung der DNA-Konzentration (2.2.3) verwendet.

2.2.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Durch entsprechende Restriktionsenzyme aus Plasmiden geschnittene DNA-Fragmente (2.2.5) wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.7) aufgetrennt, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Peqlab, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert und mittels Anionenaustauschersäulen aufgereinigt. Alternativ wurde zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau das Protokoll des E.Z.N.A., Cycle Pure Kits (Peqlab, Erlangen) verwendet.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Restriktionsfragmenten erfolgte unter Verwendung des Quick Ligation Kits (NewEngland Biolabs, Ipswich, USA). Hierzu wurden 50 ng Vektor und der dreifache stöchiometrische Überschuss an DNA-Fragmenten verwendet (Crouse *et al.*, 1983). Die Ligationsansätze wurden mit 10 µl 2x Quick-Ligase-Puffer und 1 µl Quick-T4-DNA-Ligase oder alternativ T4-DNA-Ligase (5 U/µl) in einem Volumen von 20 µl bei RT für 30 min inkubiert oder über Nacht bei 4 °C.

2.2.10 Mutagenese und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Klonierung verschiedener DNA-Fragmente wurden diese unter Verwendung Sequenz-spezifischer Oligonukleotide und dem QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA) nach den Angaben des Herstellers durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dabei enthielten die Oligonukleotide je eine spezifische Sequenz für eine Restriktionsschnittstelle (siehe 2.1.11). Die PCR-Produkte wurden anschließend mit den entsprechenden Enzymen verdaut (2.2.5) und in den jeweiligen Vektor kloniert (siehe 2.1.10). Die PCR wurde mit Hilfe einer *PfuTurbo*-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde folgendes Protokoll für die Temperaturzyklen mit einer Starttemperatur von 95 °C verwendet:

- 1.) 95 °C 1 min Denaturierung
- 2.) 95 °C 50 s Denaturierung
- 3.) 60 °C 50 s Hybridisierung
- 4.) 68 °C 1 min/kb Elongation
30 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
- 5.) 68 °C 7 min Finale Elongation
- 6.) 4 °C ∞ Reaktionsstop

2.2.11 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zunächst wurde das rekombinante Plasmid mit der DNA-Sequenz von Interesse sowie der Zielvektor präparativ verdaut (2.2.5). Anschließend wurden die 5'-Enden des geöffneten Zielvektors dephosphoryliert (2.2.6). Der dephosphorylierte Zielvektor und das DNA-Fragment von Interesse wurden dann gelelektrophoretisch aufgereinigt und aus dem Gel extrahiert (2.2.7, 2.2.8). Nach erneuter gelelektrophoretischer Auftrennung der beiden Fragmente zur DNA Konzentrationsbestimmung (2.2.3), wurden diese ligiert (2.2.9). Mit dem Ligationsansatz wurden *E. coli* -Zellen transformiert (2.2.1) und positive Klone, die das rekombinante Plasmid von Interesse trugen, nach

Isolierung von Plasmid-DNA (2.2.2) über eine geeignete Restriktions-Analyse (2.2.5) identifiziert. Positive Klone wurden durch automatisierte Didesoxy-Sequenzierung vollständig überprüft (2.2.12).

2.2.12 DNA-Sequenzierung

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

2.2.13 Genotypisierung von Radixin Knockout Mäusen mittels PCR

Zur Genotypisierung mittels PCR von wildtypischen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Radixin *Knockout* Mäusen wurden zwei *Rdx*-Gen-spezifische Oligonukleotide (TH-RADIXIN-K17 und TH-RADIXIN-K18) sowie ein *Rdx*-Gen-unspezifisches Oligonukleotid (TH-RADIXIN-K10), das komplementär zu einer Sequenz stromaufwärts des *Rdx*-Genlokus ist, verwendet (2.1.11). Zur Detektion des wildtyp Allels wurden TH-RADIXIN-K10 und TH-RADIXIN-K18 verwendet, welche komplementär zu Sequenzen des *Rdx*-Genlokus sind, eingesetzt. Das daraus resultierende Amplifikationsprodukt hat eine Größe von 800 bp. Zur Detektion des *Knockout*-Allels wurden ebenfalls TH-RADIXIN-K10 sowie TH-RADIXIN-K17, welche komplementär zu Sequenzen innerhalb der Insertionskassette von

Exon 3 des *Rdx*-Genlokus sind, verwendet. Das hieraus resultierende Amplifikationsprodukt hat eine Größe von 210 bp. Die Oligonukleotide wurden nun in einer äquimolaren Multiplex-Reaktion eingesetzt, um die entsprechenden *Rdx* Allele auf dem Maus Chromosom 9 zu amplifizieren. Hierzu wurde zunächst die genomische DNA aus Schwanzbiopsien von wildtypischen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Radixin *Knockout* Mäusen mit Hilfe des Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert und nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. 4 µl der aufgereinigten genomischen DNA wurden als Matrize für die Genotypisierung mittels PCR in einem Reaktionsvolumen von 40 µl wie folgt eingesetzt:

| Reaktionskomponenten | Volumen (µl) |
|--|--------------|
| Genomische DNA | 4 |
| 10x PCR Rxn Buffer ohne MgCl ₂ (Invitrogen, Carlsbad, USA) | 3 |
| 2,5 mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, USA) | 3 |
| Oligonukleotid TH-RADIXIN-K10 10 pmol/µl | 1,5 |
| Oligonukleotid TH-RADIXIN-K17 10 pmol/µl | 0,75 |
| Oligonukleotid TH-RADIXIN-K18 10 pmol/µl | 0,75 |
| 5 U/µl Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) | 0,25 |
| 50 mM MgCl ₂ (Invitrogen, Carlsbad, USA) | 1,2 |
| H ₂ O | 25,55 |

Tab. 2.5: Reaktionskomponenten der Genotypisierung von Radixin *Knockout* Mäusen mittels PCR

Es wurde folgendes Protokoll für die Temperaturzyklen der PCR mit einer Starttemperatur von 94 °C verwendet:

- 1.) 94 °C 3 min
- 2.) 94 °C 20 s
- 3.) 72 °C 30 s
- 4.) 72 °C 2 min
3 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
- 5.) 94 °C 20 s
- 6.) 69 °C 30 s
- 7.) 72 °C 2 min
3 Wiederholungen der Schritte 5 bis 7
- 8.) 94 °C 20 s
- 9.) 66 °C 30 s
- 10.) 72 °C 2 min
3 Wiederholungen der Schritte 8 bis 10

- 11.) 94 °C 20 s
- 12.) 63 °C 30 s
- 13.) 72 °C 2 min
3 Wiederholungen der Schritte 11 bis 13
- 14.) 94 °C 20 s
- 15.) 60 °C 30 s
- 16.) 72 °C 2 min
3 Wiederholungen der Schritte 14 bis 16
- 17.) 94 °C 20 s
- 18.) 57 °C 30 s
- 19.) 72 °C 2 min
30 Wiederholungen der Schritte 17 bis 19
- 20.) 72 °C 7 min
- 21.) 10 °C ∞

Nach Abschluss der Reaktion wurden die PCR-Produkte mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese (2.2.7) aufgetrennt, analysiert und dokumentiert.

2.3 Proteinbiochemie

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Gelelektrophorese wurde mit Hilfe des Mini-Protean III Systems (Biorad, München) durchgeführt. Hierzu wurden 8%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele aus einer 40% (w/v) Acrylamid-/Bis-acrylamidlösung (Roth, Karlsruhe) hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Polyacrylamidgel entsprechend mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 6 min bei 95 °C hitze-denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 90 V während der Fokussierung im Sammelgel und 110 V während der Auftrennung im Trenngel in 1x SDS-Laufpuffer. Anschließend wurden die Proteine durch Western Blot (2.3.2) auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Größenmarker wurde der Precision Plus Protein Standards Dual Color (Biorad, München) verwendet.

2.3.2 Western Blot

Zum Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper (Immundetektion, 2.3.3) wurden die Proteine nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (2.3.1) auf eine PVDF-Membran Hybond-P der Porengröße 0,45 µm (Amersham, Freiburg) transferiert. Der Transfer erfolgte mit Hilfe von einem *Wet-Blot* Mini Trans-Blot Cell Apparat (Biorad, München) bei einer konstanten Spannung von 100 V für 75 min. Der Blot wurde ausgehend von der Anodenseite wie folgt aufgebaut: Ein Schaumstoffkissen (Biorad, München), zwei Lagen *Whatman*-Papier, PVDF-Membran, SDS-Gel, zwei Lagen *Whatman*-Papier und ein Schaumstoffkissen, alles getränkt in Western Blot-Puffer. Vor dem Blot wurde die Membran für 15 s in Methanol aktiviert, in H₂O für 2 min gewaschen und dann in Western Blot-Puffer äquilibriert.

2.3.3 Immundetektion

Für den Nachweis immobilisierter Proteine auf der PVDF-Membran (2.3.2) durch spezifische Antikörper wurde die Membran zunächst für 60 min bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C in 5% (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in 5% (w/v) Magermilchpulver oder BSA in 1x TBST unter leichtem Schütteln bei 4 °C über Nacht oder alternativ für 1 Stunden bei RT. Die Membran wurde dann dreimal für je 10 min in 1x TBST gewaschen und anschließend mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in 5% (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST für 45-60 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der zweiten Inkubation wurde erneut dreimal für jeweils 10 min mit 1x TBST gewaschen, bevor die Detektion mit der auf Chemolumineszenz basierenden Reaktionskomplettausstattung ImmobilonWestern (Millipore, Billerica, USA) nach Angaben des Herstellers erfolgte. Zur Dokumentation wurden lichtsensitive Filme (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) verwendet. Für die Detektion eines weiteren Proteins auf der PVDF-Membran wurde die Membran 30 min bei RT mit *Stripping-*

Puffer inkubiert, um zuvor gebundene Antikörper zu entfernen. Nach 2 Waschschritten mit 1x TBST wurde die Membran erneut mit Sekundärantikörper inkubiert, gewaschen und detektiert, um das Verbleiben von Signalen nach dem *Stripping*-Vorgang auszuschließen. Nun wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

2.3.4 Proteinextrakte aus transfizierten HEK293TN-Zellen

HEK293TN-Zellen wurden in 100 mm bzw. 35 mm-Schalen kultiviert (2.4.1) und nach 24 h transfiziert (2.4.4). 12-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen bei 4 °C geerntet. Hierzu wurde das Medium abgenommen, einmal mit 10 ml 1x PBS gewaschen und die Zellen mittels eines Zellschabers (Sarstedt, Nümbrecht) in 1 ml HEK-Zelllysis-Puffer geerntet. Sollte später die Phosphorylierung der ERM-Proteine mittels Western Blot (2.3.2) analysiert werden, erfolgte die Ernte in 1 ml PERM Zelllysis-Puffer. Für die Lyse wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, sofort weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.5 Protein-Expression und -Extraktion aus Bakterien

Fusionsproteine bestehend aus Glutathion-S-Transferase (GST) und den zu untersuchenden Zielproteinen wurden durch Transformation der entsprechenden pGEX-Vektoren (2.1.10) in Bakterien exprimiert. Die verwendeten Vektoren erlauben die Induktion der Proteinexpression durch Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) gezielt in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien. Hierzu wurden BI21-Codon-Plus®(DE3)-RIL mit den entsprechenden Vektoren transformiert (2.2.1) und nach 24h eine 5ml Vorkultur in Ampicillin-haltigem (100 μ g/ml) LB-Medium angeimpft und bei 37 °C kultiviert. Weitere 12 h später wurde damit eine Hauptkultur von 200 ml zu einer OD von 0,1 angeimpft, bis zu einer OD von 0,6 kultiviert und durch

Zugabe von IPTG die Proteinexpression induziert. Nach einer Expressionsdauer von 8 h bei 37 °C wurden die Bakterien pelletiert (JA10 Rotor, 10 min, 3500 rpm, 4 °C), in 7,5 ml Sonifizierungspuffer resuspendiert und dreimal für jeweils 30 s mit Ultraschall behandelt (Micro Ultrasonic Cell Disrupter, *Outputcontrol*: 60) um Zellen aufzuschließen, wobei nach dem ersten Ultraschallschritt 75 µl 100 mM PMSF in Isopropanol zugegeben wurden. Das Lysat wurde für 30 min bei 4 °C (in 14 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio one, Frickenhausen)) zentrifugiert (JA20 Rotor, 9500 U/min), der Überstand abgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.6 GST-Pulldown

Für den Nachweis von *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen wurde ein GST-*Pulldown* Experiment verwendet. Hierbei wird zum Beispiel einer der zu untersuchenden Bindepartner, fusioniert mit Glutathion-S-Transferase (GST), in Bakterienzellen exprimiert. Der potentielle Bindepartner wird ektopisch in heterologen Zellen exprimiert. Die hohe Affinität von GST zu Glutathion gestattet es, das Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose-Kügelchen zu immobilisieren, bevor diese zusammen mit dem, potentielle Bindepartner enthaltenden Zelllysat inkubiert werden. Kommt es zu einer Bindung dieser Proteine, kann der potentielle Bindepartner nach mehrmaligem Waschen aus dem Zelllysat präzipitiert, eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert werden.

Pro Ansatz wurden hierfür 50 µl Glutathion-Sepharose-Suspension (Amersham, Freiburg) dreimal mit 900 µl IP-Waschpuffer gewaschen. Die Pelletierung der Sepharose erfolgte hier und im Folgenden durch Zentrifugation für 1 min bei 30 x g. Anschließend wurden 350 µl Bakterienlysat (2.3.5) zusammen mit der Glutathion-Sepharose-Suspension für 4 h bei 4 °C in einem Über-Kopf-Schüttler bei 6 U/min inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal für 5 min mit IP-Waschpuffer gewaschen, 500 µl HEK293TN-Zelllysat (2.3.4) zugegeben und über Nacht wie oben

beschrieben inkubiert. Für den *Input* wurden 37,5 µl HEK293TN-Zelllysat abgenommen, mit 12,5 µl 4x-SDS-Probenpuffer versetzt, 6 min bei 95 °C hitzedenaturiert und bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Suspension dreimal für 10 min mit 900 µl IP-Waschpuffer und einmal für 1 min mit 900 µl 1x PBS gewaschen und pelletiert. Das Pellet wurde darauf in 50 µl 1x-SDS-Probenpuffer in 1x PBS aufgenommen, für 6 min bei 95 °C hitzedenaturiert und bei -80 °C gelagert. Die Analyse erfolgte anschließend mittels SDS-PAGE (2.3.1) und Western Blot (2.3.2).

2.3.7 Synaptosomenpräparation

Als Synaptosomen werden Vesikel aus pre- und postsynaptischen Membranen von Nervenzellen bezeichnet, die *in vitro* nach Homogenisierung und bestimmten Zentrifugationsschritten aus neuronalem Gewebe entstehen. Durch diese Präparation ist es möglich, speziell synaptische Proteine anzureichern und zu analysieren (Whittaker *et al.*, 1964). Hierzu wurden jeweils eine Radixin *Knockout* Maus (Rdx KO (-/-)) bzw. wildtypische Maus (WT (+/+)) dekapitiert, das gesamte Gehirn entnommen und in 4 ml Sucrose-Puffer A überführt. Anschließend erfolgte die Homogenisierung in einem 15 ml Potter S (B Braun, Melsungen AG, Melsungen) mit 12 Stößen bei 900 U/min. Nach vier Stößen wurden 4 ml Sucrose-Puffer A zugegeben. Anschließend wurde das homogenisierte Gehirn bei 4 °C für 10 min und 1400 x *g* ((14 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio one, Frickenhausen); JA20 Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml Sucrose-Puffer A resuspendiert und erneut mit 8 Stößen bei 900 U/min homogenisiert. Darauf wurden 4 ml Sucrose-Puffer A zugegeben und wie oben beschrieben bei 4 °C für 10 min bei 700 x *g* zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und bei 4 °C für 10 min bei 13.800 x *g* zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Sucrose-Puffer B resuspendiert und auf einen Sucrose-Gradienten (1,2 M, 1,0 M und 0,85 M Sucrose, jeweils 3 ml von unten nach oben aufsteigend) gegeben und bei 4 °C für zwei Stunden bei 82.500 x *g* zentrifugiert (SW40Ti Rotor). Synaptosomen wurden hierbei an der Grenzschicht zwischen 1,2 M und 1 M

Sucrose angereichert. Diese Bande wurde vorsichtig abgenommen, in 4x-SDS-Probenpuffer verdünnt, für 6 min bei 95 °C hitzedenaturiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Analyse erfolgte anschließend mittels SDS-PAGE (2.3.1) und Western Blot (2.3.2).

2.4 Zellbiologie und Immunzytochemie

2.4.1 Kultur von HEK293TN-Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank und unter Verwendung steriler Gefäße und Reagenzien vollzogen. HEK293TN-Zellen (2.1.5) wurden bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre auf 100 mm Zellkulturschalen (Sarstedt, Newton, USA) kultiviert. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen alle 2 bzw. 3 Tage im Verhältnis 1:4 bis 1:8, abhängig von der Konfluenz, passagiert. Zunächst wurden die Zellen mit 10ml 1x PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1x Trypsin-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, USA) für 2 min bei RT aus dem Zellverband und von der Kulturschale gelöst. Die proteolytische Aktivität von Trypsin wurde durch Zugabe von HEK293TN-Medium inaktiviert, bevor die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und anschließend auf vorgelegtes Medium enthaltende Kulturschalen in entsprechender Verdünnung verteilt wurden.

2.4.2 Präparation und Kultur primärer hippokampaler Neurone

Zur Kultivierung von hippokampalen Neuronen wurden neugeborene wildtypische (+/+) und homozygote (-/-) Radixin *Knockout* Mäuse (P0) durch Dekapitation getötet. Die Hippokampi wurden in eiskaltem 1x PBS, versetzt mit 10 mM Glukose, präpariert und zur Vereinzelung der Zellen wurden die Gewebe mit 10 µg/ml DNase I und 0,5 mg/ml Papain (alle SIGMA, Taufkirchen) in 10 mM Glukose in 1x PBS für 25min bei 37 °C inkubiert. Nach

Waschen mit 20 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium* DMEM/F12-*complete* (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden die Zellen zum Vereinzeln vorsichtig in 2ml desselben Mediums mit abgerundeten Pasteurpipetten trituriert. Die Zellen wurden dann in DMEM/F12-*complete* auf 12 mm Glasplättchen in einer Dichte von 140.000 Zellen pro Glasplättchen ausgesät. Die Glasplättchen wurden zuvor mit 1,5 µg/ml Poly-L-Lysin in 1x PBS und mit 20 µg/ml Laminin in H₂O (beide SIGMA, Taufkirchen) jeweils über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach jedem Beschichtungsschritt erfolgten zwei Waschschrte mit H₂O. Die Kulturen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Nach 4 bis 5 Stunden wurde das Medium durch Neurobasalmedium ersetzt. Nach 3 Tagen in Kultur (DIV 3) wurde 3 µM 1-[β-D-Arabinofuranosyl]-Cytosin (SIGMA, Taufkirchen) zu den Kulturen gegeben, um die Proliferation von Astrozyten zu stoppen. Alle 7 Tage in Kultur wurde ein Drittel des Kulturmediums durch frisches Neurobasalmedium ersetzt.

2.4.3 Immunzytochemie

Auf 12 mm-Glasplättchen kultivierte hippokampale Neurone wurden mit 500µl 1x PBS gewaschen und für 12 min in 500 µl 4% (w/v) Paraformaldehyd und 4% (w/v) Sucrose in 1x PBS fixiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit 500 µl 1x PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellmembran 4 min mit 500 µl 0,25% (v/v) Triton-X-100 in 1x PBS inkubiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen zur Minimierung unspezifischer Bindungen 30 min in 500 µl 1% (w/v) bovinem Serumalbumin (BSA) inkubiert, gefolgt von der Inkubation in entsprechend verdünntem Primärantikörper in 1% (w/v) BSA für 1 Stunde bei RT. Die Zellen wurden dreimal für 5 min in 500 µl 1x PBS gewaschen und für 45 min mit fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper in 1% (w/v) BSA im Dunkeln bei RT inkubiert, um ein Ausbleichen zu verhindern. Nach drei weiteren Waschschrten in 1x PBS für jeweils 5 min wurden die Glasplättchen mit AquaPoly-Mount (Polysciences, Warrington, USA) auf Objektträgern fixiert, bei RT luftgetrocknet und bei 4 °C

unter Lichtausschluss gelagert. Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Mikroskop und der entsprechenden Software (siehe 2.1.2).

2.4.4 Transfektion kultivierter Zellen

HEK293TN-Zellen (2.1.5) wurden mit Hilfe von Kalziumphosphat nach der Standardmethode (Chen und Okayama, 1987) transfiziert. Zunächst wurden die Zellen vereinzelt und auf 100 mm Zellkulturschalen (Sarstedt, Newton, USA) ausgesät. Die Kulturen wurden dann bei ca. 40-50% Konfluenz transfiziert. Für eine 100 mm Zellkulturschale wurden 12 µg Plasmid-DNA in 225 µl sterilem H₂O aufgenommen, mit 75 µl 1M CaCl₂ versetzt und gemischt. Diese Lösung wurde nun langsam und unter Vortexen schrittweise in 300 µl 2x HBS pipettiert. Nach 15 min Inkubationszeit bei RT wurde der Transfektionsmix in das HEK293TN-Medium (ohne Zusatz von G418) über den Zellen unter leichtem Schwenken hinzutropft und für 24 h bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert.

Neuronale Primärkulturen (2.4.2) auf 12 mm Glasplättchen wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll mit Hilfe von Kalziumphosphat zwischen neun und zwölf Tagen in Kultur (DIV 9-12) transfiziert. 2 µg Plasmid-DNA wurden in 18,75 µl sterilem H₂O aufgenommen und mit 6,25 µl 1 M CaCl₂ versetzt. Bei Doppeltransfektionen wurde 1 µg Plasmid-DNA pro Konstrukt eingesetzt. Diese Lösung wurde nun langsam und unter Vortexen schrittweise in 25 µl 2x HBS pipettiert und dann für 15 min bei RT inkubiert. Vom präkonditionierten Medium der zu transfizierenden Zellen wurden 700 µl abgenommen und separat aufbewahrt. Zu dem auf den Zellen verbliebenen Medium wurde der Transfektionsmix hinzupipettiert. Nach Inkubation der Zellen bei 5% (v/v) CO₂ für eine Stunde bei 37 °C wurde das komplette Medium abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen kurz mit 500 µl vorgewärmtem HEPES-Puffer gewaschen und das zuvor separierte Medium sowie zusätzlich 300 µl frisches Neurobasalmedium zurück auf die

Zellen gegeben. Die Expressionsdauer betrug je nach Konstrukt 12 bis 72 Stunden.

2.4.5 Pharmakologische Behandlung von primären hippokampalen Neuronen

Primäre hippokampale Neurone wurden nach DIV 14-21 auf 12 mm Glasplättchen mit pharmakologischen Substanzen in der angegebenen Konzentration und Zeit bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Als Kontrollen wurden Neurone derselben Präparation nur mit dem Lösungsmittel inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 500 µl 1x PBS gewaschen und entweder mittels eines Zellschabers (Sarstedt, Nümbrecht) in 250 µl P-ERM Zelllysis-Puffer geerntet oder fixiert und für die Immunzytochemie verwendet (2.4.3). Für die Lyse wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 4x-SDS-Probenpuffer verdünnt, für 6 min bei 95 °C hitzedenaturiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Parallel wurden 10 µl des Überstandes abgenommen und mit Hilfe der Reaktionskomplettausstattung BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) die Proteinkonzentrationen bestimmt. Hiernach erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE (2.3.1) und Western Blot (2.3.2).

Folgende pharmakologische Substanzen wurden in der angegebenen Konzentration verwendet:

| Name | Eingesetzte Konzentration | Lager-Konzentration und Lösungsmittel | Wirkungsweise | Herkunft |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---|------------------------------|
| AMPA | 4 μ M | 5 mM in H ₂ O | Agonist des AMPA-Rezeptors | SIGMA-Aldrich, Taufkirchen |
| Bicucullin | 50 μ M | 10 mM in H ₂ O | Antagonist des GABA-Rezeptors | SIGMA-Aldrich, Taufkirchen |
| GABA | 50 μ M | 50 mM in H ₂ O | Agonist des GABA-Rezeptors | SIGMA-Aldrich, Taufkirchen |
| Rho-Kinase-Inhibitor-II | 50 μ M | 5 mg/ml in DMSO | Inhibitor der RhoA-abhängigen Kinase (ROCK) | Calbiochem, Merck, Darmstadt |
| Staurosporin | 10 nM | 50 mM in DMSO | Allgemeiner Proteinkinase Inhibitor | Tocris, Missouri, USA |

Tab. 2.6: Verwendete Pharmaka für die Untersuchung der Phosphorylierung von ERM-Proteinen

2.4.6 Induktion chemischer LTP und LTD

Für die aktivitätsabhängige Untersuchung der Phosphorylierung der ERM-Proteine wurden Protokolle zur Induktion von *long term potentiation* (LTP) und *long term depression* (LTD) basierend auf der Applikation von Forskolin und Rolipram bzw. DHPG eingesetzt (Huber *et al.*, 2001; Otmakhov *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 1997).

Für die Induktion von LTP wurden primäre hippocampale Neurone nach DIV 14-21 zunächst für 20 min in 1 ml ACSF(+) inkubiert, einmal kurz mit ACSF(-) gewaschen und danach für 10 min in ACSF(-) supplementiert mit 50 μ M Forskolin und 0,1 μ M Rolipram (beide Tocris, Missouri, USA) bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Als Kontrolle wurden Neurone derselben Präparation eingesetzt, die parallel mit ACSF(+) supplementiert mit DMSO (SIGMA-Aldrich, Taufkirchen) inkubiert wurden. Hiernach wurde der Überstand abgenommen, 700 μ l konditioniertes Neurobasal-Medium auf die

Neurone gegeben und für weitere 20 min bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert.

Für die Induktion von LTD wurden primäre hippocampale Neurone nach DIV 14 für 5 min mit 50 µM DHPG (Tocris, Missouri, USA) oder H₂O als Kontrolle in 300 µl Neurobasal-Medium behandelt, einmal mit 1x PBS gewaschen und für weitere 60 min in 500 µl konditioniertem Neurobasal-Medium bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen einmal mit 500 µl eiskaltem 130 mM HEPES in 1x PBS gewaschen und entweder mit 250 µl HEPES-Lysis-Puffer geerntet; analog wie unter 2.4.5 beschrieben, oder fixiert und für die Immunzytochemie verwendet (2.4.3).

2.5 Verhaltensexperimente

2.5.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle Experimente wurden mit adulten weiblichen und männlichen Radixin *Knockout* (-/-) Mäusen durchgeführt (2.1.4), die als Nachkommen von heterozygoten Elterntieren in einer spezifizierten pathogenfreien Versuchstierhaltung des Labors für Verhaltensneurobiologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH, Zürich, Schweiz) geboren wurden. Nach 21 Tagen wurden die Nachkommen von den Elterntieren abgesetzt und nach Geschlecht getrennt. Im Alter von ca. drei Monaten, eine Woche vor Beginn der Experimente, wurden die Tiere in Einzelkäfige der Etagenhaltung überführt. Hier wurden die Mäuse bei einem umgekehrten 12 Stunden Tagesrhythmus mit einer Lichtphase von 20:00-08:00 Uhr bei 22 °C und 55% Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle Tiere hatten direkten Zugang zu Wasser und Futter. Alle Experimente wurden in der Dunkelphase durchgeführt. Als Kontrollgruppe wurden wildtypische (+/+) Wurfgeschwister verwendet. Die Durchführung erfolgte unter Genehmigung des Schweizer Veterinäramts in Übereinstimmung mit den Richtlinien für die Behandlung von Labortieren (Olfert *et al.*, 1993).

2.5.2 Experimentelles Design

Für alle Experimente wurde zwischen Genotyp und Geschlecht unterschieden (Zwischensubjektfaktoren). Für das *trace fear conditioning* Experiment wurde zusätzlich zwischen *no trace* und *20s trace* unterschieden. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR (2.2.13), die Geschlechtsbestimmung nach Begutachtung. Alle Experimente erfolgten in einer balancierten, zufälligen Abfolge von Genotyp und Geschlecht. In der folgenden Tabelle ist die Anzahl aller Tiere und der Ablauf für die jeweiligen Experimente dargestellt:

| Ablauf der Experimente | Tage | Anzahl Rdx KO (-/-) | | Anzahl WT (+/+) | |
|---|------|---------------------|----------|-----------------|----------|
| | | Weiblich | Männlich | Weiblich | Männlich |
| Gruppe 1: <i>Elevated plus maze</i> | 1 | 5 | 5 | 3 | 7 |
| Gruppe 2: 2.1 <i>Open Field</i> | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 2.2 <i>Trace fear conditioning</i> | 7 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Gruppe 3: 3.1 <i>Rotarod</i> | 2 | 4* | 4* | 4 | 4 |
| 3.2 Horizontales Gitter | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 3.3 <i>Trace fear conditioning</i> | 7 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Gruppe 4: <i>Water maze (working memory)</i> | 12 | 6 | 9 | 5 | 5 |
| Gruppe 5: <i>Water maze (reference memory)</i> | 12 | 6 | 7 | 6 | 4 |

Tabelle: 2.7: Zusammenfassung des Experimentellen Ablaufs und der Anzahl der eingesetzten Mäuse. *Nach der statistischen Analyse wurden jeweils ein weibliches und ein männliches Tier der Rdx KO (-/-) Mäuse ausgeschlossen

2.5.3 Aufbau und Ablauf der Verhaltensexperimente

2.5.3.1 *Elevated plus maze*

Das *Elevated plus maze* wird eingesetzt, um spontanes Angstverhalten von Nagetieren zu testen und basiert auf dem natürlichen Verhalten dieser Tiere, hohe, offene Räume zu meiden (Crawley, 2007). Das *Elevated plus maze* wurde aus schwarzgestrichenem Plexiglas hergestellt und mittels eines Stativs 50 cm über dem Erdboden platziert. Das *plus maze* besteht aus vier gleich großen Armen ausgehend von einem quadratischen Zentrum mit der Kantenlänge von 5 x 5 cm. Jeder Arm ist 5 cm breit und 30 cm lang. Jeweils ein Paar der sich gegenüberliegenden Seiten war durch 15 cm hohe, nichtdurchsichtige Wände an drei Seiten geschlossen und konnten nur über das Zentrum erreicht werden. Die beiden anderen Arme waren, bis auf eine 3 mm hohe Kante, nicht begrenzt. Das *maze* befand sich in einem Raum mit diffusem Licht und einer konstanten Temperatur von 23 ± 1 °C. Für den Test wurde eine Maus in das Zentrum gesetzt, der Kopf in Richtung eines offenen Arms weisend. Hiernach konnte sich diese für 5 min frei auf dem *maze* bewegen, bevor sie wieder zurück in den Käfig gesetzt wurde. Vor dem nächsten Test wurde das *maze* mit 70%igem Ethanol in H₂O gesäubert. Über dem *maze* war eine Digitalkamera befestigt, welche mit der Rate von 5 Hz Bilder an einen Computer übermittelte. Für die Analyse der Bilder wurde das Ethovision (Noldus Technology, Wageningen, Niederlande) *Tracking-System* benutzt. Hierbei wurden zwei Parameter bestimmt: (i) der prozentuale zeitliche Aufenthalt in den offenen Armen in Bezug auf die Gesamtzeit im *maze* [$\text{offen}/(\text{offen}+\text{geschlossen}) \cdot 100\%$]; (ii) die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme.

2.5.3.2 *Open Field*

Der *Open Field* Test wird zur quantitativen Analyse der Bewegungsaktivität und dem Erkundungsverhalten von Mäusen in einer neuen unbekanntem Umgebung eingesetzt (Crawley, 2007). Das *Open Field* bestand aus vier hölzernen, weißen Behältern mit einer Grundfläche von 40 x 40 cm und einer

Wandhöhe von 40 cm, welche sich in einem Raum mit diffusem Licht und einer konstanten Temperatur von 23 ± 1 °C befanden. Jede Maus wurde vorsichtig in der Mitte des Behälters platziert und ihr Verhalten über 60 min mittels einer Digitalkamera (wie unter 2.5.3.1) dokumentiert. Vor dem nächsten Versuch wurden die Behälter mit 70% Ethanol in H₂O gesäubert. Nach 24 h wurde jede Maus wieder in denselben Behälter gesetzt und der Versuch wiederholt. Für die Analyse wurde innerhalb von 5min-Intervallen die zurückgelegte Distanz in cm während der 60 Minuten langen Testphase an dem jeweiligen Tag bestimmt.

2.5.3.3 *Rotarod*

Um die Motorkoordination der Mäuse zu untersuchen, wurde das *Rotarod* Ugo-Basile Model 7650 (Comerio, VA, Italien) verwendet, welches sich in einem Raum mit diffusem Licht und einer konstanten Temperatur von 23 ± 1 °C befand. Pro Experiment wurde eine Maus getestet. Hierfür wurde diese auf das sich mit 4 U/min drehende *Rotarod* gesetzt. Während der fünfminütigen Testphase erhöhte sich die Drehzahl linear auf 40 U/min. Hierbei wurde die Latenzzeit mit einem Maximum von 300 s bis zum Herunterfallen dokumentiert. Nach 24 h wurde der Test mit denselben Mäusen einmal wiederholt.

2.5.3.4 Horizontales Gitter

Um speziell die Motor-Stärke der Vorder- und Hinterpfoten zu untersuchen, wurde ein horizontales Gitter eingesetzt. Hiefür wurde ein gewöhnlicher Käfigdeckel verwendet, deren Ränder 4 cm breit mit Gewebeklebeband beklebt waren. Dadurch wurde verhindert, dass die Maus über die Kanten klettern konnte. Das Gitter wurde mittels eines Stativs 40 cm horizontal über dem Boden in einem Raum mit diffusem Licht und einer konstanten Temperatur von 23 ± 1 °C befestigt. Für den Test wurde die Maus in der Mitte des Gitters platziert und dieses vorsichtig umgedreht, wodurch die Maus

Kopfüber an dem Gitter hing. Direkt anschließend wurde die Latenzzeit mit einem Maximum von 300 s bis zum Herunterfallen dokumentiert.

2.5.3.5 *Morris water maze*

Der *Morris water maze* Test ist ein weit verbreitetes Experiment, um räumliches Lernen und Gedächtnis zu untersuchen (Lathe & Morris 1994). Hierbei werden Mäuse oder Ratten in ein wassergefülltes Becken gesetzt und müssen eine nicht sichtbare Plattform durch die Orientierung anhand von Landmarken innerhalb des Versuchsraums wiederfinden.

Das Becken bestand aus einem weißen Tank mit einem Durchmesser von einem Meter und einer Höhe von 36 cm, welcher auf eine Höhe von 20 cm mit Wasser (21 ± 1 °C) befüllt war. Imaginär wurden zwei orthogonale Linien gebildet, die durch das Zentrum des Beckens verliefen, so dass vier gleichgroße Quadranten (NE, SE, SW und NW) entstanden; ihre Schnittpunkte mit dem Rand des Beckens wurden als N, E, S und W bezeichnet. Der Tank stand auf einem Plateau in einer Höhe von 30 cm in einem Raum mit diffusen Lichtverhältnissen und einer konstanten Temperatur von 21 ± 1 °C. Um das Becken waren unterschiedliche sichtbare Landmarken verteilt, die über die gesamte Testphase nicht verändert wurden. Nach jedem Testdurchgang mit männlichen bzw. weiblichen Mäusen und am Ende jedes Tages wurde das Becken gereinigt und mit frischem Wasser befüllt. Als versteckte Plattform wurde ein Plexiglaszylinder mit einer Höhe von 19 cm und einem Durchmesser von 7 cm verwendet, der auf dem Grund des Beckens fest verankert werden konnte. Wurde die Plattform gefunden, war es den Mäusen aufgrund der rauen Oberfläche möglich auf diese zu klettern und dort zu verweilen. Vor dem eigentlichen Test hinsichtlich *working memory* (2.5.3.5.1) bzw. *reference memory* (2.5.3.5.2) erfolgte die Untersuchung mit einer sichtbaren Plattform. Hierbei wurde die Plattform in der Mitte des Beckens platziert und mit einem roten Schirm (Durchmesser: 12 cm) sichtbar gemacht. Die Mäuse hatte viermal (nach 6, 14 und weiteren 6 h) zwei Versuche, mit einer Pause von 15 s, die Plattform innerhalb von 60 s zu erreichen. Die Startpositionen befanden sich in N, E, S oder W an denen die

Mäuse mit dem Kopf zum Rand weisend in das Becken gesetzt wurden. Erreichte die Maus die Plattform nicht innerhalb von 60 s wurde sie vorsichtig zu der Plattform geleitet. Nach Erreichen der Plattform durften die Mäuse für 15 s auf dieser verweilen. Innerhalb der kurzen Pausen wurden die Mäuse vorsichtig mit einem Tuch getrocknet und anschließend wieder in das Becken gesetzt. Während der längeren Pausen wurden die Mäuse wieder zurück in ihre Käfige gesetzt. Über dem Becken war eine Digitalkamera befestigt, welche mit der Rate von 5 Hz Bilder an einen Computer übermittelte. Für die Analyse der Bilder wurde das Ethovision (Noldus Technology, Wageningen, Niederlande) *Tracking-System* benutzt. Hierbei wurden die Zeit bis zum Erreichen der Plattform (Latenzzeit) und die zurückgelegte Strecke dokumentiert.

2.5.3.5.1 *Water maze (working memory)*

Für das *working memory* Protokoll im *water maze*, welches speziell für die Untersuchung der kurzfristigen Speicherung und Verarbeitung von Informationen aus der Umgebung verwendet wird (Becker & Morris 1999), wurde die versteckte Plattform (siehe 2.5.3.5) jeden Tag an einer neuen Position innerhalb des Beckens positioniert. Der Test erfolgte in demselben Becken wie unter 2.5.3.5 beschrieben. Die Mäuse hatten nach dem Test mit der sichtbaren Plattform an Tag 1 bis 6 zwei Versuche mit einer Pause von 15 s die Plattform zu erreichen und an Tag 7 bis 9 zwei Versuche mit einer Pause von 10 min. Falls die Maus die Plattform innerhalb von 60 s nicht erreichte, wurde sie vorsichtig zu der Plattform geleitet. Nach Erreichen der Plattform durften die Mäuse für 15 s auf dieser verweilen. Zwischen den Testphasen wurden die Mäuse vorsichtig mit einem Tuch getrocknet, während der langen Pause in einer lichtundurchlässigen Box gehalten und anschließend wieder in das Becken gesetzt. Nach den Tests wurden sie zurück zu ihren Käfigen gebracht. Zwölf Plattformpositionen wurden definiert (siehe 2.5.3.5): sechs im Abstand von 35 cm (in Richtung N, S, NE, SE, SW, und NW) und weitere sechs im Abstand von 15 cm (in Richtung N, E, S, W, NW und SE) zum Zentrum des Beckens. Die

Startpositionen waren für die direkt aufeinander folgenden Versuche immer unterschiedlich und wurden zufällig aus N, E, S, W, NE, NW, SE und SW gewählt. Für die Analyse wurde die durchschnittliche Zeit bis zum Erreichen der Plattform (Latenzzeit) innerhalb eines Versuchs bzw. die Differenz zwischen dem ersten und zweiten Versuch über die neun Testtage dokumentiert.

2.5.3.5.2 *Water maze (reference memory)*

Das *reference memory* Protokoll im *water maze* wird speziell für die Untersuchung der langfristigen Speicherung von Informationen aus der Umgebung für die Orientierung verwendet (Morris & Frey 1997). Die versteckte Plattform befand sich nach dem Test mit der sichtbaren Plattform (vergleiche 2.5.3.5) für die folgenden sechs Tage immer an derselben Position innerhalb des Beckens (*Acquisition Phase*). Der Test erfolgte in demselben Becken wie unter 2.5.3.5. Die Mäuse wurden trainiert, die Plattform zu finden. Hierfür hatten sie pro Tag zwei Versuche mit einer Pause von 15 s. Falls die Maus die Plattform innerhalb von 60 s nicht erreichte, wurde sie vorsichtig zu der Plattform geleitet. Nach Erreichen der Plattform durften die Mäuse für 15 s auf dieser verweilen. Zwischen den Testphasen wurden die Mäuse vorsichtig mit einem Tuch getrocknet und anschließend wieder in das Becken gesetzt. Hiernach wurden sie zurück zu ihren Käfigen gebracht. Die Position der Plattform wurde für jede Maus zufällig aus den folgenden vier Positionen gewählt: NE, NW, SE und SW, welche sich in der Mitte des jeweiligen Quadranten mit einem Abstand von 35cm zum Zentrum des Beckens befanden.

Nach der *Acquisition Phase* folgte an Tag 7 der *Probe Test*. Hierfür wurde die Plattform aus dem Becken entfernt, die Maus an der gegenüberliegenden Position der ehemaligen Plattform in das Becken gesetzt und für 45 s frei schwimmen gelassen. Anschließend wurde die Maus aus dem Becken genommen, mit einem Tuch getrocknet und wieder zurück in ihren Käfig gesetzt. Für die Analyse wurde das Suchmuster sowie die zurückgelegte

Distanz und der prozentuale Aufenthalt innerhalb der vier Quadranten über die Zeit dokumentiert.

An Tag 8 bis 10 erfolgte die *Reversal Phase*. Hierfür wurde die Plattform in der Mitte des Quadranten gegenüber ihrer vorherigen Position verankert. Der Test der Mäuse erfolgte wie zuvor für die *Acquisition Phase* beschrieben.

2.5.3.6 *Trace fear conditioning*

Eine spezielle Hippokampus-abhängige Form des assoziativen Lernens stellt das *Trace fear conditioning* dar (Crestani *et al.*, 2002; Paulsen & Moser 1998; Wasserman & Miller 1997), bei dem der unbedingte Reiz (US) und der bedingte Reiz (CS) zeitlich voneinander getrennt sind.

Hierfür wurden zwei unterschiedliche Konditionierungskäfige in verschiedenen Umgebungen eingesetzt. Der erste Aufbau (Umgebung A) bestand aus vier „*Skinner-Boxen*“ (Coulborn Instruments, Model E10-10; Allentown, PA, USA), deren Innenraum schallisoliert und belüftet war. Jede Kammer enthielt ein Bodengitter aus Edelstahlrohren (Durchmesser: 4 mm), in einem Abstand von 6 mm zueinander, über die ein Elektroschock appliziert werden konnte (Generator: Coulborn Instruments, Model E13-14; Allentown, PA, USA). Die Hauptkammer hatte eine Größe von 30 x 25 x 29 cm, wobei diese durch eine weitere rechteckige Kammer aus Plexiglas auf eine Fläche von 17,5 x 13 cm innerhalb der Hauptkammer beschränkt wurde. Die Kammer wurde mit einer Glühbirne (2,8 W) beleuchtet, die sich an der Wand 21 cm über dem Bodengitter befand. An dem Bodengitter befand sich ein kleiner Elektromotor, an dessen Rad einseitig eine Mutter verschraubt war, wodurch eine Unwucht und damit eine Vibration des Gitters erzeugt wurde. Das dadurch entstandene Geräusch wurde für eine Minute mit einem Mikrophon aufgenommen und permanent über einen Lautsprecher, der unterhalb der Glühbirne befestigt war, mit 65 dB wiedergegeben.

Der zweite Aufbau (Umgebung B) bestand aus vier lichtundurchlässigen, hölzernen Kabinen, deren Innenraum ebenfalls schallisoliert und belüftet war. Im Innenraum befand sich eine zylinderförmige Kammer aus Plexiglas (Durchmesser: 19 cm) mit einem glatten Boden aus weißem Plastik. Anstelle

der Glühbirne wurde ein Infrarotlicht verwendet. Wie in Umgebung A wurde über einen Lautsprecher permanent das Geräusch des Elektromotors mit 65 dB wiedergegeben. Als zusätzlicher dominanter Geruch wurde eine nicht entzündete Duftkerze mit Zimtgeruch (COOP, Zürich, Schweiz) in die linke Ecke der Kammern gestellt. Jede der acht Kammern enthielt zusätzlich eine Digitalkamera, die 30 cm über dem Zentrum des Bodens der Kammern positioniert war. Diese war über einen Multiplexer (YSQ-430, Sony Japan) an einen Computer angeschlossen, auf dem die NIH Image Software (Version 1.61; National institute of health, West Chester, USA) für Echtzeit-Analysen installiert war. Der Algorithmus für die Detektion der *freezing*-Reaktion wurde schon zuvor sehr detailliert durch Richmond *et al.* 1998 beschrieben: Sukzessive Digitale Bilder (192 x 144 = 27.648 Pixel, 8-bit Graustufen) mit einer Rate von 1 Hz werden hierbei miteinander verglichen und der Unterschied in der Anzahl der Pixel von einem Bild zum Nächsten berechnet. Wenn dieser geringer als 0,05% im Vergleich zu der gesamten Anzahl der Pixel pro Bild ist, wird der Zustand des Tieres in diesem Sekundenintervall als *freezing* bezeichnet.

Für den *Trace fear conditioning* Versuch wurden die vier Gruppen der Mäuse (Genotyp (2) x Geschlecht(2)) in zwei weitere Gruppen eingeteilt: *No trace* und *20s trace*.

An Tag 1 wurden allen Tieren drei aufeinander folgende Paare von CS und US in der Umgebung A präsentiert. Der CS war durch die erzeugte Vibration des Elektromotors gegeben, der US durch einen Elektroschock (0,25 mA, 1 s). In der *no trace* Gruppe folgte der US dem 30 Sekunden langen CS sofort, in der *20s trace* Gruppe mit einer Verzögerung von 20 Sekunden. Nach dem Test wurden die Tiere zurück in ihre Käfige gesetzt. Für die Analyse wurde der prozentuale Anteil an *freezing* über die Zeit des CS während der drei Paare aus CS und US dokumentiert und als Maß der erworbenen Konditionierung interpretiert. In Abbildung 2.1 ist der schematische Ablauf der Konditionierung in der Umgebung A dargestellt.

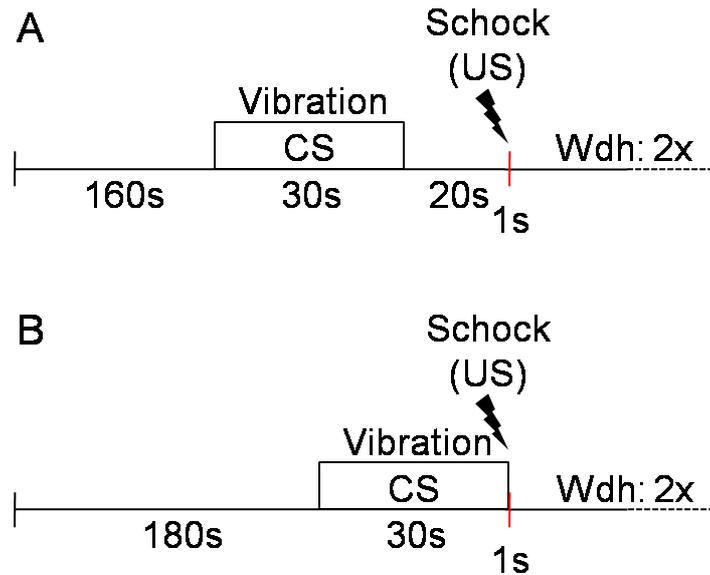


Abb. 2.1: Schematischer Ablauf der Konditionierung in Umgebung A. (A) *no trace* Gruppe. (B) *20s trace* Gruppe. Bedingter Reiz: Vibration (CS), unbedingter Reiz: Elektroschock (US). Wiederholung (Wdh).

An Tag 2 wurden die Mäuse für acht Minuten ohne Präsentation von CS und US zurück in die Umgebung A gesetzt, um die *freezing*-Reaktion auf die Umgebung A zu untersuchen. Hierfür wurde der prozentuale Anteil an *freezing* in Minuten-Intervallen über die gesamte Zeit dokumentiert. Anschließend wurden die Tiere wieder zurück in ihre Käfige gesetzt.

An Tag 3 bis 7 wurde die *freezing*-Reaktion auf den CS in einer neuen Umgebung getestet. Hierfür wurden die Mäuse in Umgebung B gesetzt und der CS über acht Minuten präsentiert. Anschließend wurden die Tiere wieder in ihre Käfige zurückgesetzt. Für die Analyse wurde der durchschnittliche Unterschied der *freezing*-Reaktion der letzten 15 s vor dem CS und der ersten 15 s während des CS in Prozent über die fünf Tage dokumentiert und als ein Maß der Konditionierung interpretiert. In Abbildung 2.2 ist der schematische Ablauf des CS-Tests in Umgebung B dargestellt.

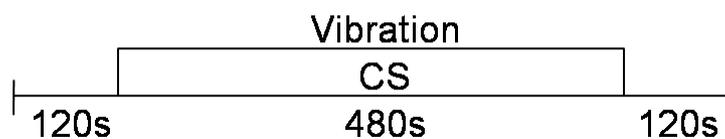


Abb. 2.2: Schematischer Ablauf des CS-Tests in Umgebung B. Bedingter Reiz: Vibration (CS).

2.6 Quantitative Analyse und Statistik

2.6.1 Western Blot Signalintensitäten

Für die Bestimmung der Signalintensitäten von Immundetektionen (2.3.3) nach Western Blot (2.3.2) wurden die Filme mit Hilfe eines Scanners mit Durchlichtaufsatz (Scanner: Epson perfection 3200 PHOTO) in Graustufen mit 300 *dpi* digitalisiert und unter Verwendung der ImageJ Software Version 1.38 (National institute of health, West Chester, USA) analysiert. Alle relativen Signalintensitäten wurden anhand der Signalintensitäten der entsprechenden Kontrolldetektionen normalisiert. Die daraus resultierenden Werte für die Kontrollbedingungen wurden gleich 100% gesetzt und die Werte der übrigen Bedingungen im Verhältnis zu diesen betrachtet. Die Verarbeitung der Rohdaten und die statistische Analyse durch Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung, des Standardfehlers des Mittelwertes und der *p*-Werte nach dem *student's test* erfolgte unter Verwendung des Programms Excel (Microsoft, München). Hierbei wurde ein zweiseitiger, gepaarter *t-test* mit folgenden Irrtumswahrscheinlichkeiten gewählt: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM) von der Anzahl *n* unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren dementsprechend den SEM.

2.6.2 IHC Kolokalisation und Clustergrößen

Für die Analyse der Lokalisation der GABA_AR $\alpha 5$ Untereinheit oder Radixin wurde die Kolokalisation dieser mit dem synaptischen Marker SV2 als eine synaptische Lokalisation definiert. Hierfür wurden morphologisch intakte Neurone nach Transfektion (2.4.4) der entsprechenden Vektoren (2.1.10) oder einer pharmakologischen Behandlung (2.4.5) mit einer sich anschließenden Immunzytochemie (2.4.3) zufällig ausgewählt. Die Digitalisierung erfolgte durch konfokale Lasermikroskopie mit dem inversen konfokalen Laser-scanning Mikroskop Leica DM IRBE (Leica, Wetzlar) oder

dem konfokalen Laser-scanning Mikroskop Olympus Fluoview FV1000 (Olympus, Hamburg) und der entsprechenden Software jeweils in einem sequenziellen Mehrkanal-Aufnahme-Modus. Für konfokale Aufnahmen verschiedener Zellen wurden die gleichen Bildverstärker-Einstellungen innerhalb eines Experiments verwendet. Die Bilder wurden im TIF-Format gespeichert und mit Hilfe der Software MetaMorph 7.1 (Universal Imaging, Downingtown, USA) analysiert.

Für die Untersuchung der synaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ bzw. Radixin wurden die entsprechenden punktförmigen Signale (Cluster), die durch die Überlagerung mit dem Signal für SV2 gelb erschienen, und die Anzahl der übrigen GABA_AR $\alpha 5$ oder Radixin Signale, die rot erschienen, mit der Funktion „*count cells*“ nach einem Bildabgleich über „*threshold image*“, mit unveränderten Einstellungen innerhalb eines Experiments, bestimmt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil synaptischer Signale unter Verwendung folgender Formel berechnet: (Gelbe Signale / (gelbe Signale + rote Signale)) * 100%.

Für die Messung von Fluoreszenzintensitäten wurden die Mehrkanal-TiF-Bilder mit Hilfe der Funktion „*color separate*“ in den roten, grünen und blauen Kanal unterteilt. Anschließend wurde ein Bildabgleich mit der Funktion „*threshold image*“ ausgeführt. Mit Hilfe der Funktion „*Integrated Morphometry Analysis*“ wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (totaler Grauwert/Fläche) für jeden Kanal mit gleichen *threshold*-Einstellungen innerhalb eines Experiments bestimmt.

Die extrasynaptischen und synaptischen Cluster wurden mit Hilfe der Funktion „*count cells*“ bestimmt, wobei jedes einzelne begrenzte Signal als ein Objekt gezählt wurde. Anschließend wurde unter Verwendung der Funktion „*Integrated Morphometry Analysis*“ die Pixelanzahl der einzelnen Objekte bestimmt (*Area; single object*).

Die Verarbeitung der Rohdaten und die statistische Analyse erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Für die Untersuchung der extrasynaptischen und synaptischen Clustergrößen wurde zusätzlich eine Analyse der Variaten (ANOVA) mit Genotyp (Rdx KO (-/-) / WT (+/+)) x Lokalisation (synaptisch / extrasynaptisch) unter Verwendung des Programms SPSS; Version 15 (Chicago IL, USA) eingesetzt.

2.6.3 Verhaltensanalysen

Die Analyse der Daten aus den Verhaltenexperimenten (siehe 2.5) erfolgte unter Verwendung der parametrischen Analyse von Variaten (ANOVA) und der Analyse von Kovariaten (ANCOVA). Alle Analysen wurden mit Hilfe von SPSS für Window; Version 13 (Chicago IL, USA), mit einer zweiseitigen *Type I* Fehlerrate von $p < 0,05$ als Grenze für die statistische Signifikanz, durchgeführt. Hierbei beinhalteten die Zwischensubjektfaktoren: Genotyp (WT (+/+) vs. Rdx KO (-/-)) und Geschlecht (weiblich vs. männlich). Die Innersubjektvariablen setzten sich je nach Aufbau des Experiments zum Beispiel aus Tag, Intervall oder Versuch zusammen. Zur Übersicht sind die Innersubjektvariablen im jeweiligen Abschnitt der Ergebnisse separat angegeben. Für die ANCOVA aus den Experimenten des *Rotarods* und horizontalen Gitters wurde zusätzlich das Gewicht der Tiere, welches allgemein zwischen den Geschlechtern stark variiert, als Kovariate mit einbezogen. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (\pm SD) oder \pm Standardabweichung des Mittelwerts (\pm SEM) von der Anzahl n unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD oder die SEM.

3 Ergebnisse

Radixin (Rdx) wurde als ein neuer Interaktionspartner der GABA_A Rezeptor alpha5 Untereinheit (GABA_AR α5) identifiziert (Loebrich *et al.*, 2006) und scheint GABA_A Rezeptoren, welche speziell diese Untereinheit beinhalten, an extrasynaptischen Bereichen der Plasmamembran zu bündeln (siehe Einleitung 1.3). Mechanismen zur Regulation dieser Interaktion sowie deren Funktion im Hinblick auf eine extrasynaptische Bündelung wurden bislang nicht hinreichend untersucht. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Mechanismus sowie die physiologische Funktion der Interaktion von Radixin und der GABA_AR α5 Untereinheit genauer zu untersuchen.

3.1 Lokalisation der GABA_AR α5 Untereinheit nach der Expression von Radixin Mutanten

Die spezifische Phosphorylierung von Radixin an Threonin 564 ist für die Aktivierung des Proteins notwendig (Chen *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, inwieweit diese Phosphorylierung einen Einfluss auf die Lokalisation der GABA_AR α5 Untereinheit haben könnte, wurden GFP-Fusionsproteine zweier spezifischer Phosphorylierungsmutanten von Radixin generiert und in primären hippocampalen Neuronen exprimiert. Zum einen wurde Threonin durch Asparaginsäure ersetzt (RdxT564D-GFP), welche durch ihre negative Ladung eine ständige Phosphorylierung nachahmt (Phosphorylierungs-Mimik-Mutante), zum anderen wurde Threonin durch Alanin ersetzt (RdxT564A-GFP) welches nicht phosphoryliert werden kann (Phosphorylierungs-Minus-Mutante). Als Kontrolle wurde GFP exprimiert. Nach einer Expressiondauer von 24 h wurde eine Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen GABA_AR α5 und den präsynaptischen Marker SV2 durchgeführt. Anhand der Kolo-kalisation immunreaktiver Punkte von GABA_AR α5 (rot) mit SV2 (grün) war es möglich, eine Aussage über die synaptische Lokalisation von GABA_AR α5 zu treffen, welche in der Überlagerung der Punkte gelb erschien (Abb. 3.1 A). Der Prozentsatz der

synaptischen Lokalisation wurde durch das Verhältnis der gelben Punkte zu der Gesamtzahl der GABA_AR α5 positiven Punkte (rote plus gelbe Punkte per Neuron) ermittelt. Nach der Expression von GFP (Kontrolle) wurde eine synaptische Lokalisation von $14,89 \pm 2,30\%$ für GABA_AR α5 festgestellt. Vergleichbare Werte finden sich in der Literatur von unabhängigen Arbeitsgruppen (Brunig *et al.*, 2002). Die Analyse der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α5 nach RdxT564D-GFP Expression ergab keine signifikante Veränderung ($13,79 \pm 1,63\%$) im Vergleich zur Kontrolle. Hingegen führte die Expression von RdxT564A-GFP zu einem Anstieg der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α5 auf $34,20 \pm 2,98\%$ (Abb. 3.1 B). Diese Ergebnisse lassen auf eine synaptische Lokalisation von GABA_AR α5 in Abhängigkeit von einer spezifischen Phosphorylierung von Radixin an Threonin 564 schließen.

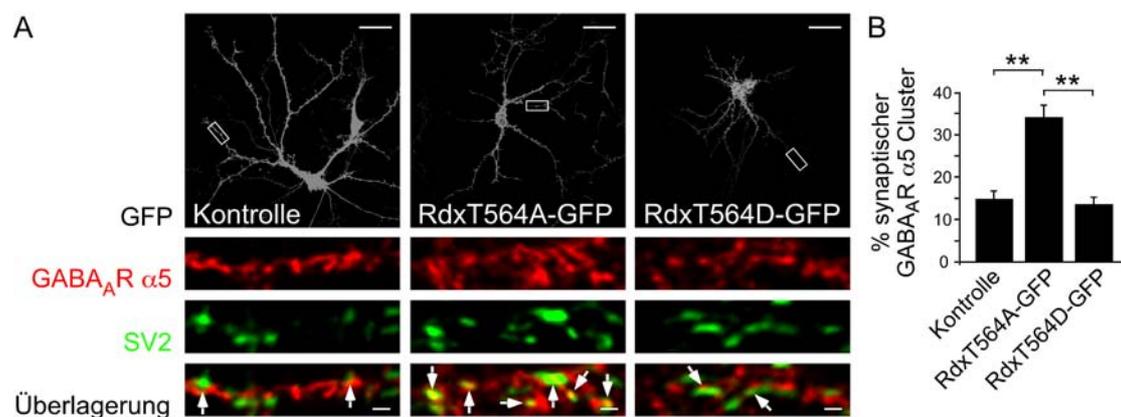


Abb. 3.1: Synaptische Verteilung von GABA_AR α5 nach Expression von Radixin-Phosphorylierungsmutanten. (A) Immunfärbung von GABA_AR α5 (rot) und SV2 (grün) nach der Expression von GFP (Kontrolle), RdxT564A-GFP (Phosphorylierungs-Minus-Mutante) und RdxT564D-GFP (Phosphorylierungs-Mimik-Mutante) in hippocampalen Neuronen. Die jeweils vergrößerten Bildausschnitte sind in der entsprechenden Übersicht (GFP Signal in Graustufen) mit einem Kasten markiert. Die Pfeile zeigen synaptische Lokalisationen (gelb) von GABA_AR α5 an SV2 positiven Synapsen in der Überlagerung. Die Größenbalken entsprechen 22 μm bzw. 1 μm (Bildausschnitte). (B) Quantifizierung der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α5 in Prozent. Insgesamt wurden 8611 Synapsen aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 10 bis 16 Neuronen analysiert, $**p < 0,01$. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

3.2 Einfluss von RhoGTPasen auf die Phosphorylierung der ERM-Proteine und die Lokalisation von GABA_AR α 5

Kleine RhoGTPasen spielen eine große Rolle bei Regulation des Aktin-Zytoskeletts, aber auch bei der Signaltransduktion (Hall & Nobes 2000; Narumiya 1996). Es ist bekannt, dass GTPasen der Rho-Familie einen Einfluss auf die Aktivierung der ERM-Proteine haben (Ivetic & Ridley 2004; Jeon *et al.*, 2002). Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit eine Expression von RhoGTPasen die Phosphorylierung der ERM-Proteine verändert und ob dies einen Einfluss auf die synaptische Lokalisation von GABA_AR α 5 hat. Hierzu wurden zunächst unterschiedliche dominant negative und konstitutiv aktive RhoGTPasen für 24 h in HEK293TN-Zellen exprimiert. Anschließend wurde die Phosphorylierung des konservierten C-terminalen Threonins der ERM-Proteine (vergleiche Einleitung 1.3) mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch jeweils das phosphorylierte Protein erkennt (PERM), analysiert.

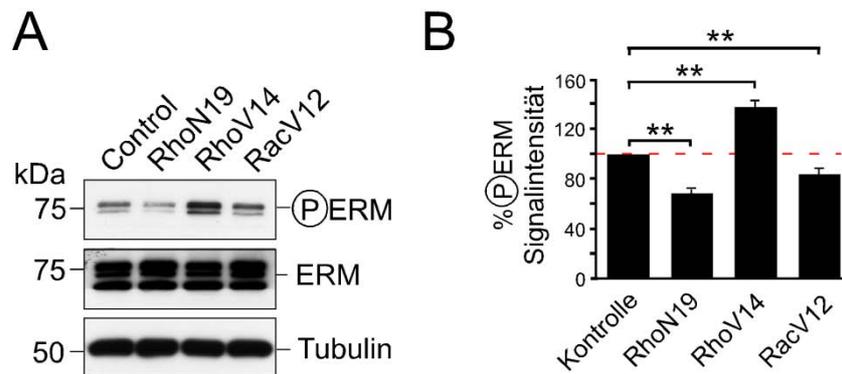


Abb. 3.2: Einfluss von RhoGTPasen auf die Phosphorylierung der ERM-Proteine. (A) Western Blot Analyse von Zellextrakten aus HEK293TN-Zellen nach der Expression von dominant negativen und konstitutiv aktiven RhoGTPasen. Immundetektion der an konserviertem Threonin phosphorylierten ERM Proteine (PERM), der Gesamtheit aller ERM-Proteine sowie Tubulin (Ladkontrolle) mit Hilfe spezifischer Antikörper. kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards in Kilodalton. (B) Quantitative Analyse der in A dargestellten Daten aus n = 6 Experimenten mit $**p < 0,01$. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Wie in Abbildung 3.2 A und B zu sehen, führte die Überexpression von dominant negativem RhoA (RhoN19) zu einer verringerten Phosphorylierung ($68,41 \pm 3,14\%$) im Vergleich zur Kontrolle (Transfektion des Leervektors; gleich 100% gesetzt). Die Überexpression von konstitutiv aktivem RhoA (RhoV14) hingegen zeigte einen Anstieg in der Phosphorylierung der ERM-

Proteine ($137,54 \pm 4,76\%$). Eine Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1 (RacV12), das antagonistisch zu RhoA wirkt (siehe Einleitung 1.4), führte wiederum zu einem Anstieg der Phosphorylierung der ERM-Proteine ($83,94 \pm 4,25\%$).

Diese Ergebnisse deuten auf eine von RhoGTPasen abhängige Phosphorylierung der ERM-Proteine hin. In Abschnitt 3.1 konnte gezeigt werden, dass die spezifische Phosphorylierung von Radixin an Threonin 564 einen Einfluss auf die synaptische Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ hat. Es stellte sich nun die Frage, inwieweit die von RhoGTPasen vermittelte Phosphorylierung des konservierten Threoninrestes ebenso die synaptische Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ beeinflussen könnte. Hierzu wurden die konstitutiv aktiven und dominant negativen RhoGTPasen zusammen mit GFP über einen Zeitraum von 24 h in primären hippocampalen Neuronen exprimiert (Abb. 3.3). Anschließend wurde, wie unter 3.1 beschrieben, die synaptische Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ analysiert.

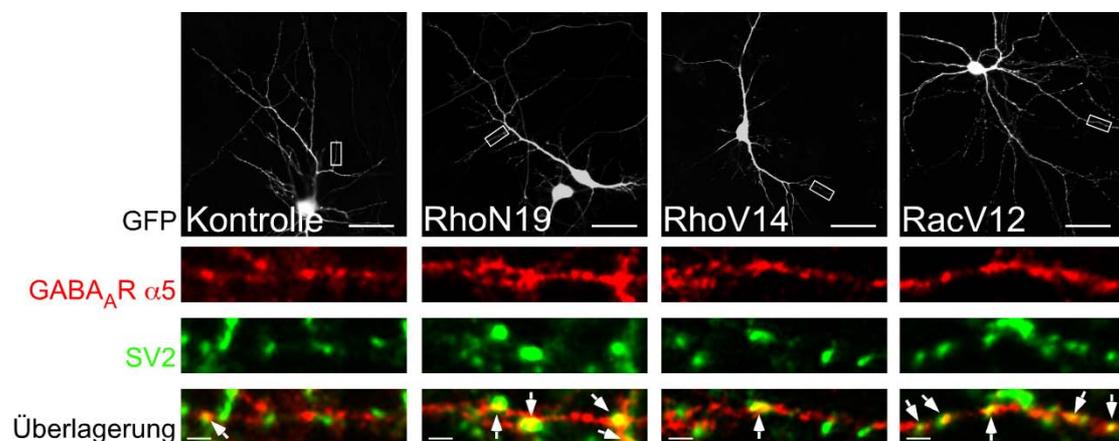


Abb. 3.3: Synaptische Verteilung von GABA_AR $\alpha 5$ nach Expression von RhoGTPasen. Immunfärbung von GABA_AR $\alpha 5$ (rot) und SV2 (grün) nach der Expression von GFP allein (Kontrolle) oder zusammen mit RhoN19, RhoV14 oder RacV12 in primären hippocampalen Neuronen. Die jeweils vergrößerten Bildausschnitte sind in der entsprechenden Übersicht (GFP Signal in Graustufen) mit einem Kasten markiert. Die Pfeile zeigen synaptische Lokalisationen (gelb) von GABA_AR $\alpha 5$ an SV2 positiven Synapsen in der Überlagerung. Die Größenbalken entsprechen 22 μm bzw. 1 μm (Bildausschnitte).

Nach Expression von GFP allein (Kontrolle) konnte bei $14,89 \pm 2,25\%$ der GABA_AR $\alpha 5$ Untereinheiten eine synaptische Lokalisation beobachtet werden. Dies entspricht in etwa der Kontrollsituation in Abb. 3.1 B. Hingegen führte die Expression von RhoN19 ($38,67 \pm 2,41\%$) als auch RacV12 ($41,43 \pm 0,93\%$)

zu einem signifikanten Anstieg in der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α5. Dieser Anstieg konnte nach der Expression von RhoV14 hingegen ($11,21 \pm 0,49\%$) nicht beobachtet werden (Abb. 3.4).

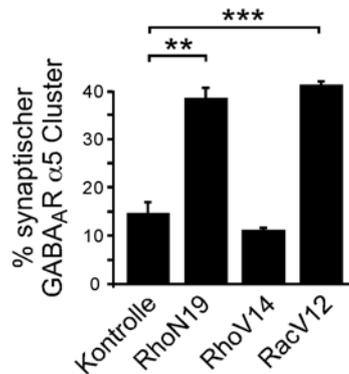


Abb. 3.4: Quantifizierung der synaptischen Verteilung von GABA_AR α5 nach Expression von RhoGTPasen. Angaben in Prozent. Insgesamt wurden 20.628 Synapsen aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 10 bis 16 Neuronen analysiert, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Die Expression von Cdc42, einer weiteren GTPase der Rho-Familie ergab keine Veränderung der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α5 (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse deuten auf eine von RhoGTPase vermittelte Dephosphorylierung der ERM-Proteine durch inaktives RhoA oder aktives Rac1 hin, was die synaptische Lokalisation von GABA_AR α5 zu beeinflussen scheint.

3.3 Einfluss der Phosphorylierung von Radixin auf dessen Lokalisation

Bisher wurde die synaptische Lokalisation von GABA_AR α5 in Abhängigkeit der Phosphorylierung der ERM-Proteine und im speziellen von Radixin untersucht. Es stellte sich daher die Frage, inwieweit die spezifische Phosphorylierung des Threoninrestes 564 von Radixin (siehe Einleitung 1.3), seine eigene Lokalisation innerhalb eines Neurons beeinflusst. Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, wurde die zytosolische und

Plasmamembran-ständige Verteilung von GFP-Fusionsproteinen der Radixin-Phosphorylierungsmutanten nach Expression in primären hippocampalen Neuronen analysiert. Wie in Abbildung 3.5 anhand der Querschnittsanalysen zu erkennen, war RdxWT-GFP (Kontrolle) sowohl im Zytosol als auch an der Plasmamembran lokalisiert. Die Lokalisation der Phosphorylierungs-Mimik-Mutante von Radixin (RdxTD-GFP) konzentrierte sich hingegen vermehrt an der Plasmamembran und weniger im Zytosol. Interessanterweise konnte eine ähnliche Verteilung auch bei der Phosphorylierungs-Minus-Mutante von Radixin (RdxTA-GFP) beobachtet werden. Auch hier war das Fusionsprotein stärker an der Plasmamembran lokalisiert als im Zytosol.

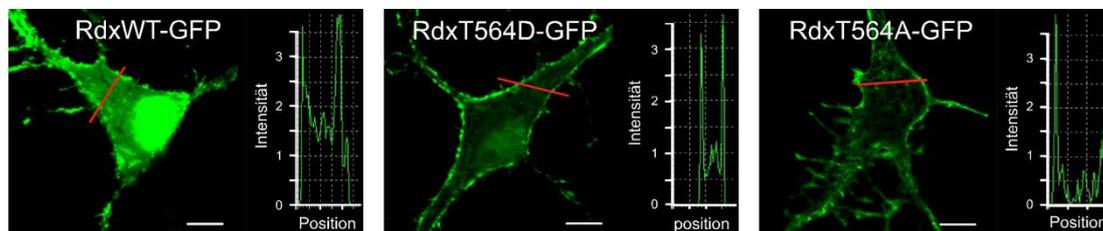


Abb. 3.5: Lokalisation der Radixin Phosphorylierungsmutanten in Neuronen. In primären hippocampalen Neuronen wurden RdxWT-GFP, RdxT564D-GFP und RdxT564A-GFP exprimiert und die GFP Signalintensitäten im Bereich des Somas von der Plasmamembran über das Zytosol analysiert. Die rote Linie markiert jeweils den Bereich der Querschnittsanalyse über das Soma. Der entsprechende Graph zeigt die GFP Signalintensitäten entlang der Linie von links nach rechts in willkürlichen Einheiten. Die Größenbalken entsprechen 100 μm .

Die Ergebnisse deuten auf eine Phosphorylierungs-unabhängige Lokalisation von Radixin an der Plasmamembran hin. Als nächstes wurde untersucht, inwieweit die Interaktion von Radixin und GABA_AR $\alpha 5$ durch die spezifische Phosphorylierung von Threonin 564 beeinflusst wird. *Pulldown*-Experimente mit einem GST-Fusionsprotein der großen intrazellulären Schleife von GABA_AR $\alpha 5$ (GST $\alpha 5$ loop) und den Radixin-Phosphorylierungsmutanten zeigten, dass RdxT564D-myc mit GST $\alpha 5$ loop präzipitiert werden konnte (Abb 3.6 A), wie bereits durch Loebrich *et al.* 2006 publiziert. RdxT564D-myc dagegen konnte nicht mit GST $\alpha 5$ loop präzipitiert werden (Abb. 3.6 B). Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung des Threoninrestes 564 von Radixin für eine Interaktion mit GABA_AR $\alpha 5$ erforderlich ist.

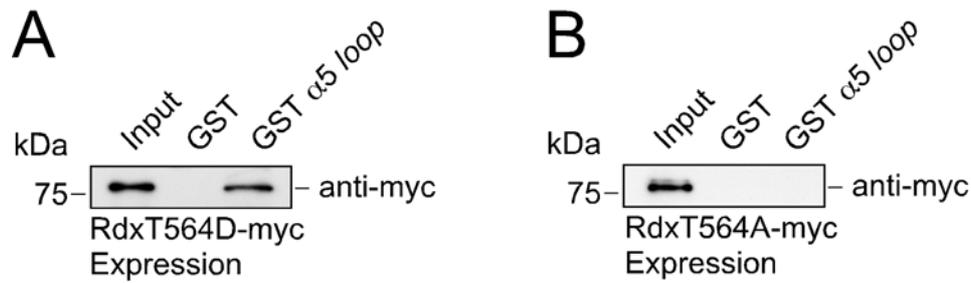


Abb. 3.6: Interaktion von GABA_AR $\alpha 5$ und Radixin Phosphorylierungsmutanten. Repräsentative Western Blot Analyse von drei unabhängigen *Pulldown*-Experimenten mit der großen intrazellulären Schleife der GABA_AR $\alpha 5$ Untereinheit (GST $\alpha 5$ loop) und (**A**) der myc-markierten Radixin-Phosphorylierungs-Mimik-Mutante (RdxT564D-myc) sowie (**B**) der myc markierten Phosphorylierungs-Minus-Mutante (RdxT564A-myc) nach der Expression in HEK293TN-Zellen. Als Kontrolle für die Präzipitation wurde jeweils GST allein eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch spezifische Antikörper gegen myc. kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards in Kilodalton.

Sowohl Radixin, als auch GABA_AR $\alpha 5$ lokalisieren offenbar zu ca. 15% an synaptischen Bereichen (Brunig *et al.*, 2002; Christie & de Blas 2002; Loebrich *et al.*, 2006). Die Expression von RhoGTPasen führte zu einer veränderten synaptischen Lokalisation der GABA_AR $\alpha 5$ Untereinheit (vergleiche Abb. 3.4). Wie in Abb. 3.2 gezeigt, scheinen diese auch einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Radixin zu haben und hierdurch die Interaktion mit GABA_AR $\alpha 5$ zu beeinflussen (vergleiche Abb. 3.6).

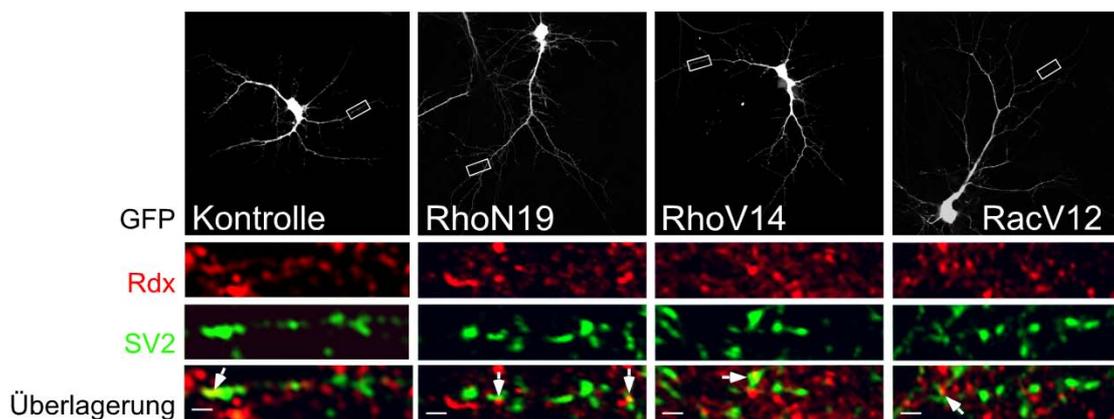


Abb. 3.7: Synaptische Verteilung von Radixin nach der Expression von RhoGTPasen. Immunfärbung von Radixin (rot) und SV2 (grün) nach der Expression von GFP allein (Kontrolle) oder zusammen mit RhoN19, RhoV14 oder RacV12 in primären hippocampalen Neuronen. Die jeweils vergrößerten Bildausschnitte sind in der entsprechenden Übersicht (GFP Signal in Graustufen) mit einem Kasten markiert. Die Pfeile zeigen synaptische Lokalisationen (gelb) von Radixin an SV2 positiven Synapsen in der Überlagerung. Die Größenbalken entsprechen 22 μ m bzw. 1 μ m (Bildausschnitte).

Es stellte sich nun die Frage, inwieweit die Lokalisation von Radixin nach Expression von dominant negativen und konstitutiv aktiven RhoGTPasen beeinflusst sein könnte. Hierzu wurde das Experiment aus Abschnitt 3.2 (Abb. 3.3) wiederholt, allerdings anstelle von GABA_AR α 5 Radixin detektiert und dessen synaptische Lokalisation analysiert (Abb. 3.7 und 3.8).

Sowohl die Expression von RhoN19 ($11,59 \pm 3,07\%$) und RacV12 ($12,29 \pm 2,45\%$) welche zuvor zu einem Anstieg der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5 führten (vergleiche Abb. 3.4), als auch GFP allein (Kontrolle; $8,55 \pm 1,40\%$) und RhoV14 ($10,20 \pm 4,60\%$) beeinflussten die synaptische Lokalisation von Radixin nicht signifikant (Abb. 3.8).

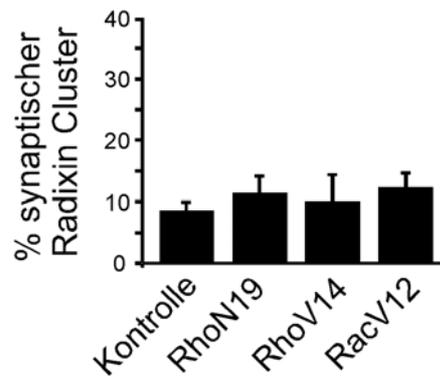


Abb. 3.8: Quantifizierung der synaptischen Verteilung von Radixin nach Expression von RhoGTPasen. Angaben in Prozent. Insgesamt wurden 11.035 Synapsen aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 9 bis 11 Neuronen analysierten, $p > 0,1$. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Die gezeigten Ergebnisse lassen auf eine synaptische Lokalisation von GABA_AR α 5 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung Radixins schließen, wobei die Lokalisation von Radixin selbst nicht verändert wird. Die Phosphorylierung von Radixin scheint durch die Aktivität unterschiedlicher GTPasen der Rho-Familie reguliert zu werden (vergleiche Abb. 3.2). Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, welche Kinasen bei dieser Signaltransduktion eine mögliche Rolle spielen könnten.

3.4 Einfluss von Rho-Kinasen auf die synaptische Lokalisation von GABA_AR α 5

Es gibt Hinweise, dass unterschiedliche Kinasen wie die Protein Kinase C (PKC), die Myotonie Dystrophie Cdc42 bindende Kinase (MRCK) aber auch die RhoA abhängige Kinase (ROCK) bei der Phosphorylierung der ERM-Proteine eine Rolle spielen (Matsui *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2001). Um genauer zu untersuchen welche dieser Kinasen an der Phosphorylierung von Radixin und der unter Umständen damit verbundenen synaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5 beteiligt sein könnten, wurden primäre hippocampale Neurone mit unterschiedlichen Kinaseinhibitoren behandelt und anschließend die Phosphorylierung der ERM-Proteine analysiert. Hierfür wurde zunächst ein allgemeiner Protein-Kinaseinhibitor (Staurosporin) eingesetzt. Staurosporin konkurriert mit ATP um die entsprechende Bindestelle an Kinasen und weist hierbei eine höhere Affinität als ATP auf. Da die enzymatische Aktivität der Kinasen von der ATP-Bindung abhängig ist, wirkt Staurosporin als ein allgemeiner Proteinkinaseinhibitor (Tamaoki *et al.*, 1986).

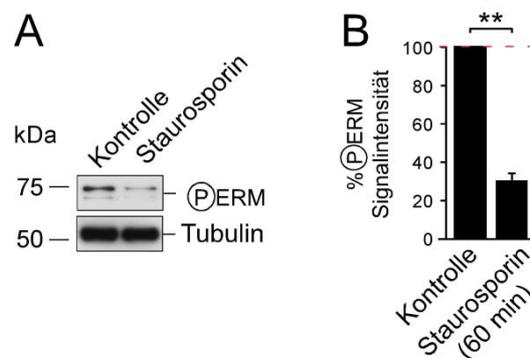


Abb. 3.9: Phosphorylierung der ERM-Proteine nach Staurosporinbehandlung. (A) Western Blot Analyse von Zellextrakten aus primären hippocampalen Neuronen nach einstündiger Behandlung mit 10 nM Staurosporin. Immundetektion von den am konservierten Threonin phosphorylierten ERM-Proteinen (PERM) sowie Tubulin als Ladekontrolle mit Hilfe spezifischer Antikörper. kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards in Kilodalton. (B) Quantitative Analyse der in A dargestellten Daten aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit $**p < 0,01$. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde in Gegenwart von 10 nM Staurosporin wurden die Neurone lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membran übertragen. Diese wurden mit spezifischen Antikörpern gegen den phosphorylierten konservierten Threoninrest der ERM-Proteine (PERM) und Tubulin als Ladekontrolle detektiert (Abb. 3.9 A). Die Analyse der Staurosporin-behandelten Neurone ergab eine auf $30,55 \pm 3,65\%$ verringerte Phosphorylierung der ERM-Proteine im Vergleich zu den unbehandelten Neuronen (Kontrolle) (Abb. 3.9 B).

Im nächsten Experiment wurde ein spezifischer Kinaseinhibitor (Rho-K-I) gegen die RhoA-abhängige Kinase (ROCK) eingesetzt. Wie Staurosporin konkurriert auch Rho-K-I mit ATP um die Bindung an die Kinase, zeigt aber eine hohe Selektivität für ROCK (Takami *et al.*, 2004). In Abhängigkeit der Zeit führte die Behandlung von primären hippocampalen Neuronen mit 50 μM Rho-K-I zu einer verringerten Phosphorylierung der ERM-Proteine. Nach einer 60-minütigen Inhibition von ROCK mit 50 μM Rho-K-I wurde eine Reduktion der Phosphorylierung der ERM-Proteine auf $40,30 \pm 7,80\%$ im Vergleich zu der Kontrolle festgestellt (Abb. 3.10 A-C).

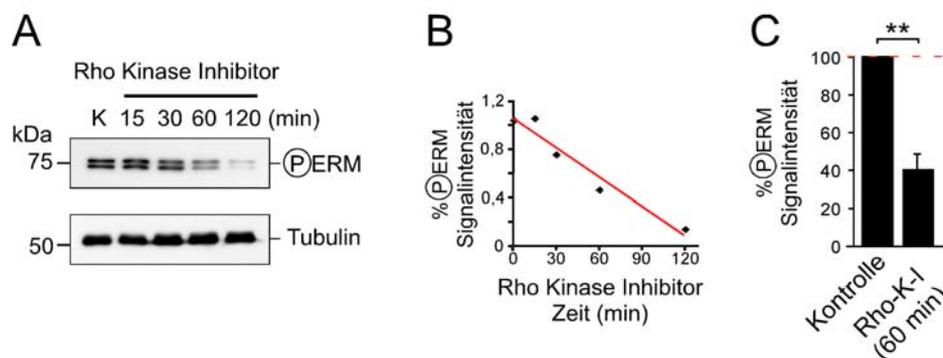


Abb. 3.10: Phosphorylierung der ERM-Proteine nach Inhibition der Rho-abhängigen Kinase. (A) Western Blot Analyse von Zellextrakten aus primären hippocampalen Neuronen nach der Behandlung mit einem spezifischen Kinase Inhibitor (Rho-K-I) gegen die RhoA-abhängige Kinase (ROCK). Immundetektion am konservierten Threonin phosphorylierter ERM-Proteine (PERM) sowie Tubulin als Ladekontrolle mit Hilfe spezifischer Antikörper. kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards in Kilodalton. (B) Signalintensitäten von PERM an den angegebenen Zeitpunkten aus A in Prozent. (C) Quantitative Analyse der in A dargestellten Daten aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten zum Zeitpunkt 60 min mit $**p < 0,01$. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Die Expression von dominant negativem RhoA führte zu einer verringerten Phosphorylierung der ERM-Proteine und einem Anstieg der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5 (siehe Ergebnisse Abschnitt 3.2). Eine Dephosphorylierung der ERM-Proteine durch Inhibition der RhoA-abhängigen Kinase sollte daher ebenfalls zu einer vermehrten synaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5 führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden primäre hippocampale Neurone für 60 min mit 50 μ M Rho-K-I behandelt und anschließend die synaptische Lokalisation von GABA_AR α 5, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, analysiert. Unter Kontrollbedingungen kolokalisierten $7,81 \pm 2,86\%$ der GABA_AR α 5 Signale mit dem synaptischen Marker SV2. Nach Inhibition der RhoA-abhängigen Kinase ROCK hingegen wurde eine synaptische Lokalisation der GABA_AR α 5 Untereinheit von $29,92 \pm 2,02\%$ ermittelt.

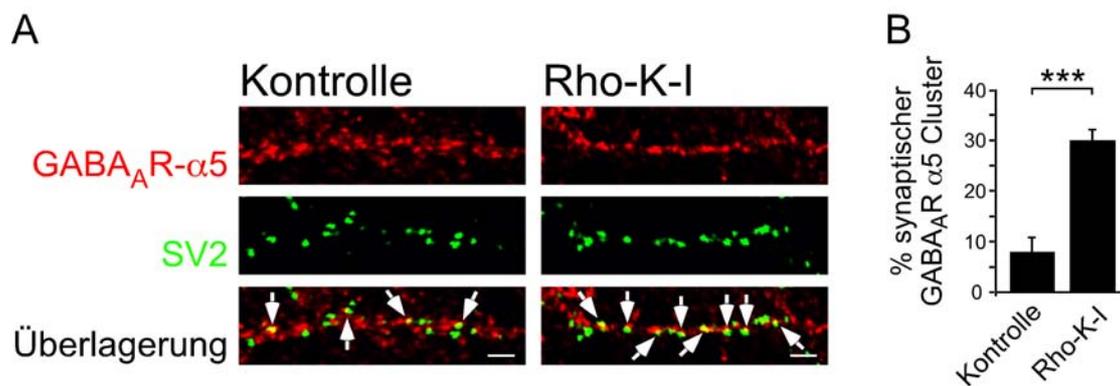


Abb. 3.11: Synaptische Verteilung von GABA_AR α 5 nach Inhibition der RhoA-abhängigen Kinase. (A) Immunfärbung von GABA_AR α 5 (rot) und SV2 (grün) nach der einstündigen Behandlung von primären hippocampalen Neuronen mit dem spezifischen RhoA-Kinaseinhibitor (Rho-K-I; 50 μ M) gegen die RhoA-abhängige Kinase (ROCK). Exemplarisch gezeigt sind distale dendritische Bereiche der Neurone. Die Pfeile zeigen synaptische Lokalisationen (gelb) von GABA_AR α 5 an SV2 positiven Synapsen in der Überlagerung. Die Größenbalken entsprechen 22 μ m bzw. 1 μ m (Bildausschnitte). (B) Quantifizierung der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5 in Prozent. Insgesamt wurden 13.471 Synapsen aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 9 bis 10 Neuronen analysiert, *** $p < 0,001$. Alle Daten sind Mittelwerte, der Fehlerbalken repräsentiert den SEM.

Die in Abschnitt 3.1 bis 3.4 gezeigten *in vitro*-Daten lassen auf eine synaptische Lokalisation der GABA_AR α 5 Untereinheit in Abhängigkeit der Radixin-Phosphorylierung von Threonin 564 schließen. Um die neuronale Funktion von Radixin *in vivo* näher zu untersuchen, wurde im Folgenden eine Radixin *Knockout* Mauslinie (Rdx KO) analysiert.

3.5 Analyse einer Radixin *Knockout* Mauslinie hinsichtlich der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5

Im Jahre 2002 veröffentlichte das Labor von Sachiko Tsukita die Herstellung einer Radixin *Knockout* Mauslinie (Rdx KO (-/-)) durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (Kikuchi *et al.*, 2002). Loebrich *et al.* konnte 2006 zeigen, dass die Bündelung der GABA_AR α 5 Untereinheit in diesen Mäusen gestört ist (Loebrich *et al.*, 2006). Im Folgenden wurde die synaptische und extrasynaptische Verteilung von GABA_AR α 5 in homozygoten Rdx KO (-/-) Mäusen und wildtypischen Wurfgeschwistern (WT (+/+)) analysiert. Hierzu wurden mit Hilfe differentieller Zentrifugation prä- und postsynaptische Proteine in Synaptosomen aus Gehirnextrakten adulter Rdx KO (-/-) Mäuse angereichert. Die Zusammensetzung dieser synaptosomalen Fraktionen wurde mit der von WT (+/+) Mäusen hinsichtlich des GABA_AR α 5 Gehalts verglichen. Wie in Abbildung 3.12 A und B dargestellt, stieg der Anteil von GABA_AR α 5 in Synaptosomen aus Rdx KO (-/-) Mäusen auf $173,88 \pm 14,10\%$ im Vergleich zu WT (+/+) Mäusen (gleich 100% gesetzt).

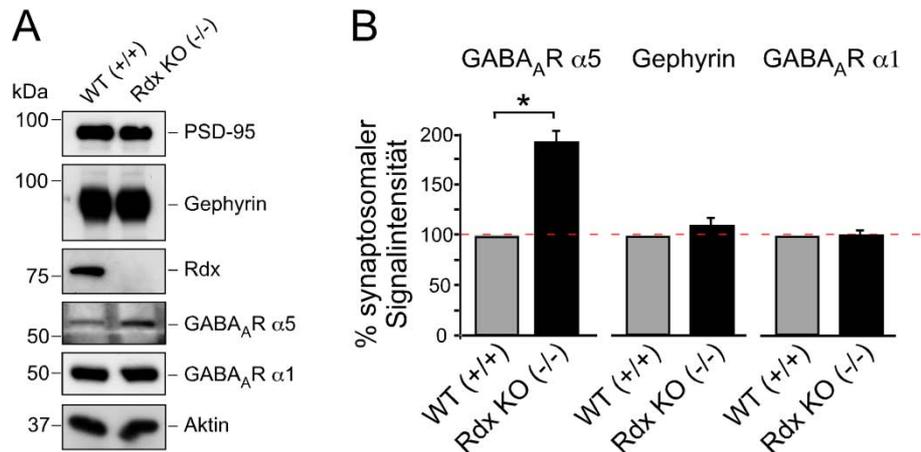


Abb. 3.12: Anreicherung von GABA_AR α5 in Synaptosomen nach Depletion von Radixin. (A) Western Blot Analyse von Synaptosomen aus Gehirnextrakten adulter Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäuse. Die Immundetektion der gezeigten Proteine erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die Detektion von Aktin wurde als Ladekontrolle eingesetzt. kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards in Kilodalton. (B) Quantitative Analyse der in A dargestellten Signalintensitäten von GABA_AR α5, Gephyrin und GABA_AR α1 in Prozent aus n = 3 unabhängigen Experimenten mit **p* < 0,05. Die Signalintensitäten der detektierten Proteine aus WT (+/+) Mäuse wurde jeweils gleich 100% gesetzt (gestrichelte rote Linie). Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Weder Gephyrin (Rdx KO (-/-): 112,60 ± 6,86%), ein wichtiges Ankerprotein der inhibitorischen Synapse (siehe Einleitung 1.1.2), noch GABA_AR α1 (Rdx KO (-/-): 99,39 ± 2,63%), eine weitere Untereinheit der GABA_A-Rezeptoren, wiesen signifikant unterschiedliche Anreicherungen zwischen den Synaptosomen aus Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen auf. Die Detektion von Aktin erfolgte als Ladekontrolle zur Normalisierung der übrigen Signale. Die Depletion von Radixin führte zu einem erhöhten Anstieg von GABA_AR α5 in synaptosomalen Fraktionen. Es stellte sich nun die Frage, inwieweit sich dieses Ergebnis mit Hilfe von Immunfärbungen bestätigen lassen würde. Hierzu wurden primäre hippocampale Neurone aus Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen präpariert und die synaptische Lokalisation von GABA_AR α5; wie unter Abschnitt 3.1 beschrieben, analysiert. Die Quantifizierung der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α5 ergab einen Anstieg auf 33,60 ± 3,44% in den Neuronen von Rdx KO (-/-) im Vergleich zu Neuronen von WT (+/+) Mäusen (14,29 ± 0,38%) (Abb. 3.13 A und B).

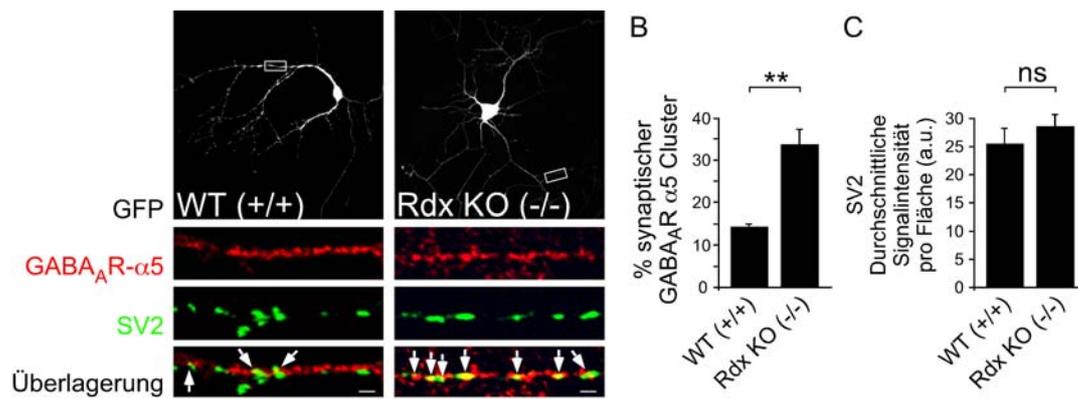


Abb. 3.13: Synaptische Verteilung von GABA_AR α5 nach Depletion von Radixin.

(A) Immunfärbung von GABA_AR α5 (rot) und SV2 (grün) in primären hippocampalen Neuronen aus Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen. Die jeweils vergrößerten Bildausschnitte sind in der entsprechenden Übersicht (GFP Signal in Graustufen) mit einem Kasten markiert. Die Pfeile zeigen synaptische Lokalisationen (gelb) von GABA_AR α5 an SV2 positiven Synapsen in der Überlagerung. Die Größenbalken entsprechen 22 μm bzw. 1 μm (Bildausschnitte). (B) Quantifizierung der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α5 in Prozent. (C) Durchschnittliche Signalintensität von SV2 pro Fläche. Insgesamt wurden 18.420 Synapsen aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 5 bis 14 Neuronen analysiert, ** $p < 0,01$, ^{ns} $p > 0,05$. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Nachdem mit der Umverteilung von GABA_AR α5 eine postsynaptische Veränderung in den Rdx KO (-/-) Mäusen beobachtet werden konnte, erfolgte durch Untersuchung von SV2 nun eine Analyse der Präsynapse. Die Quantifizierung der durchschnittlichen Signalintensität von SV2 ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen Rdx KO (-/-) ($28,51 \pm 2,07$ a.u.) und WT (+/+) Mäusen ($25,53 \pm 2,79$ a.u.) (Abb. 3.13 C). Falls Radixin für die extrasynaptische Verankerung der GABA_AR α5 Untereinheit wichtig ist und wie in Abb. 3.13 B gezeigt, die Depletion von Radixin zu einem Anstieg der synaptischen GABA_AR α5 Lokalisation führt, sollte eine Abnahme der extrasynaptischen bzw. eine Zunahme der synaptischen GABA_AR α5 Clustergrößen erwartet werden. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden synaptische und extrasynaptische Clustergrößen der GABA_AR α5 Untereinheit in hippocampalen Neuronen von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen miteinander verglichen.

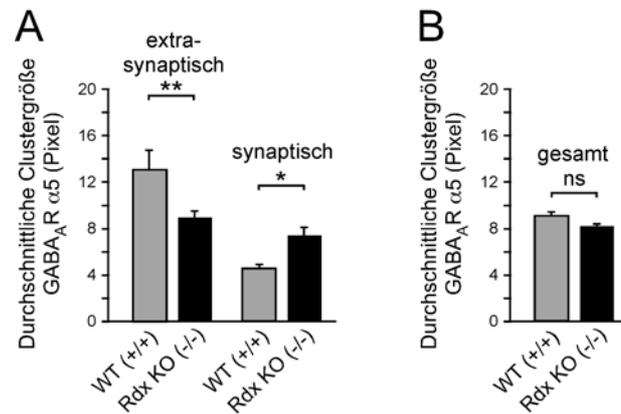


Abb. 3.14 Extrasynaptische und synaptische GABA_AR α5 Clustergrößen nach Depletion von Radixin. (A) Quantifizierung der durchschnittlichen extrasynaptischen und synaptischen GABA_AR α5 Clustergrößen in primären hippocampalen Neuronen aus Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen. (B) Quantifizierung der durchschnittlichen Größe aller GABA_AR α5 Cluster in primären hippocampalen Neuronen aus Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen. Insgesamt wurden 13.258 Cluster aus jeweils n = 9-13 Neuronen pro Genotyp mit ^{ns}p > 0,05, *p < 0,05 und **p < 0,01 analysiert. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Die Analyse der extrasynaptischen GABA_AR α5 Clustergrößen ergab eine signifikante Verringerung in Rdx KO (-/-) (8,98 ± 0,25 Pixel) im Vergleich zu WT (+/+) (13,07 ± 0,32 Pixel) Neuronen. Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der synaptischen Clustergrößen einen signifikanten Anstieg in Rdx KO (-/-) (7,40 ± 0,23 Pixel) im Vergleich zu WT (+/+) (4,57 ± 0,36 Pixel) Neuronen (Abb. 3.14 A). Eine gepaarte Auswertung für extrasynaptische und synaptische Clustergrößen ergab interessanterweise keinen signifikanten Unterschied zwischen Rdx KO (-/-) (8,16 ± 0,16 Pixel) und WT (+/+) (9,05 ± 0,22 Pixel) Neuronen.

3.6 Einfluss neuronaler Aktivität auf die Phosphorylierung der ERM-Proteine

Bisher wurde die Funktion von Radixin in Bezug auf dessen Phosphorylierungs-abhängige Aktivierung hinsichtlich der Lokalisation der GABA_AR α5 Untereinheit untersucht. Unterschiedliche Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass neuronale Aktivität zur Modulation von RhoGTPase abhängigen Signalkaskaden führen kann (Schubert *et al.*, 2006; Schubert &

Dotti 2007). Es stellte sich daher die Frage, ob eine veränderte neuronale Aktivität Einfluss auf die Phosphorylierung und somit Aktivierung von Radixin haben könnte.

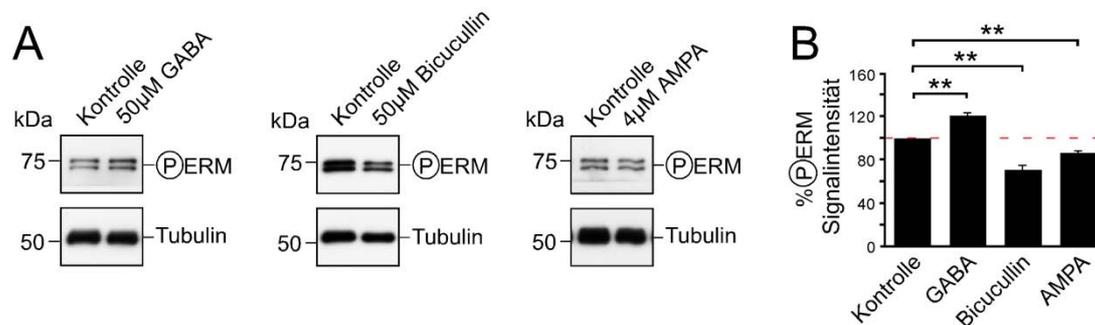


Abb. 3.15 Phosphorylierung der ERM-Proteine nach Behandlung mit GABA, Bicucullin oder AMPA. (A) Western Blot Analyse von Zellextrakten aus primären hippocampalen Neuronen nach einstündiger Behandlung mit 50 µM GABA, 50 µM Bicucullin oder 4 µM AMPA. Immundetektion der an dem konservierten Threonin phosphorylierten ERM-Proteine (PERM) sowie Tubulin als Ladekontrolle mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die Signalintensitäten der Kontrollen wurden jeweils gleich 100% gesetzt (gestrichelte rote Linie). kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards in Kilodalton. (B) Quantitative Analyse der in A dargestellten Daten aus n = 3-5 unabhängigen Experimenten mit $**p < 0,01$. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Um diese Frage näher zu untersuchen, wurde der GABA Rezeptor zunächst mit seinem Agonisten GABA in primären hippocampalen Neuronen stimuliert oder mit dem kompetitiven Antagonisten Bicucullin blockiert (Khawaled *et al.*, 1999). Anschließend wurde die Phosphorylierung der ERM-Proteine analysiert.

Nach Aktivierung der GABA Rezeptoren mit 50 µM GABA konnte ein Anstieg der Phosphorylierung der ERM-Proteine auf $121,21 \pm 2,92\%$ im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (gleich 100% gesetzt) beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu führte die Blockade der GABA_A Rezeptoren mit 50 µM Bicucullin zu einer Verringerung der Phosphorylierung der ERM-Proteine auf $70,82 \pm 4,44\%$. Interessanterweise konnte auch nach der Aktivierung von AMPA Rezeptoren mit dem spezifischen Agonisten AMPA eine signifikante Verringerung der Phosphorylierung der ERM-Proteine auf $86,46 \pm 1,32\%$ beobachtet werden (Abb. 3.15 A und B).

Es ist bekannt, dass GABA_AR vermittelte Ströme einen großen Einfluss auf die Erregbarkeit von Neuronen ausüben (Freund & Buzsaki 1996; Stelzer

1992; Wigstrom & Gustafsson 1983; Yang *et al.*, 2010). Zum einen unterstützte die Inhibition von GABA_A Rezeptoren die Induktion von lang anhaltenden erregenden Potentialen (LTP) (Grover & Yan 1999; Steele & Mauk 1999). Zum anderen konnte LTP in Mäusen, in denen GABA_AR vermittelte inhibitorische Ströme erhöht waren, nur durch Inhibition der GABA_A Rezeptoren induziert werden (Hess *et al.*, 1996). Es stellte sich daher die Frage, inwieweit LTP bzw. lang anhaltende hemmende Potentiale (LTD) einen Einfluss auf die Phosphorylierung und Aktivierung der ERM-Proteine haben könnten. Hierfür wurde ein Protokoll zur Induktion von chemischen LTP mit Forskolin und Rolipram bzw. chemischen LTD mit DHPG (siehe Material und Methoden 2.4.6) angewandt und anschließend die Phosphorylierung der ERM-Proteine analysiert. Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, ergab eine Western Blot Analyse nach Induktion von LTP in primären hippocampalen Neuronen eine Reduzierung der Phosphorylierung der ERM-Proteine auf $61,52 \pm 12,10\%$ im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (gleich 100% gesetzt).

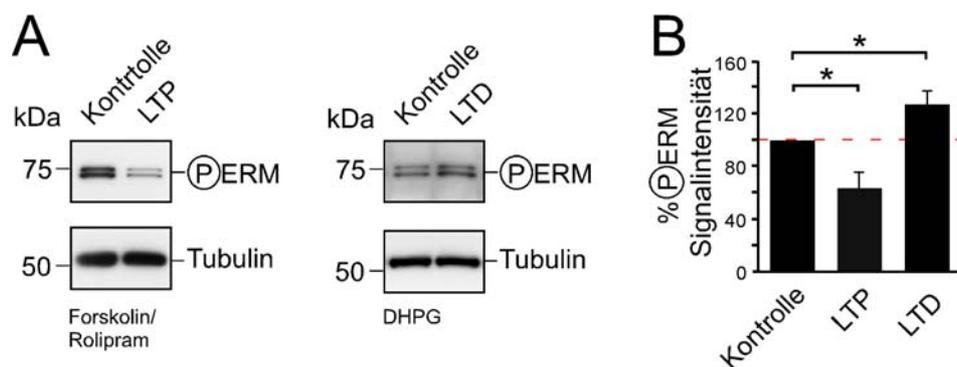


Abb. 3.16: Phosphorylierung der ERM-Proteine nach Induktion von LTP und LTD. (A) Western Blot Analyse von Zellextrakten aus primären hippocampalen Neuronen nach der Induktion von LTP mit Forskolin und Rolipram bzw. LTD mit DHPG. Immundetektion der am konservierten Threonin phosphorylierten ERM-Proteine (PERM) sowie Tubulin als Ladekontrolle mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die Signalintensitäten der Kontrollen wurden jeweils gleich 100% gesetzt (gestrichelte rote Linie). kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards in Kilodalton. (B) Quantitative Analyse der in A dargestellten Daten aus $n = 7-10$ unabhängigen Experimenten mit $*p < 0,05$. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Im Gegensatz hierzu führte die Induktion von LTD zu einem Anstieg der Phosphorylierung auf $127,20 \pm 10,53\%$ (Abb. 3.16 A und B) im Vergleich zur Kontrolle.

Die Ergebnisse lassen auf eine Phosphorylierung und damit eine Aktivierung der ERM-Proteine in Abhängigkeit neuronaler Aktivität schließen.

3.7 Verhaltensanalyse einer Radixin *Knockout* Mauslinie

Synaptische Plastizität beschreibt die Veränderung der Stärke der synaptischen Übertragung. Diese kann unter anderem sowohl an der Präsynapse durch die Menge der freigesetzten Neurotransmitter, als auch an der Postsynapse durch die Menge der Neurotransmitter-Rezeptoren moduliert werden. Des Weiteren spielt hierbei die Morphologie und Verbindung der Prä- und Postsynapse eine wichtige Rolle. Aktivitätsabhängige synaptische Plastizität wird als ein wichtiger neuropsychologischer Mechanismus betrachtet, der Lernprozessen und der Gedächtnisbildung zugrunde liegt. Zwei klassische Phänomene, die für die Untersuchung der aktivitätsabhängigen synaptischen Plastizität eingesetzt werden, sind die Induktion von LTP und LTD, die zu einer Verstärkung bzw. Verringerung der synaptischen Übertragung führen (Alvarez & Sabatini 2007; Bliss & Lomo 1973; Feldman 2009; Martin *et al.*, 2000).

Wie in Abschnitt 3.7 gezeigt, scheint die Induktion von LTP bzw. LTD zu einer Veränderung der Phosphorylierung bzw. Aktivierung der ERM-Proteine zu führen. Aktives Radixin scheint wiederum für die synaptische bzw. extrasynaptische Lokalisation der GABA_AR $\alpha 5$ Untereinheit eine wichtige Rolle zu spielen (vgl. Abb. 3.1). Interessanterweise konnten unabhängige Arbeitsgruppen verbesserte Lernleistungen von GABA_AR $\alpha 5$ *Knockout* Mäusen und $\alpha 5$ -Mutanten beobachten (Collinson *et al.*, 2002; Crestani *et al.*, 2002). Es wäre daher möglich, dass auch Radixin *Knockout* Mäuse eine Veränderung hinsichtlich des Lernens und Gedächtnisses aufweisen. Um dies genauer zu untersuchen, wurde das Verhalten von Rdx KO (-/-) Mäusen charakterisiert.

3.7.1 Verhalten im *Open Field* und *Elevated plus maze*

Der *Open Field* Test wird zur quantitativen Analyse der Bewegungsaktivität und dem Erkundungsverhalten von Mäusen in einer neuen, unbekanntem Umgebung eingesetzt (Crawley, 2007). In der Regel werden die Mäuse hierzu in einen weißen, oben offenen Behälter gesetzt und ihr Verhalten über eine definierte Zeit unter kontrollierter Raumtemperatur, Umgebungsgeräuschen und Lichtverhältnissen dokumentiert. Da Mäuse normalerweise hell erleuchtete, unbekannte und offene Flächen meiden, erlaubt der *Open Field* Test auch die Analyse von Angst auslösender Bewegungsaktivität. Durch die Wiederholung des Tests mit demselben Tier ist es des Weiteren möglich, Rückschlüsse auf das Erinnerungsvermögen zu ziehen, da sich die Tiere nach wiederholter Exposition an eine neue Umgebung gewöhnen (Crawley 1985).

Für die Analyse wurden die Mäuse jeweils in eine Ecke des Behälters gesetzt und die zurückgelegte Distanz mit Hilfe eines Videosystems über eine Stunde aufgezeichnet und in 12 Intervalle von 5 Minuten unterteilt. Nach 24 Stunden wurde der Test unter denselben Bedingungen wiederholt. An Tag Eins im ersten Intervall verringerte sich die zurückgelegte Distanz von ca. 1800 cm kontinuierlich auf ca. 1000 cm im letzten Intervall (Haupteffekt für Intervall: $F(11,132) = 18,88; p < 0,001$). Wie eine 3-Weg ANOVA Analyse (Genotyp x Geschlecht x Intervall) ergab, zeigte sich ein Unterschied zwischen den Geschlechtern, wobei die Weibchen insgesamt eine größere Strecke zurücklegten als die Männchen (Haupteffekt für Geschlecht: $F(1,12) = 9,23; p < 0,05$). Ein signifikanter Unterschied zwischen Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen konnte hierbei jedoch nicht beobachtet werden (Haupteffekt für Genotyp: $F(1,12) = 0,21; p = 0,66$). Nach 24 Stunden war die zurückgelegte Distanz im ersten Intervall (ca. 1400 cm) sowie im letzten Intervall (ca. 800 cm) geringer als an Tag Eins (3-Weg ANOVA; Intervall x Geschlecht x Tag: $F(11,132) = 2,18; p < 0,05$). Es zeigte sich aber kein Unterschied zwischen den Genotypen, weder innerhalb des zweiten Tages, noch im Vergleich von Tag 1 mit Tag 2 (3-Weg ANOVA; Intervall x Genotyp x Tag $F(11,132) = 0,77; p = 0,67$). Dies deutet auf eine normale

Bewegungsaktivität und Habituation der Rdx KO (-/-) Mäuse im Vergleich zu der wildtypischen Kontrollgruppe hin.

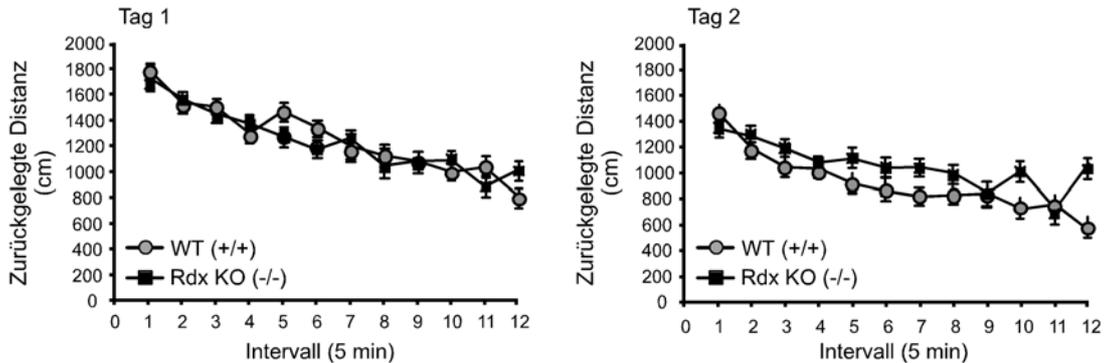


Abb. 3.17: Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen im *Open Field*. Die Bewegungsaktivität von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen innerhalb einer Stunde ist als zurückgelegte Distanz in cm über 12 aufeinander folgende Intervalle von 5 min dargestellt (Tag 1). 24 Stunden später erfolgte die erneute Exposition derselben Mäuse in derselben Umgebung (Tag 2). Graue geschlossene Kreise symbolisieren WT (+/+) Mäuse, schwarze geschlossene Quadrate Rdx KO (-/-) Mäuse. Insgesamt wurden jeweils acht Tiere pro Genotyp mit der gleichen Anzahl an Weibchen und Männchen untersucht. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Es wird angenommen, dass GABA_A Rezeptoren bei der Ausprägung von Angstverhalten eine wesentliche Rolle spielen. Zum Beispiel zeigten heterozygote GABA_AR γ 2 *Knockout* Mäuse eine höhere Aversion gegenüber hohen offenen Räumen (Crestani *et al.*, 1999). Hierbei scheinen auch die alpha-Untereinheiten der GABA_A Rezeptoren und dabei vornehmlich die α 2-Untereinheit involviert zu sein. Für die α 5-Untereinheit konnte bisher keine Beteiligung am Angstverhalten beobachtet werden (Crestani *et al.*, 2002; Low *et al.*, 2000; Mohler 2007). Dennoch sollten die Radixin *Knockout* Mäuse hinsichtlich ihres Angstverhaltens untersucht werden. Hierzu wurde ein so genanntes *Elevated plus maze* eingesetzt. Es handelt sich hierbei um ein vierarmiges Kreuz mit jeweils zwei offenen und zwei geschlossenen Armen, das 50 cm über dem Boden aufgebaut wird. Da Mäuse hohe offene Räume meiden, kann der Aufenthalt in den offenen bzw. geschlossenen Armen als ein Indikator für Angst interpretiert werden (Crawley, 2007). Für die Analyse wurden die Mäuse in die Mitte des Kreuzes gesetzt und sowohl ihr Aufenthalt, als auch die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme über einen Zeitraum von

fünf Minuten dokumentiert. Hierbei konnte für die Rdx KO (-/-) ($27,99 \pm 3,88\%$) Mäuse zwar ein längerer Aufenthalt in den offenen Armen beobachtet werden, die Differenz zu den WT (+/+) ($19,71 \pm 3,60\%$) Mäusen war aber nicht signifikant (Haupteffekt für Genotyp: $F(1,17) = 2,45$; $p = 0,14$) (Abb. 3.18 A). Auch die Analyse der Anzahl der Eintritte in die offenen Arme ergab keinen Unterschied zwischen Rdx KO (-/-) ($9,70 \pm 0,84$) und WT (+/+) ($9,17 \pm 0,77$) Mäusen (Haupteffekt für Genotyp: $F(1,17) = 0,219$; $p = 0,645$) (Abb. 3.18 B). Die Ergebnisse deuten auf ein ähnliches Angstverhalten von Radixin *Knockout* Mäusen im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen hin.

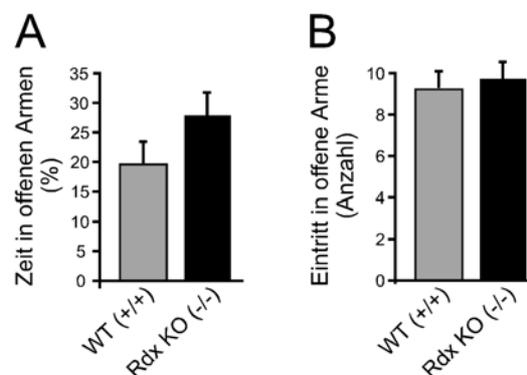


Abb. 3.18: Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen im *Elevated plus maze*. (A) Prozentuale Angabe des Aufenthalts von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen in den offenen Armen bezogen auf die Gesamtzeit (5 min). (B) Anzahl der Eintritte von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen in die offenen Arme über die gesamte Zeit (5 min). Insgesamt wurden 10 WT (+/+) Mäuse mit drei Weibchen und sieben Männchen sowie 10 Rdx KO (-/-) Mäuse mit jeweils fünf Weibchen und Männchen untersucht. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

3.7.2 Motor-Koordination, Balance und Motor-Stärke

Fast jedes Verhalten erfordert Bewegungen. Falls diese zum Beispiel durch veränderte neuromuskuläre Verbindungen oder ein beeinträchtigtes Gleichgewicht gestört werden, kann dies einen direkten Einfluss auf das Verhalten ausüben. Es könnte daher zu Fehlinterpretationen von Verhaltenstests kommen, weil die Mäuse nicht in der Lage sind, sich normal zu bewegen. GABA_A Rezeptoren gehören zu den vorrangigen inhibitorischen Neurotransmitter-Rezeptoren im Gehirn, die auch für die Regulation von

Motorfunktionen wichtig sind (Barnard *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1999; Sieghart 2000). Zum Beispiel zeigte eine *Knockout* Maus für die $\alpha 1$ -Untereinheit Motorkoordinationsstörungen und einen Tremor (Kralic *et al.*, 2005).

Um sowohl die Rolle von Radixin selbst, als auch einen möglichen Einfluss auf nachfolgende Verhaltensexperimente zu untersuchen, wurden die Radixin *Knockout* Mäuse hinsichtlich ihrer Motorfunktion analysiert. Hierzu wurden die Tiere zunächst auf dem *Rotarod* getestet. Es handelt sich hierbei um einen rotierenden Zylinder mit einem Durchmesser von drei Zentimetern. Die Mäuse wurden auf den rotierenden Zylinder gesetzt, dessen Drehzahl kontinuierlich gesteigert und die Zeit bis zum Herunterfallen der Mäuse (Latenzzeit) gemessen wird (Jones und Roberts, 1968). Nach 24 h wurde der Test unter denselben Bedingungen wiederholt. Interessanterweise zeigten Rdx KO (-/-) ($215,47 \pm 36,03$ s) Mäuse am ersten Tag eine etwas längere Latenzzeit im Vergleich zu WT (+/+) ($147,40 \pm 30,94$ s) Mäusen, wobei eine 2-Weg ANOVA Analyse (Genotyp x Geschlecht) mit dem Gewicht als Kovariate keinen signifikanten Unterschied ergab (Haupteffekt für Genotyp Tag 1: $F(1,10) = 1,94$; $p = 0,20$). Der Vergleich der Latenzzeit von Tag 1 zu Tag 2 mit Hilfe einer 3-Weg ANOVA Analyse (Genotyp x Geschlecht x Tag) zeigte hingegen eine Tendenz für eine Interaktion von Genotyp und Tag ($F(1,10) = 3,60$; $p = 0,09$).

Dies spiegelt möglicherweise den stärkeren Anstieg der Latenzzeit für die WT (+/+) Mäuse von Tag eins zu Tag zwei im Vergleich zu den Rdx KO (-/-) Mäusen wieder. Dennoch ergab die getrennte Analyse des zweiten Tages keine signifikanten Unterschiede zwischen Rdx KO (-/-) ($240,20 \pm 26,30$ s) und WT (+/+) ($268,23 \pm 22,58$ s) Mäusen (Haupteffekt für Genotyp Tag 2: $F(1,10) = 0,61$; $p = 0,45$).

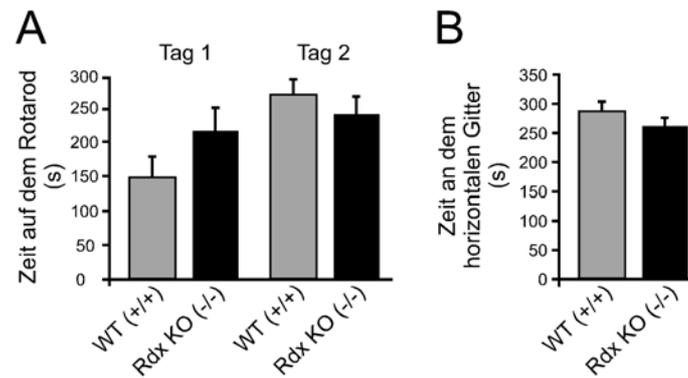


Abb. 3.19: Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen auf einem Rotarod bzw. einem horizontalen Gitter. (A) Latenzzeit in Sekunden bis zum Herunterfallen der Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen von einem Rotarod. Insgesamt wurden 6 - 8 Mäuse pro Genotyp mit dem gleichen Verhältnis an Weibchen und Männchen untersucht. **(B)** Latenzzeit in Sekunden bis zum Herunterfallen der Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen von einem horizontalen Gitter. Insgesamt wurden acht Mäuse pro Genotyp mit der gleichen Anzahl an Weibchen und Männchen untersucht. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Ein weiterer motorischer Test, speziell für die Motor-Stärke der Vorder- und Hinterläufe stellt die Untersuchung der Latenzzeit bis zum Herunterfallen von einem horizontalen Gitter dar (Sango *et al.*, 1996). Hierzu wurden die Tiere kopfüber an das horizontale Gitter gesetzt und die Latenzzeit bis zum Herunterfallen dokumentiert. Eine 2-Weg ANOVA Analyse (Genotyp x Geschlecht) mit dem Gewicht als Kovariate zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen (Haupteffekt für Genotyp: $F(1,12) = 1,79$; $p = 0,21$) (Abb. 3.19 B). Wie es scheint, ist sowohl die Motor-Koordination und Balance als auch die Motor-Stärke in den Rdx KO (-/-) Mäusen nicht beeinträchtigt. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für die im Folgenden beschriebene Untersuchung und Interpretation des Verhaltens der Tiere im *Morris water maze* dar.

3.7.3 Verhalten im *Morris water maze*

Der *Morris water maze* Test ist ein weit verbreiteter Test, um räumliches Lernen zu untersuchen, bei dem Ratten oder Mäuse in einen mit weiß eingefärbten Wasser gefüllten runden Tank gesetzt werden. Innerhalb des

Tanks befindet sich kurz unterhalb der Wasseroberfläche eine nicht sichtbare Plattform. Der Test basiert auf der Voraussetzung, dass Tiere wie Ratten und Mäuse Wasser meiden und eine Strategie entwickeln, unter möglichst geringem Einsatz aus dem Wasser zu entkommen. Dies spiegelt sich in der Abnahme der zurückgelegten Strecke und Zeit bis zum Erreichen der Plattform wieder und kann als ein Messwert für die Fähigkeit zur räumlichen Erinnerung interpretiert werden (Wenk 2004). Markante Objekte, sogenannte Landmarken, die um das *maze* angeordnet sind, ermöglichen hierbei die Orientierung. Durch unterschiedliche Protokolle bei der Durchführung des Tests können zwei verschiedene Formen des Lernens und der Erinnerung untersucht werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, einen sogenannte *reference memory test* durchzuführen. Hierbei befindet sich die Plattform für eine längere Testphase immer an derselben Stelle und die Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform wird analysiert. Dies ermöglicht, räumliche Erinnerungen zu untersuchen, die für eine längere Zeit im Gedächtnis gespeichert werden (Prusky *et al.*, 2004). Zum anderen kann ein sogenannter *working memory test* durchgeführt werden. Hierbei wird die Plattform nach jedem Testtag, an dem die Tiere mehrere Versuche haben, die Plattform zu finden, an eine neue Position gesetzt. Anschließend erfolgt die Analyse der Differenzen der Latenzzeiten der einzelnen Versuche innerhalb eines Testtages. Im Vergleich zu dem *reference memory test* können hiermit vorwiegend die Verarbeitung, das Verwerfen oder der Wiederabruf von Informationen aus einer sich ändernden Umgebung innerhalb eines kurzen Zeitraums untersucht werden (Steele & Morris 1999).

Wie bereits erwähnt, scheinen GABA_AR eine wichtige Rolle bei Lernen und Gedächtnis zu spielen (Mohler *et al.*, 2008). Für eine GABA_AR $\alpha 5$ *Knockout* Maus konnte eine Verbesserung gegenüber der wildtypischen Kontrollgruppe im *working memory test* des *Morris water maze* beobachtet werden (Collinson *et al.*, 2002). Experimente mit einem spezifischen inversen Agonisten gegen GABA_AR $\alpha 5$ bestätigten diese Untersuchungen (Dawson *et al.*, 2006). Da Radixin an GABA_AR $\alpha 5$ bindet (Loebrich *et al.*, 2006) und für dessen synaptische bzw. extrasynaptische Lokalisation verantwortlich zu sein scheint (vergleiche Abb. 3.1), könnte es

auch in Prozesse, die Lernen und Gedächtnis betreffen, involviert sein. Im Folgenden wurden Rdx KO (-/-) Mäuse in der *working memory* Version des *Morris water maze* getestet. Hierzu wurden die Tiere zunächst für 4 Tage mit einer sichtbaren Plattform an die Testbedingungen gewöhnt. Die Analyse der Latenzzeit bis zum Auffinden der sichtbaren Plattform zeigte keine Unterschiede zwischen Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Tiere über einen Zeitraum von 10 Tagen zweimal mit einem Intervall von 15 Sekunden bzw. 10 Minuten in das Wasserbecken gesetzt und die Zeit bis zum Erreichen einer nicht sichtbaren Plattform dokumentiert. Wie in Abbildung 3.20 A dargestellt, benötigten Rdx KO (-/-) Mäuse im ersten Versuch durchschnittlich $39,83 \pm 1,69$ s bis zum Erreichen der Plattform. Dieser Wert reduzierte sich auf $30,04 \pm 2,02$ s im zweiten Versuch. Eine 4-Weg ANOVA Analyse (Tag (10) x Versuch (2) x Genotyp (2) x Geschlecht (2)) führte hierbei zu einer signifikanten Verringerung bis zum Erreichen der Plattform sowohl über die Tage ($F(9,189) = 3,09; p < 0,01$), als auch zwischen den Versuchen innerhalb eines Tages ($F(1,21) = 60,10; p < 0,001$). Diese Analyse bezieht WT (+/+) Mäuse mit ein, bei denen sich auch eine Verbesserung von $33,15 \pm 2,03$ s im ersten Versuch auf $21,03 \pm 2,42$ s im zweiten Versuch. Insgesamt wurde für Rdx KO (-/-) Mäuse aber eine größere Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform festgestellt. Dies zeigte ein Haupteffekt für den Genotyp ($F(1,21) = 9,54; p < 0,01$). Dieser war jedoch unabhängig sowohl von den Tagen (Tag x Genotyp: $F(9,189) = 0,72, p = 0,69$), als auch von den Versuchen innerhalb der Tage (Versuch x Genotyp: $F(1,21) = 0,68; p = 0,42$). Scheinbar benötigten Rdx KO (-/-) Mäuse insgesamt länger bis zum Erreichen der Plattform, die Verbesserung über die Tage und innerhalb eines Tages war aber nicht signifikant unterschiedlich gegenüber WT (+/+) Mäusen (Abb. 3.20 B). Diese Faktoren gelten als Hauptindikatoren für eine Veränderung im *working memory* des *Morris water maze*.

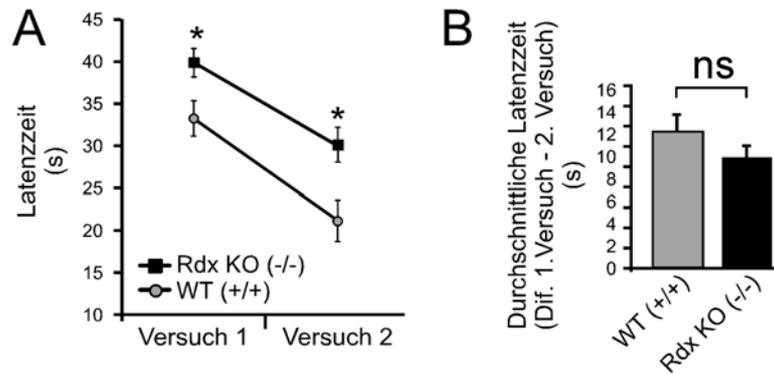


Abb. 3.20: Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen im *working memory test* des *Morris water maze*. Über 10 Tage wurde die Latenzzeit bis zum Auffinden einer nicht sichtbaren Plattform gemessen. Die Tiere hatten pro Tag zwei Versuche. Die Plattform befand sich jeden Tag an einer neuen Position. **(A)** Durchschnittliche Latenzzeit in Sekunden bis zum Auffinden der Plattform während des ersten und zweiten Versuchs bei Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen. **(B)** Differenz der durchschnittlichen Latenzzeit des ersten und zweiten Versuchs in Sekunden bis zum Auffinden der Plattform bei Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen. Insgesamt wurden 10 WT (+/+) Mäuse mit 5 Weibchen und 5 Männchen sowie 15 Rdx KO (-/-) Mäuse mit 5 Weibchen und 9 Männchen untersucht. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SD.

Der gezeigte Haupteffekt für den Genotyp zwischen Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen könnte ein Hinweis auf eine Rolle von Radixin in einem anderen Zusammenhang von räumlicher Erinnerung geben. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Radixin *Knockout* Mäuse bezüglich *referenz memory* im *Morris water maze* getestet. Hierzu wurden die Tiere zunächst wieder für 4 Tage mit einer sichtbaren Plattform an die Testbedingungen gewöhnt. Die Analyse der Latenzzeit bis zum Auffinden der sichtbaren Plattform zeigte keine Unterschiede zwischen Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Tiere über einen Zeitraum von 10 Tagen zweimal mit einem Intervall von 15 Sekunden in das Wasserbecken gesetzt und die Zeit bis zum Erreichen einer nicht sichtbaren Plattform dokumentiert. Für die ersten 6 Tage befand sich die Plattform immer an der gleichen Position (*Acquisition Phase*). Am siebten Tag wurde die Plattform entfernt und der Weg der Maus bezüglich der zurückgelegten Distanz und der Zeit in den einzelnen Quadranten des Beckens dokumentiert (*Probe Test*). Hiernach wurde die Plattform in die Mitte des gegenüberliegenden Quadranten gesetzt und erneut die Zeit bis zum Erreichen der Plattform gemessen (*Reversal Phase*). Für die *Acquisition* und *Reversal Phase* wurden für Rdx KO (-/-) Mäuse längere Latenzzeiten bis zum

erreichen der Plattform beobachtet. Im Durchschnitt benötigten die Rdx KO (-/-) Mäuse $28,92 \pm 1,48$ s und die WT (+/+) Mäuse $22,87 \pm 1,72$ s. Eine 4-Weg ANOVA Analyse (Tag (9) x Versuch (2) x Genotyp (2) x Geschlecht (2)) ergab einen Haupteffekt für den Genotyp ($F(1,19) = 7,10$; $p < 0,05$), der bei einer getrennten Analyse der *Reversal Phase* noch größer war (Rdx KO (-/-) $30,80 \pm 2,00$ s; WT (+/+) $19,33 \pm 2,32$ s; $F(1,19) = 14,06$; $p < 0,01$) (Abb.3.21 A). Die Analyse des *Probe Tests* zeigte eine signifikant höhere Distanz für WT (+/+) ($130,19 \pm 11,07$ cm) Mäuse bezüglich der zurückgelegten Strecke im Ziel-Quadranten im Vergleich zu Rdx KO (-/-) ($91,61 \pm 9,54$ cm) Mäusen. Eine 4-Weg ANOVA Analyse (Quadrant (4) x Intervall (3) x Genotyp (2) x Geschlecht (2)) ergab eine Interaktion von Quadrant und Genotyp ($F(3,57) = 3,99$; $p < 0,05$). Ähnliches zeigte die Untersuchung der Aufenthaltszeiten in den einzelnen Quadranten. WT (+/+) Mäuse hielten sich dabei zu $43,26 \pm 4,07\%$ im Zielquadranten auf, Rdx KO (-/-) Mäuse hingegen zu $32,27 \pm 3,50\%$ ($F(3,57) = 2,86$; $p < 0,05$) (Abb. 3.21 B, D und E). Um einen Einfluss motorischer Unterschiede beider Gruppen auf die gezeigten Ergebnisse auszuschließen, wurde die Schwimmgeschwindigkeit während des *Probe Tests* ermittelt. Wie in Abbildung 3.21 C dargestellt, konnte keine signifikante Abweichung zwischen Rdx KO (-/-) ($20,58 \pm 1,17$ cm/s) und WT (+/+) ($21,03 \pm 1,29$ cm/s) Mäusen beobachtet werden (Genotyp Effekt: $F(1,18) = 0,07$; $p = 0,80$).

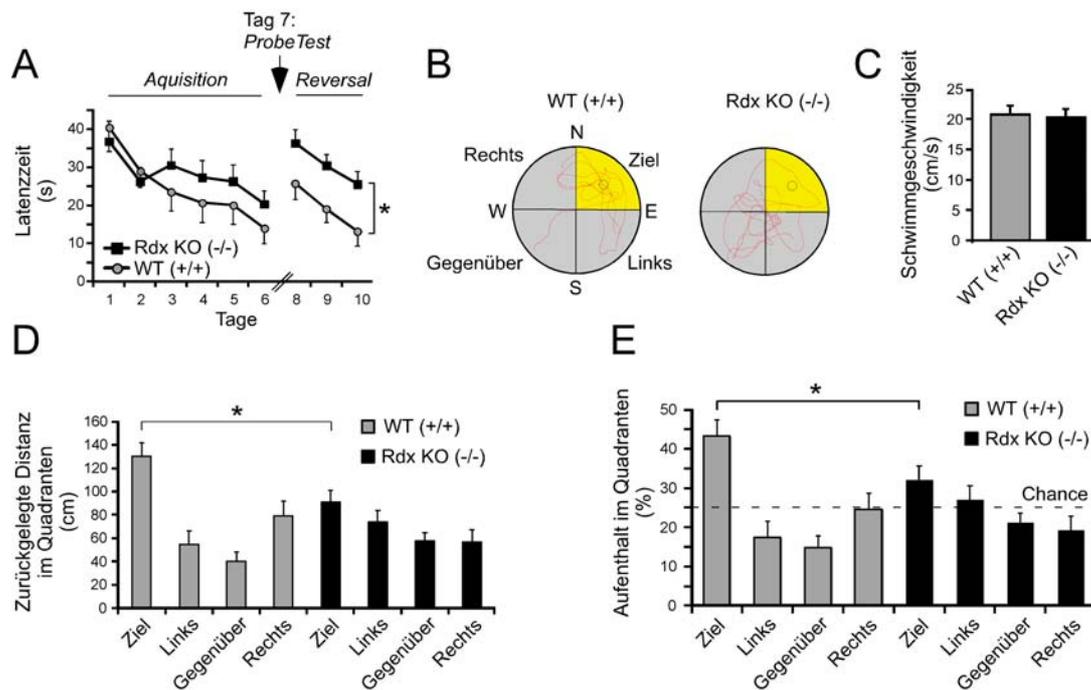


Abb. 3.21: Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen im *reference memory test* des *Morris water maze*. Über 10 Tage wurde das Verhalten bis zum Auffinden einer nicht sichtbaren Plattform dokumentiert. Hierbei befand sich die Plattform während der ersten 6 Tage (*Acquisition Phase*) jeweils in der Mitte des Zielquadranten (gelber Bereich in B), an Tag sieben (*Probe Test*, siehe Pfeil in A) wurde die Plattform entfernt und für die letzten drei Tage (*Reversal Phase*) in der Mitte des gegenüberliegenden Quadranten positioniert. Die Tiere wurden zweimal pro Tag in einem Intervall von 15 s getestet (**A**) Durchschnittliche Latenzzeit in Sekunden der Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäuse bis zum Auffinden der Plattform über neun Tage (**B**) Repräsentative Darstellung der zurückgelegten Strecke einer Rdx KO (-/-) bzw. WT (+/+) Maus innerhalb des *water maze* während des *Probe Tests*. (**C**) Durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit in cm/s während des *Probe Tests* von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen. (**D**) Zurückgelegte Distanz in cm innerhalb der einzelnen Quadranten während des *Probe Tests* für Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäuse. (**E**) Prozentualer Aufenthalt in den einzelnen Quadranten während des *Probe Tests* für Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäuse. Insgesamt wurden 10 WT (+/+) Mäuse mit 6 Weibchen und 4 Männchen sowie 13 Rdx KO (-/-) Mäuse mit 6 Weibchen und 7 Männchen untersucht. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SD.

Die gezeigten Ergebnisse lassen auf eine Veränderung betreffend *reference memory* für Radixin *Knockout* Mäuse im *Morris water maze* Experiment schließen, betreffend *working memory* hingegen scheint keine Beeinflussung vorzuliegen.

Es wird angenommen, dass der Hippokampus bei der räumlichen Orientierung und Erinnerung eine wichtige Rolle spielt (Burgess *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 1996). Daher wurden Rdx KO (-/-) Mäuse in einem weiteren Hippokampus-spezifischen Verhaltenstest untersucht.

3.7.4 Verhalten im *trace fear conditioning*

Der Hippokampus spielt eine wichtige Rolle in vielen Formen assoziativen Lernens und beim Gedächtnis (Gilbert & Kesner 2002; Wallenstein *et al.*, 1998). Hierbei umfasst ein Lernprozess, der als klassische Konditionierung bezeichnet wird, die Assoziation von Reizen aus der Umwelt mit einem bestimmten Verhalten und wurde als erstes durch Ivan Pavlov beschrieben (Pavlov, 1927). *Trace fear conditioning* ist eine spezielle Hippokampus-abhängige Form assoziativen Lernens, bei der ein unbedingter Reiz (US) und bedingter Reiz (CS) zeitlich voneinander getrennt sind (Rawlins, 1985; Yee *et al.*, 2004). Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäuse wurden daher hinsichtlich Ihrer Fähigkeit untersucht, einen CS mit einem US zu assoziieren, der mit einer Verzögerung von 20 Sekunden erfolgte.

Als erstes erfolgte die Konditionierung. Hierzu wurden die Mäuse in einen Konditionierungskäfig gesetzt und dreimal hintereinander dem bedingten Reiz (CS: Vibration) für 30 s ausgesetzt, dem entweder sofort (*no trace*) oder nach 20 s (*20s trace*) der unbedingte Reiz (US: Elektroschock) folgte. Während der Präsentation des CS wurde die Angstreaktion in Form der zeitlichen Dauer einer körperlichen Starre (*freezing*) gemessen. Sowohl Rdx KO (-/-), als auch WT (+/+) Mäuse zeigten eine ansteigende *freezing*-Reaktion über die Dauer der Versuche in beiden *trace* Situationen (Abb. 3.22 A und B). Eine 4-Weg ANOVA Analyse (Versuch (3) x Genotyp (2) x Geschlecht (2) x *trace* (2)) ergab einen signifikanten Anstieg der *freezing*-Reaktion über den Zeitraum der Versuche ($F(2,48) = 9,31; p < 0,0001$) und eine Interaktion mit *trace* (Versuche x *trace*: $F(2,48) = 4,17; p < 0,05$). Eine Interaktion mit dem Genotyp (Versuch x Genotyp: $F(2,48) = 0,04; p = 0,96$) und *trace* (Versuch x Genotyp x *trace*: $F(2,48) = 0,71; p = 0,50$) konnte nicht gezeigt werden. 24 Stunden später wurde die Assoziation mit dem Kontext, der räumlichen Umgebung des Konditionierungskäfigs, überprüft. Hierzu wurden die Tiere erneut in den Konditionierungskäfig zurückgesetzt und die *freezing*-Reaktion über einen Zeitraum von acht Minuten, unterteilt in Minutenintervalle, gemessen. Die WT (+/+) Mäuse zeigten einen signifikanten Unterschied für die durchschnittliche *freezing*-Reaktion über die gesamten Intervalle zwischen der *no trace* ($5,65 \pm 2,98\%$) und *20s trace* ($19,35 \pm 2,98\%$) Situation

($F(1,12) = 7,81; p < 0,05$). Die Rdx KO (-/-) Mäuse hingegen zeigten keine signifikante Veränderung zwischen der *no trace* ($11,59 \pm 2,98\%$) und *20s trace* ($10,10 \pm 2,98\%$) Situation ($F(1,12) = 0,19; p = 0,67$) (Abb. 3.22. C und D). Eine 4-Weg ANOVA Analyse (Intervall (8) x Genotyp (2) x Geschlecht (2) x *trace* (2)) ergab eine Interaktion von Genotyp und *trace* mit $F(1,24) = 6,49$ und $p < 0,05$. Weitere 24 Stunden später wurde für 5 Tage die durchschnittliche *freezing*-Reaktion über einen Zeitraum von acht Minuten während der Präsentation des CS in einem neuen, neutralen Käfig untersucht. Dieser unterschied sich im Aussehen, den Lichtverhältnissen und dem Geruch von dem Konditionierungskäfig. Wie in Abbildung 3.22 E dargestellt, zeigten WT (+/+) Mäuse für die *no trace* Situation eine durchschnittliche *freezing*-Reaktion von $8,54 \pm 1,49\%$, diese war in der *20s trace* Situation signifikant auf $1,17 \pm 1,49\%$ reduziert ($F(1,12) = 11,91; p < 0,01$). Im Gegensatz hierzu konnte für Rdx KO (-/-) Mäuse kein signifikanter Unterschied in der *freezing*-Reaktion zwischen der *no trace* ($5,50 \pm 1,49\%$) und der *20s trace* ($5,58 \pm 1,49\%$) Situation beobachtet werden ($F(1,12) = 0,002; p = 0,97$). Eine 4-Weg ANOVA Analyse (Tag (5) x Genotyp (2) x Geschlecht (2) x *trace* (2)) ergab eine Interaktion von Genotyp und *trace* mit $F(1,24) = 6,24$ und $p < 0,05$.

Die Ergebnisse zeigen, dass bezüglich der zeitlichen Differenz zwischen den CS und US im *trace fear conditioning* Radixin *Knockout* Mäuse bei der erneuten Präsentation des CS eine unabhängige *freezing*-Reaktion im Gegensatz zu der abhängigen *freezing*-Reaktion der wildtypischen Kontrollen aufweisen.

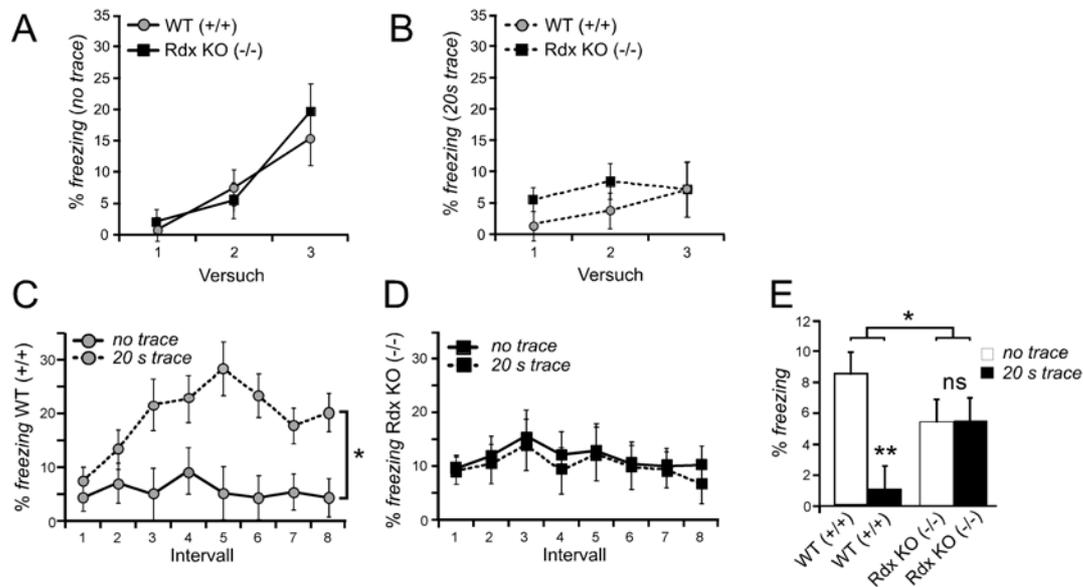


Abb. 3.22: Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen im *trace fear conditioning*. (A und B) Konditionierung: Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen wurde dreimal eine Kombination aus CS (bedingter Reiz: Vibration) und US (unbedingter Reiz: Elektroschock) präsentiert. Dargestellt ist die prozentuale *freezing*-Reaktion während des CS, dem direkt (*no trace*) oder nach einer Pause von 20 s (*20s trace*) der US folgte. (C und D) Kontext Test: 24 h nach der Konditionierung wurden die Mäuse in den Konditionierungskäfig zurückgesetzt und die *freezing*-Reaktion über 8 min beobachtet. Dargestellt ist die durchschnittliche *freezing*-Reaktion über acht Minutenintervalle für Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäuse in der *no trace* und *20s trace* Situation. (E) CS Test: Weitere 24 h später wurden die Mäuse über fünf Tage in einen neutralen Käfig gesetzt und die *freezing*-Reaktion über 8 min dokumentiert. Dargestellt ist die durchschnittliche Differenz der *freezing*-Reaktion 15 s vor und 15 s während des CS über fünf Tage zwischen der *no trace* und *20s trace* Situation von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen. Insgesamt wurden 16 WT (+/+) Mäuse und 16 Rdx KO (-/-) Mäuse mit der gleichen Anzahl an Weibchen und Männchen untersucht. Alle Daten sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren den SD.

4 Diskussion

Die schnelle synaptische Inhibition im ZNS von Säugetieren wird vornehmlich durch Neurotransmitter-Rezeptoren der GABA_A-Rezeptoren vermittelt. Die Bindung von GABA an den Rezeptor führt zur Öffnung des ligandengesteuerten Ionenkanals und zu einem Einstrom von Chlorid-Ionen in das Zellinnere, was im adulten Gehirn zur Hyperpolarisierung des postsynaptischen Membranpotentials führt und damit die Wahrscheinlichkeit eines Aktionspotentials herabsetzt. Für eine effiziente synaptische Transmission ist es notwendig, dass die GABA_A Rezeptoren in der postsynaptischen Plasmamembran gebündelt werden (siehe Kapitel 1.2.2 und 1.2.3). Ein Hauptgerüstprotein der inhibitorischen Synapse, das hierbei eine wichtige Rolle spielt, ist Gephyrin. Die Depletion von Gephyrin führt zu einer Auflösung von GABA_AR Clustern und zu einer diffusen Verteilung dieser Rezeptoren in der Plasmamembran (Kneussel *et al.*, 1999). Interessanterweise bleibt die Bündelung einiger Untereinheiten wie $\alpha 1$ und $\alpha 5$ nach der Depletion von Gephyrin unbeeinflusst, was auf eine Gephyrin-unabhängige Verankerung dieser Untereinheiten schließen lässt. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass andere Proteine existieren, die für die Bündelung dieser Untereinheiten verantwortlich sind (Kneussel *et al.*, 2001). In der Tat konnten Loebrich *et al.* (2006) das Protein Radixin als neuen Interaktionspartner für die $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_A Rezeptors identifizieren. Radixin scheint für die Bündelung $\alpha 5$ -enthaltender GABA_AR verantwortlich zu sein. Eine mögliche Regulation dieser Interaktion sowie deren Einfluss, den sie auf die Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ nehmen könnten, ist jedoch bisher nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, einen potentiellen Mechanismus der Interaktion sowie dessen zelluläre sowie physiologische Auswirkungen auf die Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ im Nervensystem von *Mus musculus* zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung und Aktivierung Radixins abhängig von neuronaler Aktivität gesteuert wird und dass dieser Prozess von RhoGTPasen und Rho-abhängigen Kinasen vermittelt wird. Abhängig vom Aktivierungszustand

Radixins konnten veränderte synaptische bzw. extrasynaptische Lokalisationen von GABA_AR α 5 beschrieben werden. Des Weiteren zeigten Verhaltensanalysen einer Radixin *Knockout* Mauslinie Veränderungen hinsichtlich Lernen und Gedächtnis. Diese könnten auf die Umverteilung der GABA_AR α 5 Untereinheit in Abhängigkeit der Aktivierung Radixins zurückzuführen sein.

4.1 Regulation und Einfluss der Interaktion von Radixin mit GABA_AR α 5 auf dessen synaptische Lokalisation

Eine zentrale Beobachtung dieser Arbeit war, dass die Inaktivierung von Radixin zu einer vermehrten Lokalisation von GABA_AR α 5 an der Synapse führte.

Die Informationsverarbeitung im Gehirn von Säugetieren wird durch ein dynamisches Zusammenspiel zwischen erregender und hemmender neuronaler Transmission reguliert (Gaiarsa *et al.*, 2002). Die Gedächtnisbildung im Hippokampus hängt hierbei grundlegend von der Aktivität der Glutamat-Rezeptoren, also von der erregenden neuronalen Transmission ab. Verschiedene Studien zeigten zudem, dass die erregende Transmission direkt durch GABAerge Inhibition geschwächt werden kann (Stelzer 1992; Wigstrom & Gustafsson 1983). Hierfür scheint hauptsächlich die schnelle phasische Inhibition an der Synapse verantwortlich zu sein (Steckler *et al.*, 1998). Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, befindet sich GABA_AR α 5 hauptsächlich in extrasynaptischen Bereichen der Plasmamembran (Pirker *et al.*, 2000; Sur *et al.*, 1999) und scheinen für die langsame tonische Inhibition verantwortlich zu sein. Über deren physiologische Funktion ist bisher jedoch nur wenig bekannt (Glykys *et al.*, 2008). Allerdings wurde immer wieder auch ein kleiner Anteil von GABA_AR α 5 an Synapsen beobachtet (Brunig *et al.*, 2002; Loebrich *et al.*, 2006; Serwanski *et al.*, 2006). Dies konnte ebenfalls in dieser Arbeit bestätigt werden. Nach wie vor war jedoch die Funktion dieser synaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5 unbekannt. Interessanterweise beschreiben neueste

Veröffentlichungen eine spezielle langsame synaptische Inhibition, die spezifisch durch $\alpha 5$ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren vermittelt wird (Vargas-Caballero *et al.*, 2010; Zarnowska *et al.*, 2009). Ob und inwieweit eine synaptische Lokalisation der GABA_AR $\alpha 5$ aber verändert und reguliert werden kann, war unbekannt. Wie die Analyse von zwei Phosphorylierungs-Mutanten ergab, scheint Radixin hieran offenbar beteiligt zu sein. Die Expression einer Phosphorylierungs-Mimik-Mutante von Radixin führte zu einer überwiegend extrasynaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$, die Expression einer Phosphorylierungs-Minus-Mutante hingegen zu einem signifikanten Anstieg der synaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$. Dies lässt auf eine synaptische Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ in Abhängigkeit von der Phosphorylierung Radixins an Threonin 564 und seiner damit verbundenen Aktivierung schließen. Eine spezifische Phosphorylierung des Threonin-Restes 564 führt zu einer Stabilisierung der offenen aktiven Konformation des Proteins, eine Dephosphorylierung zu einer geschlossenen inaktiven Konformation (Huang *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2001). Übereinstimmend hiermit war es mittels Präzipitations-Experimenten möglich, eine Interaktion zwischen der Phosphorylierungs-Mimik-Mutante von Radixin und GABA_AR $\alpha 5$ nachzuweisen. Nicht jedoch konnte eine Interaktion zwischen der Phosphorylierungs-Minus-Mutante von Radixin und GABA_AR $\alpha 5$ beobachtet werden. Differentiell regulierte Interaktionen und Lokalisationen synaptischer Proteine in Abhängigkeit von deren Phosphorylierungszustand wurden bereits beschrieben. So führt die Phosphorylierung von PSD-95 zu einem Anstieg in seiner synaptischen Lokalisation. Über die erhöhte Affinität von phosphoryliertem PSD-95 zum AMPA Rezeptor wird dessen synaptische Lokalisation darauf ebenfalls gesteigert (Kim *et al.*, 2007). Ähnliche Mechanismen wurden auch für die Interaktion und die synaptische Lokalisation von Gephyrin und dem Glyzin-Rezeptor an der inhibitorischen Synapse beschrieben (Zita *et al.*, 2007). Ferner wurde bei nicht-neuronalen Zellen eine von dem Phosphorylierungszustand der ERM-Proteine abhängige Interaktion mit den Transmembranproteinen CD43, CD44 und ICAM-2 beobachtet (Hamada *et al.*, 2003; Yonemura *et al.*, 1998).

Als synaptische Plastizität wird die Fähigkeit einer Synapse bezeichnet, die Stärke der synaptischen Transmission zu modulieren. Ein Prozess, der zur synaptischen Plastizität beiträgt, ist die Veränderung der Anzahl von Neurotransmitter-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran (Groc *et al.*, 2007; Petrini *et al.*, 2009). Vorausgehende Arbeiten konnten hier bereits einen Austausch zwischen synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren über laterale Diffusion innerhalb der Plasmamembran zeigen. Sowohl für AMPA- als auch NMDA-Rezeptoren der exzitatorischen Synapse (Borgdorff & Choquet 2002; Groc *et al.*, 2004; Levi *et al.*, 2008; Tovar & Westbrook 2002), wie auch für Glyzin- und GABA-Rezeptoren der inhibitorischen Synapse (Bogdanov *et al.*, 2006; Meier *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2005), konnte die Diffusion zwischen synaptischen und extrasynaptischen Bereichen nachgewiesen werden. Eine Verankerung der Rezeptoren in der postsynaptischen Membran wird hierbei über Bindungen der Rezeptoren an Gerüstproteine erzeugt, die wiederum an dem Zytoskelett verankert sind (Kneussel & Loebrich 2007; Specht & Triller 2008).

Wie dieser Austausch zwischen extrasynaptischen und synaptischen Rezeptoren und deren Interaktionen mit Gerüstproteinen im Einzelnen reguliert werden, ist vor allem für die inhibitorische Synapse kaum untersucht. Die Daten in dieser Arbeit deuten auf Prozesse hin, bei denen die Phosphorylierung von ERM-Proteinen in Abhängigkeit von RhoGTPasen eine Umverteilung zwischen synaptischen und extrasynaptischen GABA_AR α 5 regulieren kann. Die Expression von dominant negativem RhoA führte zu einer Dephosphorylierung der ERM-Proteine und einem Anstieg der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5. Umgekehrt führte die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von RhoA zur Phosphorylierung der ERM-Proteine, woraufhin ein Anstieg in der extrasynaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5 beobachtet wurde. Untersuchungsergebnisse anderer Arbeiten bestätigten diese Vorgänge. Zum Beispiel führte die Inhibition von RhoA zu einer deformierten Ausbildung der Microvilli in Epithelzellen, was auf eine Inaktivierung der ERM-Proteine zurückgeführt werden konnte (Yonemura *et al.*, 2002). Des Weiteren führte die Expression von konstitutiv aktivem RhoA in neuronalen Vorläuferzellen des Hippokampus zu einem Anstieg der

Phosphorylierung von Moesin (Jeon *et al.*, 2002). Im Gegensatz hierzu führt Rac1 offenbar zu einer Dephosphorylierung und Inaktivierung der ERM-Proteine, wie die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Rac1 an der immunologischen Synapse von T-Zellen zeigte (Faure *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen sind konsistent mit dem in der vorliegenden Arbeit gezeigtem Ergebniss nach Expression von konstitutiv aktiven Rac1 in HEK293TN-Zellen, was ebenfalls zu einer Dephosphorylierung der ERM-Proteine führte. Unter diesen Bedingungen zeigte GABA_AR α 5 in primären hippocampalen Neuronen einen Anstieg in der synaptischen Lokalisation. Die Auswirkungen der Expression von RhoA und Rac1 scheinen dabei zu gegensätzlichen Effekten sowohl in Bezug auf die Phosphorylierung, als auch auf die Lokalisation von GABA_AR α 5 zu führen. Tatsächlich gibt es Hinweise auf eine antagonistische Regulation der beiden GTPasen. Die Aktivierung von Rac1 durch den GEF Tiam1 führte zu einer Inaktivierung von RhoA in neuronalen Zellen, Fibroblasten und Epithelzellen (Leeuwen *et al.*, 1997; Sander *et al.*, 1999; Zondag *et al.*, 2000). Dies erklärt die gegensätzliche extrasynaptische bzw. synaptische Lokalisation von GABA_AR α 5 nach der Expression von RhoA bzw. Rac1.

Wie schon durch andere Arbeiten gezeigt (Hughes & Fehon 2006; Jeon *et al.*, 2002; Parisiadou *et al.*, 2009) und in dieser Arbeit bestätigt, wird die Aktivität der ERM-Proteine über eine Proteinkinase-abhängige Phosphorylierung gesteuert. Welche Kinasen hierbei im speziellen für die Phosphorylierung verantwortlich sind, wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass die Rho-abhängige Kinase (ROCK) *in vitro* zu einer Phosphorylierung der ERM-Proteine führt (Matsui *et al.*, 1998). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte jedoch später, dass die Inhibition von ROCK *in vivo* die Phosphorylierung der ERM-Proteine nicht beeinflusst (Matsui *et al.*, 1999). Neuere Arbeiten lassen des Weiteren eine Rolle der Proteinkinase C (PKC) α bei der Phosphorylierung von Ezrin (Ng *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2009) und der Cdc42-bindenden Kinase MRCK (Nakamura *et al.*, 2000) vermuten. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, konnte nach Inhibition von ROCK sowohl eine Dephosphorylierung der ERM-Proteine, als auch eine erhöhte synaptische Lokalisation von GABA_AR α 5 in primären hippocampalen

Neuronen beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit einer speziellen Funktion von ROCK bei der Phosphorylierung der ERM-Proteine. Um dieses zu bestätigen und um die Beteiligung weiterer Kinasen auszuschließen, wären weitere Untersuchungen nötig. Schließlich gibt es Hinweise, dass ERM-Proteine selbst auf die Aktivierung der RhoGTPasen wirken können. So kann RhoGDI direkt an die aktive Konformation der ERM-Proteine binden (Takahashi *et al.*, 1998), wodurch die inhibierende Interaktion von RhoGDI auf RhoA aufgelöst wird. Anschließend kann RhoA durch die Bindung von GTP aktiviert werden (Hamada *et al.*, 2001). Hieraus könnte sich eine positive Rückkoppelung ergeben: Die Aktivierung von RhoA führt zur Aktivierung von ROCK, wodurch ERM-Proteine aktiviert werden. Diese führt im Gegenzug zur Aktivierung von RhoA. Hierdurch wird eine Bindung von GABA_AR α 5 an Radixin ermöglicht, was die extrasynaptische Lokalisation des Rezeptors begünstigt.

Interessanterweise führte, wie bereits für PSD-95 und den AMPA-Rezeptor bzw. Gephyrin und den Glyzin-Rezeptor diskutiert, eine Phosphorylierung des synaptischen Gerüstproteins zu einem Anstieg der synaptischen Lokalisation der Rezeptoren. Im Falle von Radixin und GABA_AR α 5 scheint es genau umgekehrt zu sein. Die Phosphorylierung von Radixin führte zu einer höheren extrasynaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5. Dies könnte für neuronale Signalkaskaden nötig sein, die eine gegensätzliche Rezeptorverteilung in synaptischen und extrasynaptischen Bereichen benötigen. Wie ist dies aber molekular auf Ebene der Gerüstproteine zu erklären? Eine Möglichkeit, diese Prozesse zu erklären, bietet die in dieser Arbeit beobachtete unveränderte extrasynaptische Lokalisation von Radixin. Wie gezeigt, scheint diese unabhängig von dem Aktivierungszustand von Radixin über die RhoGTPasen und ROCK zu sein. Diese Beobachtung stimmt mit dem im Kapitel 1.3 angesprochenen, zweistufigem Aktivierungsprozess der ERM-Proteine überein. Offenbar findet als erstes eine Bindung der ERM-Proteine an PIP₂ statt, ein Phospholipid der Plasmamembran. Daraufhin könnte es zur Phosphorylierung des konservierten Threonins kommen, wodurch die Proteine in ihrer offenen aktiven Konformation stabilisiert würden (Huang *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2001). Die synaptische Lokalisation von

GABA_AR α 5 scheint also nicht über eine parallele Umverteilung von Radixin, sondern über die Interaktion zu Radixin gesteuert zu werden. Wie hier gezeigt, befindet sich Radixin sowohl in aktiver, als auch inaktiver Konformation hauptsächlich an extrasynaptischen Bereichen, interagiert aber nur in der aktiven Konformation mit GABA_AR α 5. Wie beschrieben, führt dies zu einer vermehrt extrasynaptischen Lokalisation des Rezeptors. Die hier beschriebenen Einflüsse von RhoGTPasen könnten neben der Phosphorylierung von Radixin unter Umständen auch an der Rekrutierung der ERM-Proteine zur Plasmamembran beteiligt sein. Es konnte gezeigt werden, dass RhoA zu einer Aktivierung der Typl Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase (PIP5K) führt, wodurch die Bildung von PIP₂ katalysiert wird (Weernink *et al.*, 2004). Hierdurch könnte es zu einer gesteigerten Rekrutierung der ERM-Proteine an die Plasmamembran und dadurch zu einer vermehrten extrasynaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5 kommen. Übereinstimmend hiermit wurde in dieser Arbeit eine vermehrte extrasynaptische Lokalisation von GABA_AR α 5 nach Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von RhoA, bzw. eine vermehrte synaptische Lokalisation nach Expression einer dominant negativen Mutante von RhoA beschrieben. Welche genaue Rolle der Zusammensetzung der Plasmamembran und im speziellen dem Anteil an PIP₂ bei der Regulation der Lokalisation von GABA_AR α 5 über Radixin zukommt, müsste daher genauer untersucht werden. Ein interessanter, aber bisher kaum betrachteter Aspekt in Bezug auf die Lokalisation von Neurotransmitter-Rezeptoren ist der Einfluss von sogenannten *Lipid-Rafts* innerhalb der Plasmamembran. Es handelt sich hierbei um PIP₂-, Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Membrandomänen, die offenbar einen spezialisierten Plasmamembranbereich für Signaltransduktionen bilden können (Simons & Toomre 2000). Es ist bekannt, dass Neurotransmitter-Rezeptoren innerhalb dieser Domänen lokalisiert sein können und dass hierdurch ihre Funktion beeinflusst werden kann (Allen *et al.*, 2007). Eine Analyse der Zusammensetzung von *Lipid-Rafts* identifizierte vorwiegend GABA_A-Rezeptoruntereinheiten, die vorwiegend extrasynaptisch lokalisiert sind (Li *et al.*, 2007).

Aus den bisher gezeigten und diskutierten Daten kann man ein Modell ableiten, bei dem Radixin ein extrasynaptisches Gerüstprotein darstellt, welches in Abhängigkeit von RhoGTPasen und über die Aktivität von ROCK eine extrasynaptische Bündelung der GABA_AR α 5 gewährleistet. So könnte die laterale Diffusion von GABA_AR α 5 in synaptische Bereiche über Radixin verhindert bzw. reguliert werden.

4.2 *in vivo* Analyse der Funktion von Radixin bezüglich der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5

Alle bisher diskutierten Ergebnisse wurden aus *in vitro* Experimenten in primären hippokampalen Neuronen erhoben. Um die Funktion von Radixin bei der Lokalisation von GABA_AR α 5 *in vivo* genauer untersuchen zu können, wurde hinsichtlich dieser Fragestellung eine Radixin *Knockout* Mauslinie analysiert. Die Depletion von Radixin führte zu einer erhöhten synaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5, sowohl innerhalb synaptosomaler Fraktionen nach biochemischer Aufreinigung, als auch nach immunzytochemischer Analyse kultivierter hippokampaler Neurone. Die Beobachtung stimmt mit den zuvor diskutierten Daten aus *in vitro* Experimenten überein, wobei zwischen der spezifischen Inaktivierung von Radixin und dem Verlust des gesamten Proteins unterschieden werden muss. Bemerkenswerterweise führten beide Ansätze zu ähnlichen Ergebnissen in Bezug auf die synaptische Lokalisation von GABA_AR α 5. Dies unterstützt die Theorie, in welcher Radixin über Bindung der α 5-Untereinheit GABA_A-Rezeptoren extrasynaptisch bündelt. Nach Inaktivierung bzw. Depletion von Radixin kommt es folglich zu einem Anstieg der synaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5.

Dies ist allerdings nur vorstellbar, wenn der Rezeptor nach lateraler Diffusion in der Plasmamembran (Bogdanov *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2005) und Erreichen von postsynaptischen Bereichen wiederum durch andere Gerüstproteine in der postsynaptischen Membran konzentriert werden kann. Eine synaptische Bündelung könnte über eine Interaktion mit Gephyrin erfolgen. Gephyrin stellt ein wichtiges Gerüstprotein der inhibitorischen

Synapse dar, welches für die Bündelung von synaptischen GABA_A-Rezeptoren verantwortlich ist (siehe Kapiteln 1.2.2). Interaktionen mit GABA_AR scheinen hierbei vor allem über die γ 2- und α 2-Untereinheiten vermittelt zu werden (Kirsch *et al.*, 1995; Tretter *et al.*, 2008). Ein hoher Anteil von GABA_AR im Hippokampus setzt sich offenbar aus α 5-, β 3- und γ 2-Untereinheiten zusammen (Burgard *et al.*, 1996; Caraiscos *et al.*, 2004). Aufgrund dessen wäre es denkbar, dass die γ 2-Untereinheit die Verankerung von GABA_AR α 5 über Gephyrin vermittelt. Es wird vermutet, dass in der postsynaptischen Membran nur eine definierte Anzahl von Neurotransmitter-Rezeptoren immobilisiert werden kann, also eine begrenzte Anzahl von freien Positionen für Rezeptoren an der Synapse zur Verfügung stehen (Shi *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2005). Erreichen zuvor extrasynaptische Rezeptoren über laterale Diffusion die Synapse, müssten folglich bereits vorhandene Rezeptoren aus der Synapse entfernt werden bevor neue Rezeptoren an der Synapse verankert werden können. Wie in dieser Arbeit gezeigt, scheint die Menge an vorwiegend synaptisch lokalisierten GABA_AR α 1 in Synaptosomen der GABA_AR α 5 *Knockout* Maus aber nicht verändert. Untersuchungen weiterer Untereinheiten wie zum Beispiel α 2, zum Beispiel durch immunhistochemische Analysen, wären nötig, um eine Verdrängung von synaptischen Rezeptoren nach lateraler Diffusion von GABA_AR α 5 in synaptische Bereiche zu bestätigen. In Einklang mit dieser Theorie konnte allerdings eine Veränderung der α 5-spezifischen GABA_AR-Clustergrößen beschrieben werden. Übereinstimmend mit der geringen synaptischen und vorwiegend extrasynaptischen Lokalisation von α 5 (Brunig *et al.*, 2002), konnten an Synapsen kleinere, α 5-enthaltende Cluster im Vergleich zu größeren extrasynaptischen α 5-enthaltenden Clustern beobachtet werden. Dieses Verhältnis scheint sich nach der Depletion von Radixin offenbar zu verschieben: es wurden hiernach größere synaptische bzw. kleinere extrasynaptische GABA_AR α 5 Cluster beobachtet. Bemerkenswerterweise zeigte die Analyse der durchschnittlichen Cluster-Größe über die gesamte Plasmamembran keine signifikante Veränderung, was der Beobachtung, dass die Menge an GABA_AR α 5 in der Plasmamembran nach der Depletion von Radixin nicht verändert scheint, entspricht. Prozesse wie Endozytose und

Exozytose oder eine veränderte Proteinexpression scheinen daher nicht an der Verschiebung von GABA_AR α 5 zwischen synaptischen und extrasynaptischen Bereichen der Plasmamembran beteiligt zu sein (Loebrich *et al.*, 2006). Dies wiederum unterstützt die Theorie, dass Rezeptoren über laterale Diffusion, in Abhängigkeit von einer extrasynaptischen Verankerung durch Radixin, zwischen synaptischen und extrasynaptischen Bereichen ausgetauscht werden können.

Synaptische Plastizität ist ein Prozess, der sowohl an der Postsynapse durch die Regulation der Anzahl der Neurotransmitter-Rezeptoren, als auch an der Präsynapse durch eine veränderte Exozytose der Neurotransmitter-Vesikel stattfindet (Groc *et al.*, 2007; McBain & Kauer 2009; Petrini *et al.*, 2009). Außerdem wird eine mögliche Beteiligung der ERM-Proteine an der Synapsenbildung diskutiert (Furutani *et al.*, 2007; Parisiadou *et al.*, 2009) und auch Rho-GTPasen spielen bei diesen Prozessen eine Rolle (Chrzanowska-Wodnicka & Burridge 1996; Tashiro *et al.*, 2000). Wie in dieser Arbeit gezeigt, sind sowohl wichtige inhibitorische und exzitatorische Ankerproteine (Gephyrin bzw. PSD-95) an der Postsynapse wie auch das präsynaptische Neurotransmitter-Vesikel-Proteinprotein SV2 nach der Depletion von Radixin in ihrem Vorkommen aber nicht verändert. Dies lässt vermuten, dass die gezeigte veränderte synaptische bzw. extrasynaptische Lokalisation von GABA_AR α 5 nicht auf eine Veränderung der Synapsendichte zurückzuführen ist.

4.3 Einfluss neuronaler Aktivität auf die Aktivierung von Radixin

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Rolle von Radixin und RhoGTPasen bei der Regulation der Lokalisation von GABA_AR α 5 diskutiert. Wie gezeigt, scheint die synaptische Plastizität in Bezug auf GABA_AR α 5 über eine von RhoGTPasen-abhängige Phosphorylierung und Aktivierung von Radixin reguliert zu sein. Wie aber könnten diese Prozesse oberhalb der angesprochenen Signalkaskaden gesteuert werden? Eine Möglichkeit wäre,

dass Reize, wie die Aktivierung von inhibitorischen oder exzitatorischen Neurotransmitter-Rezeptoren, Einfluss auf die Signalkaskaden nehmen.

Interessanterweise wurde nach Induktion von LTP oder nach Aktivierung der AMPA-Rezeptoren in dieser Arbeit eine Dephosphorylierung der ERM-Proteine festgestellt. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren zur Aktivierung von GEFs führt (Kiraly *et al.*, 2010; Van Aelst & Cline 2004), die wiederum entsprechende RhoGTPasen aktivieren können (siehe Einleitung 1.4). Tiam1, ein Rac1-spezifischer GEF, interagiert zum Beispiel direkt mit der NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors (Tolias *et al.*, 2005). Diese Aktivierung führt indirekt über den Einstrom von Ca^{2+} zur Aktivierung von CamKII und PKC, wodurch Tiam1 phosphoryliert und die GEF-Aktivität gesteigert wird (Fleming *et al.*, 1999; Fleming *et al.*, 1997). Ebenfalls Kalirin7, ein weiterer GEF für Rac1, interagiert mit dem NMDA-Rezeptor über die NR2B-Untereinheit und wird möglicherweise über die Phosphorylierung von CamKII aktiviert (Xie *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde für den AMPA-Rezeptor eine Interaktion über GIT1 und Liprin-a mit dem GEF β -Pix gezeigt, welche eine Rekrutierung von β -Pix zur Plasmamembran ermöglicht (Collins *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

Über den Einfluss von inhibitorischen Neurotransmitter-Rezeptoren auf die Aktivierung von RhoGTPasen ist hingegen weniger bekannt. Ein in diesem Zusammenhang interessantes Protein stellt Collybistin dar, ein GEF für Cdc42. Auch wenn in dieser Arbeit die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Cdc42 die Lokalisation von GABA_AR α 5 nicht beeinflusste, sollte dennoch kurz auf die Funktion von Collybistin eingegangen werden, da andere GABA_AR über Collybistin beeinflusst werden könnten. Ursprünglich wurde Collybistin als ein Interaktionspartner von Gephyrin entdeckt (Kins *et al.*, 2000; Xiang *et al.*, 2006). Zusammen mit Neuroligin 2, einem Zelladhäsionsprotein der inhibitorischen Synapse, scheint Collybistin für die Rekrutierung von Gephyrin und damit auch von GABA_A-Rezeptoren zur Synapse notwendig zu sein (Poulopoulos *et al.*, 2009). Zwar ist eine Aktivierung von Collybistin in Abhängigkeit von GABA_A-Rezeptoren bisher

nicht bekannt, allerdings könnte man aufgrund der räumlichen Nähe der Proteine eine gegenseitige Regulation vermuten.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität eine Aktivierung von GEFs bzw. GAPs erfolgen kann, die wiederum entsprechende RhoGTPasen aktivieren bzw. inhibieren. Dies würde daraufhin den Aktivierungszustand der ERM-Proteine beeinflussen, wodurch die extrasynaptische bzw. synaptische Lokalisation der $\alpha 5$ -enthaltenden GABA_AR reguliert werden könnte. Die Steuerung der Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität könnte hierbei für das Gleichgewicht zwischen Inhibition und Erregung in einem Neuron entscheidend sein. Wie in dieser Arbeit gezeigt, scheint der Aktivitätszustand von Radixin und damit sehr wahrscheinlich auch die Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ tatsächlich durch die Modulation neuronaler Aktivität beeinflusst zu werden. Die Aktivierung einer anhaltenden inhibitorischen Transmission führte dabei offenbar zu einer Aktivierung der ERM-Proteine, was zu einer vermehrten extrasynaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ führen sollte. Unter diesen Bedingungen sollte der Rezeptor vornehmlich an der tonischen (langsamen) Inhibition beteiligt sein (Caraiscos *et al.*, 2004; Glykys & Mody 2006; Scimemi *et al.*, 2005). Unlängst konnte durch die Analyse einer $\alpha 5$ *Knockout* Mauslinie gezeigt werden, dass tonische Ströme, die von GABA_AR $\alpha 5$ vermittelt werden, die Induktion von LTP positiv beeinflussen. Zu bemerken wäre hierbei, dass die Depletion der $\alpha 5$ -Untereinheit zu einer Verbesserung Hippokampus-abhängiger Lernprozesse führte (Martin *et al.*, 2010). Im Gegensatz hierzu führte die Aktivierung einer anhaltenden erregenden Transmission offenbar zu einer Inaktivierung der ERM-Proteine, was zu einer vermehrten synaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ führen sollte. Unter diesen Bedingungen könnte der Rezeptor an der phasischen Inhibition beteiligt sein. Einige Arbeiten konnten eine neue $\alpha 5$ -spezifische (so genannte langsame) phasische Inhibition zeigen. In Pyramidalzellen des Cortex führt ein GABA_AR $\alpha 5$ -selektiver inverser Agonist ($\alpha 5$ IA) zu einer Verringerung von synaptischen GABAergen Potentialen (Ali & Thomson 2008). Außerdem könnte GABA_AR $\alpha 5$ an einer speziellen synaptischen Form von GABAergen Strömen

mit einer langsamen Kinetik beteiligt sein (Zarnowska *et al.*, 2009). In hippokampalen Schnitten von $\alpha 5$ *Knockout* Mäusen war die Amplitude und die Signalabfallzeit induzierter inhibitorischer postsynaptischer Potentiale reduziert, was wiederum auf eine reduzierte synaptische Inhibition durch die Depletion von GABA_AR $\alpha 5$ schließen lässt (Collinson *et al.*, 2002). Außerdem wird diskutiert, dass die Aktivität von GABA_AR $\alpha 5$ durch einen Ableitungsmechanismus und/oder durch einer Veränderung des Membranpotentials Einfluss auf die Erregbarkeit von Neuronen nehmen könnte. Im Hippokampus führte die spezifische Aktivität von GABA_AR $\alpha 5$ sowohl zu einer verringerten Erregbarkeit von einzelnen Neuronen (Bonin *et al.*, 2007) und neuronalen Netzwerken (Glykys & Mody 2006), als auch zu einer verringerten Stärke der gesamten Netzwerkoszillationen (Towers *et al.*, 2004).

GABA_AR $\alpha 5$ können daher sowohl an extrasynaptischer tonischer Inhibition beteiligt sein und so die Erregbarkeit eines neuronalen Netzwerkes regulieren, als auch an der synaptischen phasischen Inhibition, um damit die synaptische Plastizität direkt zu beeinflussen. Diese Eigenschaften setzen eine spezifische Regulation von GABA_AR $\alpha 5$ voraus und könnten die Ursache für die Rolle der $\alpha 5$ -Untereinheit bei Hippokampus-abhängigen Lernprozessen und dem Gedächtnis sein.

4.4 Auswirkungen auf das Verhalten von *Mus musculus* nach der Depletion von Radixin

Aktivitätsabhängige synaptische Plastizität beschreibt die Veränderung der Stärke der synaptischen Übertragung in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität und wird als ein wichtiger neuropsychologischer Mechanismus betrachtet, der Lernprozessen und der Gedächtnisbildung zugrunde liegt (Bliss & Lomo 1973; Feldman 2009; Rebola *et al.*, 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Radixin zu einer erhöhten Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ an der Synapse führt, also die Plastizität der inhibitorischen Synapse beeinflusst. Eine Vielzahl anderer Arbeiten konnte zuvor eine

Beteiligung von GABA_A-Rezeptoren in der Ausbildung kognitiver Fähigkeiten zeigen, speziell GABA_AR α 5 werden hierbei wichtige Funktionen zugesprochen (Mohler 2007; Mohler *et al.*, 2008). Diese Interpretationen basierten jedoch immer auf einem direkten Funktionsverlust der α 5-Untereinheit, die hier beschriebenen Beobachtungen der erhöhten synaptischen verringerten extrasynaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5 sind hingegen auf eine Depletion des Gerüstproteins Radixin zurückzuführen. Sowohl das Explorations- und Angstverhalten, als auch die Motor-Koordination, Balance und Motor-Stärke scheint in den Radixin *Knockout* Mäusen nicht beeinflusst zu sein. Dies stimmt mit den Beobachtungen von einer transgenen Mauslinie, die eine GABA_AR α 5 Mutante (H105R) exprimiert und mit Beobachtungen von α 5 *Knockout* Mäusen überein (Collinson *et al.*, 2002; Crestani *et al.*, 2002). Ebenso konnten in *Knockout* Mäusen für die δ -Untereinheit, die ebenfalls hauptsächlich extrasynaptisch lokalisiert ist, keine Unterschiede bezüglich des Angstverhaltens und der Motor-Koordination im Vergleich zu wildtypischen Kontrollgruppen beobachtet werden (Wiltgen *et al.*, 2005). Hingegen zeigte die Depletion von α 1 oder α 2 in Mäusen nach einer eigentlich Sedativ-wirkenden Behandlung mit Diazepam eine erhöhte Explorationsaktivität und ein erhöhtes Angstverhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Low *et al.*, 2000; Rudolph *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte für eine α 3 *Knockout* Maus eine erhöhte spontane Aktivität in einer neuen Umgebung beobachtet werden (Yee *et al.*, 2005). Dieses stimmt mit der hauptsächlich synaptischen Lokalisation (Brunig *et al.*, 2002) und der daher vermittelten phasischen Inhibition dieser Rezeptoruntereinheiten überein. Für eine erhöhte Exzitation, die bei dem Verlust von neuronaler Inhibition vorliegt, wurden hyperaktive Phänotypen von Mäusen beschrieben (Pouget *et al.*, 2009; Viggiano 2008). Des Weiteren führte die erhöhte Endozytose der β 2- und γ 2-Untereinheiten zu epileptischen Anfällen im Tiermodell, was auf eine reduzierte Inhibition zurückzuführen war (Naylor *et al.*, 2005). Allerdings hat die in der vorliegenden Arbeit beschriebene erhöhte synaptische Lokalisation von GABA_AR α 5 durch Depletion von Radixin keinen Einfluss auf die motorischen Fähigkeiten oder die Aktivität von Mäusen. Eine naheliegende Erklärung hierfür könnte die räumlich spezifische Expression der GABA_AR α 5

geben. Andre bereits angesprochene GABA_A-Untereinheiten werden vorwiegend im Cerebellum exprimiert (Fritschy & Panzanelli 2006; Low *et al.*, 2000), ein Gehirnbereich, der insbesondere mit Motor-Funktionen in Verbindung gebracht wird (Marr 1969). GABA_AR α 5 hingegen wird hauptsächlich im Hippokampus exprimiert (Siehe Einleitung 1.2.3), der als essentiell für die Gedächtniskonsolidierung angesehen wird (Eichenbaum *et al.*, 1992; Kemp & Manahan-Vaughan 2007; Squire 1992). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Radixin in Mäusen und die damit offenbar verbundene erhöhte synaptische Lokalisation von GABA_AR α 5 in hippocampalen Neuronen zu einem veränderten Verhalten bezüglich Lernen und Gedächtnis führt.

Wie in dieser Arbeit dargestellt, scheinen Radixin *Knockout Mäuse* in einem *trace fear conditioning* Test für assoziatives Lernen keinen *trace*-Effekt zu zeigen. Anders ausgedrückt, obwohl zwei Stimuli (CS und US) in ihrer zeitlichen Abfolge getrennt voneinander auftreten, kommt es bei den Radixin *Knockout* Mäusen dennoch zu einer Assoziation der beiden Stimuli. In Bezug auf das assoziative Lernen würde dies im Vergleich zur wildtypischen Kontrollgruppe eine Verbesserung bei der Assoziation zeitlich voneinander getrennter Ereignisse bedeuten. Hierbei handelt es sich um einen Prozess, der sehr eng mit der Funktion des Hippokampus verknüpft ist und vermutlich einer abgewandelten hippocampalen Signaltransduktion zugrunde liegt (Rawlins 1985). Auch die Depletion der α 5-Untereinheit in *Knockout* Mäusen sowie die transgene Expression einer α 5-Mutante (H105R) führte zu einer verbesserten Assoziation zweier zeitlich getrennter Stimuli in Mäusen (Crestani *et al.*, 2002; Eichenbaum *et al.*, 1992; Kemp & Manahan-Vaughan 2007; Squire 1992; Yee *et al.*, 2004). Im Gegensatz hierzu führte die Reduktion NMDA-Rezeptor-vermittelter Ströme zu einer Beeinträchtigung der Assoziation zeitlich getrennter Stimuli (Gilmartin & Helmstetter 2010). Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass GABA_AR α 5 bei der Steuerung des Gleichgewichts von erregender und hemmender Transmission bezüglich der temporalen Assoziation von Ereignissen eine entscheidende Rolle einnehmen könnte.

Neben dem *trace fear conditioning* wurde auch das Verhalten von Radixin *Knockout* Mäusen im *Morris water maze* untersucht. Der Test hinsichtlich *working memory* ergab hierbei keine Unterschiede zwischen Radixin *Knockout* Mäusen und der wildtypischen Kontrollgruppe. Im Gegensatz hierzu wurde für den Funktionsverlust von $\alpha 5$ nach spezifischer Inhibition oder Depletion des Proteins selbst eine Verbesserung der *working memory* durch unabhängige Arbeitsgruppen beobachtet (Collinson *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2006). Der Funktionsverlust von $\alpha 5$ scheint daher im Gegensatz zur veränderten synaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ in Radixin *Knockout* Mäusen eine unterschiedliche Auswirkung auf den *working memory Test* im *Morris water maze* zu haben. Eine möglicherweise unterschiedliche synaptische und extrasynaptische Funktion von GABA_AR $\alpha 5$ in Bezug auf Verhaltensprozesse wird weiter unter diskutiert.

Bemerkenswerterweise zeigte eine Analyse der *reference memory* im *Morris water maze* Test eine Beeinträchtigung der Radixin *Knockout* Mäuse während der *Acquisition*- und *Reversal*-Phase. Insgesamt benötigten die Mäuse länger bis zum Erreichen einer versteckten Plattform. Auch der nach sechs Tagen durchgeführte *Probe*-Test, zeigte eine geringere Präferenz der Radixin *Knockout* Mäuse für die ehemalige Position der versteckten Plattform, was als eine Beeinträchtigung in der Erinnerung bezüglich der zuvor erlernten Lokalisation der Plattform interpretiert werden kann. Die *reference memory* scheint daher in Radixin *Knockout* Mäusen negativ beeinflusst zu sein. Bislang liegen keine Daten bezüglich der *Morris water maze*-spezifischen *reference memory* für die $\alpha 5$ *Knockout* Mäuse vor, was für einen direkten Vergleich zwischen diesen beiden Tiermodellen interessant wäre. Allerdings konnte eine neueste Veröffentlichung die Beeinträchtigung der Erinnerung für Objektpositionen nach Expression einer $\alpha 5$ -Mutante (H105R) in Mäusen zeigen (Prut *et al.*, 2010). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann dies ebenfalls als Beeinträchtigung einer Hippokampus-abhängigen *reference memory* betrachtet werden.

Das der Funktionsverlust eines Proteins zu scheinbar gegensätzlichen Auswirkungen auf das Verhalten führt, ist nicht ungewöhnlich. So wurde für eine *Knockout* Maus der GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors eine

Beeinträchtigung der *working memory* beobachtet, wobei für die *reference memory* keine Beeinflussung festzustellen war (Sanderson *et al.*, 2008; Sanderson *et al.*, 2007). Es wird vermutet, dass im Hippokampus unterschiedlichste Prozesse die unterschiedlichen Formen der Gedächtnisbildung gewährleisten (Bannerman & Sprengel 2010). Eine weitere Erklärung für die auf den ersten Blick gegensätzlichen Ergebnisse bezüglich der *working* und *reference memory* stellt die Betrachtung der Beteiligung von Kurzzeit- und Langzeit- Gedächtnisprozessen hinsichtlich dieser beiden Erinnerungsformen dar. Für *working memory* wird vorwiegend das Kurzzeitgedächtnis benötigt, wohingegen in die *reference memory* sowohl Kurz- als auch Langzeitgedächtnis involviert sind (Redish & Touretzky 1998; Sanderson *et al.*, 2007).

Wie bereits oben diskutiert, könnte der Austausch zwischen synaptischen und extrasynaptischen GABA_AR $\alpha 5$ das Verhältnis zwischen erregender und hemmender neuronaler Transmission beeinflussen. Wie es scheint, führen erhöhte exzitatorische Ströme bzw. verringerte inhibitorische Ströme an der Synapse zu einer veränderten Plastizität in Form von LTP und damit zu einem verbesserten Lernen (Morris 2006; Rolls & Kesner 2006). Es wurde gezeigt, dass zeitliche und räumliche Erinnerungen durch eine erregende Neurotransmission, vermittelt von NMDA-Rezeptoren im Hippokampus, kontrolliert werden. Mäuse, denen die NR1-Untereinheit des NMDA-R in der CA1 Region des Hippokampus fehlt, zeigten einen Verlust von LTP. Sowohl die Beeinträchtigung im *trace conditioning* Experiment als auch in der räumlichen *reference memory* wurden beobachtet, wobei die assoziative Erinnerung nicht beeinflusst war (Huerta *et al.*, 2000; Tsien *et al.*, 1996). Der durch die Depletion von Radixin verursachte Anstieg in der synaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ könnte daher zu einer Erhöhung der inhibitorischen synaptischen Transmission führen und so dem NMDA-R vermittelten LTP entgegenwirken, was die beeinträchtigte Leistung der Radixin *Knockout* Mäuse im *reference memory* erklären könnte. Parallel hierzu könnte die verringerte extrasynaptische Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ in Radixin *Knockout* Mäusen zu einer verminderten tonischen Inhibition führen. Folglich würde dies die Ausbildung von LTP unterstützen, was die

Verbesserung hinsichtlich des assoziativen Lernens von Radixin *Knockout* Mäusen erklären könnte. Dies steht im Einklang mit der oben angesprochenen Beobachtung einer verbesserten Assoziation zweier zeitlich voneinander getrennter Stimuli in $\alpha 5$ *Knockout* Mäusen, was ebenfalls nach der spezifischen Expression einer $\alpha 5$ -Mutante (H105R) im Hippokampus von Mäusen beobachtet werden konnte (Crestani *et al.*, 2002; Yee *et al.*, 2004).

Wie bereits erwähnt, ermöglicht der Hippokampus, die Fähigkeit auszubilden, zeitlich und räumlich getrennte Ereignisse in Verbindung zu bringen (Rawlins 1985; Paulsen & Moser 1998). Diese Fähigkeit erfordert jedoch komplexe Mechanismen der Regulation, damit unbedeutende oder „falsche“ Assoziationen minimiert werden können. Die synaptische (phasische) Inhibition oder extrasynaptische (tonische) Inhibition vermittelt durch GABA_AR $\alpha 5$ scheint bei diesen physiologischen Kontrollmechanismen eine wichtige Rolle zu spielen. Je nach Umwelt (Art des Experiments) wurde in der vorliegenden Arbeit eine Verbesserung oder Beeinträchtigung hinsichtlich des Lernens und der Gedächtnisbildung beobachtet. Die hier erhobenen Daten führen somit erstmals zu der Hypothese, dass die tonische und phasische von GABA_AR $\alpha 5$ vermittelte Inhibition, voneinander unabhängige physiologische Funktionen auf Ebene des Lernens und Gedächtnisses kontrollieren.

Die aktivitätsabhängige Regulation des GABA_AR $\alpha 5$ über Radixin erweitert damit das gegenwärtige Verständnis von synaptischer Plastizität und den damit verbundenen Prozessen hinsichtlich Lernen und der Gedächtnisbildung.

4.5 Modell der Radixin-abhängigen synaptischen bzw. extrasynaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5

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

GABA_A-Rezeptoren, welche die α 5-Untereinheit enthalten, werden über eine direkte Interaktion mit dem Gerüstprotein Radixin in extrasynaptischen Bereichen der Plasmamembran verankert. Die Bindung von Radixin an die α 5-Untereinheit ist von dem Aktivierungszustand Radixins abhängig. Im inaktiven Zustand liegt eine intramolekulare Interaktion von Radixin aus der N-terminale FERM-Domäne mit seinem C-terminalen Bereich vor, der über eine F-Aktin-Bindestelle verfügt. In dieser geschlossenen Konformation beschränkt sich die Lokalisation von Radixin hauptsächlich auf das Zytosol. Die Aktivierung von Radixin könnte einem zweistufigem Prozess unterliegen: Die Bindung der FERM-Domäne an PIP₂ (ein Phospholipid der Plasmamembran) führt zur Rekrutierung von Radixin an die Plasmamembran. Die anschließende Phosphorylierung Radixins an einem C-terminalen Threoninrest stabilisiert die offene aktive Konformation und ermöglicht die Bindung von Radixin an die α 5-Untereinheit von GABA_AR. Da Radixin über eine Verbindung zum F-Aktin-Zytoskelett fast ausschließlich extrasynaptisch lokalisiert ist, werden α 5-enthaltende GABA_AR über phosphoryliertes Radixin an extrasynaptischen Bereichen in der Plasmamembran verankert. Geht Radixin in der geschlossenen inaktiven Konformation über, wird die Bindung zur α 5-Untereinheit aufgehoben. GABA_AR, welche die α 5-Untereinheit enthalten und zuvor über Radixin an extrasynaptischen Bereichen verankert waren, können nun frei in der Plasmamembran diffundieren und synaptische Bereiche erreichen. An GABAergen Synapsen könnten GABA_AR, die über die α 5-Untereinheit verfügen, über eine im selben Rezeptor vorhandene α 2- oder γ 2-Untereinheit durch eine direkte oder indirekte Interaktion mit Gerüstprotein Gephyrin in der postsynaptischen Membran verankert werden.

Die Phosphorylierung von Radixin, welche den Übergang in seine aktive Form begünstigt, wird über die Rho-abhängige Kinase ROCK vermittelt. Die

Aktivität der kleinen RhoGTPase Rho und damit auch die Aktivität von ROCK, hängt wiederum von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-Aktivierungsproteinen (GAPs) ab. Erstere katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und führen zur Aktivierung von Rho. Letztere unterstützen die Hydrolyse von GTP zu GDP und führen zur Inaktivierung von Rho. Es ist bekannt, dass neuronale Aktivität die Aktivierung von Rho über GEFs und GAPs beeinflusst. In Abhängigkeit von neuronaler Aktivität könnte es so zur einer Aktivierung bzw. Inaktivierung von Radixin kommen, wodurch die extrasynaptische bzw. synaptische Lokalisation $\alpha 5$ -enthaltender GABA_A-Rezeptoren reguliert werden könnte. Wie es scheint, führt erregende neuronale Aktivität zu einem Anstieg der synaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ und sollte daher eine von GABA_AR $\alpha 5$ -vermittelte synaptische (phasischen) Inhibition verstärken. Im Gegensatz hierzu scheint hemmende neuronale Aktivität zum Anstieg der extrasynaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ zu führen und sollte daher die von GABA_AR $\alpha 5$ -vermittelte extrasynaptische (tonischen) Inhibition erhöhen. Das Gleichgewicht zwischen neuronaler Inhibition und Erregung könnte in Abhängigkeit der Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ einen Einfluss auf Hippokampus-abhängige Lernprozesse und das Gedächtnis haben.

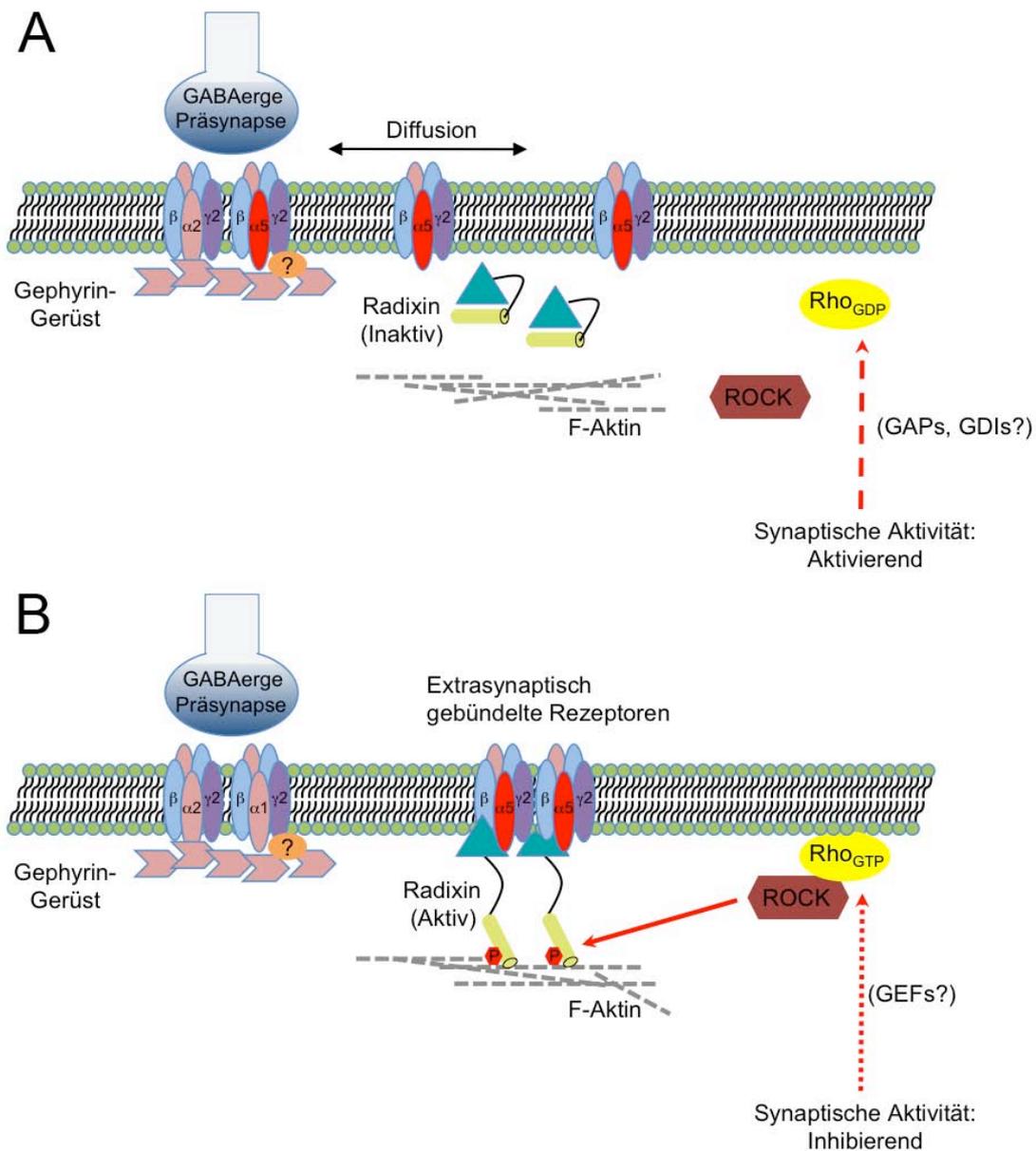


Abb. 4.1: Modell der Radixin-abhängigen synaptischen bzw. extrasynaptischen Lokalisation von GABA_AR α 5. (A) Aktivierende neuronale Aktivität führt über GAPs und GDIs zur Inhibition von Rho (RhoGDP). Die Rho-abhängige Kinase ROCK bleibt inaktiv. Dadurch kann Radixin nicht Phosphoryliert werden und verbleibt in einer geschlossenen inaktiven Konformation. GABA_AR, die über eine α 5-Untereinheit verfügen, können frei in der Plasmamembran diffundieren und so synaptische Bereiche erreichen. Hier könnte über eine direkte oder indirekte Interaktion der γ 2- oder α 2-Untereinheiten mit dem Gephyringerüst eine Verankerung von α 5-enthaltenden GABA_AR in der postsynaptischen Membran erfolgen. Dies könnte zur Verminderung der tonischen Inhibition bzw. Erhöhung der phasischen Inhibition, vermittelt von GABA_AR α 5, führen. (B) Inhibierende neuronale Aktivität führt über GEFs zur Aktivierung von Rho (RhoGTP), wodurch ROCK aktiviert wird. Die Bindung von Radixin an PIP₂, ein Lipid der Plasmamembran, und die Phosphorylierung von Radixin durch ROCK überführen Radixin in eine offene aktive Konformation. In dieser aktiven Form bindet Radixin an die α 5-Untereinheit von GABA_AR und verankert diese Rezeptoren an extrasynaptischen Bereichen in der Plasmamembran. Dies könnte zur Erhöhung der tonischen Inhibition bzw. Verringerung der phasischen Inhibition, vermittelt von GABA_AR α 5, führen.

4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebene Regulation der synaptischen bzw. extrasynaptischen Lokalisation der $\alpha 5$ -Untereinheit von GABA_AR in Abhängigkeit von Radixin, sollte neue Einblicke in das Verständnis der Modulation erregender und hemmender neuronaler Aktivität geben. Essentiell für eine weitere Untersuchung dieser Modulation sind elektrophysiologische Experimente. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Depletion von Radixin zu einer erhöhten synaptischen Lokalisation von GABA_AR $\alpha 5$ führt, jedoch müssen elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, inwieweit die Depletion von Radixin tatsächlich zu einem Anstieg synaptischer inhibitorischer Potentiale führt. Hierbei sollte neben der durch GABA_AR $\alpha 5$ vermittelten synaptischen (phasischen) Inhibition, auch die extrasynaptische (tonische) Inhibition, vermittelt durch GABA_AR $\alpha 5$, genau analysiert werden. Erschwert werden diese Fragestellungen jedoch durch eine begrenzte Anzahl von GABA_AR $\alpha 5$ -spezifischen Inhibitoren. Neue GABA_AR $\alpha 5$ -spezifische Inhibitoren mit einer hohen selektiven pharmakologischen Wirkung zusammen mit elektrophysiologischen Untersuchungen könnten genauere Einblicke in die Physiologie der von GABA_AR $\alpha 5$ vermittelten phasischen und tonischen Inhibition geben.

Experimente, bei denen ein Funktionsverlust der $\alpha 5$ -Untereinheit des GABA_AR zur Untersuchung der physiologischen Rolle des Rezeptors eingesetzt wurde, ergaben erste Hinweise auf eine Beteiligung von GABA_AR $\alpha 5$ am Lernen und der Gedächtnisbildung. Die Möglichkeit der gezielten Steuerung der von GABA_AR $\alpha 5$ vermittelten phasischen oder tonischen Inhibition über die Aktivierung von Radixin besitzt einen Vorteil gegenüber klassischen Experimenten, bei denen die Funktion von GABA_AR $\alpha 5$ gänzlich ausgeschaltet wurde. Dies könnte helfen, die Rollen der phasischen und tonischen Inhibition, sowie die dadurch modulierte Erregung, in Bezug auf Lernprozesse und die Gedächtnisbildung besser voneinander abzugrenzen und zu verstehen. Daraus gewonnene Erkenntnisse könnten des Weiteren zum Verständnis von neurodegenerativen Erkrankungen beitragen.

Literaturverzeichnis

- Ali AB, Thomson AM. 2008. Synaptic alpha 5 subunit-containing GABAA receptors mediate IPSPs elicited by dendrite-preferring cells in rat neocortex. *Cereb Cortex* 18:1260-71
- Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM. 2007. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* 8:128-40
- Alvarez VA, Sabatini BL. 2007. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 30:79-97
- Arancibia-Carcamo IL, Moss SJ. 2006. Molecular organization and assembly of the central inhibitory postsynapse. *Results Probl Cell Differ* 43:25-47
- Arancibia-Carcamo IL, Yuen EY, Muir J, Lumb MJ, Michels G, *et al.*, 2009. Ubiquitin-dependent lysosomal targeting of GABA(A) receptors regulates neuronal inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17552-7
- Artola A, Singer W. 1987. Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature* 330:649-52
- Aspenstrom P, Fransson A, Saras J. 2004. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 377:327-37
- Banke TG, Bowie D, Lee H, Haganir RL, Schousboe A, Traynelis SF. 2000. Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 20:89-102
- Bannerman DM, Sprengel R. 2010. Multiple memory mechanisms? The long and the short of it. *EMBO J* 29:1790-1
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, *et al.*, 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313
- Barria A, Derkach V, Soderling T. 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* 272:32727-30
- Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, *et al.*, 2001. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 28:46-8
- Bayer KU, De Koninck P, Leonard AS, Hell JW, Schulman H. 2001. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* 411:801-5
- Bear MF, Malenka RC. 1994. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 4:389-99
- Becker JT, Morris RG. 1999. Working memory(s). *Brain Cogn* 41:1-8
- Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW. 2009. Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci* 29:12757-63
- Benarroch EE. 2007. GABAA receptor heterogeneity, function, and implications for epilepsy. *Neurology* 68:612-4

- Benke TA, Luthi A, Isaac JT, Collingridge GL. 1998. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 393:793-7
- Bernards A. 2003. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta* 1603:47-82
- Betz H, Kuhse J, Schmieden V, Laube B, Kirsch J, Harvey RJ. 1999. Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors. *Ann N Y Acad Sci* 868:667-76
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-23
- Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-56
- Bogdanov Y, Michels G, Armstrong-Gold C, Haydon PG, Lindstrom J, *et al.*,
2006. Synaptic GABAA receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *EMBO J* 25:4381-9
- Bollan K, Robertson LA, Tang H, Connolly CN. 2003. Multiple assembly signals in gamma-aminobutyric acid (type A) receptor subunits combine to drive receptor construction and composition. *Biochem Soc Trans* 31:875-9
- Bonin RP, Martin LJ, MacDonald JF, Orser BA. 2007. Alpha5GABAA receptors regulate the intrinsic excitability of mouse hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 98:2244-54
- Borgdorff AJ, Choquet D. 2002. Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* 417:649-53
- Bormann J, Feigenspan A. 1995. GABAC receptors. *Trends Neurosci* 18:515-9
- Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:586-99
- Brickley SG, Revilla V, Cull-Candy SG, Wisden W, Farrant M. 2001. Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature* 409:88-92
- Brioni JD, McGaugh JL. 1988. Post-training administration of GABAergic antagonists enhances retention of aversively motivated tasks. *Psychopharmacology (Berl)* 96:505-10
- Brunig I, Scotti E, Sidler C, Fritschy JM. 2002. Intact sorting, targeting, and clustering of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes in hippocampal neurons in vitro. *J Comp Neurol* 443:43-55
- Burgard EC, Tietz EI, Neelands TR, Macdonald RL. 1996. Properties of recombinant gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms containing the alpha 5 subunit subtype. *Mol Pharmacol* 50:119-27
- Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. 2002. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35:625-41
- Caillard O, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL. 1999. Mechanisms of induction and expression of long-term depression at GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus. *J Neurosci* 19:7568-77

- Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, *et al.*, 2004. Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3662-7
- Chambers DN, Bretscher A. 2005. Ezrin mutants affecting dimerization and activation. *Biochemistry* 44:3926-32
- Chen J, Cohn JA, Mandel LJ. 1995. Dephosphorylation of ezrin as an early event in renal microvillar breakdown and anoxic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7495-9
- Chen TJ, Gehler S, Shaw AE, Bamberg JR, Letourneau PC. 2006. Cdc42 participates in the regulation of ADF/cofilin and retinal growth cone filopodia by brain derived neurotrophic factor. *J Neurobiol* 66:103-14
- Choquet D, Triller A. 2003. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci* 4:251-65
- Christie SB, de Blas AL. 2002. alpha5 Subunit-containing GABA(A) receptors form clusters at GABAergic synapses in hippocampal cultures. *Neuroreport* 13:2355-8
- Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 133:1403-15
- Collins MO, Husi H, Yu L, Brandon JM, Anderson CN, *et al.*, 2006. Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem* 97 Suppl 1:16-23
- Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Maubach KA, Cothliff R, *et al.*, 2002. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *J Neurosci* 22:5572-80
- Cope DW, Hughes SW, Crunelli V. 2005. GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *J Neurosci* 25:11553-63
- Coulter DA. 2001. Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties. *Int Rev Neurobiol* 45:237-52
- Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. 2000. GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci* 16:296-312
- Crawley JN. 1985. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 9:37-44
- Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, *et al.*, 2002. Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8980-5
- Crestani F, Lorez M, Baer K, Essrich C, Benke D, *et al.*, 1999. Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat Neurosci* 2:833-9
- Crouse GF, Frischauf A, Lehrach H. 1983. An integrated and simplified approach to cloning into plasmids and single-stranded phages. *Methods Enzymol* 101:78-89
- Dawson GR, Maubach KA, Collinson N, Cobain M, Everitt BJ, *et al.*, 2006. An inverse agonist selective for alpha5 subunit-containing GABAA receptors enhances cognition. *J Pharmacol Exp Ther* 316:1335-45

- Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, Philippar U, Barzik M, *et al.*, 2007. Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat Cell Biol* 9:1347-59
- Di Filippo M, Picconi B, Tantucci M, Ghiglieri V, Bagetta V, *et al.*, 2009. Short-term and long-term plasticity at corticostriatal synapses: implications for learning and memory. *Behav Brain Res* 199:108-18
- Draguhn A, Axmacher N, Kolbaev S. 2008. Presynaptic ionotropic GABA receptors. *Results Probl Cell Differ* 44:69-85
- Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ. 1992. The hippocampus--what does it do? *Behav Neural Biol* 57:2-36
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B. 1998. Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1:563-71
- Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-35
- Fallon JR. 2000. Building inhibitory synapses: exchange factors getting into the act? [comment]. *Nat Neurosci* 3:5-6
- Faure S, Salazar-Fontana LI, Semichon M, Tybulewicz VL, Bismuth G, *et al.*, 2004. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol* 5:272-9
- Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. 2010. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:276-87
- Feldman DE. 2009. Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu Rev Neurosci* 32:33-55
- Feng HJ, Kang JQ, Song L, Dibbens L, Mulley J, Macdonald RL. 2006. Delta subunit susceptibility variants E177A and R220H associated with complex epilepsy alter channel gating and surface expression of alpha4beta2delta GABAA receptors. *J Neurosci* 26:1499-506
- Fievet BT, Gautreau A, Roy C, Del Maestro L, Mangeat P, *et al.*, 2004. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* 164:653-9
- Fleming IN, Elliott CM, Buchanan FG, Downes CP, Exton JH. 1999. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem* 274:12753-8
- Fleming IN, Elliott CM, Collard JG, Exton JH. 1997. Lysophosphatidic acid induces threonine phosphorylation of Tiam1 in Swiss 3T3 fibroblasts via activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 272:33105-10
- Freund TF, Buzsaki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470
- Fritschy JM, Panzanelli P. 2006. Molecular and synaptic organization of GABAA receptors in the cerebellum: Effects of targeted subunit gene deletions. *Cerebellum* 5:275-85
- Fukunaga K, Stoppini L, Miyamoto E, Muller D. 1993. Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 268:7863-7

- Furutani Y, Matsuno H, Kawasaki M, Sasaki T, Mori K, Yoshihara Y. 2007. Interaction between telencephalin and ERM family proteins mediates dendritic filopodia formation. *J Neurosci* 27:8866-76
- Gaiarsa JL, Caillard O, Ben-Ari Y. 2002. Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci* 25:564-70
- Gary R, Bretscher A. 1993. Heterotypic and homotypic associations between ezrin and moesin, two putative membrane-cytoskeletal linking proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10846-50
- Gary R, Bretscher A. 1995. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell* 6:1061-75
- Gasnier B. 2000. The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* 82:327-37
- Gautreau A, Louvard D, Arpin M. 2000. Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane. *J Cell Biol* 150:193-203
- Gieseemann T, Schwarz G, Nawrotzki R, Berhorster K, Rothkegel M, *et al.*, 2003. Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J Neurosci* 23:8330-9
- Gilbert PE, Kesner RP. 2002. Role of the rodent hippocampus in paired-associate learning involving associations between a stimulus and a spatial location. *Behav Neurosci* 116:63-71
- Gilmartin MR, Helmstetter FJ. 2010. Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. *Learn Mem* 17:289-96
- Glykys J, Mann EO, Mody I. 2008. Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J Neurosci* 28:1421-6
- Glykys J, Mody I. 2006. Hippocampal network hyperactivity after selective reduction of tonic inhibition in GABA A receptor alpha5 subunit-deficient mice. *J Neurophysiol* 95:2796-807
- Glykys J, Mody I. 2007. Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron* 56:763-70
- Gray EG. 1959. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* 183:1592-3
- Greger IH, Ziff EB, Penn AC. 2007. Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends Neurosci* 30:407-16
- Groc L, Choquet D, Stephenson FA, Verrier D, Manzoni OJ, Chavis P. 2007. NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *J Neurosci* 27:10165-75
- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, *et al.*, 2004. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7:695-6
- Grover LM, Yan C. 1999. Blockade of GABAA receptors facilitates induction of NMDA receptor-independent long-term potentiation. *J Neurophysiol* 81:2814-22

- Gundelfinger ED, tom Dieck S. 2000. Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain. *Naturwissenschaften* 87:513-23
- Hagenbuch N, Feldon J, Yee BK. 2006. Use of the elevated plus-maze test with opaque or transparent walls in the detection of mouse strain differences and the anxiolytic effects of diazepam. *Behav Pharmacol* 17:31-41
- Hall A, Nobes CD. 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:965-70
- Hamada K, Seto A, Shimizu T, Matsui T, Takai Y, *et al.*, 2001. Crystallization and preliminary crystallographic studies of RhoGDI in complex with the radixin FERM domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57:889-90
- Hamada K, Shimizu T, Yonemura S, Tsukita S, Hakoshima T. 2003. Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. *EMBO J* 22:502-14
- Harris KM, Kater SB. 1994. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17:341-71
- Heja L, Barabas P, Nyitrai G, Kekesi KA, Lasztozsi B, *et al.*, 2009. Glutamate uptake triggers transporter-mediated GABA release from astrocytes. *PLoS One* 4:e7153
- Hess G, Aizenman CD, Donoghue JP. 1996. Conditions for the induction of long-term potentiation in layer II/III horizontal connections of the rat motor cortex. *J Neurophysiol* 75:1765-78
- Huang L, Wong TY, Lin RC, Furthmayr H. 1999. Replacement of threonine 558, a critical site of phosphorylation of moesin in vivo, with aspartate activates F-actin binding of moesin. Regulation by conformational change. *J Biol Chem* 274:12803-10
- Huber KM, Roder JC, Bear MF. 2001. Chemical induction of mGluR5- and protein synthesis--dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol* 86:321-5
- Huerta PT, Sun LD, Wilson MA, Tonegawa S. 2000. Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 25:473-80
- Hughes EG, Elmariah SB, Balice-Gordon RJ. 2010. Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Mol Cell Neurosci* 43:136-45
- Hughes SC, Fehon RG. 2006. Phosphorylation and activity of the tumor suppressor Merlin and the ERM protein Moesin are coordinately regulated by the Slik kinase. *J Cell Biol* 175:305-13
- Hyland K. 1999. Neurochemistry and defects of biogenic amine neurotransmitter metabolism. *J Inherit Metab Dis* 22:353-63
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96:23-8
- Ishikawa H, Tamura A, Matsui T, Sasaki H, Hakoshima T, Tsukita S. 2001. Structural conversion between open and closed forms of radixin: low-angle shadowing electron microscopy. *J Mol Biol* 310:973-8
- Itoh K, Sakakibara M, Yamasaki S, Takeuchi A, Arase H, *et al.*, 2002. Cutting edge: negative regulation of immune synapse formation by anchoring lipid raft to cytoskeleton through Cbp-EBP50-ERM assembly. *J Immunol* 168:541-4

- Ivetic A, Ridley AJ. 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology* 112:165-76
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. 2008. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 9:331-43
- Jaffe AB, Hall A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247-69
- Jeon S, Kim S, Park JB, Suh PG, Kim YS, *et al.*, 2002. RhoA and Rho kinase-dependent phosphorylation of moesin at Thr-558 in hippocampal neuronal cells by glutamate. *J Biol Chem* 277:16576-84
- Ju YH, Guzzo A, Chiu MW, Taylor P, Moran MF, *et al.*, 2009. Distinct properties of murine alpha 5 gamma-aminobutyric acid type a receptors revealed by biochemical fractionation and mass spectroscopy. *J Neurosci Res* 87:1737-47
- Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci* 33:121-9
- Kemp A, Manahan-Vaughan D. 2007. Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? *Trends Neurosci* 30:111-8
- Khawaled R, Bruening-Wright A, Adelman JP, Maylie J. 1999. Bicuculline block of small-conductance calcium-activated potassium channels. *Pflugers Arch* 438:314-21
- Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, *et al.*, 2002. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet* 31:320-5
- Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M. 1995. Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378:85-8
- Kim E, Sheng M. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:771-81
- Kim MJ, Futai K, Jo J, Hayashi Y, Cho K, Sheng M. 2007. Synaptic accumulation of PSD-95 and synaptic function regulated by phosphorylation of serine-295 of PSD-95. *Neuron* 56:488-502
- Kins S, Betz H, Kirsch J. 2000. Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat Neurosci* 3:22-9
- Kiraly DD, Eipper-Mains JE, Mains RE, Eipper BA. 2010. Synaptic plasticity, a symphony in GEF. *ACS Chem Neurosci* 1:348-65
- Kirsch J, Kuhse J, Betz H. 1995. Targeting of glycine receptor subunits to gephyrin-rich domains in transfected human embryonic kidney cells. *Mol Cell Neurosci* 6:450-61
- Kneussel M, Brandstatter JH, Gasnier B, Feng G, Sanes JR, Betz H. 2001. Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABA(A) receptor subtypes. *Mol Cell Neurosci* 17:973-82
- Kneussel M, Brandstatter JH, Laube B, Stahl S, Muller U, Betz H. 1999. Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* 19:9289-97

- Kneussel M, Haverkamp S, Fuhrmann JC, Wang H, Wassle H, *et al.*, 2000. The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8594-9
- Kneussel M, Loebrich S. 2007. Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors. *Biol Cell* 99:297-309
- Ko J, Kim S, Valtchanoff JG, Shin H, Lee JR, *et al.*, 2003. Interaction between liprin-alpha and GIT1 is required for AMPA receptor targeting. *J Neurosci* 23:1667-77
- Kohr G. 2006. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* 326:439-46
- Komatsu Y, Iwakiri M. 1993. Long-term modification of inhibitory synaptic transmission in developing visual cortex. *Neuroreport* 4:907-10
- Kralic JE, Criswell HE, Osterman JL, O'Buckley TK, Wilkie ME, *et al.*, 2005. Genetic essential tremor in gamma-aminobutyric acidA receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Clin Invest* 115:774-9
- Krystal JH, Staley J, Mason G, Petrakis IL, Kaufman J, *et al.*, 2006. Gamma-aminobutyric acid type A receptors and alcoholism: intoxication, dependence, vulnerability, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 63:957-68
- Kullmann DM, Erdemli G, Asztely F. 1996. LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over. *Neuron* 17:461-74
- Lalo U, Andrew J, Palygin O, Pankratov Y. 2009. Ca²⁺-dependent modulation of GABAA and NMDA receptors by extracellular ATP: implication for function of tripartite synapse. *Biochem Soc Trans* 37:1407-11
- Lane KT, Beese LS. 2006. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J Lipid Res* 47:681-99
- Lathe R, Morris RG. 1994. Analysing brain function and dysfunction in transgenic animals. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20:350-8
- Leeuwen FN, Kain HE, Kammen RA, Michiels F, Kranenburg OW, Collard JG. 1997. The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol* 139:797-807
- Levi S, Logan SM, Tovar KR, Craig AM. 2004. Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:207-17
- Levi S, Schweizer C, Bannai H, Pascual O, Charrier C, Triller A. 2008. Homeostatic regulation of synaptic GlyR numbers driven by lateral diffusion. *Neuron* 59:261-73
- Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. 2006. Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nat Med* 12:1016-22
- Li X, Serwanski DR, Miralles CP, Bahr BA, De Blas AL. 2007. Two pools of Triton X-100-insoluble GABA(A) receptors are present in the brain, one associated to lipid rafts and another one to the post-synaptic GABAergic complex. *J Neurochem* 102:1329-45

- Locke CJ, Kautu BB, Berry KP, Lee SK, Caldwell KA, Caldwell GA. 2009. Pharmacogenetic analysis reveals a post-developmental role for Rac GTPases in *Caenorhabditis elegans* GABAergic neurotransmission. *Genetics* 183:1357-72
- Loebrich S, Bähring R, Katsuno T, Tsukita S, Kneussel M. 2006. Activated radixin is essential for GABAA receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton. *EMBO J* 25:987-99
- Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, *et al.*, 2000. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 290:131-4
- Luo L. 2002. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:601-35
- Malinow R, Malenka RC. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-26
- Maljevic S, Krampfl K, Cobilanschi J, Tilgen N, Beyer S, *et al.*, 2006. A mutation in the GABA(A) receptor alpha(1)-subunit is associated with absence epilepsy. *Ann Neurol* 59:983-7
- Mammoto A, Sasaki T, Asakura T, Hotta I, Imamura H, *et al.*, 1998. Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun* 243:86-9
- Man HY, Sekine-Aizawa Y, Haganir RL. 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* 104:3579-84
- Manahan-Vaughan D, Braunewell KH. 1999. Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8739-44
- Marr D. 1969. A theory of cerebellar cortex. *J Physiol* 202:437-70
- Martin LJ, Zurek AA, MacDonald JF, Roder JC, Jackson MF, Orser BA. 2010. Alpha5GABAA receptor activity sets the threshold for long-term potentiation and constrains hippocampus-dependent memory. *J Neurosci* 30:5269-82
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23:649-711
- Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, *et al.*, 1998. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140:647-57
- Matsui T, Yonemura S, Tsukita S. 1999. Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* 9:1259-62
- Maubach K. 2003. GABA(A) receptor subtype selective cognition enhancers. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2:233-9
- McBain CJ, Kauer JA. 2009. Presynaptic plasticity: targeted control of inhibitory networks. *Curr Opin Neurobiol* 19:254-62
- McKay PF, Foster KL, Mason D, Cummings R, Garcia M, *et al.*, 2004. A high affinity ligand for GABAA-receptor containing alpha5 subunit antagonizes ethanol's neurobehavioral effects in Long-Evans rats. *Psychopharmacology (Berl)* 172:455-62

- Mehta D, Rahman A, Malik AB. 2001. Protein kinase C- α signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *J Biol Chem* 276:22614-20
- Meier J, Vannier C, Serge A, Triller A, Choquet D. 2001. Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat Neurosci* 4:253-60
- Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D. 1995. Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* 15:563-72
- Milner B. 1959. The memory defect in bilateral hippocampal lesions. *Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc* 11:43-58
- Mohler H. 2007. Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: impact of GABAA receptors. *J Neurochem* 102:1-12
- Mohler H, Rudolph U, Boison D, Singer P, Feldon J, Yee BK. 2008. Regulation of cognition and symptoms of psychosis: focus on GABA(A) receptors and glycine transporter 1. *Pharmacol Biochem Behav* 90:58-64
- Morishita W, Sastry BR. 1996. Postsynaptic mechanisms underlying long-term depression of GABAergic transmission in neurons of the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 76:59-68
- Morris RG. 2006. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci* 23:2829-46
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-6
- Morris RG, Frey U. 1997. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352:1489-503
- Moss SJ, Smart TG. 2001. Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* 2:240-50
- Mulkey RM, Malenka RC. 1992. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9:967-75
- Muller RU, Stead M, Pach J. 1996. The hippocampus as a cognitive graph. *J Gen Physiol* 107:663-94
- Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, *et al.*, 1999. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23:569-82
- Nakamura N, Oshiro N, Fukata Y, Amano M, Fukata M, *et al.*, 2000. Phosphorylation of ERM proteins at filopodia induced by Cdc42. *Genes Cells* 5:571-81
- Nakayama AY, Luo L. 2000. Intracellular signaling pathways that regulate dendritic spine morphogenesis. *Hippocampus* 10:582-6
- Narumiya S. 1996. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem* 120:215-28
- Naylor DE, Liu H, Wasterlain CG. 2005. Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *J Neurosci* 25:7724-33

- Neves G, Cooke SF, Bliss TV. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9:65-75
- Newpher TM, Ehlers MD. 2009. Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol* 19:218-27
- Ng T, Parsons M, Hughes WE, Monypenny J, Zicha D, *et al.*, 2001. Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J* 20:2723-41
- Nguyen R, Reczek D, Bretscher A. 2001. Hierarchy of merlin and ezrin N- and C-terminal domain interactions in homo- and heterotypic associations and their relationship to binding of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP. *J Biol Chem* 276:7621-9
- Niethammer M, Kim E, Sheng M. 1996. Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157-63
- Nobes CD, Hall A. 1995. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* 23:456-9
- Nusser Z, Somogyi P. 1997. Compartmentalised distribution of GABAA and glutamate receptors in relation to transmitter release sites on the surface of cerebellar neurones. *Prog Brain Res* 114:109-27
- Olofsson B. 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* 11:545-54
- Otmakhov N, Khibnik L, Otmakhova N, Carpenter S, Riahi S, *et al.*, 2004. Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J Neurophysiol* 91:1955-62
- Palmer MJ, Irving AJ, Seabrook GR, Jane DE, Collingridge GL. 1997. The group I mGlu receptor agonist DHPG induces a novel form of LTD in the CA1 region of the hippocampus. *Neuropharmacology* 36:1517-32
- Parisiadou L, Xie C, Cho HJ, Lin X, Gu XL, *et al.*, 2009. Phosphorylation of ezrin/radixin/moesin proteins by LRRK2 promotes the rearrangement of actin cytoskeleton in neuronal morphogenesis. *J Neurosci* 29:13971-80
- Paulsen O, Moser EI. 1998. A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 21:273-8
- Petrini EM, Lu J, Cognet L, Lounis B, Ehlers MD, Choquet D. 2009. Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation. *Neuron* 63:92-105
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H. 1982. Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* 257:9389-93
- Pinheiro P, Mulle C. 2006. Kainate receptors. *Cell Tissue Res* 326:457-82
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. 2000. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101:815-50
- Pouget P, Wattiez N, Rivaud-Pechoux S, Gaymard B. 2009. A fragile balance: perturbation of GABA mediated circuit in prefrontal cortex generates high intraindividual performance variability. *PLoS One* 4:e5208

- Poulopoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, *et al.*, 2009. Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63:628-42
- Prusky GT, Douglas RM, Nelson L, Shabanpoor A, Sutherland RJ. 2004. Visual memory task for rats reveals an essential role for hippocampus and perirhinal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5064-8
- Prut L, Prenosil G, Willadt S, Vogt K, Fritschy JM, Crestani F. 2010. A reduction in hippocampal GABA receptor alpha5 subunits disrupts the memory for location of objects in mice. *Genes Brain Behav*
- Quirk K, Blurton P, Fletcher S, Leeson P, Tang F, *et al.*, 1996. [3H]L-655,708, a novel ligand selective for the benzodiazepine site of GABAA receptors which contain the alpha 5 subunit. *Neuropharmacology* 35:1331-5
- Rebola N, Srikumar BN, Mulle C. 2010. Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol* 588:93-9
- Redish AD, Touretzky DS. 1998. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural Comput* 10:73-111
- Ren L, Hong SH, Cassavaugh J, Osborne T, Chou AJ, *et al.*, 2009. The actin-cytoskeleton linker protein ezrin is regulated during osteosarcoma metastasis by PKC. *Oncogene* 28:792-802
- Riento K, Villalonga P, Garg R, Ridley A. 2005. Function and regulation of RhoE. *Biochem Soc Trans* 33:649-51
- Rivera C, Voipio J, Kaila K. 2005. Two developmental switches in GABAergic signalling: the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J Physiol* 562:27-36
- Roche KW, O'Brien RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Huganir RL. 1996. Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16:1179-88
- Rolls ET, Kesner RP. 2006. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog Neurobiol* 79:1-48
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, *et al.*, 1999. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 401:796-800
- Rudolph U, Mohler H. 2004. Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:475-98
- Saliba RS, Michels G, Jacob TC, Pangalos MN, Moss SJ. 2007. Activity-dependent ubiquitination of GABA(A) receptors regulates their accumulation at synaptic sites. *J Neurosci* 27:13341-51
- Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. 1999. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 147:1009-22
- Sanderson DJ, Good MA, Seeburg PH, Sprengel R, Rawlins JN, Bannerman DM. 2008. The role of the GluR-A (GluR1) AMPA receptor subunit in learning and memory. *Prog Brain Res* 169:159-78

- Sanderson DJ, Gray A, Simon A, Taylor AM, Deacon RM, *et al.*, 2007. Deletion of glutamate receptor-A (GluR-A) AMPA receptor subunits impairs one-trial spatial memory. *Behav Neurosci* 121:559-69
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7
- Sango K, McDonald MP, Crawley JN, Mack ML, Tiff CJ, *et al.*, 1996. Mice lacking both subunits of lysosomal beta-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. *Nat Genet* 14:348-52
- Schmidt A, Hall A. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587-609
- Schubert V, Da Silva JS, Dotti CG. 2006. Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *J Cell Biol* 172:453-67
- Schubert V, Dotti CG. 2007. Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture. *J Cell Sci* 120:205-12
- Scimemi A, Semyanov A, Sperk G, Kullmann DM, Walker MC. 2005. Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *J Neurosci* 25:10016-24
- Serwanski DR, Miralles CP, Christie SB, Mehta AK, Li X, De Blas AL. 2006. Synaptic and nonsynaptic localization of GABAA receptors containing the alpha5 subunit in the rat brain. *J Comp Neurol* 499:458-70
- Sheng M, Hoogenraad CC. 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76:823-47
- Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R. 2001. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105:331-43
- Sieghart W. 2000. Unraveling the function of GABA(A) receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21:411-3
- Simons K, Toomre D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-9
- Smith MJ, Pozo K, Brickley K, Stephenson FA. 2006. Mapping the GRIF-1 binding domain of the kinesin, KIF5C, substantiates a role for GRIF-1 as an adaptor protein in the anterograde trafficking of cargoes. *J Biol Chem* 281:27216-28
- Specht CG, Triller A. 2008. The dynamics of synaptic scaffolds. *Bioessays* 30:1062-74
- Squire LR. 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195-231
- Staley KJ, Huguenard JR. 2006. A thalamic sleep tonic. *Epilepsy Curr* 6:164-6
- Steckler T, Sahgal A, Aggleton JP, Drinkenburg WH. 1998. Recognition memory in rats--III. Neurochemical substrates. *Prog Neurobiol* 54:333-48
- Steele PM, Mauk MD. 1999. Inhibitory control of LTP and LTD: stability of synapse strength. *J Neurophysiol* 81:1559-66

- Steele RJ, Morris RG. 1999. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus* 9:118-36
- Stelzer A. 1992. GABAA receptors control the excitability of neuronal populations. *Int Rev Neurobiol* 33:195-287
- Sur C, Fresu L, Howell O, McKernan RM, Atack JR. 1999. Autoradiographic localization of alpha5 subunit-containing GABAA receptors in rat brain. *Brain Res* 822:265-70
- Suzuki T, Okumura-Noji K, Tanaka R, Tada T. 1994. Rapid translocation of cytosolic Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II into postsynaptic density after decapitation. *J Neurochem* 63:1529-37
- Tada T, Sheng M. 2006. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:95-101
- Tahirovic S, Hellal F, Neukirchen D, Hindges R, Garvalov BK, *et al.*, 2010. Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex. *J Neurosci* 30:6930-43
- Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Hotta I, Takaishi K, *et al.*, 1998. Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl. *Oncogene* 16:3279-84
- Takami A, Iwakubo M, Okada Y, Kawata T, Odai H, *et al.*, 2004. Design and synthesis of Rho kinase inhibitors (I). *Bioorg Med Chem* 12:2115-37
- Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 135:397-402
- Tashiro A, Minden A, Yuste R. 2000. Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex* 10:927-38
- Thomas P, Mortensen M, Hosie AM, Smart TG. 2005. Dynamic mobility of functional GABAA receptors at inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 8:889-97
- Tolias KF, Bikoff JB, Burette A, Paradis S, Harrar D, *et al.*, 2005. The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron* 45:525-38
- Tovar KR, Westbrook GL. 2002. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 34:255-64
- Towers SK, Gloveli T, Traub RD, Driver JE, Engel D, *et al.*, 2004. Alpha 5 subunit-containing GABAA receptors affect the dynamic range of mouse hippocampal kainate-induced gamma frequency oscillations in vitro. *J Physiol* 559:721-8
- Tretter V, Jacob TC, Mukherjee J, Fritschy JM, Pangalos MN, Moss SJ. 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* 28:1356-65
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327-38
- Twelvetrees AE, Yuen EY, Arancibia-Carcamo IL, MacAskill AF, Rostaing P, *et al.*, 2010. Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron* 65:53-65

- Tyagarajan SK, Fritschy JM. 2010. GABA(A) receptors, gephyrin and homeostatic synaptic plasticity. *J Physiol* 588:101-6
- Unwin N. 1998. The nicotinic acetylcholine receptor of the Torpedo electric ray. *J Struct Biol* 121:181-90
- Van Aelst L, Cline HT. 2004. Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr Opin Neurobiol* 14:297-304
- Vargas-Caballero M, Martin LJ, Salter MW, Orser BA, Paulsen O. 2010. alpha5 Subunit-containing GABA(A) receptors mediate a slowly decaying inhibitory synaptic current in CA1 pyramidal neurons following Schaffer collateral activation. *Neuropharmacology* 58:668-75
- Viggiano D. 2008. The hyperactive syndrome: metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behav Brain Res* 194:1-14
- Wallenstein GV, Eichenbaum H, Hasselmo ME. 1998. The hippocampus as an associator of discontinuous events. *Trends Neurosci* 21:317-23
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW. 1999. GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397:69-72
- Wang H, Olsen RW. 2000. Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction. *J Neurochem* 75:644-55
- Wang SH, Morris RG. 2010. Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu Rev Psychol* 61:49-79, C1-4
- Wasserman EA, Miller RR. 1997. What's elementary about associative learning? *Annu Rev Psychol* 48:573-607
- Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. 2002. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* 213:1-47
- Weernink PA, Meletiadis K, Hommeltenberg S, Hinz M, Ishihara H, *et al.*, 2004. Activation of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42. *J Biol Chem* 279:7840-9
- Wenk GL. 2004. Assessment of spatial memory using the radial arm maze and Morris water maze. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit 8 5A
- Whittaker VP, Michaelson IA, Kirkland RJ. 1964. The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochem J* 90:293-303
- Wigstrom H, Gustafsson B. 1983. Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition. *Nature* 301:603-4
- Wiltgen BJ, Sanders MJ, Ferguson C, Homanics GE, Fanselow MS. 2005. Trace fear conditioning is enhanced in mice lacking the delta subunit of the GABAA receptor. *Learn Mem* 12:327-33
- Xiang S, Kim EY, Connelly JJ, Nassar N, Kirsch J, *et al.*, 2006. The crystal structure of Cdc42 in complex with collybistin II, a gephyrin-interacting guanine nucleotide exchange factor. *J Mol Biol* 359:35-46

- Xie Z, Srivastava DP, Photowala H, Kai L, Cahill ME, *et al.*, 2007. Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron* 56:640-56
- Yang B, Tadavarty R, Xu JY, Sastry BR. 2010. Activity-mediated plasticity of GABA equilibrium potential in rat hippocampal CA1 neurons. *Exp Neurol* 221:157-65
- Yee BK, Hauser J, Dolgov VV, Keist R, Mohler H, *et al.*, 2004. GABA receptors containing the alpha5 subunit mediate the trace effect in aversive and appetitive conditioning and extinction of conditioned fear. *Eur J Neurosci* 20:1928-36
- Yee BK, Keist R, von Boehmer L, Studer R, Benke D, *et al.*, 2005. A schizophrenia-related sensorimotor deficit links alpha 3-containing GABAA receptors to a dopamine hyperfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17154-9
- Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S. 1998. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 140:885-95
- Yonemura S, Matsui T, Tsukita S. 2002. Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci* 115:2569-80
- Yuste R, Tank DW. 1996. Dendritic integration in mammalian neurons, a century after Cajal. *Neuron* 16:701-16
- Zarnowska ED, Keist R, Rudolph U, Pearce RA. 2009. GABAA receptor alpha5 subunits contribute to GABAA, slow synaptic inhibition in mouse hippocampus. *J Neurophysiol* 101:1179-91
- Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Horwitz AF. 2003. Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1. *J Cell Biol* 161:131-42
- Zita MM, Marchionni I, Bottos E, Righi M, Del Sal G, *et al.*, 2007. Post-phosphorylation prolyl isomerisation of gephyrin represents a mechanism to modulate glycine receptors function. *EMBO J* 26:1761-71
- Zondag GC, Evers EE, ten Klooster JP, Janssen L, van der Kammen RA, Collard JG. 2000. Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 149:775-82

Anhang

A Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------------|--|----|
| Abb. 1.1: | Schematische Darstellung einer chemischen Synapse | 11 |
| Abb. 1.2: | Schematische Darstellung des Aufbaus der GABA _A -Rezeptoren | 16 |
| Abb. 1.3: | Schematische Darstellung des Aufbaus sowie der Aktivierung von ERM-Proteinen | 24 |
| Abb. 1.4: | Aktivierungskreislauf der Rho-GTPasen | 28 |
| Abb. 2.1: | Schematischer Ablauf der Konditionierung in Umgebung A. | 68 |
| Abb. 2.2: | Schematischer Ablauf des CS-Tests in Umgebung B. | 68 |
| Abb. 3.1: | Synaptische Verteilung von GABA _A R α 5 nach Expression von Radixin- Phosphorylierungsmutanten | 73 |
| Abb. 3.2: | Einfluss von RhoGTPasen auf die Phosphorylierung der ERM-Proteine | 74 |
| Abb. 3.3: | Synaptische Verteilung von GABA _A R α 5 nach Expression von RhoGTPasen | 75 |
| Abb. 3.4: | Quantifizierung der synaptischen Verteilung von GABA _A R α 5 nach Expression von RhoGTPasen | 76 |
| Abb. 3.5: | Lokalisation der Radixin Phosphorylierungsmutanten in Neuronen | 77 |
| Abb. 3.6: | Interaktion von GABA _A R α 5 und Radixin Phosphorylierungsmutanten | 78 |
| Abb. 3.7: | Synaptische Verteilung von Radixin nach der Expression von RhoGTPasen | 78 |
| Abb. 3.8: | Quantifizierung der synaptischen Verteilung von Radixin nach Expression von RhoGTPasen | 79 |
| Abb. 3.9: | Phosphorylierung der ERM-Proteine nach Staurosporinbehandlung | 80 |
| Abb. 3.10: | Phosphorylierung der ERM-Proteine nach Inhibition der Rho-abhängigen Kinase | 81 |
| Abb. 3.11: | Synaptische Verteilung von GABA _A R α 5 nach Inhibition der RhoA-abhängigen Kinase | 82 |
| Abb. 3.12: | Anreicherung von GABA _A R α 5 in Synaptosomen nach Depletion von Radixin | 84 |
| Abb. 3.13: | Synaptische Verteilung von GABA _A R α 5 nach Depletion von Radixin | 85 |
| Abb. 3.14: | Extrasynaptische und synaptische GABA _A R α 5 Clustergrößen nach Depletion von Radixin | 86 |
| Abb. 3.15: | Phosphorylierung der ERM-Proteine nach Behandlung mit GABA, Bicucullin oder AMPA | 87 |
| Abb. 3.16: | Phosphorylierung der ERM-Proteine nach Induktion von LTP und LTD | 88 |
| Abb. 3.17: | Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen im Open Field | 91 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Abb. 3.18: | Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen im <i>Elevated plus maze</i> | 92 |
| Abb. 3.19: | Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen auf einem <i>Rotarod</i> bzw. einem horizontalen Gitter | 94 |
| Abb. 3.20: | Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen im <i>working memory test</i> des <i>Morris water maze</i> | 97 |
| Abb. 3.21: | Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen im <i>reference memory test</i> des <i>Morris water maze</i> | 99 |
| Abb. 3.22: | Verhalten von Rdx KO (-/-) und WT (+/+) Mäusen im <i>trace fear conditioning</i> | 102 |
| Abb. 4.1: | Modell der Radixin-abhängigen synaptischen bzw. extrasynaptischen Lokalisation von GABA _A R α 5 | 123 |

B Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----------|--|----|
| Tab. 2.1: | Verwendete Primärantikörper | 40 |
| Tab. 2.2: | Verwendete Sekundärantikörper | 40 |
| Tab. 2.3: | Verwendete Vektoren | 41 |
| Tab. 2.4: | Verwendete Oligonukleotide | 42 |
| Tab. 2.5: | Reaktionskomponenten der Genotypisierung von Radixin <i>Knockout</i> Mäusen mittels PCR | 48 |
| Tab. 2.6: | Verwendete Pharmaka für die Untersuchung der Phosphorylierung von ERM-Proteinen | 58 |
| Tab. 2.7: | Zusammenfassung des experimentellen Ablaufs und der Anzahl der eingesetzten Mäuse. *Nach der statistischen Analyse wurden jeweils ein weibliches und ein männliches Tier der Rdx KO (-/-) Mäuse ausgeschlossen | 60 |

C Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|------------|--|--------------------------------|--|
| A | Alanin | DMEM | Dulbeccos modifiziertes <i>Eagle</i> Medium |
| $\alpha 5$ | alpha5-Untereinheit des GABA _A R | DMSO | Dimethylsulfoxid |
| Abb. | Abbildung | DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ACSF | <i>Artificial cerebrospinal fluid</i> | DNase | Desoxyribonuklease |
| AMPA | α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol Propionsäure | dNTP | Desoxyribonukleotid-triphosphat |
| ANCOVA | Analyse von Kovariaten | DTT | 1,4-Dithiotreitol |
| ANOVA | Analyse von Variaten | E | Osten |
| AP2 | Adapterprotein 2 | | |
| as | <i>antisense</i> | E3KARP | <i>Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) type 3 kinase A regulatory protein</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat | EBP50 | <i>ERM-binding phosphoprotein 50</i> |
| α | anti/alpha | <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| bp | Basenpaare | EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| BR1/2 | BR1/2-Untereinheit des GABA _B -Rezeptors | EGFP | <i>enhanced green fluorescent protein</i> |
| BSA | Bovines Serumalbumin | EM | Elektronenmikroskopie |
| BZ | Benzodiazepam | ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| bzw. | beziehungsweise | ERM | Ezrin, Radixin, Moesin |
| CA | <i>Cornu ammonis</i> | <i>et al.</i> , | und andere |
| CaMKII | Ca ²⁺ Calmodulin-abhängige Protein Kinase II | EtBr | Ethidiumbromid |
| cAMP | zyklischen Adenosinmonophosphats | FBS | fötales Rinderserum |
| CD43/44/50 | <i>cell surface glycoprotein 43/44/50</i> | FCS | fötales Kälberserum |
| Cdc42 | <i>cell division cycle protein 42</i> | FERM | 4.1/ERM-Domäne |
| cDNA | komplementäre DNA | <i>g</i> | Erdbeschleunigungskonstante |
| CIP | <i>calf intestine phosphatase</i> | GABA | γ -Aminobuttersäure |
| CoIP | Koimmunpräzipitation | GABA _A R | γ -Aminobuttersäure-A-Rezeptor/en |
| CS | bedingter Reiz | GABA _A R $\alpha 5$ | γ -Aminobuttersäure-A-Rezeptor/en, welche die $\alpha 5$ -Untereinheit tragen |
| C-terminal | carboxyterminal | GABARAP | <i>GABA_A-receptor associated protein</i> |
| CY2 | Carbocyanin | GAD | <i>glutamic acid decarboxylase</i> |
| CY3 | Indocarbocyanin | GAPs | GTPase-Aktivierungsproteinen |
| CY5 | Indodicarbocyanin | GAT | GABA-Transporter |
| D | Asparaginsäure | | |
| DHPG | (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine | | |
| DIV | <i>days in vitro</i> | | |

| | | | |
|------------|--|----------|--|
| GDP | Guanosindiphosphat | NW | Nordwest |
| GDI | GDP-Dissoziations-Inhibitor | OD | Optische Dichte |
| GEF | Guaninnukleotid-Austauschfaktor | P | Postnataltag |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> | PAGE | Polyacrylamidgellelektrophorese |
| GKAP | <i>guanylate kinase-associated protein</i> | PB | Phosphatpuffer |
| GluR | Glutamat-Rezeptor | PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung |
| GlyR | Glyzin-Rezeptor | PCR | Polymerasekettenreaktion |
| G-Protein | GTP-bindendes Protein | PERM | Phosphoryliertes ERM |
| GST | Glutathion-S-Transferase | pH | $-\log [H^+]$ |
| GTP | Guanosintriphosphat | PIP2 | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate |
| H | Histidin | PKA/C | Proteinkinase A/C |
| H105R | Histidin an Position 105 mit Arginin ersetzt | PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| HBS | HEPES-gepufferte Salzlösung | PNS | peripheres Nervensystem |
| HEK | <i>Human embryonic kidney</i> | PSD | Postsynaptische Dichte |
| HEPES | N-[2-Hydroxyethyl]-Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure] | PSD-95 | <i>postsynaptic density protein 95</i> |
| HPSF | <i>high purified salt free</i> | PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| HRP | <i>horseradish Peroxidase</i> | R | Arginin |
| ICAM | <i>Intercellular Adhesion molecule</i> | Rdx | Radixin |
| ICC | Immunzytochemie | RdxT564A | Radixin: Threonin an Position 564 mit Alanin ersetzt |
| IHC | Immunhistochemie | RdxT564D | Radixin: Threonin an Position 564 mit Asparaginsäure ersetzt |
| IP | Immunopräzipitation | Rho-K-I | Kinaseinhibitor |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid | RNA | Ribonukleinsäure |
| kb | Kilobasenpaare | RNAi | RNA-Interferenz |
| KO | <i>Knockout</i> | RNase | Ribonuklease |
| LB | <i>lysogeny broth</i> | ROCK | Rho-abhängige Kinase |
| LTD | Langzeitdepression | ROI | <i>region of interest</i> |
| LTP | Langzeitpotenzierung | rpm | Umdrehungen pro Minute |
| M | Molar | RT | Raumtemperatur |
| N | Norden | S | Süden |
| NaAc | Natriumazetat | s | <i>sense</i> |
| NE | Nordost | SDS | Natriumdodecylsulfat |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat | SD | Standardabweichung |
| NMDAR | NMDA-Rezeptor | SE | Südost |
| NR2B | NR2B-Untereinheit des NMDAR | SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| N-terminal | aminoterminal | | |

| | |
|-------|---|
| SV2 | <i>synaptic vesicle 2</i> |
| SW | Südwest |
| T | Threonin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBS | Tris gepufferte Salzlösung |
| TBS-T | TBS mit Tween |
| TE | Tris-EDTA |
| Tiam | T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein |
| TM | Transmembrandomäne |
| Tris | Trishydroxymethylamino-methan |
| U | <i>Unit</i> |
| u.a. | unter anderem |
| US | unbedingte Reiz |
| VASP | <i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i> |
| VIAAT | <i>vesicular inhibitory aminoacid transporter</i> |
| v/v | Volumenprozent |
| WB | Western Blot |
| Wdh | Wiederholung |
| W | Westen |
| wt | Wildtyp |
| w/o | ohne |
| w/v | Gewichtprozent |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentralnervensystem |

D Einheiten

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

E Präfixe

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

F Wissenschaftlicher Werdegang

Grundstudium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster von 2001 bis 2003.

Hauptstudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster mit den Hauptfächern Zoologie, Mikrobiologie und Biochemie von 2003 bis 2006.

Diplomarbeit am Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung im Institut für medizinische Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Volker Gerke mit dem Thema: "Annexin A2 bei Adhäsions- und Migrationsprozessen".

Seit Januar 2007 Doktorand im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg in dem Institut für Molekulare Neurogenetik unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias Kneussel.

Aufenthalt als Gastforscher im Frühjahr 2009 im Institut für Verhaltensneurobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Joram Feldon an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich.

G Publikationen

Originalveröffentlichungen

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

Kongressbeiträge

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

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

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

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

H Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Kneussel für die unermüdliche Betreuung meines Projektes, die umfangreiche Unterstützung meiner Arbeit und den Anregungen, die zu dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben. Seine Tür stand immer für mich offen.

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

PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich und PD Dr. Hartwig Lüthen möchte ich für die Begutachtung meiner Disputation danken.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe danke ich für das ausgesprochen freundschaftliche Verhältnis und die große Unterstützung in allen Bereichen. Ich habe mich immer gefreut, zu ihnen ins Labor zu kommen.

Besonders Frank danke ich für die Hilfe bei der Entstehung dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich Frank als Freund danken.

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

Auch meiner Schwester Vanessa und meinem Schwager André danke ich sehr für ihre Hilfe in den unmöglichsten Situationen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer in allem unterstützt haben und mir so viel in meinem Leben ermöglicht haben.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die ich über alles liebe. Ines und mein Sohn Petter gaben mir immer wieder Kraft und Motivation, jeden Tag aufzustehen und in die Welt hinauszugehen.