

**Untersuchung der Funktion von TRIM3 in
Mikrotubuli-assoziierten Transportprozessen
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

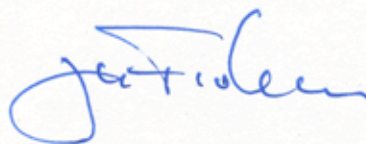
vorgelegt von

Dorthe Labonté, geb. Belgardt
aus Emden

Hamburg
August 2012

Genehmigt vom Fachbereich 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. April 2012

Hamburg, den 05. April 2012



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
1 Einleitung	7
1.1 Das Nervensystem der Säugetiere	7
1.2 Chemische Synapsen	8
1.2.1 Die exzitatorische Synapse	9
1.2.2 Die inhibitorische Synapse	13
1.2.3 Die Zelladhäsionsproteine der Neuroligin-Familie	14
1.2.4 Synaptische Plastizität und Hippokampus-assoziiertes Gedächtnis	16
1.3 Intrazelluläre Transportprozesse	18
1.3.1 Molekulare Motoren	19
1.3.2 Das Motorprotein KIF21B	21
1.3.3 Regulationsebenen des intrazellulären Transports	22
1.4 Posttranslationale Modifikation	25
1.4.1 Ubiquitylierung	25
1.4.2 RING-E3-Ligasen der TRIM-Proteinfamilie	27
1.4.3 Das TRIM-NHL-Protein TRIM3	29
1.5 Zielsetzung der Arbeit	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	32
2.1.2 Geräte	32
2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen	33
2.1.4 Tiere	37
2.1.5 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme	38
2.1.6 Größenstandards	38
2.1.7 Reaktionskomplettausstattungen (Kits)	38
2.1.8 Antikörper	39
2.1.9 Leervektoren und Konstrukte	40
2.1.10 Oligonukleotide	42

2.2	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.1	Klonierung von DNA-Fragmenten	43
2.2.2	Klonierung mit hybridisierten Oligonukleotiden	44
2.2.3	Klonierung von shRNA-Expressionsvektoren	44
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	47
2.2.6	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	47
2.2.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	47
2.2.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	47
2.2.9	DNA-Konzentrationsbestimmung	48
2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten	48
2.2.11	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	48
2.2.12	Transformation von Bakterien	49
2.2.13	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	49
2.2.14	DNA-Sequenzierung	50
2.2.15	Genotypisierung von <i>Trim3-Knockout</i> -Mäusen	50
2.2.16	Das Hefe-2-Hybrid-System	51
2.2.16.1	Transformation von Hefen mit Köder- und Beute-Konstrukt	52
2.2.16.2	β -Galaktosidase-Test	52
2.3	Proteinbiochemische Methoden	53
2.3.1	Differenzielle Zentrifugation	53
2.3.2	Koimmunpräzipitation	53
2.3.3	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	54
2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.3.5	Western Blot	55
2.3.6	Immundetektion	56
2.3.7	Coomassiefärbungen von PVDF-Membranen	56
2.4	Zellbiologische Methoden	57
2.4.1	Kultur von HEK293-Zellen	57
2.4.2	Präparation und Kultur primärer hippokampaler Neurone	57
2.4.3	Lysis kultivierter Zellen	58
2.4.4	Cycloheximid- <i>chase</i> -Experiment	58
2.4.5	Transfektion	59

2.4.6	Immunzytochemie	59
2.4.7	<i>Timelapse</i> -Videomikroskopie	61
2.4.8	Elektronenmikroskopie	61
2.5	Quantitative Analyse und Statistik	62
2.5.1	Auswertung von Western Blot-Signalintensitäten	62
2.5.2	Auswertung von Signalintensitäten aus Immunfärbungen	63
2.5.3	Auswertungen von <i>Timelapse</i> -Aufnahmen	63
3	Ergebnisse	64
3.1	Interaktion von TRIM3 und KIF21B	64
3.1.1	Koimmunpräzipitation von TRIM3 mit KIF21B aus Rattenhirnextrakten	64
3.1.2	Koimmunpräzipitation von heterolog exprimierten KIF21B- und TRIM3-Fusionsproteinen	65
3.1.3	Interaktion von TRIM3 mit KIF21B im Hefe-2-Hybrid-System	67
3.1.4	Kolokalisation von KIF21B und TRIM3 in kultivierten Neuronen	69
3.2	Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Interaktion von KIF21B und TRIM3	75
3.2.1	Untersuchungen zur möglichen Funktion von TRIM3 im KIF21B-vermittelten Neuroligin-Transport	76
3.2.1.1	Koimmunpräzipitation von TRIM3 und KIF21B mit Neuroligin aus Rattenhirnextrakten	76
3.2.1.2	Untersuchung der ultrastrukturellen Lokalisation von TRIM3	77
3.2.1.3	Kolokalisation von KIF21B, TRIM3 und Neuroligin in kultivierten Neuronen	77
3.2.1.4	Analyse der Zelloberflächenlokalisation von Neuroligin in <i>Trim3</i> - <i>Knockout</i> -Mäusen	79
3.2.2	Untersuchung des Einflusses von TRIM3 auf die Degradation von KIF21B	81
3.2.2.1	Bestimmung der Protein-Halbwertszeit von KIF21B in kultivierten Neuronen	81
3.2.2.2	KIF21B-Proteingehalt in TRIM3-depletierten Hirnlysaten	84
3.2.2.3	Analyse des KIF21B-Gehaltes nach Überexpression von TRIM3 in kultivierten Neuronen	85

3.3	Einfluss von TRIM3 auf die intrazelluläre Verteilung von KIF21B und KIF5	87
3.4	Einfluss von TRIM3 auf die Kinetik KIF5-vermittelter Transportprozesse	91
4	Diskussion	97
4.1	Die Interaktion von KIF21B und TRIM3	98
4.2	Funktion von TRIM3 im KIF21B-vermittelten Neuroligin-Transport	102
4.3	KIF21B als potenzielles Substrat der Ubiquitin-E3-Ligase TRIM3	105
4.4	Einfluss von TRIM3 auf die intrazelluläre Kinesin-Verteilung	107
4.5	Einfluss von TRIM3 auf Kinesin-vermittelten Transport	112
4.6	Ausblick	115
5	Literaturverzeichnis	117
Anhang		I
A	Abbildungsverzeichnis	I
B	Tabellenverzeichnis	II
C	Abkürzungsverzeichnis	II

Zusammenfassung

Neurone sind aufgrund ihrer polaren Morphologie während der Entwicklung und zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion auf intrazelluläre Transportprozesse angewiesen. Die meisten Proteine werden im Soma translatiert und mit Hilfe von Motorproteinen aktiv zu ihren axonalen oder dendritischen Bestimmungsorten transportiert. Dabei werden transmembrane Oberflächenproteine als Bestandteil von Transportvesikeln über den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche gebracht. Auch lokale Proteinsynthese in Dendriten und Axonen ist auf aktiven Transport angewiesen, da mRNA als Bestandteil von Protein-mRNA-Komplexen, den RNA *Granules*, transportiert wird. Dabei erfolgt der Langstreckentransport zwischen dem Soma und der Zellperipherie entlang von Mikrotubuli über Motorproteine der Kinesin/KIF- und Dynein-Familien, der Kurzstreckentransport unterhalb der Zellmembran wird entlang des Aktinzytoskeletts von Myosin-Motoren vermittelt. Die Motoren binden ihr *Cargo* oftmals nicht direkt sondern über Adapterproteine, wobei spezifische Adapter/*Cargo*-Interaktionen die Motorzielsteuerung und posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung die Motor-*Cargo*-Bindung beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion des hauptsächlich neuronal exprimierten Proteins TRIM3 (*Tripartite Motif Containing 3*) in Mikrotubuli-assoziierten Transportprozessen untersucht. TRIM3 wurde bereits als potenzieller Myosin-Adapter beschrieben, aber auch zusammen mit dem RNA-Bindeprotein Pur- α als Bestandteil von RNA *Granules* identifiziert, die durch KIF5 transportiert werden. In dieser Arbeit wurde in Koimmunpräzipitationsversuchen mit Rattenhirnlysaten TRIM3 als Interaktionspartner des neuronalen Motorproteins KIF21B identifiziert. Diese Interaktion konnte durch Koimmunfärbungen kultivierter Neurone bestätigt werden. Darüber hinaus konnte mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems gezeigt werden, dass die beiden Proteine durch direkte Bindung der KIF21B-*Stalk*-Domäne mit der TRIM3-RBCC-Domäne interagieren.

Da TRIM3 als aktive Ubiquitin-E3-Ligase beschrieben wurde und die direkte Interaktion auf einen Substrat-Enzym-Komplex hindeuten konnte, wurde untersucht, ob TRIM3 die Ubiquitin-abhängige Degradation von KIF21B vermittelt. Dabei wurde in dieser Arbeit erstmals die Stabilität eines Transport-vermittelnden Motors in Neuronen analysiert und KIF21B mit einer Halbwertszeit von über 24 Stunden als relativ stabiles Protein charakterisiert. Analysen des KIF21B-Gehaltes in Hippokampi von Wildtyp- und *Trim3*-

Knockout-Mäusen sowie Degradations- und Überexpressionsstudien in kultivierten Neuronen zeigten allerdings, dass TRIM3 nicht in die KIF21B-Degradation involviert ist.

Eine weitere Analyse von Hippokampus-Lysaten lieferte jedoch Hinweise darauf, dass TRIM3 in spezifischen Kinesin-vermittelten Transportprozessen als Adapter fungieren könnte. So enthielten bestimmte membranhaltige Fraktionen differenziell zentrifugierter Hippokampus-Lysate aus *Trim3-Knockout*-Mäusen signifikant weniger KIF21B als Wildtyp-Lysate. Auch der KIF5-Gehalt war in einer membranhaltigen Fraktion TRIM3-depletierter Lysate tendenziell stark reduziert. Die zytosolische Fraktion TRIM3-depletierter Lysate zeigte hingegen für beide Motorproteine einen tendenziell erhöhten Gehalt. Dies könnte darauf hindeuten, dass TRIM3 die Assoziation der Motoren mit bestimmten Komponenten membranhaltiger Fraktionen ermöglicht. TRIM3 scheint jedoch nur für die Motorassoziation spezifischer Komponenten erforderlich, da in dieser Arbeit auch gezeigt werden konnte, dass die Oberflächenlokalisation des Zelladhäsionsmoleküls Neuroligin, eines KIF21B-Cargos, in *Trim3-Knockout*-Mäusen unverändert war.

In Echtzeitanalysen kultivierter Neurone konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass GFP-markierte Pur- α -Partikel, die potenziell von KIF5 transportiert werden, im *Trim3-Knockout*-Hintergrund eine signifikant erhöhte Maximalgeschwindigkeit aufwiesen und sich weiter vom Startpunkt entfernten. Weiterführende Experimente müssen klären, ob die erhöhte Pur- α -Transportgeschwindigkeit durch die subzelluläre Umverteilung von KIF5 nach TRIM3-Depletion zustande kommt oder durch eine hiervon unabhängige TRIM3-Funktion verursacht wird.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass TRIM3 auch im Mikrotubuli-assoziierten Transport eine Rolle spielt, indem es die subzelluläre Verteilung der Motorproteine KIF5 und KIF21B und die kinetischen Transportparameter eines KIF5-abhängigen Cargos beeinflusst. Weiterführende Studien müssen den molekularen Mechanismus dieser Ergebnisse klären. Dieser könnte auch Ursache für das in unabhängigen Studien beobachtete veränderte Hippokampus-assoziierte Lernverhalten der *Trim3-Knockout*-Mäuse sein.

1 Einleitung

1.1 Das Nervensystem der Säugetiere

Das Nervensystem ist ein hochkomplexes Organ, das die gesamte Kommunikation eines Organismus mit seiner Umwelt und das Zusammenspiel aller inneren Körperfunktionen koordiniert. Der grundlegende anatomische Aufbau des Nervensystems ist in allen Säugetieren identisch und lässt sich in ein zentrales Nervensystem (ZNS) und ein peripheres Nervensystem (PNS) unterteilen (Trepel, 2004). Das ZNS besteht aus Gehirn und Rückenmark, während das periphere Nervensystem alle Nervenbahnen umfasst, die von reizaufnehmenden Organen zum ZNS hinleiten (afferente Nerven), und alle Nervenbahnen, die vom ZNS zu ausführenden Organen leiten (efferente Nerven). Das ZNS ist somit eine Art Schaltstelle, die über afferente Nerven Reize aus der Umgebung oder von inneren Organen empfängt, diese verarbeitet und dann über efferente Nerven Befehle an ausführende Organe sendet.

Die funktionelle Grundeinheit, die diese Informations- bzw. Reizverarbeitung gewährleistet, ist das Neuron (Trepel, 2004; Kandel *et al.*, 2000). Trotz einer Vielzahl unterschiedlicher Neuronentypen ist allen ein funktionell und morphologisch gleicher Grundaufbau gemein: Der Zellkörper (Soma) enthält den Nukleus und den Großteil der Zellmaschinerie zur Proteinbiosynthese wie endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat. Vom Soma entspringen mehrere Zellfortsätze (Neuriten), die sich in Dendriten und Axon unterscheiden (siehe Abb. 1.1). Die Dendriten bilden ein oftmals weit verzweigtes Netzwerk, das die Reize vorgeschalteter Zellen aufnimmt. Diese Reize werden dann über das Axon an nachgeschaltete Neurone oder Effektororgane wie die Muskeln weitergeleitet. Im Gegensatz zu den dendritischen Fortsätzen, die oft zahlreich aber kurz sind, verfügen Neurone in der Regel nur über einen axonalen Fortsatz, der die Länge eines Dendriten aber um ein Vielfaches übertreffen kann. So beträgt die Reichweite von Dendriten typischerweise mehrere 100 μm , die Länge von Axonen hingegen kann je nach Körperregion und Spezies mehrere 100 μm bis mehrere Meter betragen (Rafols *et al.*, 1989; Kandel *et al.*, 2000).

Ein weiterer wichtiger Zelltyp des Nervensystems sind Gliazellen. Man schätzt ihre Zahl im Gehirn dreimal so hoch wie die der Neurone, deren Anzahl bei ca. 10^{11} liegt (Purves *et al.*, 2008; Kandel *et al.*, 2000). Ursprünglich wurde Gliazellen reine Stützfunktion zugesprochen, doch sie übernehmen zudem viele physiologische Funktionen. Im ZNS

spielen neben der Mikroglia - Makrophagen-ähnlichen Zellen, die der Immunabwehr dienen - und den Oligodendrozyten, die durch Bildung lipidreicher Myelinschichten die axonale Leitgeschwindigkeit (siehe 1.2) erhöhen, die Astrozyten eine wichtige Rolle (Purves *et al.*, 2008). Durch Regulation bzw. Modulation der interzellulären Flüssigkeit beeinflussen diese Zellen die neuronale Reizweiterleitung und sind darüber hinaus an der neuronalen Entwicklung und der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Trepel, 2004; Stipursky *et al.*, 2011).

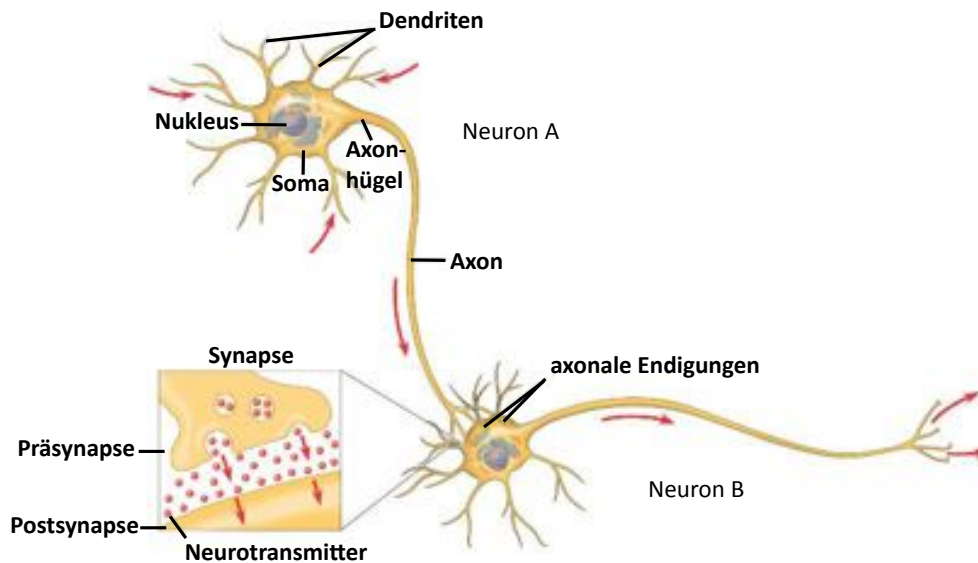


Abb. 1.1: Schematische Darstellung neuronaler Reizweiterleitung an chemischen Synapsen. Neuron A empfängt über seine Dendriten eingehende Reize (rote Pfeile), die über das Axon weitergeleitet werden. An der axonalen Endigung werden von der Präsynapse Botenstoffe (Neurotransmitter) ausgeschüttet, die durch den synaptischen Spalt diffundieren und an Rezeptoren in der dendritischen Postsynapse des nachgeschalteten Neurons B binden. Dadurch wird in Neuron B ein Reiz ausgelöst, der wiederum über das Axon an nachgeschaltete Neurone weitergeleitet wird. (Verändert nach Campbell und Reece, 2007)

1.2 Chemische Synapsen

Die Reizweiterleitung zwischen Neuronen beruht prinzipiell auf der elektrischen Erregbarkeit dieser Zellen und erfolgt im ZNS hauptsächlich an sog. chemischen Synapsen. (Purves *et al.*, 2008; Kandel *et al.*, 2000). Diese hochspezialisierten Verknüpfungspunkte bestehen aus der Präsynapse des vorgeschalteten Neurons, der Postsynapse des nachgeschalteten Neurons und dem 20-30 nm breiten synaptischen Spalt, der zwischen diesen beiden Strukturen liegt (siehe Abb. 1.1). Die Präsynapse wird stets von axonalen Endigungen gebildet, während die Postsynapse in der Regel dendritisch oder somatisch lokalisiert ist.

Die neuronale Reizweiterleitung erfolgt in Form von sog. Aktionspotentialen. Die Zellmembran der Neurone weist im Ruhezustand eine elektrische Spannung auf, die durch unterschiedliche Ionenverteilung im intra- und extrazellulären Milieu zustande kommt. Im Zellinnern dominieren dabei negative Ladungsträger, das Ruhepotential beträgt in vielen Zellen ca. -70 mV. Öffnen sich in der dendritischen oder somatischen Zellmembran lokalisierte Ionenkanäle, kommt es zu einem Einstrom positiver Ladung in die Zelle und damit zu einer lokalen Depolarisation. Diese setzt sich über spannungsabhängige Ionenkanäle in der Zelle fort und akkumuliert am Soma. Wird am sog. Axonhügel ein bestimmter Schwellenwert überschritten, setzt sich die Depolarisation nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip als Aktionspotential entlang des Axons fort. An der axonalen Endigung führt die Depolarisation zur Exozytose Neurotransmitter-gefüllter Vesikel, die in der sog. aktiven Zone der Präsynapse konzentriert sind (siehe Abb. 1.1). Die Neurotransmitter fungieren als Botenstoffe, die nach Freisetzung ins extrazelluläre Milieu durch den synaptischen Spalt zur Postsynapse diffundieren und dort an spezifische Neurotransmitterrezeptoren binden. Diese Rezeptoren sind häufig ligandengesteuerte Ionenkanäle, die sich durch Binden des Neurotransmitters öffnen. Dies führt wiederum zum Einstrom positiver Ladung und damit zur Depolarisation der postsynaptischen Membran. So kann im reizempfangenden Neuron wiederum ein Aktionspotential ausgelöst und weitergeleitet werden. Neben dem Einstrom positiver Ladungsträger kann es auch - abhängig vom Neurotransmitterrezeptor - zum Einstrom negativer Ladungsträger und damit zu einer Hyperpolarisation kommen. Die Hyperpolarisation erniedrigt die Wahrscheinlichkeit zum Auslösen eines Aktionspotentials, da in der Folge ein höherer Schwellenwert erreicht werden muss. Hyperpolarisation findet dementsprechend an sog. hemmenden oder inhibitorischen Synapsen statt, Depolarisation an erregenden oder exzitatorischen Synapsen. Beide Synapsentypen unterscheiden sich sowohl funktionell als auch morphologisch und werden in den nachfolgenden Kapiteln näher beschrieben.

1.2.1 Die exzitatorische Synapse

Die exzitatorische Synapse wird auch als asymmetrische Synapse bezeichnet, da sich die prä- und postsynaptische Seite strukturell in elektronenmikroskopischen Aufnahmen stark unterscheiden (Colonnier, 1968). Die Präsynapse enthält eine Vielzahl runder, ca. 40 nm großer Neurotransmittervesikel, während sich die Postsynapse durch ein großes, elektronendichtes Proteinnetzwerk unterhalb der postsynaptischen Membran auszeichnet,

der sog. postsynaptischen Dichte (PSD). Exzitatorische Synapsen sind im adulten Gehirn meist nicht direkt auf dem dendritischen Schaft lokalisiert, sondern auf kleinen, 0.5 - 2 μm langen Fortsätzen, den dendritischen Dornen oder *Spines* (Boyer *et al.*, 1998; Colonnier, 1968). Der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS ist die Aminosäure Glutamat und Glutamatrezeptoren vermitteln den größten Teil der schnellen, erregenden synaptischen Reizweiterleitung (Transmission) (Ozawa *et al.*, 1998). Je nach ihrer Wirkungsweise unterscheidet man zwischen metabotropen und ionotropen Glutamatrezeptoren, wobei letztere anhand ihrer Agonisten nochmals unterschieden werden in AMPA (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure)-, NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)- und Kainat-Rezeptoren (Ozawa *et al.*, 1998). Die ionotropen Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte, Kationen-spezifische Ionenkanäle und für schnelle synaptische Transmission verantwortlich (Purves *et al.*, 2008). Insbesondere AMPA- und NMDA-Rezeptoren sind intensiv untersucht. Exzitatorische Synapsen besitzen meist beide Rezeptortypen, wobei AMPA-Rezeptoren den Hauptteil der schnellen Erregungsweiterleitung vermitteln und NMDA-Rezeptoren die Erregungsstärke langfristig modulieren (Kessels und Malinow, 2009). Kainat-Rezeptoren sind im Gegensatz hierzu weniger an der postsynaptischen Signalübertragung beteiligt, sondern wirken durch vornehmlich präsynaptische Lokalisation auf diese ein (Contractor *et al.*, 2011). Generell sind diese Rezeptoren weniger umfassend charakterisiert, doch ihre Assoziation mit neurologischen Erkrankungen wie Autismus oder Schizophrenie und die durch Kainat induzierten Krampfanfälle in Tiermodellen unterstreichen ihre Bedeutung (Contractor *et al.*, 2011).

AMPA-Rezeptoren sind Heterotetramere bestehend aus den Untereinheiten GluR1 bis GluR4. In der Regel bilden zwei Homodimere einen tetrameren Rezeptor, wobei durch alternatives Spleißen und RNA-*Editing* die Rezeptorvariabilität noch erhöht wird (Kessels und Malinow, 2009, Greger *et al.*, 2007). Die Zusammensetzung der Untereinheiten ist nicht nur entscheidend für die Leitfähigkeit und Kinetik des Ionenkanals, sondern auch für seine Rekrutierung zur Postsynapse, wo die Anzahl der AMPA-Rezeptoren direkt mit der Stärke der synaptischen Transmission korreliert (Greger *et al.*, 2007; Opazo und Choquet, 2011).

NMDA-Rezeptoren sind ebenfalls Heterotetramere, die sich aus insgesamt 14 Isoformen der Untereinheiten NR1 bis NR3 zusammensetzen. NMDA-Rezeptoren besitzen entweder 2 oder 3 verschiedene Untereinheiten, jedoch immer die NR1-Untereinheit (Paelotti, 2011). Die Kanalpore des NMDA-Rezeptors ist im Ruhezustand durch ein Mg^{2+} -Ion blockiert und

erst nach Depolarisation der postsynaptischen Membran wird diese Blockade aufgehoben, so dass Kationen einströmen können (Hollmann und Heinemann, 1994). Durch diesen Mechanismus öffnen NMDA-Rezeptoren immer erst nach bereits erfolgter Aktivierung der AMPA-Rezeptoren. Synapsen, die nur NMDA-Rezeptoren enthalten, werden auch als stille Synapsen bezeichnet, da sie keine Depolarisation der Postsynapse auslösen können (Kerchner und Nicoll, 2008). Eine weitere Besonderheit der NMDA-Rezeptoren ist ihre Permeabilität für Ca^{2+} . Der Ca^{2+} -Einstrom führt zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden und ist entscheidend für eine durch den NMDA-Rezeptor vermittelte Veränderung der synaptischen Stärke. Diese als Langzeitpotenzierung (LTP) oder Langzeitdepression (LTD) bezeichnete Modulation ist nach heutiger Kenntnis die molekulare Grundlage für Lernen und Gedächtnisbildung und wird in Kapitel 1.2.4 detaillierter beschrieben.

Neben diesen ionotropen Glutamaterezeptoren existieren 3 Klassen mit insgesamt 8 metabotropen Glutamaterezeptoren (Purves *et al.*, 2008). Diese an G-Proteine gekoppelten Rezeptoren vermitteln eine langsame synaptische Transmission, indem sie das Membranpotential indirekt über sekundäre Botenstoffe modulieren. Sie spielen wie die NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Induktion bestimmter Formen von LTP und LTD (Citri und Malenka, 2008; Anwyl, 2009).

Ein besonderes Merkmal der erregenden Synapse ist ihre ausgeprägte postsynaptische Dichte (PSD), ein enges filamentöses Proteinnetzwerk, das bis zu 400 verschiedene Proteine enthält und eine Masse von ca. 1 Gigadalton hat (Ziff, 1997; Chen *et al.*, 2005). Es dient vornehmlich der Verankerung der Neurotransmitterrezeptoren gegenüber der Präsynapse und ermöglicht durch die räumliche Konzentration vieler Signalkaskaden-Proteine wie Phosphatasen oder Kinasen eine schnelle Weiterleitung synaptischer Reize (Chen *et al.*, 2005). Trotz der Vielzahl und Dichte an Proteinen ist die PSD keine starre Struktur, sondern sie kann ihre Größe in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität innerhalb weniger Minuten verändern und ist auch für die Ausbildung von LTP und LTD entscheidend (Dosemeci *et al.*, 2001). Die PSD ist meist am „Kopfe“ eines Spines lokalisiert, die Bereiche außerhalb der PSD werden je nach Entfernung zu dieser als peri- oder extrasynaptische Bereiche bezeichnet und weisen hohe endozytotische Aktivität auf (Sheng und Hoogenraad, 2007; Kim und Sheng, 2009).

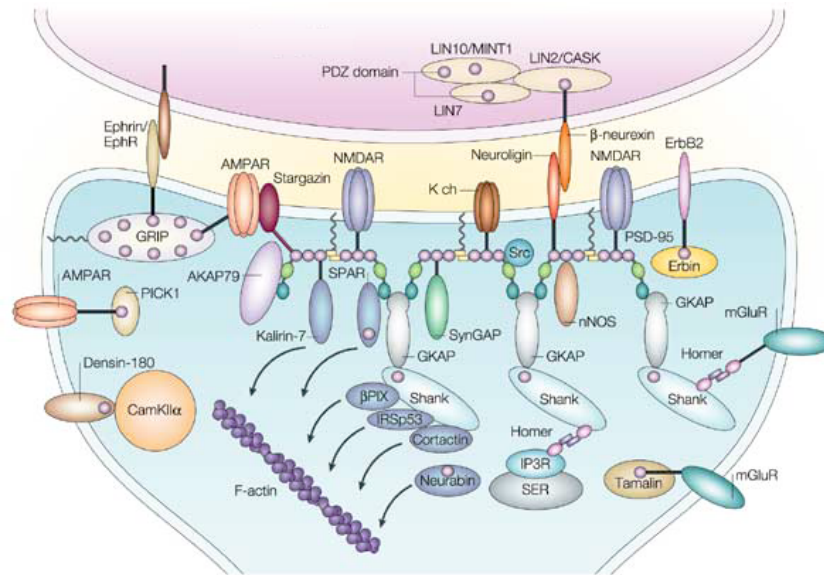


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der postsynaptischen Spezialisierung einer glutamatergen exzitatorischen Synapse. Post- und Präsynapse sind über Zelladhäsionsmoleküle miteinander verbunden. In der Postsynapse dient die postsynaptische Dichte (PSD), ein enges Proteinnetzwerk aus bis zu 400 verschiedenen Proteinen, der Verankerung der Glutamaterezeptoren und der Konzentration von Signalmolekülen zur schnellen Weiterleitung synaptischer Reize. (Verändert nach Kim und Sheng, 2004)

Abb. 1.2 gibt einen schematischen Überblick über eine solche postsynaptische Spezialisierung. Die Verankerung der Neurotransmitterrezeptoren erfolgt über ihre direkte oder indirekte Assoziation mit sog. Gerüstproteinen. Ein wichtiges PSD-Gerüstprotein ist zum Beispiel PSD95. Es interagiert direkt mit NR2-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors und indirekt über das Transmembranprotein Stargazin mit dem AMPA-Rezeptor (Niethammer *et al.*, 1996; Kornau *et al.* 1997; Chen *et al.*, 2000). Der AMPA-Rezeptor ist zudem über direkte Bindung an das Gerüstprotein GRIP1 in der PSD verankert (Kornau *et al.* 1997). PSD95 bindet darüber hinaus das Gerüstprotein GKAP, das selbst wiederum mit Gerüstproteinen der Homer- und Shank-Familie in Verbindung steht (Kim *et al.*, 1997; Sheng und Kim, 2000; Sheng und Hoogenraad, 2007). Proteine der Shank-Familie interagieren mit verschiedenen F-Aktin-Bindepartnern und könnten so die aktivitätsabhängige Modulation des Aktinzytoskeletts beeinflussen (Vessey und Karra, 2007; Naisbitt *et al.*, 1999; Hering und Sheng, 2003).

Während ca. 6% aller in der PSD identifizierten Proteine zu den Gerüstproteinen zählen, verfügen ca. 20% über enzymatische oder regulatorische Funktion (Sheng und Hoogenraad, 2007). Dabei stellen die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und das Ras-GTPase-aktivierende Protein SynGAP den größten Teil dieser Fraktion und ihr großer

Einfluss auf die Modulation der synaptischen Stärke unterstreicht die Bedeutung von Signalkaskaden-Molekülen in der synaptischen Transmission (Kim und Sheng, 2009; Yamauchi, 2005; Rumbaugh *et al.*, 2006).

1.2.2 Die inhibitorische Synapse

Die inhibitorische Synapse ist im Gegensatz zur exzitatorischen in der Regel direkt auf dem dendritischen Schaft oder am Soma lokalisiert (Qian und Sejnowski, 1990). Da sich ihre prä- und postsynaptische Seite strukturell in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht stark unterscheiden, wird sie auch als symmetrische Synapse bezeichnet (Colonnier, 1968). Die Neurotransmittervesikel der Präsynapse sind meist leicht abgeflacht und die postsynaptische Dichte weniger stark ausgeprägt. Die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS sind die Aminosäure Glyzin und das biogene Amin GABA (γ -Aminobuttersäure), wobei Glyzin wesentlich stärker in Hirnstamm und Rückenmark als im Gehirn lokalisiert ist (Baer *et al.*, 2009) und daher hier nicht detailliert beschrieben wird. Beide Neurotransmitter vermitteln durch Bindung an Anionen-spezifische, pentamere Ionenkanäle eine schnelle inhibitorische Transmission, bei der der Einstrom von Cl^- -Ionen zu einer Hyperpolarisation führt und so die Wahrscheinlichkeit für eine Depolarisation der Zelle herabsetzt (siehe auch Kapitel 1.2).

GABA bindet an metabotrope GABA_B - und ionotrope GABA_A - oder GABA_C -Rezeptoren. Die GABAerge Transmission wird zudem in eine frühe „phasische“ und eine späte „tonische“ Inhibition unterschieden (Farrant und Nusser, 2005). Die phasische Inhibition wird durch synaptische GABA-Rezeptoren vermittelt, während die tonische Inhibition auf Aktivierung extrasynaptischer Rezeptoren durch GABA-*spill-over* aus dem synaptischen Spalt beruht (Farrant und Nusser, 2005; Isaacson *et al.*, 1993).

Ionotrope GABA_A -Rezeptoren sind maßgeblich für die schnelle phasische Inhibition verantwortlich und ihre Komplexität ist mit sieben Untereinheiten und weiteren Isoformen und Spleißvarianten ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π) wesentlich größer als die der GABA_C -Rezeptoren (siehe unten) (Luscher *et al.*, 2011). Die Rezeptorkomposition entscheidet über physiologische und pharmakologische Eigenschaften und über die synaptische oder extrasynaptische Lokalisation (Belelli *et al.*, 2009). Die meisten GABA_A -Rezeptoren bestehen aus einer γ -Untereinheit und jeweils 2 α - und β -Untereinheiten, wobei die

Zusammensetzung aus den Untereinheiten $\alpha 1$, $\beta 2$ und $\gamma 2$ im Gehirn die häufigste ist (Farrant und Nusser, 2005).

Ionotrope GABA_C-Rezeptoren sind Pentamere aus ρ -Untereinheiten ($\rho 1-3$) und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Rezeptoreigenschaften sehr von der GABA_A-Klasse (Chebib, 2004; Johnston *et al.*, 2010). Sie werden vor allem in der Retina, aber auch in anderen Regionen des ZNS wie Hippokampus oder Rückenmark exprimiert und u.a. mit Kurzsichtigkeit und Schmerz Wahrnehmung in Verbindung gebracht (Johnston *et al.*, 2010). Heterodimere GABA_B-Rezeptoren vermitteln analog zu metabotropen Glutamaterezeptoren durch Kopplung an G-Proteine eine langsame synaptische Transmission (Purves *et al.*, 2008).

Auch GABA- und Glyzinrezeptoren werden gegenüber der Präsynapse durch eine postsynaptische Dichte verankert, die PSD der inhibitorischen Synapse ist jedoch weniger komplex als die der exzitatorischen. Eines der wichtigsten PSD-Proteine ist hier das Gerüstprotein Gephyrin (Tyagarajan und Fritschy, 2010). Es bildet durch Oligomerisierung unter der postsynaptischen Membran ein hexagonales Gitter, das wiederum selbst über Interaktion mit dem Zytoskelett stabilisiert wird (Kneussel und Betz, 2000; Sola *et al.*, 2004; Papadopoulos und Soykan, 2011). Gephyrin ist sowohl für die synaptische Stabilisierung von Glyzinrezeptoren als auch von GABA_A-Rezeptoren verantwortlich, wobei die postsynaptische Verankerung bestimmter GABA_A-Rezeptorsubtypen von Gephyrin unabhängig ist (Meyer *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1998; Essrich *et al.*, 1998; Kneussel *et al.*, 1999; Kneussel *et al.*, 2001).

1.2.3 Die Zelladhäsionsproteine der Neuroligin-Familie

Für die Ausbildung und Aufrechterhaltung synaptischer Strukturen sind Zelladhäsionsproteine von großer Bedeutung, da sie an allen Schritten der Synaptogenese - von der Bildung erster Axon-Dendrit-Kontakte bis zur Rekrutierung post- und präsynaptischer Proteine zur Ausbildung funktioneller Synapsen - maßgeblich beteiligt sind (Brose, 1999; Washbourne *et al.*, 2004; Bottos *et al.*, 2011). 7% aller PSD-Proteine sind Zelladhäsionsmoleküle wie Cadherine, NCAM oder Neuroligine (Sheng und Hoogenraad, 2007). Neuroligine sind postsynaptische Transmembranproteine, die heterophil mit präsynaptischen Transmembranproteinen der Neurexin-Familie interagieren (siehe Abb. 1.2) (Ichtchenko *et al.*, 1995; Ichtchenko *et al.*, 1996). Für beide Proteine sind mehrere

Isoformen und Spleißvarianten beschrieben, die über die Spezifität und Funktion der Neuroligin-Neurexin-Interaktion bestimmen, und beide sind über ihre C-Termini mit Proteinen der PSD bzw. aktiven Zone verbunden (Chih *et al.*, 2006; Wei und Zhang, 2010; Wright und Washbourne, 2011; Pouloupoulos *et al.*, 2009). Für die 3 hauptsächlich exprimierten Neuroligin-Isoformen in Nagern konnte zudem eine Isoform-spezifische Verteilung gezeigt werden: Neuroligin 3 ist an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen lokalisiert, während Neuroligin 2 hauptsächlich an inhibitorischen und Neuroligin 1 an exzitatorischen Synapsen detektiert wird (Chih *et al.*, 2005; Song *et al.*, 1999; Varoqueaux *et al.*, 2004; Budreck und Scheiffele, 2007).

Dem Neuroligin/Neurexin-Komplex wurde lange eine entscheidende Rolle in der Bildung neuer synaptischer Kontakte zugesprochen, da Neurone in Kokultur mit nicht-neuronalen Zellen, die Neuroligin überexprimieren, präsynaptische Strukturen ausbilden und Überexpression von Neurexinen zur Bildung postsynaptischer Strukturen führt (Scheiffele *et al.*, 2000; Graf *et al.*, 2004). Zudem führt die Überexpression von Neuroligin-Isoformen in neuronaler Zellkultur zu einer erhöhten synaptischen Dichte, während die Reduktion der Neuroligin-Expression diese herabsetzt (Dean *et al.*, 2003; Chih *et al.*, 2004; Chih *et al.*, 2005). *Knockout*- und Mutagenese-Studien haben allerdings gezeigt, dass Neuroligine *in vivo* nicht die Synapsenbildung initiieren, sondern vielmehr für die Synapsenreifung und eine korrekte synaptische Transmission verantwortlich sind (Varoqueaux *et al.*, 2006; Südhoff, 2008; Etherton *et al.*, 2011). So hat die Depletion einzelner oder mehrerer Neuroligine *in vivo* keinen Einfluss auf die Synapsenzahl und -struktur, führt aber zu einer gestörten synaptischen Transmission, die im Falle des Neuroligin(1-3)-Triple-*Knockouts* sogar letal ist (Varoqueaux *et al.*, 2006; Chubykin *et al.*, 2007; Südhoff, 2008). Die Bedeutung der Neuroligin/Neurexin-Interaktion wird auch durch Mutationen in humanen Neuroligin- und Neurexin-Genloci deutlich, die zu geistigen Entwicklungsstörungen des Autismusspektrums (ASD) führen. Die Ursache für ASD wird in einer gestörten GABAergen Transmission in der frühen Entwicklung vermutet, die zu einem Ungleichgewicht von Erregung und Inhibition in neuronalen Schaltkreisen führt (Pizzarelli und Cherubini, 2011). Entsprechend wurden Transmissions-Imbalancen und „autistische“ Verhaltensweisen auch in Neuroligin-depletierten Mäusen beobachtet (Pizzarelli und Cherubini, 2011; Südhof, 2008).

1.2.4 Synaptische Plastizität und Hippokampus-assoziiertes Gedächtnis

Synapsen sind sehr dynamische Strukturen, die ihre morphologischen und physiologischen Eigenschaften in Abhängigkeit neuronaler Aktivität ändern. Diese als synaptische Plastizität bezeichnete Dynamik wird als molekulare Grundlage für Lern- und Gedächtnisvorgänge angesehen (Citri und Malenka, 2008, Whitlock *et al.*, 2006). Je nach Dauer der synaptischen Veränderung wird zwischen Kurzzeitplastizität (Millisekunden bis Minuten) und Langzeitplastizität (Minuten bis \geq Wochen) unterschieden (Citri und Malenka, 2008). Während Kurzzeitplastizität hauptsächlich präsynaptisch verursacht wird, beruht Langzeitplastizität auf Veränderungen der Postsynapse (Zucker und Regehr, 2002; Citri und Malenka, 2008).

Die langfristige Verstärkung oder Schwächung der synaptischen Transmission (Langzeitpotenzierung/ LTP und Langzeitdepression/LTD) wurde im neuronalen Netzwerk des Hippokampus entdeckt und hier intensiv untersucht (Bliss und Gardner-Medwin, 1973; Derkach *et al.*, 2007; Citri und Malenka, 2008). Der im medialen Schläfenlappen des Großhirns gelegene Hippokampus spielt bei Menschen und Nagern eine wichtige Rolle in der Konsolidierung des sog. episodischen Gedächtnisses (Purves *et al.*, 2008). So sind Patienten mit Hippokampusläsionen nicht in der Lage, Ereignisse der jüngeren Vergangenheit zu erinnern, während Geschehnisse, die vor wenigen Minuten oder vor dem Zeitpunkt der Läsion passierten, erinnert werden können. Darüber hinaus ist der Hippokampus wichtig für räumliche Navigation und assoziatives Lernen (Sanderson *et al.*, 2008; Gorchetnikov und Grossberg, 2007; Squire *et al.*, 2004). Er ist dabei aber keine isolierte Struktur, sondern funktionell eng mit angrenzenden Kortexregionen zur Hippokampusformation verknüpft, die wiederum selbst in ein Netzwerk mit anderen Hirnregionen eingebettet ist (Perouansky und Pearce, 2011). Der Informationsfluss erfolgt in der Hippokampusformation hauptsächlich unidirektional entlang des trisynaptischen Schaltkreises, der auch als Modellsystem zur Untersuchung der molekularen Mechanismen synaptischer Plastizität dient (Tamminga *et al.*, 2010) (siehe Abb. 1.3). Werden z.B. die Axone der Schaffer-Kollateralen (Abb. 1.3, 3) *in vitro* hochfrequent stimuliert, so erhöht sich dauerhaft die postsynaptische Antwort der exzitatorischen Neurone im CA1-Feld (LTP). Bei niederfrequenter Stimulation hingegen erniedrigt sich ihre postsynaptische Antwort (LTD) (Kandel *et al.*, 2000).

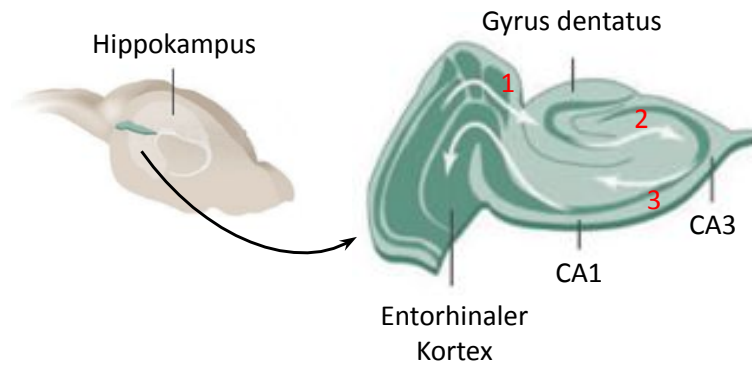


Abb. 1.3: Unidirektionaler Informationsfluss im Hippokampus. Lage und schematischer Querschnitt des murinen Hippokampus. Der Hauptinformationsfluss im Hippokampus folgt dem trisynaptischen Schaltkreis: Reize kommen aus dem Entorhinalkortex über die perforante Bahn (1) zum Gyrus Dentatus, werden über die Moosfasern (2) zum CA3-Feld und von dort über die Schaffer-Kollaterale (3) zum CA1-Feld geleitet. Der Schaltkreis mündet wieder im Entorhinalkortex. CA: Cornu ammonis. (Verändert nach Bannerman und Sprengel, 2007)

Solch eine Änderung der synaptischen Stärke kann durch verschiedene Mechanismen an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen hervorgerufen werden (Citri und Malenka, 2008; Castillo *et al.*, 2011). Die NMDA-Rezeptor abhängige Plastizität exzitatorischer Synapsen der CA1-Region ist dabei am besten charakterisiert (Citri und Malenka, 2008). Abb. 1.4 zeigt stark vereinfacht ihren molekularen Mechanismus. Grundsätzlich erfolgt in der Postsynapse ein steter AMPA-Rezeptoraustausch: AMPA-Rezeptoren werden endozytiert, dem *Recycling*-Endosom zugeführt und von dort wieder exozytiert (Derkach *et al.*, 2007; Citri und Malenka, 2008). Bei der Initiierung von LTP erfolgt nach verstärkter Depolarisation und Aktivierung der NMDA-Rezeptoren (siehe Kapitel 1.2.1) ein starker Ca^{2+} -Strom, der mehrere Signalkaskaden in Gang setzt. Zum einen wird durch Aktivierung der CaMKII die kleine GTPase Rab11 aktiviert, was zur vermehrten Exozytose von AMPA-Rezeptoren aus dem *Recyclingpool* führt (Citri und Malenka, 2008; Henley *et al.*, 2011). AMPA-Rezeptoren werden in die perisynaptische Membran inseriert, diffundieren zur Postsynapse und werden dort über die PSD verankert. Zum anderen erfolgt die Phosphorylierung postsynaptischer AMPA-Rezeptoren. Dies fördert ihre Insertion in die postsynaptische Membran und erhöht zudem die Leitfähigkeit mancher Rezeptorsubtypen (Lee *et al.*, 2010; Derkach *et al.*, 2007; Henley *et al.*, 2011). Diese frühe LTP-Phase führt also zu einer Verstärkung der synaptischen Transmission durch schnelle Rezeptorinsertion in die postsynaptische Membran und Erhöhung der Kanalleitfähigkeit. Zur langfristigen Etablierung von LTP sind in der späten Phase zudem Genexpression, Proteinsynthese und damit verbundene gezielte Transportprozesse erforderlich (siehe auch Kap. 1.3 und 1.3.3).

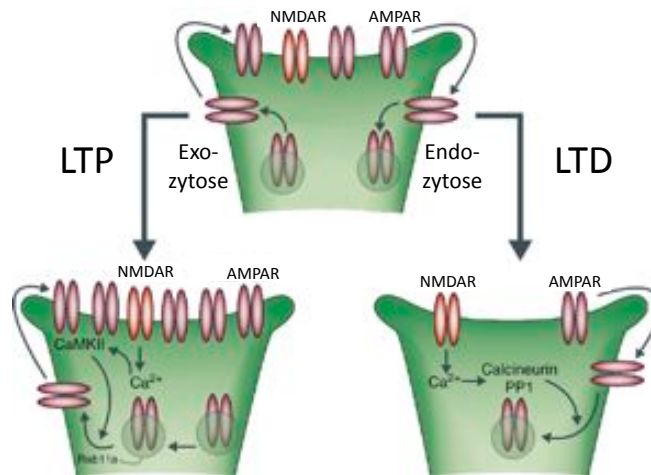


Abb. 1.4: NMDA-Rezeptor vermittelte synaptische Plastizität. In ruhenden Synapsen erfolgt ein konstitutiver AMPA-Rezeptoraustausch durch Endo- und Exozytose. Starker Ca^{2+} -Einstrom durch NMDA-Rezeptoren aktiviert die Kinase CaMKII, die wiederum die kleine GTPase Rab11 aktiviert und damit die vermehrte AMPA-Rezeptor-Exozytose verursacht. Die synaptische Transmission wird verstärkt (LTP). Geringer Ca^{2+} -Einstrom aktiviert u.a. Phosphatasen wie Calcineurin und PP1 und führt zu einer vermehrten AMPA-Rezeptor-Endozytose. Die synaptische Transmission wird geschwächt (LTD). LTP: Langzeitpotenzierung; LTD: Langzeitdepression. (Verändert nach Citri und Malenka, 2008)

Die LTD-Induktion kann ebenfalls durch einen NMDA-Rezeptor vermittelten Ca^{2+} -Einstrom erfolgen, der jedoch unterhalb des Schwellenwertes zur LTP-Induktion liegt (Citri und Malenka, 2008). Der Ca^{2+} -Einstrom aktiviert Phosphatasen- und Kinasen-abhängige Signalkaskaden, die zu einer Loslösung von AMPA-Rezeptoren aus der Postsynapse und ihrer vermehrten Endozytose führen, wodurch die synaptische Transmissionsstärke erniedrigt wird (Citri und Malenka, 2008; Henley *et al.*, 2011). Auch für die langfristige LTD-Etablierung sind in der späten Phase Genexpression, Proteinsynthese und aktive Transportprozesse erforderlich.

1.3 Intrazelluläre Transportprozesse

Neurone sind morphologisch und funktionell stark polarisierte Zellen (Axon versus Dendrit). Da der Großteil der Zellmaschinerie zur Proteinsynthese im Soma lokalisiert ist, benötigen Neurone zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion aktive Transportprozesse, um z.B. die Zellperipherie - wie axonale Präsynapsen oder dendritische Postsynapsen - gezielt und effizient mit Proteinen zu versorgen (Hirokawa *et al.*, 2009). Dies erfolgt über 3 Klassen molekularer Motoren, die unter ATP-Verbrauch ein Transportgut entlang von Zytoskelettelementen aktiv zu seinem Bestimmungsort bringen. Diese Motoren werden im folgenden Kapitel näher beschrieben.

1.3.1 Molekulare Motoren

Intrazellulärer Transport wird von 3 verschiedenen Motorproteinfamilien vermittelt: Den Myosinen, Kinesinen und Dyneinen (Hirokawa *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2008). Myosine benutzen dabei Aktinfilamente als molekulare Straßen, während Kinesine und Dyneine auf Mikrotubuli „laufen“. Hier sei zunächst auf die spezielle Organisation des neuronalen Zytoskeletts hingewiesen. Sowohl Mikrotubuli als auch Axone weisen mit einem schnell wachsenden (+)-Ende und einem langsam wachsenden (-)-Ende eine definierte Polarität auf. Das neuronale Aktinzytoskelett ist direkt unter der Zellmembran angereichert, insbesondere in der Präsynapse und in *Spines*, wobei die (+)-Enden der Aktinfilamente in der Regel zur Zellmembran orientiert sind (Hirokawa *et al.*, 2010; Bridgman, 2004; Schafer, 2004). Die Mikrotubuli weisen im Axon mit den (+)-Enden alle uniform in die Peripherie (Baas *et al.*, 1988). In den proximalen (Soma nahen) Dendriten ist ihre Anordnung gemischt, nur in distalen (Soma fernen) Dendriten in der Zellperipherie weisen ebenfalls alle (+)-Enden der Mikrotubuli nach außen. Der Langstreckentransport zwischen Soma und Peripherie erfolgt hauptsächlich entlang von Mikrotubuli über Kinesine und Dyneine, der Kurzstreckentransport im Zellkortex über Myosine und das Aktinzytoskelett (Ross *et al.*, 2008).

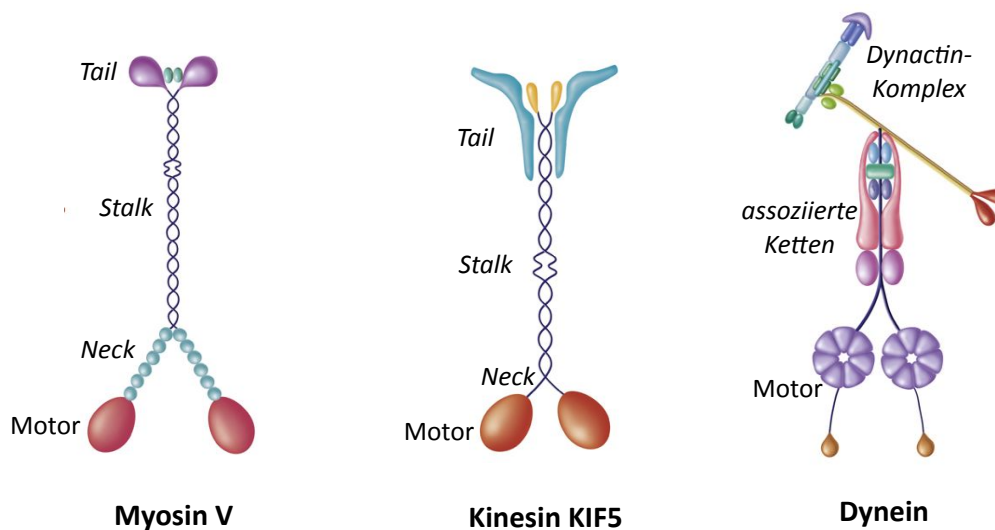


Abb. 1.5: Schematische Darstellung Zytoskelett-assoziiierter molekularer Motoren. Myosine wie Myosin V vermitteln Transport entlang von Aktinfilamenten, Kinesine wie KIF5 und zytoplasmatisches Dynein laufen entlang von Mikrotubuli. Die globulären Motordomänen der sog. schweren Ketten assoziieren mit dem Zytoskelett und ermöglichen in Kooperation mit der *Neck*-Region unter ATP-Hydrolyse eine schrittweise, prozessive Bewegung. *Coiled-coil* Regionen im *Stalk*-Bereich dienen oft der Homodimerisierung der schweren Ketten. *Cargo*-Bindung erfolgt in der Regel über die *Tail*-Domäne und weitere assoziierte Proteine, die wie der Dynactin-Komplex auch die Mobilität regulieren können. (Verändert nach Hirokawa *et al.*, 2010)

Alle 3 Motorproteinklassen verfügen über globuläre Motordomänen und weitere Domänen und/oder assoziierte Proteine zur Dimerisierung, Transportgut (*Cargo*)-Bindung oder Aktivitätsregulierung (siehe Abb. 1.5). Zudem ist ihnen ein prinzipieller Mechanismus zur Schritterzeugung gemein (Schliwa und Woehlke, 2003). Bei dimeren Motoren ist jeweils nur eine der 2 Motordomänen mit dem Zytoskelett assoziiert. Durch ATP-Hydrolyse erfährt die Motordomäne eine Konformationsänderung, die auf benachbarte Domänen übertragen und dadurch verstärkt wird. So verursacht ATP-Hydrolyse in der Myosin V- oder KIF5-Motordomäne eine Drehung und Streckung der *Neck*-Region in eine definierte Richtung (Rice *et al.*, 1999; Veigel und Schmidt, 2011). Die freie Motordomäne wird nach vorne bewegt und kann nun mit dem Zytoskelett interagieren. Dadurch erfolgt eine schrittweise Bewegung nach dem sog. *Hand over Hand*-Mechanismus (Schliwa und Woehlke, 2003).

Die Motoren der Myosin-Superfamilie vermitteln Transport entlang des Aktinzytoskeletts (Hirokawa *et al.*, 2010). 24 verschiedene Myosin-Klassen und ca. 40 humane Myosin-Genloci sind beschrieben (Foth *et al.*, 2006; Hartman *et al.*, 2011). Während konventionelles Myosin II Muskelkontraktion vermittelt, sind unkonventionelle Myosine in intrazellulären Transport involviert (Hartman *et al.*, 2011). Myosin-Motoren laufen in Richtung (+)-Ende, die einzige Ausnahme bildet Myosin VI, das in Richtung (-)-Ende läuft (Hirokawa *et al.*, 2010).

Die Proteine der Kinesin-Superfamilie (KIF) benutzen Mikrotubuli als molekulare Straßen. Säugetiere exprimieren ca. 45 Kinesine, die in 14 Klassen und je nach Lage der Motordomäne in N-, C- oder M-Kinesine eingeteilt werden (N-terminale, C-terminale oder interne Motordomäne) (Hirokawa *et al.*, 2010). Die Vielfalt der Kinesine wird durch alternatives Spleißen noch weiter erhöht (Setou *et al.*, 2004). N-Kinesine wie KIF5 laufen anterograd vom (-)-Ende in Richtung (+)-Ende, während C-Kinesine retrograd vom (+)-Ende in Richtung (-)-Ende laufen (Hirokawa *et al.*, 2010). Ihre Schrittlänge beträgt ca. 8 nm und ihre Transportgeschwindigkeit 0.1-1.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (Ross *et al.*, 2008; Hirokawa und Takemura, 2004). M-Kinesine nehmen eine Sonderstellung ein, da sie Mikrotubuli ATP-abhängig depolymerisieren und keine Transportfunktion haben (Hirokawa *et al.*, 2010).

Dyneine sind ebenfalls Mikrotubuli-abhängige Motoren und werden in axonemale und zytoplasmatische Dyneine unterschieden, wobei nur letztere intrazellulären Transport vermitteln (Hirokawa *et al.*, 2010). Das retrograd laufende zytoplasmatische Dynein ist ein großer Proteinkomplex (ca. 1.5 Megadalton), bestehend aus 2 schweren Ketten mit ATPase-

Aktivität und zahlreichen assoziierten Ketten und Proteinkomplexen (siehe Abb. 1.5). Im Gegensatz zur Vielzahl von Myosinen und Kinesinen ist nur eine Dynein-Schwere-Kette beschrieben, die intrazellulären Transport vermittelt (Kardon und Vale, 2009; Hirokawa *et al.*, 2010). Die Spezifität in der *Cargo*-Bindung erfolgt bei diesem Motor über die große Variabilität assoziierter Proteine.

1.3.2 Das Motorprotein KIF21B

Das Kinesin-Superfamilien-Protein KIF21B wurde erstmals 1999 zusammen mit seinem engsten homologen Protein KIF21A beschrieben (Marszalek *et al.*, 1999). Die beiden ca. 180 kDa großen, anterograden Motorproteine werden hauptsächlich neuronal exprimiert und gehören zur Klasse der N-Kinesine. Der N-terminalen Motordomäne folgt eine ca. 1000 AS lange *Stalk*-Domäne, die mehrere *Coiled-coil*-Regionen zur Dimerisierung besitzt (vergleiche Abb. 1.5). Der C-Terminus wird von 7 sog. *WD-Repeats* gebildet. Diese 40 AS langen Motive falten sich zu antiparallelen β -Faltblättern, die gemeinsam die Supersekundärstruktur eines mehrblättrigen β -Propellers einnehmen. β -Propeller stellen in vielen Proteinen eine Plattform für Protein-Protein-Interaktionen dar und dienen so auch der KIF21A-*Cargo*-Bindung (Smith, 2008; Shen *et al.*, 2008). Für KIF21A wurde auch eine *Cargo*-Bindung über die *Stalk*-Domäne beschrieben (Kakinuma und Kiyama, 2009). Trotz ihrer großen Homologie - KIF21A und KIF21B sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 60% identisch und zu 75% ähnlich - bilden die beiden Proteine keine Heterodimere und sind zudem intrazellulär unterschiedlich verteilt: KIF21A ist in Neuronen sowohl dendritisch als auch axonal lokalisiert, KIF21B hingegen stark dendritisch angereichert (Marszalek *et al.*, 1999).

Das einzig bislang bekannte KIF21B-*Cargo* ist das Zelladhäsionsmolekül Neuroligin (Schapitz, 2009, Dissertation). Schapitz konnte zeigen, dass KIF21B den anterograden Transport von Neuroligin 1 zur Zelloberfläche vermittelt. Neben der Interaktion konnte Schapitz belegen, dass sowohl eine Reduktion der KIF21B-Expression als auch eine Koexpression von dominant-negativ wirkenden KIF21B-Deletionskonstrukten zu einer Reduktion von Neuroligin an der Zelloberfläche führen. Auch eine durch LTP induzierte vermehrte Zelloberflächenlokalisierung von Neuroligin konnte durch Reduktion der KIF21B-Expression blockiert werden. Ging Schapitz noch von einer spezifischen Interaktion von KIF21B mit der Neuroligin-Isoform 1 aus, ist inzwischen deutlich, dass alle Neuroligin-

Isoformen mit KIF21B interagieren können (persönliche Information von E. Thies, Inst. für Molekulare Neurogenetik, ZMNH, Hamburg).

Darüber hinaus wurden verschiedene SNPs in oder nahe dem *KIF21B*-Genlocus als Suszeptibilitätsfaktor für Multiple Sklerose, die chronisch-entzündlichen Darm erkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa und die entzündlich-rheumatische Erkrankung Morbus Bechterew identifiziert (IMSGC, 2010; Goris *et al.*, 2010; Franke *et al.*, 2008; Danoy *et al.*, 2010). Die funktionelle Bedeutung von KIF21B ist für keine der Krankheiten nachgewiesen. Auffällig ist jedoch, dass in allen Erkrankungen eine Störung oder Fehlregulation des Immunsystems ausschlaggebend ist und dass KIF21B abgesehen vom Gehirn auch in der Milz exprimiert wird (Marszalek *et al.*, 1999). Dies deutet auf eine mögliche Funktion des Motorproteins in Immunzellen hin. In der Multiplen Sklerose, einer Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer Demyelinisierung und Degeneration axonaler Fortsätze im ZNS kommt, könnten nicht nur Veränderungen in Immunzellen sondern auch in Neuronen und/oder Gliazellen krankheitsverursachend sein, da KIF21B sowohl in Neuronen als auch in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert wird (Dugas *et al.*, 2006).

1.3.3 Regulationsebenen des intrazellulären Transports

Neben der KIF21B-Neurologin-Interaktion ist eine große Vielzahl Motor-*Cargo*-Interaktionen beschrieben und charakterisiert (Hirokawa *et al.*, 2010). So transportiert KIF17 NMDA-Rezeptor enthaltende Vesikel, Myosin V und VI transportieren AMPA-Rezeptor enthaltende Vesikel und KIF5 Mitochondrien und mRNA-Protein-Komplexe (mRNA *Granules*). Letztere sind für die lokale Proteintranslation in Neuriten und damit auch für die Bildung synaptischer Plastizität entscheidend (Sanchez-Carbente und Desgroseillers, 2008). Ein gezielter Transport erfordert neben der spezifischen Assoziation von Motor und *Cargo* auch auf weiteren Ebenen genaue Regulation. So müssen im Soma translatierte präsynaptische Proteine gezielt ins Axon geliefert werden, postsynaptische Proteine oder bestimmte mRNA *Granules* hingegen in Dendriten. Bei der Etablierung von LTP oder LTD müssen im Dendriten wiederum nur die „aktivierten“, aber nicht die „ruhenden“ Synapsen mit Proteinen beliefert werden.

Neurone verfügen über diverse regulatorische Mechanismen zur Proteinzielsteuerung, deren Zusammenspiel jedoch weitgehend unklar ist. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Dynein

entscheidend für dendritische Zielsteuerung ist, da die Inhibition von Dynein zum Verlust der dendritischen Lokalisation von AMPA-Rezeptoren führt und axonale Proteine durch eine „erzwungene“ Dynein-Interaktion in Dendriten gelenkt werden (Kapitein *et al.*, 2010). Lewis und Kollegen konnten in ähnlichen Experimenten zeigen, dass auch Myosin Va und ein intaktes Aktinzytoskelett für die Zielsteuerung dendritischer Proteine notwendig sind (Lewis *et al.*, 2009). Auch Adapterproteine können die Zielsteuerung regulieren. Viele Rezeptoren werden gemäß des Rezeptor-Adapter-Motor-Modells transportiert (siehe Abb. 1.6A) (Setou *et al.*, 2004). So wird der NMDA-Rezeptor durch einen Proteinkomplex aus LIN2, LIN7 und LIN10 an den anterograden Motor KIF17 gebunden und AMPA-Rezeptoren sind über das PSD-Protein GRIP1 an KIF5 gebunden (Setou *et al.*, 2000; Setou *et al.*, 2002). Setou und Kollegen konnten in Überexpressionsstudien zeigen, dass der Adapter GRIP1 KIF5 in somatodendritische Kompartimente steuert, das axonale Gerüstprotein JSAP1 steuert KIF5 dagegen in somatoaxonale Kompartimente (Setou *et al.*, 2002). Darüber hinaus spielen auch posttranslationale Modifikationen der Motorproteine und des Zytoskeletts eine entscheidende Rolle (siehe Kapitel 1.4).

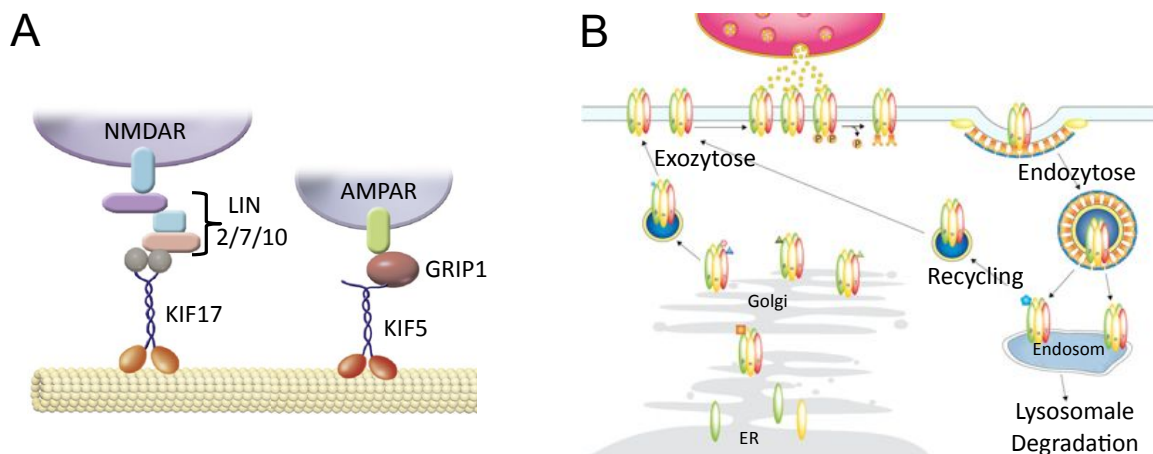


Abb. 1.6: Rezeptor-Adapter-Motor-Modell und intrazelluläre Transportwege des GABA_A-Rezeptors. (A) Motorproteine (KIF17 und KIF5) binden ihr *Cargo* (NMDA-/AMPA-Rezeptor) oftmals nicht direkt, sondern über singuläre Adapter (GRIP1) oder Adapterkomplexe (LIN2/LIN7/LIN10). (B) GABA_A-Rezeptoruntereinheiten assemblieren im endoplasmatischen Retikulum (ER) zu funktionellen Rezeptoren. Über den Golgi-Apparat werden die Rezeptoren zur Zellmembran transportiert und exozytiert. Durch Diffusion in der Zellmembran gelangen sie zur Postsynapse. Phosphorylierung induziert Rezeptorendozytose und Transport zum Endosom. Von hier erfolgt entweder der Rücktransport zur Zellmembran (*Recycling*) oder der Transport zum Lysosom zur Degradation. (A: Verändert nach Hirokawa *et al.*, 2010; B: Verändert nach Tretter und Moss, 2008)

Die Weichenstellung „Axon versus Dendrit“ ist jedoch nur eine von vielen Möglichkeiten. Abb. 1.6B zeigt vereinfacht die intrazellulären Transportwege eines Oberflächenrezeptors am Beispiel des GABA_A-Rezeptors (Tretter und Moss, 2008). Die Rezeptoruntereinheiten setzen sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) zu funktionellen Rezeptoren zusammen. Nach Rezeptorreifung und Bildung sekretorischer Vesikel am Golgi-Apparat erfolgt der Transport zur Oberfläche. Der Rezeptor wird in die Zellmembran inseriert, diffundiert in die Postsynapse und wird dort verankert. Phosphorylierung induziert die Endozytose des Rezeptors und Transport zum Endosomenkompartiment. Hier kann der Rezeptor entweder die *Recycling*-Route einschlagen und zurück zur Oberfläche transportiert werden oder er wird zum Lysosom transportiert und dort degradiert. Jede dieser Transportrouten erfordert die Assoziation der Rezeptoren mit unterschiedlichen Motorproteinen und weiteren (regulatorischen) Proteinen, von denen im Folgenden einige exemplarisch genannt werden. So erfolgt der Transport vom Golgi-Apparat zur Membran über den anterograden Motor KIF5, wobei HAP1 (*huntingtin associated protein 1*) als Adapter fungiert (Twelvetrees *et al.*, 2010). HAP1 spielt auch eine Rolle am *Sorting*-Endosom, da hier die HAP1-GABA_A-Rezeptor-Interaktion darüber entscheidet, ob Rezeptoren recycelt oder lysosomal degradiert werden (Kittler *et al.*, 2004). Während der Transport von Endozytose- und *Recycling*-Vesikeln am frühen Endosom von Myosin über Aktinfilamente vermittelt wird, ist für den Transport später Endosomen zu lysosomalen Kompartimenten Dynein verantwortlich (Osterweil *et al.*, 2005; Rudolf *et al.*, 2011; Burkhardt *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 2011). Heisler und Kollegen konnten zeigen, dass der GABA_A-Rezeptor-Bindepartner Muskelin sowohl für die Rezeptorendozytose über Myosin VI als auch die Dynein-abhängige lysosomale Degradation erforderlich ist und Muskelin beim Transit vom *Sorting*-Endosom zum Lysosom vermutlich den Motorwechsel von Myosin auf Dynein ermöglicht (Heisler *et al.*, 2011).

Neben dem Motorwechsel muss auch die ortsgenaue Freisetzung des *Cargos* vom Motor reguliert werden. Hierzu konnte gezeigt werden, dass eine CaMKII-vermittelte Phosphorylierung des Motors KIF17 die Dissoziation seines *Cargo*-Adapters zur Folge hat (Guillaud *et al.*, 2008). Da CaMKII stark in *Spines* angereichert ist und durch LTP-Induzierung aktiviert wird (siehe Kapitel 1.2.4), kann so das *Cargo* spezifisch an aktivierten Synapsen vom Motor gelöst werden.

1.4 Posttranslationale Modifikation

Wie zuvor beschrieben kann die Modifikation eines Motorproteins durch Phosphorylierung die *Cargo*-Zielsteuerung beeinflussen. Solch eine posttranslationale Veränderung von Proteinen durch kovalente Bindung chemischer Gruppen oder auch kleiner Proteine in regulierten enzymatischen Prozessen wird generell als posttranslationale Modifikation (PTM) bezeichnet. Über 400 verschiedene PTM sind bekannt, u.a. Phosphorylierung, Glykolysierung, Palmitoylierung, Ubiquitinylierung und SUMOylierung (Farley und Link, 2009). PTM kann je nach angefügter Modifikation verschiedenste Auswirkungen haben und spielt auch im intrazellulären Transport eine wichtige Rolle. So kann sich z.B. die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins ändern, Interaktionen mit anderen Proteinen können verstärkt oder abgeschwächt werden, Signalkaskaden aktiviert oder inhibiert und Proteine degradiert oder stabilisiert werden (Farley und Link, 2009).

Neben der Modifikation von Motorproteinen durch Phosphorylierung können auch Mikrotubuli vielfach modifiziert werden, wodurch u.a. die Bindung Mikrotubuli-assoziiierter Proteine (MAP) wie Kinesin oder Dynein beeinflusst wird (Westermann und Weber, 2003; Janke und Kneussel, 2010). So läuft KIF5 bevorzugt auf acetylierten Mikrotubuli, während KIF17 und KIF1A diese Präferenz nicht zeigen (Cai *et al.*, 2009). Dompierre und Kollegen bestätigten die erhöhte KIF5-Bindung durch Tubulinacetylierung und zeigten darüber hinaus, dass die Transportgeschwindigkeit von BDNF (*brain derived neurotrophic factor*)-Vesikeln durch diese PTM erhöht wird (Dompierre *et al.*, 2007). Auch Polyglutamylierung beeinflusst den Transport. So führt aktivitätsinduzierte Tubulinpolyglutamylierung zu einer erhöhten Bindung von nicht-Motor-MAPs an Mikrotubuli und inhibiert bestimmte KIF5-vermittelte Transportprozesse (Maas *et al.*, 2009). PTM reguliert zudem die axonale *Cargo*-Zielsteuerung, wobei hier mehrere Modifikationen (Acetylierung, Detyrosinierung, Polyglutamylierung) involviert zu sein scheinen (Reed *et al.*, 2006; Hammond *et al.*, 2010).

1.4.1 Ubiquitinylierung

Eine weitere wichtige und zugleich eine der bekanntesten PTM ist die Ubiquitinylierung. Sie ist in die Regulation etlicher zellulärer Prozesse wie Proteinstabilität, Transkription und DNA-Reparatur involviert, spielt aber ebenfalls in intrazellulären Transportprozessen - z.B. bei der Endozytose - eine große Rolle (Liu und Walters, 2010). Die reversible Ubiquitin-Modifikation erfordert die konsekutive Aktivität von mindestens drei Enzymen, wodurch

spezifische Lysinreste eines Proteins kovalent mit dem ca. 8 kDa großen Ubiquitin-Protein verknüpft werden (siehe Abb. 1.7). Zuerst erfolgt die Aktivierung von Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1, indem unter ATP-Hydrolyse Ubiquitin an E1 gebunden wird. Anschließend wird das aktivierte Ubiquitin auf das Enzym E2 übertragen. E2 – auch konjugierendes Enzym genannt – überträgt dann mit Hilfe einer E3-Ligase Ubiquitin auf das Substrat (Hershko und Ciechanover, 1998). E3-Ligasen der HECT-Familie übernehmen dabei direkt das aktivierte Ubiquitin von E2 und übertragen es dann auf das Substrat (Mabb und Ehlers, 2010). E3-Ligasen der RING-Protein-Familie hingegen kommen nicht direkt mit Ubiquitin in Kontakt. Sie dienen eher als Übertragungsplattform, indem sie gleichzeitig Substrat und den Ubiquitin-E2-Komplex binden und durch diese räumliche Nähe den Ubiquitin-Transfer von E2 auf das Substrat katalysieren. 7 verschiedene Lysinreste des konjugierten Ubiquitins können nun wiederum selbst mit Ubiquitin verknüpft werden, wodurch spezifische Ubiquitinketten entstehen (Abb. 1.7, Kx=Lysinreste 6, 11, 27, 29, 33, 48, 63) (Adhikari und Chen, 2009).

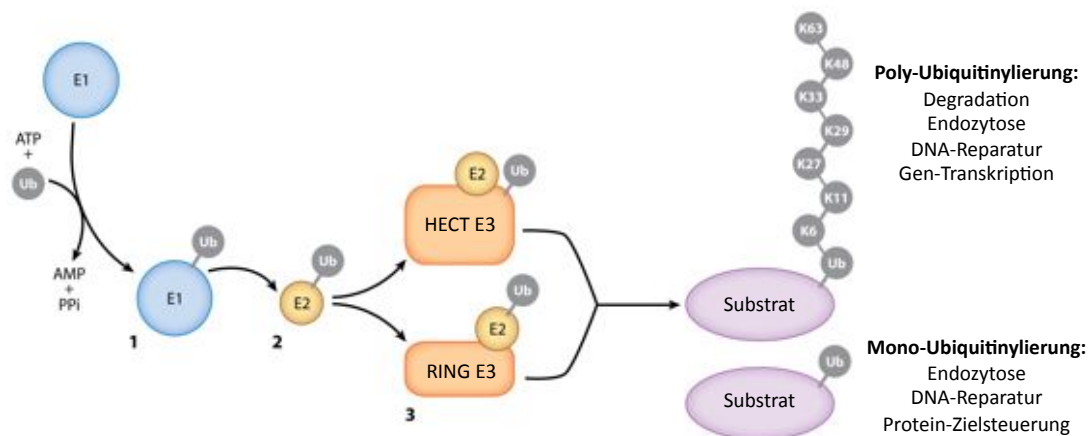


Abb. 1.7: Die Enzymkaskade der Substrat-Ubiquitylierung. Unter ATP-Hydrolyse erfolgt durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 die Aktivierung von Ubiquitin (Ub) (1). Dieses wird dann auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 übertragen (2). E3-Ligasen vermitteln dann entweder direkt (HECT-Domäne-Ligasen) oder indirekt (RING-Domäne-Ligasen) die Übertragung von E2 auf das Substrat (3). Substrate können mono- oder polyubiquityliert werden. Polyubiquitinketten können dabei an 7 verschiedenen Lysinresten (Kx) im Ubiquitin-Protein verknüpft werden. So entsteht eine Vielzahl von Ubiquitinmarkierungen, die spezifische Signale in diversen zellulären Funktionen darstellen. (Verändert nach Mabb und Ehlers, 2010)

Die Anzahl der konjugierten Ubiquitin-Reste und ihre Art der Verknüpfung entscheiden über das Schicksal des Substrats (Mabb und Ehlers, 2010). So führt Polyubiquitylierung zytoplasmatischer Proteine zu deren Abbau im proteolytisch aktiven 26S-Proteasomen-Komplex, während Monoubiquitylierung die Endozytose von Oberflächenrezeptoren

reguliert (Haglund und Dikic, 2005). Im humanen Genom sind lediglich 16 E1-Enzyme und 53 E2-Enzyme, aber über 500 E3-Ligasen kodiert (Tai und Schumann, 2008). Die Substratspezifität der Ubiquitynylierung erfolgt entsprechend durch die E3-Ligasen. Die Art der Ubiquitynylierung wird hingegen durch die E2-E3-Interaktion entschieden, da die E2-Enzyme die Verknüpfungsart (z.B. K63 oder K48) bestimmen (Napolitana *et al.*, 2011).

In Neuronen spielt Ubiquitynylierung auch bei der synaptischen Plastizität eine große Rolle und Mutationen in Komponenten der Ubiquitin-Enzym-Kaskade sind mit einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen verbunden (Mabb und Ehlers, 2010; Segref und Hoppe, 2009). So führt die Deletion der E3-Ligase UBE3A in der Maus zu Hippokampus-assoziierten Lerndefiziten und zum Verlust von LTP-Induktion (Jiang *et al.*, 1998). Im Menschen verursacht UBE3A-Depletion das Angelman-Syndrom, eine Entwicklungsstörung, die u.a. mit schwerer geistiger Behinderung verbunden ist (Greer *et al.*, 2010).

1.4.2 RING-E3-Ligasen der TRIM-Proteinfamilie

RING-E3-Ligasen sind die größte Gruppe der E3-Ligasen und vermitteln einen indirekten Ubiquitintransfer, indem sie gleichzeitig E2-Enzym und Substrat binden (siehe Abb. 1.7). Dabei können sie entweder selbständig als E2-Substrat-Mittler agieren oder wie die *Cullin*-RING-Ligasen in einen Multiproteinkomplex eingebettet sein (Mabb und Ehlers, 2010). Eine der größten Gruppen der „Einzel“-RING-E3-Ligasen bildet die TRIM-Protein-Familie, für die ca. 70 Genloci im Säugetiergenom beschrieben sind (Napolitano und Meroni, 2012). Sie spielen in etlichen biologischen Prozessen wie Transkription, antiviraler Immunantwort oder Onkogenese eine wichtige Rolle, haben jedoch nicht alle eine nachgewiesene E3-Ligase-Aktivität (Ozato *et al.*, 2008). Allen Mitgliedern der TRIM-Protein-Familie ist das N-terminale *Tripartite Motif* (TRIM oder auch RBCC-Domäne) gemein (Meroni und Diez-Roux, 2005). Es besteht aus einer RING (*Really Interesting New Gene*)-Domäne, ein oder zwei B-Box-Motiven und einer *Coiled-coil*-Domäne (siehe Abb. 1.8). Die Zinkionen-koordinierende RING-Domäne spielt für die Bindung von E2-Enzymen eine kritische Rolle (Napolitano und Meroni, 2012). Die B-Box-Motive binden ebenfalls Zinkionen und treten nur in TRIM-Proteinen auf. Ihre genaue Funktion ist noch nicht gänzlich geklärt, doch konnte für das TRIM-Protein MID1 gezeigt werden, dass die B-Box-Motive die E3-Ligase-Aktivität verstärken (Han *et al.*, 2011). Die *Coiled-coil*-Domäne dient der Homo- oder Heteromultimerisierung (Reymond *et al.*, 2001). Der RBCC-Domäne schließt sich ein variabler C-Terminus an, anhand dessen die TRIM-Proteine in 11 Klassen eingeteilt werden

und der über Substratbindung und intrazelluläre Verteilung bestimmt (Reymond *et al.*, 2001; Short und Cox, 2006; Ozato *et al.*, 2008). Letztere wird aber auch durch die *Coiled-coil*-Domäne bestimmt. TRIM-Proteine können über diese Domäne große Proteinkomplexe bilden und die Deletion der *Coiled-coil*-Domäne führt zu einer diffusen Verteilung von sonst spezifisch lokalisierten TRIM-Proteinen (Reymond *et al.*, 2001).

Familie	RBCC-Motiv	variabler C-Terminus	Mitglieder der Proteinfamilie
C-I			MID1, MID2, TRIM9, TRIM36, TRIM46, TRIM67
C-II			TRIM54, TRIM55, TRIM63
C-III			TRIM42
C-IV			TRIM11, TRIM4, TRIM5α, TRIM6, TRIM7, TRIM10, TRIM11, TRIM15, TRIM17, TRIM21, TRIM22, TRIM25, TRIM26, TRIM27, TRIM34, TRIM35, TRIM38, TRIM39, TRIM41, TRIM43, TRIM47, TRIM48, TRIM49, TRIM50, TRIM53, TRIM58, TRIM60, TRIM62, TRIM64, TRIM65, TRIM68, TRIM69, TRIM72, TRIM75
C-V			PML, TRIM8, TRIM31, TRIM40, TRIM52, TRIM56, TRIM61, TRIM73, TRIM74
C-VI			TRIM24, TRIM28, TRIM33
C-VII			TRIM2, TRIM3, TRIM32, TRIM71
C-VIII			TRIM37
C-IX			TRIM23
C-X ^a			TRIM45
C-XI ^b			TRIM13, TRIM59

Abb. 1.8: Die TRIM-Protein-Familie. Alle TRIM (*Tripartite Motif*)-Proteine verfügen N-Terminal über das RBCC-Motiv aus RING-Domäne (R), 1 oder 2 B-Box-Domänen (B1/2) und einer *Coiled-coil*-Domäne (CC). Die ca. 70 TRIM-Proteine werden anhand ihrer variablen C-Termini in 11 Klassen unterteilt. Die RBCC-Domäne ist für die E3-Ligase-Funktion und Di- bzw. Multimerisierung entscheidend, die C-terminalen Domänen vermitteln Substratbindung und intrazelluläre Lokalisation. ARF: *ADP Ribosylation Factor-like*; BR: Bromodomäne; COS: *C-terminal subgroup One Signature*; FN3: Fibronectin Typ 3; FIL: *Filamin-Repeats*; MATH: *Mepirin and tumour-necrosis factor receptor-Associated Factor Homology*; MID: *Midline*; NHL: *NCL-1/HT2A/Lin-41*; PHD: *Plant Homeodomain*; PML: *Promyelocytic Leukaemia*; SPRY: *SplA/Ryanodine receptor*; TM: Transmembran. (Verändert nach Ozato *et al.*, 2008)

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass manche TRIM-Proteine neben einer Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität auch SUMO-E3-Ligase-Aktivität besitzen (Chu und Yang, 2011). Diese PTM ist eng verwandt mit der Ubiquitynylierung und die Konjugation der ca. 11 kDa großen SUMO-Proteine (*small ubiquitin like modifier*) erfordert ebenfalls die konzertierte Aktivität von E1-, E2- und E3-Enzymen (Gareau und Lima, 2010). SUMOylierung kann wie Ubiquitynylierung je nach zellulärem Kontext unterschiedlichste Auswirkungen haben, da SUMOylierung Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen, modifizieren oder auch verhindern kann (Wilkinson und Henley, 2010).

1.4.3 Das TRIM-NHL-Protein TRIM3

TRIM3 (*Tripartite Motif Containing 3*) bildet zusammen mit TRIM2, TRIM32 und TRIM71 die kleine Subfamilie der TRIM-NHL-Proteine (Klasse VII, siehe Abb. 1.8), wobei die RBCC-Domäne innerhalb der Gruppe Unterschiede aufweist: TRIM2, TRIM3 und TRIM32 besitzen nur eine B-Box, TRIM71 hingegen zwei (Wulczyn *et al.*, 2010; Roma-Mateo *et al.*, 2011). Der C-Terminus wird von 6 NHL-Wiederholungen gebildet. Diese 44 AS langen Motive wurden erstmal in den Proteinen *Ncl-1*, *HT2A* und *LIN41* beschrieben und sind den *WD-Repeats* sehr ähnlich (Slack und Ruvkun, 1998). Sie bilden ebenfalls einen aus β -Faltblättern bestehenden, mehrblättrigen β -Propeller und dienen vermutlich auch der Protein-Protein-Wechselwirkung (Slack und Ruvkun, 1998; Wulczyn *et al.*, 2010; vergl. Kapitel 1.3.2). TRIM2, TRIM3 und TRIM71 verfügen zudem noch über Aktin-Bindeprotein/Filamin-ähnliche Wiederholungen, die zwischen der RBCC-Domäne und den NHL-Wiederholungen lokalisiert sind, denen aber noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden konnte (Wulczyn *et al.*, 2010).

TRIM3 wurde erstmals 1999 als direkter Bindepartner des Aktin-basierten Motorproteins Myosin V beschrieben und wegen seiner starken Anreicherung im Gehirn als *Brain Expressed RING-Finger-Protein* (BERP) bezeichnet (El-Husseini und Vincent, 1999). Die TRIM3-Expression ist dabei im Cerebellum (Kleinhirn) am höchsten, doch auch im Kortex und Hippokampus wird eine sehr deutliche Expression beobachtet. Aufgrund der punktförmigen, zytoplasmatischen Verteilung von TRIM3 und seiner Assoziation mit Myosin V wurde bereits in der ersten Publikation eine Funktion von TRIM3 in aktiven Transportprozessen vermutet. Auch eine Rolle in Neuritenauswuchs wurde angenommen, da die Expression von TRIM3-Deletionsmutanten in PC12-Zellen zu Differenzierungsdefiziten führt. Diese Beobachtung konnte in primären Neuronen allerdings nicht bestätigt werden und *Trim3-Knockout*-Mäuse zeigen eine normale Entwicklung und Morphologie (Cheung *et al.*, 2010). Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass die große Homologie besonders von TRIM3 und TRIM2 in *Knockout*-Mäusen zu Kompensation führen könnte, ein Vergleich der Aminosäuresequenz von TRIM3 zu TRIM2 ergibt 67% Identität und 82% Ähnlichkeit (BLAST-Vergleich, NCBI). Einen weiteren Hinweis auf eine Rolle von TRIM3 in intrazellulären Transportprozessen lieferte 2005 eine Studie von Yan und Kollegen (Yan *et al.*, 2005). Sie konnten zeigen, dass TRIM3 Bestandteil des sogenannten CART (*cytoskeleton-associated recycling or*

transport)-Komplexes ist und hier im *Recycling* des Transferrinrezeptors eine Rolle spielt. Der CART-Komplex ist an frühen Endosomen lokalisiert und setzt sich aus Hrs, Actinin-4, TRIM3 und Myosin V zusammen, wobei TRIM3 die Bindung von Actinin-4 und Hrs an den Motor ermöglicht. Eine Störung dieses Komplexes führte in HeLa-Zellen zu einem verlangsamten *Recycling* des Transferrinrezeptors, die konstitutive Rezeptorendozytose selbst blieb aber unverändert. Die Autoren vermuten, dass der CART-Komplex darüber entscheidet, ob der Transferrinrezeptor eine schnelle oder langsame *Recycling*-Route einschlägt, der genaue Mechanismus ist aber nicht geklärt. Zudem scheint der CART-Komplex nur konstitutiv internalisierte Rezeptoren zu beeinflussen, da Störungen des CART-Komplexes keinen Einfluss auf den EGF-Rezeptor hatten, der erst durch Ligandenbindung internalisiert wird.

2010 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass TRIM3 eine funktionelle Ubiquitin-E3-Ligase ist (Hung *et al.*, 2010). Die Studie zeigte, dass TRIM3 für die Degradation des PSD-Proteins GKAP verantwortlich ist (siehe Kapitel 1.2.1, Abb. 1.2). So führte eine reduzierte TRIM3-Expression in kultivierten hippocampalen Neuronen zu einem erhöhten synaptischen GKAP-Gehalt und vergrößerten *Spines*, TRIM3-Überexpression hingegen minimierte den synaptischen GKAP-Gehalt und die *Spine*-Größe. Neben einer *in vitro*-Degradation konnte zudem gezeigt werden, dass die RBCC-Domäne und eine funktionelle RING-Domäne für den GKAP-Abbau essenziell sind.

Trim3-Genexpression ist zudem an neuronale Aktivität gekoppelt (Ohkawa *et al.*, 2001). So ist der *Trim3*-mRNA-Gehalt im Hippokampus von Mäusen deutlich erhöht, nachdem durch Applikation des Glutamaterezeptor-Agonisten Kainat oder des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Pentylentetrazol (PTZ) Krampfanfälle ausgelöst wurden. Cheung und Kollegen konnten in diesem Kontext zeigen, dass die PTZ-induzierte Transkriptionssteigerung über Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 erfolgt und dass TRIM3-Depletion zu einer erhöhten Resistenz gegenüber PTZ-induzierten Krämpfen führt (Cheung *et al.*, 2010). Die Autoren erklären die PTZ-Insensitivität der *Trim3-Knockout*-Mäuse durch eine reduzierte Oberflächenlokalisation von GABA_A-Rezeptoren, da kultivierte kortikale Neurone der TRIM3-depletierten Mäuse einen reduzierten Oberflächengehalt der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors aufweisen und eine Reduktion der inhibitorischen synaptischen Transmission zeigen. Die molekulare Ursache des reduzierten GABA_A-Rezeptor-Oberflächengehaltes durch TRIM3-Depletion ist aber noch ungeklärt.

Neben seiner Funktion als E3-Ligase und putativer Adapter im Myosin-abhängigen Transport scheint TRIM3 auch an Mikrotubuli-abhängigen Transportprozessen beteiligt zu sein. So wurden TRIM3 und TRIM2 als Bestandteile von RNA *Granules* identifiziert, die von KIF5 entlang von Mikrotubuli transportiert werden (Kanai *et al.*, 2004).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Grundlage dieser Dissertation war eine neu identifizierte Interaktion zwischen der RING-E3-Ligase TRIM3 und dem anterograden Motorprotein KIF21B. TRIM3 wird in Myosin-vermittelten Transportprozessen eine Adapterfunktion zugesprochen, über seine Funktion in Kinesin-vermittelten Transportprozessen ist bislang jedoch nichts bekannt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche TRIM3-Funktion im Mikrotubuli-assoziierten Transport untersucht werden. Hauptaugenmerk lag dabei zum einen auf der Frage, ob TRIM3 in die Ubiquitin-abhängige Degradation von KIF21B involviert sein könnte, besonders da der proteasomale Abbau neuronaler Motoren bislang nur wenig untersucht ist. Zum anderen sollte die Frage geklärt werden, ob TRIM3 den anterograden Transport des Zelladhäsionsmoleküls Neuroligin - des einzig bislang bekannten KIF21B-*Cargos* - beeinflusst. Darüber hinaus wurde untersucht, ob TRIM3-Depletion Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung von Kinesinen und die Kinetik von putativ Kinesin-vermitteltem *Cargo*-Transport hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden im Reinheitsgrad “zur Analyse (p.A.)” bzw. in höchstmöglicher Reinheit verwendet und - sofern nicht anders angegeben - von folgenden Firmen bezogen: Sigma (Taufkirchen), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Roche (Mannheim), AppliChem (Darmstadt), Life Technologies (Darmstadt) und VWR (Darmstadt).

Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Restriktionsenzyme von Roche (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot) und NEB - New England Biolabs - (Frankfurt); *Taq*-DNA-Polymerase von Invitrogen (Life Technologies, Darmstadt), *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase von Agilent Technologies (Santa Clara, USA), T4 DNA Ligase von Fermentas (St. Leon-Rot) und rAPid Alkaline Phosphatase und Proteinase K von Roche (Mannheim). Die verwendeten Puffer wurden jeweils vom Hersteller mit den entsprechenden Enzymen geliefert.

2.1.2 Geräte

Entwicklermaschine: CURIX60 (Agfa, Leverkusen)

Geldokumentation: Intas Gel Imager (Intas, Göttingen)

Gelkammern für Agarosegele: Owl Separation Systems B2, B1A (Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA)

Heizblock: Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)

Homogenisator: Potter S (Sartorius, Göttingen)

Mikroplattenleser: Infinite 200 PRO NanoQuant (Tecan, Männedorf, Schweiz)

Mikroskope: konfokales *Laser-scanning* Mikroskop Olympus Fluoview FV1000 mit Olympus Fluoview Software Version 2.1b (Olympus, Hamburg); Televal 31 (Zeiss, Jena)

Laborwaagen: Sartorius LC-6201 (Sartorius, Göttingen), Mettler AE240 (Mettler-Toledo, Giessen)

PCR-Maschine: PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, USA)

pH-Meter: SevenEasy (Mettler-Toledo, Giessen)

Schüttler (horizontal): Promax 2020 (Heidolph Instruments, Kelheim), WS5 (Edmund Bühler GmbH, Hechingen), innova 2300 Platform Shaker (Eppendorf, Hamburg)

Schüttler (Über-Kopf): Suspensionsmischer CMV-1S (Fröbel Labortechnik, Lindau)

SDS-PAGE-Apparatur: Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad, München)

Spannungsgeräte: Power Pac 200 (Bio-Rad, München), Power Pack P25T (Biometra, Göttingen)

Spektrophotometer: NanoQuant-Platte für Infinite 200 PRO NanoQuant (Tecan, Männedorf, Schweiz)

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

Timelapse-Videomikroskopie: inverses Axiovert 200M (Zeiss, Jena) mit Sony CCD-Kamera 12. Monochrome w/o IR-18 (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, USA),
Timelapse-Steuerung: Mac5000 (Visitron Systems, Puchheim)

UV-Illuminator: UVT-14L (Herolab, Wiesloch)

Vortex: REAX 2000 (Heidolph Instruments, Kelheim)

Wasserbad: GFL Typ 1013 (GFL, Burgwedel)

Western Blot-Apparatur: Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, München)

Western Blot Dokumentation: Intas ChemoCam (Intas, Göttingen)

Zellkulturinkubatoren: NuAire IR Autoflow CO₂ Water-Jacketed Incubator (NuAire, Plymouth, USA); Hera-Cell Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA)

Zentrifugen: J2-21 M/E, Ultrazentrifugen TL-100 und L7, (Beckman Coulter, Krefeld); 5417 C (Eppendorf, Hamburg); MC6 Minifuge (Sarstedt, Nümbrecht)

Zentrifugen-Rotoren: TLA 100.3, JA-10, JA-14, JA-20, SW-40Ti (Beckman Coulter, Krefeld)

2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

Für alle Medien, Puffer und Lösungen wurde über ein Milli-Q-System (Millipore, Schwalbach/Ts) aufgereinigtes Wasser der Qualität „Aqua bidest.“ verwendet. Falls erforderlich wurden pH-Werte mittels NaOH, KOH oder HCl eingestellt. Sterilisierung erfolgte entweder durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C oder mit Hilfe von Sterilfiltern der Ausschlussgrenze 0.22 µm (Millipore, Schwalbach/Ts). Nährmedien für

Zellkulturarbeiten wurden von Gibco Life Technologies (Darmstadt) bezogen. Standardlösungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) bzw. nach Herstellerangaben angesetzt.

Blockierungspuffer (Immundetektion)

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

Blockierungspuffer (Immunzytochemie)

1% (w/v) BSA in 1x PBS oder 2.5% (v/v) Eselserum in 1x PBS

10x BU-Salzpuffer

7% (w/v) Na₂HPO₄, 3% (w/v) NaH₂PO₄

Coomassie-Färbelösung

0.025% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Coomassie-Entfärbelösung

40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

D-MEM/F-12 complete

500 ml D-MEM/F-12 (1:1, w/o L-Glu), 10% FCS (v/v), 2 mM L-Glutamin, 25 µg/ml Pyruvat, 5 ml Penizillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml)

6x DNA-Ladepuffer

7.5 g Ficoll, 0.125 g Bromophenolblau, ad 50 ml H₂O; Aliquots wurden bei -20 °C gelagert

10x „Drop-Out“-Lösung

300 mg/L L-Isoleuzin, 1500 mg/L L-Valin, 200 mg/L Adenin-Hemisulfat, 200 mg/L L-Arginin-Hydrochlorid, 300 mg/L L-Lysin-Hydrochlorid, 200 mg/L L-Methionin, 500 mg/L L-Phenylalanin, 2000 mg/L L-Threonin, 300 mg/L L-Tyrosin

2x HBS

1.6 g NaCl, 0.074 g KCl, 0.027 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 0.2 Dextrose, 1 g HEPES, ad 100 ml H₂O; pH 7.05 (NaOH); der Puffer wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert

HEK293-Medium

500 ml D-MEM (+ 4500 mg/L Glukose, + GlutaMAX™ I,- Pyruvat), 5 ml Penizillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml), 50 ml FBS (10% (v/v) f.c.)

HEPES-Puffer

10 mM HEPES, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂; pH 7.4 (NaOH); 15 mM Glukose; der Puffer wurde sterilfiltriert

LB-Agar

LB-Medium mit 1.5% (w/v) Agar wurde autoklaviert; die Lösung wurde auf ca. 50 °C abgekühlt und zur Selektion resistenter Bakterien mit 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 (NaOH); Sterilisierung erfolgte durch Autoklavieren

IM-Ac-Puffer

20 mM HEPES, 100 mM K-Acetat, 40 mM KCl, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂; pH 7.2

IP-Waschpuffer

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

Neurobasalmedium

500 ml Neurobasal A, 2 mM L-Glutamin, 25 µg/ml Pyruvat, 5 ml Penizillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml), 2% (v/v) B27; B27-Lösung wurde erst kurz vor dem Gebrauch zum Medium hinzugefügt

Paraformaldehydlösung

40 g Paraformaldehyd, 40 g Sucrose, ad 1000 ml 1x PBS, die Lösung wurde auf 60 °C erhitzt, 1 M NaOH bis zum Aufklaren zugesetzt und mit HCl ein pH-Wert von 7.2 eingestellt; Aliquots wurden bei – 20 °C gelagert

PBS (10x)

2 g KCl, 2.4 g KH₂PO₄, 14.4 g Na₂HPO₄, 80 g NaCl; ad 1000 ml H₂O; pH 7.4 (NaOH oder HCl); Sterilisierung erfolgte durch Autoklavieren

PEG/LiAc-Puffer:

40% (w/v) PEG3500, 150 mM Lithiumacetat in 1x TE-Puffer

Phosphat-Puffer (*Elektronenmikroskopie*)

Stammlösungen von 0.2 M Na₂HPO₄ and 0.2 M NaH₂PO₄ wurden im Verhältnis 81:19 gemischt, auf 0.1 M verdünnt und der pH-Wert auf 7.4 eingestellt

Phosphatpuffer (*kompetente Zellen*)

170 mM KH₂PO₄, 720 mM K₂HPO₄; Sterilisierung erfolgte durch Autoklavieren

Plasmid-Minipräparation

Lösung I: 20 mM D-Glukose, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.5 mM EDTA (pH 8,0)

Lösung II: 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS; die Lösung wurde immer frisch angesetzt

Lösung III: 3.38 M K-Acetat, 5.6 M Eisessig (25.9 ml Eisessig auf 200 ml Lösung III)

RIPA-Puffer (modifiziert)

50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) NP40, 0.25 % (w/v) Natriumdeoxycholat, 0.5 % (v/v) Triton-X-100

SC-Galaktose-X-Gal-Medium

1.7 g Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 5 g (NH₄)₂SO₄, 20 g Galaktose, 10 g Raffinose, 0.06 mg/ml (f.c.) Leuzin, 100 ml 10x „Drop-Out“-Lösung, 100 ml 10x-BU-Salzpuffer, 8 ml X-Gal-Stammlösung; nach Bedarf 0.04 mg/ml (f.c.) Tryptophan, 0.02 mg/ml (f.c.) Uracil, 0.02 mg/ml (f.c.) Histidin; ad 1000 ml H₂O; in H₂O gelöste Hefe-Stickstoffbasis wurde autoklaviert und alle anderen Bestandteile in Form steriler Stammlösungen zugefügt; zur Herstellung von Agarplatten wurden 2% (w/v) Agar-Agar zugegeben

SC-Glukose-Selektivmedium:

1.7 g Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 5 g (NH₄)₂SO₄, 20 g Glukose, 0.06 mg/ml (f.c.) Leuzin, 100 ml 10x „Drop-Out“-Lösung; nach Bedarf 0.04 mg/ml (f.c.) Tryptophan, 0.02 mg/ml (f.c.) Uracil, 0.02 mg/ml (f.c.) Histidin; ad 1000 ml H₂O; in H₂O gelöste Hefe-Stickstoffbasis wurde autoklaviert und alle anderen Bestandteile in Form steriler Stammlösungen zugefügt; zur Herstellung von Agarplatten wurden 2% (w/v) Agar-Agar zugegeben

Schwanzbiopsie-Lysis-Puffer

2.5 mM EDTA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.45% (v/v) Tween20, 0.45% (v/v) NP40; vor Gebrauch wurde der Puffer mit 1mg/ml (f.c.) Proteinase K versetzt

SDS-Laufpuffer (10x)

250 mM Tris, 2.5 M Glyzin, 1% (w/v) SDS; pH 8.3 (HCl)

4x SDS-Probenpuffer

220 mM Tris (pH 6.8), 40% (v/v) Glyzerin, 8% (w/v) SDS, 0.8% (w/v) Bromophenol; vor Gebrauch wurden 100 µl Puffer mit 8 µl β-Mercaptoethanol versetzt

Stripping-Puffer

65 mM Tris-HCl (pH 6.7), 2% (w/v) SDS; vor Gebrauch wurden 1 ml Puffer mit 7 µl β-Mercaptoethanol versetzt

TAE (50x)

242 g Tris, 57.1 ml Essigsäure, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0); ad 1000 ml H₂O

TBJap (kompetente Zellen)

10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, ad 900 ml H₂O; pH 6.7 (KOH); zum Puffer wurden 55 mM MnCl₂ hinzugefügt, das Volumen mit H₂O auf 1000 ml aufgefüllt und sterilfiltriert

TB-Medium (kompetente Zellen)

12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin; ad 900 ml H₂O; nach dem Autoklavieren wurden 100 ml steriler Phosphat-Puffer hinzugefügt

TBST (10x)

100 mM Tris (pH 8.0), 1.5 M NaCl, 0.5% (v/v) Triton-X-100

TE-Puffer (10x)

100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA; Sterilisierung erfolgte durch Autoklavieren

TE/LiAc-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 150 mM Lithiumacetat

Transferpuffer (10x)

250 mM Tris, 1.92 M Glyzin; pH 8.3; 1x Puffer wurde vor Gebrauch mit 20% (v/v) Methanol versetzt

X-Gal-Stammlösung

20 mg/ml X-β-Gal in N,N-Dimethylformamid

YPD-Vollmedium

20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 20 g Glukose; ad 1000 ml H₂O; Sterilisierung erfolgte durch Autoklavieren; zur Herstellung von Agarplatten wurden 2% (w/v) Agar-Agar zugegeben

Zellysis-Puffer

1% (v/v) Triton-X-100, 1 mM PMSF, 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim); der Puffer wurde frisch mit 1x PBS angesetzt

2.1.4 Tiere

Es wurden Wildtypmatten vom Stamm Wistar und Wildtypmäuse vom Stamm C57Bl/6J verwendet. Außerdem wurden wildtypische (+/+) und homozygote (-/-) *Trim3-Knockout*-Mäuse benutzt, die von Dr. Ronald van Kesteren (Freie Universität Amsterdam, Niederlande) generiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt worden waren. Die Strategie zur Generierung der *Trim3-Knockout*-Linie beruhte auf der Flankierung der Exons 2 bis 4 des *Trim3*-Gens mit loxP-Stellen über homologe Rekombination und anschließende

Verpaarung mit *Cre-Deleter*-Mäusen, die die Cre-Rekombinase auch in der Keimbahn exprimieren. Die Exzision der Exons 2 bis 4 durch die Cre-Rekombinase führt zu einer Verschiebung des Leserasters und zum vorzeitigen Translationsstop des TRIM3-Proteins. In dieser Arbeit wurden als Kontrollen wenn möglich wildtypische (+/+) *Trim3-Knockout*-Wurfgeschwister verwendet. Alternativ wurden C57Bl/6J-Tiere benutzt, da die *Trim3-Knockout*-Mäuse auf diesen Hintergrund zurückgekreuzt worden sind.

2.1.5 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme

Zelllinie

HEK293-Zellen: humane embryonale Nierenzelllinie ATCC CRL-1537 (ATCC, Manassas, USA)

Bakterienstamm

XL1-Blue: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tet_r)] (Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Hefestamm

EGY48: MATa *trp1 his3 ura3 LexAop(x6)-LEU2* (Origene, Rockville, USA)

2.1.6 Größenstandards

DNA-Standard: Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde)

Protein-Standards: Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, München)

2.1.7 Reaktionskomplettausstattungen (Kits)

- Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Schwalbach/Ts)
- HiSpeed Plasmid Maxi/Midi Kit (Qiagen, Hilden)
- GenElute, endotoxin-free Plasmid Kit (Sigma, Taufkirchen)
- NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel, Düren)
- E.Z.N.A. Cycle Pure Kit (Peqlab, Erlangen)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA)
- Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche, Mannheim)

2.1.8 Antikörper

Die folgenden Primärantikörper wurden in der angegebenen Menge oder Verdünnung für Western Blot (WB), Immunzytochemie (ICC), Koimmunpräzipitation (IP) oder Elektronenmikroskopie (EM) verwendet:

Antikörper	Spezies	Verdünnung oder eingesetzte Menge	Bezugsquelle
α -Aktin A2066	polyklonal, Kaninchen	1:5000 WB	Sigma (Taufkirchen)
α -GFAP	polyklonal, Meerschweinchen	1:500 ICC	Synaptic Systems (Göttingen)
α -GFP	polyklonal, Kaninchen	1:5000 WB 3.5 μ g IP	Sigma (Taufkirchen)
α -HA	monoklonal, Maus	1:100 ICC	Roche (Mannheim)
α -KIF21B	polyklonal, Kaninchen	1:1000 WB 1:100 ICC 2 μ g IP	Sigma (Taufkirchen)
α -KIF21B	polyklonal, Kaninchen	1:2000 WB (CHX-Exp. + IP-Detektion)	Millipore (Schwalbach/Ts)
α -Kinesin-Heavy-Chain/KIF5, Klon H2	monoklonal, Maus	1:1000 WB	Millipore (Schwalbach/Ts)
α -MAP2, Klon AP-20	monoklonal, Maus	1:300 ICC	Sigma (Taufkirchen)
α -myc	monoklonal, Maus	1:5000 WB 4 μ g IP	Sigma (Taufkirchen)
α -Neurologin 4F9	monoklonal, Maus	1:2000 WB 6 μ g IP	Synaptic Systems (Göttingen)
α -Neurologin 87H9	monoklonal, Maus	1:100 ICC	Synaptic Systems (Göttingen)
α -NSE (Neuronen spezifische Enolase)	polyklonal, Huhn	1:2000 WB	Novus (Cambridge, UK)
α -Optineurin	polyklonal, Kaninchen	1:1000 WB	Abcam (Cambridge, UK)
α -SV2	monoklonal, Maus	1:100 ICC	K.M. Buckley, Harvard (Boston, USA)
α -TRIM3	polyklonal, Kaninchen	1:2000 WB, 1:100 ICC 1:400 EM	Abcam (Cambridge, UK)
IgG (unspezifische Immunglobuline)	Kaninchen	2-3.5 μ g Ko-IP	Dianova (Hamburg)
IgG (unspezifische Immunglobuline)	Maus	4-6 μ g Ko-IP	Sigma (Taufkirchen)

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Folgende Sekundärantikörper wurden verwendet:

Antikörper	Spezies	Verdünnung oder eingesetzte Menge	Bezugsquelle
α -Maus-HRP	Schaf	1:10000-1:15000 WB	Dianova (Hamburg)
α -Kaninchen-HRP	Esel	1:10000-1:15000 WB	Dianova (Hamburg)
α -Huhn-HRP	Esel	1:5.000 WB	Dianova (Hamburg)
α -Maus-Alexa488	Ziege	1:500 ICC	Dianova (Hamburg)
α -Maus-Cy5	Esel	1:500 ICC	Dianova (Hamburg)
α -Kaninchen-Cy3	Esel	1:500 ICC	Dianova (Hamburg)
α -Kaninchen-Cy5	Esel	1:500 ICC	Dianova (Hamburg)
α -Meerschweinchen-Cy3	Esel	1:500 ICC	Dianova (Hamburg)

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

2.1.9 Leervektoren und Konstrukte

Folgende Tabelle 3 gibt Auskunft über Verwendungszweck und Herkunft bzw. Generierung aller benutzten Vektoren (Leervektoren und Vektorkonstrukte):

Name	Herkunft bzw. Generierung	Verwendung
pcDNA3-HA	modifizierter pcDNA3-Vektor, (Inst. Molekulare Neurogenetik, ZMNH, Hamburg)	Expression von unfusionierter HA-Markierung
pcDNA3-myc	modifizierter pcDNA3-Vektor, (Inst. Molekulare Neurogenetik, ZMNH, Hamburg)	Klonierung von pcDNA3-myc-TRIM3 und -TRIM3 Δ RBCC; Expression von unfusionierter myc-Markierung
pcDNA3-myc-TRIM3	Amplifizierung von TRIM3 mit Oligos 17 + 18 (<i>Bgl</i> II + <i>Xho</i> I) aus pEGFP-C1-TRIM3, Insertion in pcDNA3-myc über <i>Bam</i> HI + <i>Xho</i> I	Expression von myc-markiertem TRIM3
pcDNA3-myc-TRIM3 Δ RBCC	Amplifizierung von TRIM3- Δ RBCC mit Oligos 15 + 16 (<i>Bgl</i> II + <i>Sal</i> I) aus pEGFP-C1-TRIM3, Insertion in pcDNA3-myc über <i>Bam</i> HI + <i>Xho</i> I	Expression von myc-markiertem TRIM3- Δ RBCC
pCMV6-Entry-KIF21B	Origene (Rockville, USA)	Klonierung von pGilda-KIF21B-Motor-, <i>Stalk</i> - und <i>Tail</i> -Domäne (ORF aus <i>Mus musculus</i>)
pEGFP-C1-KIF21B	I. Schapitz (Inst. Molekulare Neurogenetik, ZMNH, Hamburg)	Expression von EGFP-markiertem KIF21B (ORF aus <i>Mus musculus</i>)
pEGFP-C1-TRIM3	C. Maas (Inst. Molekulare Neurogenetik, ZMNH, Hamburg)	Matrize zur Klonierung diverser TRIM3-Konstrukte, ORF aus <i>Mus musculus</i>

pEGFP-N1	Clontech (Heidelberg)	Klonierung von pEGFP-N1-TRIM3 und -TRIM3 Δ RBCC; Expression von EGFP
pEGFP-N1-TRIM3	Subklonierung von TRIM3 aus pmRFP-N1-TRIM3 in pEGFP-N1 über <i>Bgl</i> III + <i>Sall</i>	Expression von EGFP-markiertem TRIM3
pEGFP-N1-TRIM3 Δ RBCC	Amplifizierung von TRIM3- Δ RBCC mit Oligos 15 + 16 aus pEGFP-C1-TRIM3, Insertion in pEGFP-N1 über <i>Bgl</i> III + <i>Sall</i>	Expression von EGFP-markiertem TRIM3 Δ RBCC
pGFP-Pur α	K.Kahlili (Temple University, Pennsylvania, USA)	Expression von GFP-markiertem Pur α
pGilda	Origene (Rockville, USA)	Klonierung von pGilda-KIF21B-Motor-, <i>Stalk</i> - und <i>Tail</i> -Domäne
pGilda-GABA α 1-TMIII-TMIV	S. Löbrich (Inst. Molekulare Neurogenetik, ZMNH, Hamburg)	Köder-Positivkontrolle im β -Galaktosidase-Test
pGilda-KIF21B-Motordomäne	Amplifizierung der KIF21B-Motordomäne mit Oligos 5 + 6 aus pCMV6-Entry-KIF21B; Insertion in pGilda über <i>Eco</i> RI + <i>Sall</i>	Expression von LexA-fusionierter KIF21B-Motordomäne (Köder-Konstrukt)
pGilda-KIF21B- <i>Stalk</i> -Domäne	Amplifizierung der KIF21B- <i>Stalk</i> -Domäne mit Oligos 7 + 8 aus pCMV6-Entry-KIF21B; Insertion in pGilda über <i>Eco</i> RI + <i>Sall</i>	Expression von LexA-fusionierter KIF21B- <i>Stalk</i> -Domäne (Köder-Konstrukt)
pGilda-KIF21B- <i>Tail</i> -Domäne	Amplifizierung der KIF21B- <i>Tail</i> -Domäne mit Oligos 9 + 10 aus pCMV6-Entry-KIF21B; Insertion in pGilda über <i>Eco</i> RI + <i>Sall</i>	Expression von LexA-fusionierter KIF21B- <i>Tail</i> -Domäne (Köder-Konstrukt)
pGW1-HA-Trim3	A.Y. Hung, M. Sheng (MIT, Cambridge, USA)	Expression von HA-markiertem TRIM3 (ORF aus <i>Rattus norvegicus</i>)
pGW1-HA-Trim3-C22S-C25S	A.Y. Hung, M. Sheng (MIT, Cambridge, USA)	Expression von HA-markierter TRIM3-Mutante (ORF aus <i>Rattus norvegicus</i>)
pJG4-5	Origene (Rockville, USA)	Klonierung von pJG4-5-linker und pJG4-5-TRIM3-RBCC-Domäne
pJG4-5-linker	Annealing der Oligos 11 und 12 und Insertion in den <i>Eco</i> RI + <i>Xho</i> I-geöffneten Vektor pJG4-5	Klonierung von pJG4-5-TRIM3 und pJG4-5-TRIM3 Δ RBCC
pJG4-5-Muskelin (AS 90-200)	S. Löbrich (Inst. Molekulare Neurogenetik, ZMNH, Hamburg)	Beute-Positivkontrolle im β -Galaktosidase-Test
pJG4-5-TRIM3	Exzision von TRIM3 aus pmRFP-N1-TRIM3 durch <i>Bgl</i> III + <i>Sall</i> , Insertion in pJG4-5-linker über <i>Bgl</i> III + <i>Xho</i> I	Expression von B42-fusioniertem TRIM3 (Beute-Konstrukt)

pGJ4-5-TRIM3 Δ RBCC	Exzision von TRIM3 Δ RBCC aus pEGFP-N1-TRIM3 Δ RBCC durch <i>Bgl</i> III + <i>Sall</i> , Insertion in pJG4-5-linker über <i>Bgl</i> III + <i>Xho</i> I	Expression von B42-fusioniertem TRIM3 Δ RBCC (Beute-Konstrukt)
pGJ4-5-TRIM3-RBCC-Domäne	Amplifizierung der TRIM3-RBCC-Domäne mit Oligos 13 + 14 aus pcDNA3-myc-TRIM3, Insertion in pJG4-5 über <i>Eco</i> RI + <i>Xho</i> I	Expression von B42-fusionierter TRIM3-RBCC-Domäne (Beute-Konstrukt)
pmRFP-N1	R.Y. Tsien (San Diego, USA)	Klonierung von pmRFP-N1-TRIM3
pmRFP-N1-TRIM3	Amplifizierung von TRIM3 mit Oligos 17 + 16 aus pEGFP-C1-TRIM3, Insertion in pmRFP-N1 über <i>Bgl</i> III + <i>Sall</i>	Klonierung von pEGFP-N1-TRIM3 und pJG4-5-TRIM3
pSUPER.neo+GFP	Oligoengine (Seattle, USA)	Klonierung von pSUPER.neo+GFP-KIF21B-shRNA und -scrambled-shRNA
pSUPER.neo+GFP-KIF21B-shRNA	Annealing der Oligos 1 und 2 und Insertion in den <i>Bgl</i> III/ <i>Hind</i> III-geöffneten Vektor pSUPER.neo+GFP	Expression von KIF21B-shRNA
pSUPER.neo+GFP-scrambled-shRNA	Annealing der Oligos 3 und 4 und Insertion in den <i>Bgl</i> III/ <i>Hind</i> III-geöffneten Vektor pSUPER.neo+GFP	Expression von scrambled-shRNA

Tabelle 3: Verwendete Vektoren

2.1.10 Oligonukleotide

Unmodifizierte Oligonukleotide für PCR, Sequenzierung und Erstellung hybridisierter Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) in HPSF-Qualität (*high purity salt free*) bezogen. Folgende Oligonukleotide wurden benutzt (verwendete Sequenzierungsprimer sind nicht gelistet):

Nr.	Verwendung	Sequenz (5' - 3')
1	KIF21B-shRNA-sense-Oligonukleotid gegen mRNA aus <i>Mus musculus</i>	gatccccCCACGATGACTTCAAGTTCttcaagag aGAACTTGAAGTCATCGTGttttta
2	KIF21B-shRNA-antisense-Oligonukleotid gegen mRNA aus <i>Mus musculus</i>	agcttaaaaaCCACGATGACTTCAAGTTCtctctt gaaGAACTTGAAGTCATCGTGggg
3	scrambled-shRNA-sense-Oligonukleotid	gatccccGCGCGCTTTGTAGGATTCGttcaagag aCGAATCCTACAAAGCGCGttttta
4	scrambled-shRNA-antisense-Oligonukleotid	agcttaaaaaGCGCGCTTTGTAGGATTCGtctctt gaaCGAATCCTACAAAGCGCGggg

5	KIF21B-Motordomäne <i>sense</i> -Primer	ccgGAATTCatggctggccagggcgact
6	KIF21B-Motordomäne <i>antisense</i> -Primer	taatGTTCGACctacaactccatctgcaggcg
7	KIF21B- <i>Stalk</i> -Domäne <i>sense</i> -Primer	taGAATTCatggagtacaaagcgggc
8	KIF21B- <i>Stalk</i> -Domäne <i>antisense</i> -Primer	ggatGTTCGACctaagtctgcacattgtagatg
9	KIF21B- <i>Tail</i> -Domäne <i>sense</i> -Primer	tccGAATTCgagaatggctatgcaagc
10	KIF21B- <i>Tail</i> -Domäne <i>antisense</i> -Primer	taatGTTCGACtcaagggtgggctgctgg
11	pJG4-5-linker <i>sense</i> -Oligonukleotid	aatcggggccttagatctatcgatccatgggctagctcgc gaccgcccggc
12	pJG4-5-linker <i>antisense</i> -Oligonukleotid	tcgagcccgggcccggctcgcgagctagcccatggatcga tagatctaaggccc
13	TRIM3-RBCC-Domäne <i>sense</i> -Primer	ttGAATTCatggcaaagagggaggacagc
14	TRIM3-RBCC-Domäne <i>antisense</i> -Primer	taCTCGAGtcatggcctttctgggaaggcctg
15	TRIM3 Δ RBCC <i>sense</i> -Primer	ttgAGATCTgatggccttcccagaaaggc
16	TRIM3 Δ RBCC <i>antisense</i> -Primer	taaGTTCGACagctggaggtatcgataggcc
17	TRIM3 <i>sense</i> -Primer	ttgAGATCTgatggcaaagagggaggacagc
18	TRIM3 <i>antisense</i> -Primer	taaCTCGAGctactggaggtatcgataggcc
19	TRIM3-Int4-FW-Primer	ccccatccacacgtgtgtc
20	TRIM3-Int4-RV-Primer	ctactgccaatgtgtctctg
21	TRIM3-KO-FW-Primer	gtgtgccaccatcagtgagatac

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Subklonierung eines DNA-Fragmentes wurde ein rekombinantes Plasmid mit der DNA-Sequenz von Interesse präparativ verdaut (2.2.6), der Restriktionsverdau gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5), das DNA-Fragment extrahiert (2.2.8) und die Konzentration bestimmt (2.2.9). Parallel wurde der leere Zielvektor präparativ verdaut (2.2.6), über Anionenaustauschersäulen aufgereinigt (2.2.8), die Konzentration bestimmt (2.2.9) und die 5'-Enden dephosphoryliert (2.2.7). Danach erfolgte die Ligation der Fragmente (2.2.10) und anschließende Transformation von *E. coli*-Zellen (2.2.12). Positive Klone, die das rekombinante Plasmid trugen, wurden nach Plasmid-DNA-Minipräparation (2.2.13) durch analytischen Verdau (2.2.6) identifiziert und durch DNA-Sequenzierung (2.2.14) überprüft.

Wenn eine Subklonierung nicht möglich war, wurde die DNA-Sequenz durch PCR amplifiziert, wobei rekombinante Plasmid-DNA als Matrize diente und über geschwänzelte Primer Restriktionsschnittstellen an das PCR-Produkt gefügt wurden (2.2.4). Der Reaktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5), das Amplifikat aus dem Gel eluiert (2.2.8) und präparativ verdaut (2.2.6). Nach erneuter Aufreinigung über Anionenaustauschersäulen (2.2.8) und Konzentrationsbestimmung (2.2.9) wurde das DNA-Fragment mit dem Zielvektor ligiert. Die Vorbereitung des Zielvektors und der weitere Verlauf der Klonierung erfolgte dabei wie zuvor bei der Subklonierung beschrieben.

2.2.2 Klonierung mit hybridisierten Oligonukleotiden

Zur Erweiterung der *multiple cloning site* des im Hefe-2-Hybrid-System verwendeten pJG4-5-Vektors (2.2.16) wurden zunächst ein *sense*- und ein *antisense*-Oligonukleotid mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen entworfen (Tabelle 4). Die von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisierten Oligonukleotide wurden mit sterilem H₂O auf eine Konzentration von 3 µg/µl eingestellt und 48 µl *Annealing*-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.4) mit 1 µl der *sense*- und *antisense*-Oligonukleotid-Lösung vermischt. Die Hybridisierung erfolgte mit Durchlaufen des folgenden Temperaturzyklus:

90 °C	4 min
70 °C	10 min
60 °C	5 min
50 °C	5 min
40 °C	5 min
30 °C	5 min
20 °C	5 min
10 °C	∞

Die Vektorvorbereitung und Ligation erfolgte wie zuvor beschrieben (2.2.1), allerdings wurde der geöffnete Vektor nicht dephosphoryliert, da unmodifizierte Oligonukleotide ohne Phosphatenden von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen wurden.

2.2.3 Klonierung von shRNA-Expressionsvektoren

Um die Translation spezifischer mRNA-Transkripte und damit die Expression bestimmter Gene herunterzuregulieren, wurde das RNA Interferenz-basierte pSUPER-RNAi-System verwendet (Brummelkamp *et al.*, 2002). RNA Interferenz (RNAi) bezeichnet einen in vielen eukaryotischen Zellen konservierten Mechanismus, bei dem doppelsträngige RNA

zur Degradation sequenzgleicher mRNA und damit zur posttranskriptionalen Gensuppression führt. Ein entscheidendes RNA-Intermediat in der RNAi-Signalkaskade ist die sogenannte siRNA (*short* oder *small interfering* RNA), eine 21-22 Nukleotide lange Doppelstrang-RNA mit kurzen 3'-Überhängen (Elbashir *et al.*, 2001). siRNA entsteht beim Zerschneiden eines längeren doppelsträngigen RNA-Vorläufers durch RNase III-Enzyme und führt letztlich durch Integration in den katalytisch aktiven *RNA-induced-silencing-complex* (RISC) zur Degradation der Ziel-mRNA (Elbashir *et al.*, 2001; Hammond, 2005). Die Vektoren des pSUPER-RNAi-Systems exprimieren unter dem H1 RNA Polymerase III-Promotor ein 60 Nukleotide langes Transkript, das sich zu einer Haarnadel-Struktur (shRNA oder *short hairpin* RNA) faltet und die endogene RNAi-Signalkaskade auslöst (Abb. 2.1). Dabei wird die shRNA über die endogenen RNase III-Enzyme zu funktioneller siRNA prozessiert, welche dann in den RISC-Komplex integriert wird (Paddison *et al.*, 2002).

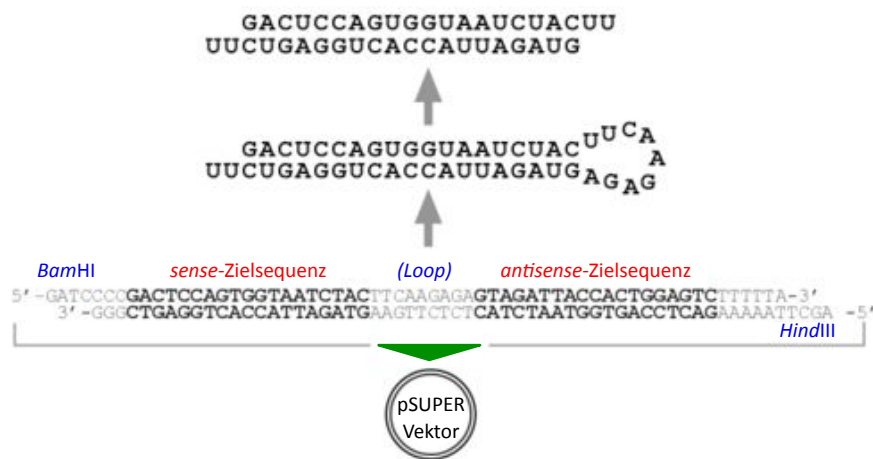


Abb. 2.1: Insertion von Oligonukleotiden in pSUPER-Vektoren und Prozessierung transkribierter shRNA zu funktioneller siRNA. Ziel-mRNA-spezifische, hybridisierte Oligonukleotide werden in den pSUPER-Vektor inseriert. Nach Transfektion eukaryotischer Zellen wird ein RNA-Transkript synthetisiert, das eine Haarnadel-Struktur bildet (shRNA/*short hairpin* RNA). Diese wird zu funktioneller siRNA prozessiert, die durch Integration in den RISC-Komplex zu RNAi-vermittelter Gensuppression führt. (Verändert aus dem Handbuch „pSUPER“, Oligoengine, Seattle, USA, 2004)

Zur Synthese der shRNA-Oligonukleotide wurden zunächst geeignete Zielsequenzen innerhalb der KIF21B-mRNA von *Mus musculus* (RefSeq-ID: NM_001039472.1) mit der Freeware „Ambion siRNA-Design“ (Ambion/Life Technologies, Darmstadt) und der Freeware „DSIR (Designer of Small Interfering RNA)“ (Vert *et al.*, 2006) identifiziert und

die Ergebnisse aus den beiden Datenbankenrecherchen auf Sequenzübereinstimmung geprüft. Es wurden drei Zielsequenzen ausgewählt und entsprechend der Herstellerangaben jeweils ein *sense*- und *antisense*-Oligonukleotid entworfen. Die *sense*-Oligonukleotide sind dabei folgendermaßen aufgebaut: 5' *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle - *sense*-Zielsequenz – *loop*-Sequenz – *antisense*-Zielsequenz – *Hind*III-Restriktionsschnittstelle (Abb. 2.1, Tabelle 4). Zur Klonierung der Vektoren wurden gemäß Herstellerangaben die *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide hybridisiert und in den über die Restriktionsenzyme *Bgl*II (*Bam*HI-kompatible Restriktionsschnittstelle) und *Hind*III geöffneten pSUPER.neo+GFP-Vektor ligiert. Der Vektor wurde vor der Ligation nicht dephosphoryliert, da unmodifizierte Oligonukleotide ohne Phosphatenden von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen wurden.

Der verwendete pSUPER-Vektor kodiert zusätzlich zu der shRNA EGFP unter dem PGK (Phosphoglyceratkinase)-Promotor, so dass transfizierte Zellen, die die shRNA exprimieren, durch Fluoreszenzdetektion identifiziert werden können. Zu Kontrollzwecken wurde das Konstrukt pSUPER.neo+GFP-*scrambled*-shRNA kloniert. Das von diesem Vektor synthetisierte Transkript enthält eine Nukleotidfolge, die mit keiner mRNA-Sequenz aus Säugetieren übereinstimmt und somit zu keiner RNAi-vermittelten Gensuppression führen sollte. Die verwendete Sequenz ist identisch mit der des *scrambled*-Kontrollvektors pSUPER.Mamm-X von Oligoengine (Chen *et al.*, 2010) und in Tabelle 4 aufgeführt. Von den drei klonierten KIF21B-shRNA-Expressionskonstrukten ist nur das mit der höchsten *Knockdown*-Effizienz aufgelistet (Tabellen 3 und 4), da nur dieses in Experimenten dieser Arbeit verwendet wurde.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten zu Klonierungszwecken wurde die korrekturlesende *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verwendet, wobei in der Regel 25 ng Plasmid-DNA als Matrize eingesetzt wurden. Die verwendeten *sense*- und *antisense*-Primer trugen jeweils an den 5'-Enden Restriktionsschnittstellen zur Insertion in den gewünschten Zielvektor und eventuell zusätzliche Nukleotide, um ein korrektes Leseraster zu bewahren. Zur Genotypisierung (2.2.15) wurde die *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt)

verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze und der Temperaturzyklen orientierte sich an den Hersteller-Protokollen der Polymerasen.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden je nach Fragmentgröße in 1-2%igen Agarosegelen aufgetrennt, die zur Sichtbarmachung der DNA das fluoreszente Nukleinsäure-Färbemittel „GelRed Nucleic Acid stain“ (Biotium, Hayward, USA) enthielten. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TAE durch Aufkochen gelöst und im Verhältnis 1:10.000 mit „GelRed Nucleic Acid stain“ versetzt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Die DNA wurde in DNA-Ladepuffer aufgenommen, auf das Gel aufgetragen und bei etwa 7-10 V/cm Gellänge elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte mit dem „Intas Gel Imager“ (Intas, Göttingen). Als Größenmarker wurde der Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde) verwendet.

2.2.6 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde mit Typ-II Restriktionsendonukleasen nach Angaben der Hersteller verdaut. Analytische Verdaue zum Durchmustern einer großen Anzahl Klone wurden in einem Volumen von 15 µl mit 1 µg DNA, präparative Verdaue zu Klonierungszwecken in Volumina von 50-100 µl mit bis zu 4 µg DNA durchgeführt. Pro 1 µg DNA wurde in der Regel 1 Unit des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt und die Reaktionsansätze in vom Hersteller empfohlenen Puffer und bei entsprechender Temperatur für 1-3 h inkubiert. Die Ansätze wurden entweder über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.5) oder wie unter 2.2.8 beschrieben aufgereinigt.

2.2.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation geschnittener Vektoren zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase (rAPid Alkaline Phosphatase; Roche, Mannheim) entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgte dabei entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

2.2.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Reaktionen wurden stets über Agarose-Gelelektrophorese (2.2.5) aufgereinigt, um spezifische von unspezifischen PCR-Produkten zu trennen. Auch präparative

Restriktionsverdau rekombinanter Plasmide wurden elektrophoretisch aufgetrennt, um Vektorrückgrat und inserierte DNA zu trennen. Die Fragmente der erwarteten Größe wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des „Agarose Gel DNA Extraction Kits“ (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben eluiert. Leervektoren und wie zuvor beschrieben isolierte PCR-Produkte wurden nach Restriktionsverdau über Anionenaustauschersäulen mittels „E.Z.N.A Cycle Pure Kit“ (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.9 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen und DNA-Reinheit erfolgte photometrisch unter Verwendung der NanoQuant-Platte des Infinite 200 PRO NanoQuant-Mikrotiterplattenlesers von Tecan (Männedorf, Schweiz).

2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Vektor und DNA-Fragment erfolgte unter Verwendung der T4 DNA Ligase von Fermentas (St. Leon-Rot). In der Regel wurden 50 ng Vektor und der dreifache molare Überschuss an DNA-Fragment eingesetzt (Crouse *et al.*, 1983). Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes erfolgte nach Herstellerangaben und wurde für 1 h bei RT inkubiert. Zur anschließenden Transformation von *E. coli*-Zellen (2.2.12) wurde die Hälfte des Ligationsansatzes eingesetzt.

2.2.11 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde in Anlehnung an Inoue *et al.* (1990) zunächst eine 3 ml-Vorkultur von *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-Blue in TB-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurde eine Maxikultur in 1000 ml TB-Medium angeimpft und diese bei 18 °C bis zu einer OD600 von 0,6 inkubiert (24-40 h). Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurde die Bakterienkultur bei 4 °C für 10 min mit 3000 rpm im Beckmann JA-10 Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 380 ml kaltem TBjap-Medium mit 2% (v/v) DMSO resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C für 10 min mit 3000 rpm im Beckmann JA-10 Rotor wurde das Pellet in 74,4 ml kaltem, DMSO-freien TBjap-Medium resuspendiert und mit

5,6 ml DMSO versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.12 Transformation von Bakterien

Die Transformation von *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue erfolgte nach einer modifizierten Methode von Inoue *et al.* (1990). Pro Ansatz wurden 100 μl chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (2.2.11) auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden mit 1,7 μl β -Mercaptoethanol (1:10 in H_2O verdünnt) versetzt und für 10 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 1/2 Volumen Ligationsansatz (2.2.10) oder 20 ng Plasmid-DNA und Inkubation für 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 40 sec bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Zellen wurden für 2 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 800 μl LB-Medium für 45 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder für 72 h bei RT inkubiert.

2.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Isolierung von reiner Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung der unter 2.1.7 gelisteten Reaktionskomplettausstattungen durch alkalischen Lyse und anschließende Aufreinigung der DNA über Anionenaustauschersäulen. Zur Durchmusterung einer größeren Anzahl von Klonen erfolgte die Plasmid-DNA-Isolierung durch alkalische Lyse nach einem modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly (1979). Alle Zentrifugationsschritte wurden bei maximaler Geschwindigkeit (14.000 rpm) in einer 5417C-Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. 2 ml Bakterienkultur wurden für 1 min zentrifugiert und das Pellet unter Zugabe von 1 μl RNase A (10 mg/ml) in 200 μl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 200 μl alkalischer Lösung II versetzt, der Ansatz durch Invertieren des Reaktionsgefäßes vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl Lösung III und Mischen durch Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 450 μl Isopropanol versetzt. Nach 20-minütiger Zentrifugation wurde das Pellet mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen, 5 min zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 μl H_2O aufgenommen.

2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Sequenzier-Serviceeinheit des ZMNH unter Leitung von PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich mit einem ABI Prism® 377 DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung des „BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte über die Freeware „4Peaks“ (Mekentosj, Aalsmeer, Niederlande). Für die Sequenzauswertung wurde die Software „DNA Strider 1.4f1“ (CEA, Gif-sur-Yvette Cedex, Frankreich) verwendet.

2.2.15 Genotypisierung von *Trim3-Knockout*-Mäusen

Die Genotypisierung der *Trim3-Knockout*-Mäuse (2.1.4) wurde mit genomischer DNA aus lysierten Schwanzbiopsien durchgeführt. Dazu wurde jede Biopsie mit 200 µl Schwanzbiopsie-Lysis-Puffer versetzt und über Nacht bei 55 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Proteinase K durch 15-minütige Inkubation bei 95 °C. Die lysierten Biopsien wurden bei 4 °C gelagert. Zur Genotypisierung wurden folgende Primer eingesetzt: TRIM3-Int4-FW-Primer (19), TRIM3-Int4-RV-Primer (20) und TRIM3-KO-FW-Primer (21) (Nummerierung siehe Tabelle 4). Die Primer 19 und 20 flankieren das 3'-Ende der im *Knockout*-Tier deletierten Gensequenz und resultieren mit DNA aus Wildtypmäusen in einem 179 bp -Fragment. Mit DNA von *Knockout*-Mäusen gibt es kein Amplifikat, da Primer 19 aufgrund der Deletion nicht binden kann. Primer 21 liegt stromaufwärts vom 5'-Ende der deletierten Gensequenz und bindet sowohl in DNA von *Knockout*- als auch von Wildtypmäusen, führt aber in Kombination mit Primer 20 zu unterschiedlich großen PCR-Produkten (Wildtyp-DNA: ca. 2.5 kb, *Knockout*-DNA: 462 bp). Die Genotypisierungs-PCR erfolgte in einem Volumen von 25 µl mit der *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt) in folgendem Reaktionsansatz:

2 µl genomische DNA
2.5 µl 10x Puffer
0.75 µl 50 mM MgCl₂
0.5 µl DMSO
2.5 µl dNTP-Mix (2 mM je Nukleotid)
0.5 µl TRIM3-Int4-FW-Primer (10 pmol/µl)
0.5 µl TRIM3-Int4-RV-Primer (10 pmol/µl)
0.5 µl TRIM3-KO-FW-Primer (10 pmol/µl)
0.25 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5U/µl)
15 µl H₂O

Folgende Temperaturzyklen wurden verwendet:

1.	95 °C	5 min
2.	95 °C	30 sec
3.	62 °C	30 sec
4.	72 °C	1 min
(33x Wiederholung der Zyklen 2-4)		
5.	72 °C	7 min
6.	4 °C	∞

Die PCR-Reaktionsansätze wurden nach Durchlaufen der Temperaturzyklen gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5) und die Fragment-Größen unter Verwendung des Intas Gel Imagers (Intas, Göttingen) dokumentiert.

2.2.16 Das Hefe-2-Hybrid-System

Das 2-Hybrid-System ist eine Methode zur Untersuchung direkter Protein-Protein-Interaktionen und macht sich ursprünglich den modularen Aufbau des Transkriptionsfaktors GAL4 in DNA-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne zu nutze (Fields und Song, 1989). Bei separater Expression der Domänen findet keine Transkription der Gene unter dem GAL4-Promotor statt. Werden die DNA-Binde- und die Aktivierungsdomäne aber jeweils mit Proteinen fusioniert, die miteinander interagieren, werden die beiden Domänen durch diese Interaktion in räumliche Nähe gebracht, so dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors wieder hergestellt wird und Genexpression stattfinden kann. In dieser Arbeit wurde das DupLEX-A Hefe-2-Hybrid-System von Origene (Rockville, USA) verwendet, das anstelle des eukaryotischen GAL4-Transkriptionsfaktors zwei prokaryotische Proteine zur Rekonstitution eines funktionellen hybriden Transkriptionsfaktors verwendet. In diesem System wird ein „Köder-Protein“ durch Klonierung in den pGilda-Vektor mit dem DNA-Binde-Protein LexA fusioniert. Das „Beute-Protein“ wird durch Klonierung in den pJG4-5-Vektor mit der Aktivierungsdomäne des Proteins B42 fusioniert. Bei Interaktion von Köder und Beute wird ein funktioneller Transkriptionsfaktor rekonstituiert, was die Transkription von Reportergenen erlaubt. Als Reportergen wurde das lacZ-Gen zur Expression der β -Galaktosidase verwendet und eine direkte Protein-Protein-Interaktion im β -Galaktosidase-Test untersucht (2.2.16.2).

2.2.16.1 Transformation von Hefen mit Köder- und Beute-Konstrukt

Die Transformation der Hefen vom Stamm EGY48 mit pGilda-Köder- und pJG4-5-Beute-Vektoren erfolgte sukzessiv unter Verwendung verschiedener SC-Glukose-Selektivmedien. Zunächst wurden 50 ml YPD-Vollmedium-Flüssigkultur mit einer einzelnen Hefekolonie angeimpft. Wenn die Kultur eine OD von 0,6 erreicht hatte, wurden die Zellen pelletiert und in sterilem H₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Hefen in 300 µl TE/LiAc-Puffer aufgenommen. Pro Ansatz wurden 100 µl Hefesuspension, 50 µg Träger-DNA (5 mg/ml; zur Denaturierung frisch aufgekochte DNA aus Lachssperma; Sigma, Taufkirchen), 0,3 µg Plasmid-DNA und 600 µl PEG/LiAc-Puffer gemischt und 30 min bei 30 °C geschüttelt. Nach Zugabe von 70 µl DMSO wurde ein Hitzeschock von 15 min bei 42 °C durchgeführt. Schließlich wurden die Zellen pelletiert, mit sterilem H₂O gewaschen und auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsdruck ausgestrichen (nach Transformation mit pGilda-Vektor: SC-Glukose-Platten ohne Histidin; nach Transformation mit pGilda- und pJG4-5-Vektor: SC-Glukose-Platten ohne Histidin und Tryptophan). Doppelt transformierte Hefen konnten nun für den β-Galaktosidase-Test verwendet werden (2.2.16.2).

2.2.16.2 β-Galaktosidase-Test

Zur Untersuchung einer direkten Interaktion zwischen Köder- und Beute-Protein wurde eine Blau-Weiss-Selektionierung mittels eines β-Galaktosidase-Tests auf X-Gal-haltigen Agarplatten durchgeführt. Hierzu wurden Hefen nach Doppeltransformation mit pGilda-Köder- und pJG4-5-Beute-Vektoren zusätzlich mit dem LacZ-Reporterplasmid pSH18-34 transformiert (2.2.16.1). Dreifach-transformierte Hefen wurden dabei mit SC-Glukose-Platten ohne Histidin, Tryptophan und Uracil selektioniert. Für den β-Galaktosidase-Test wurden diese Hefen dann auf Agarplatten von SC-Galaktose-X-Gal-Medium ausgestrichen. Das LacZ-Reporterplasmid kodiert das β-Galaktosidasegen unter der Kontrolle eines Galaktose-abhängigen, LexA-Bindestellen enthaltenden GAL1-Promotors. Im Falle einer Interaktion von Köder- und Beute-Fusionsprotein und Rekonstitution des LexA/B42-Transkriptionsfaktors wird dieses Enzym exprimiert und kann anhand der Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff nachgewiesen werden.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Differenzielle Zentrifugation

Die differenzielle Zentrifugation von Hirnlysaten aus Ratten oder Mäusen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Saito *et al.* (1997). Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Es wurden entweder ganze Gehirne von P10-alten Ratten oder Hippokampi von Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen im Alter von P10 bis P15 verwendet. Die Tiere wurden dekaptiert, die Hirne bzw. Hippokampi entnommen und in eiskaltem IM-Ac-Puffer mit Protease Inhibitor Tabletten (Roche, Mannheim), 5 mM DTT, 2 mM MgATP und 1 mM PMSF in einem Glas-Teflon Homogenisator mit 10 Stößen bei 800 rpm homogenisiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation mit 1.000 x g für 10 min bei 4 °C geklärt. Das P1-Pellet (Kerne, unaufgeschlossene Zellen) wurde verworfen. Der Überstand S1 wurde entweder aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder mit 10.000 x g für weitere 10 min bei 4 °C sedimentiert. Das so gewonnene P2-Pellet, das große Membranorganellen und -bruchstücke enthält, wurde in IM-Ac-Puffer resuspendiert, aliquotiert und schockgefroren. Um Vesikel zu sedimentieren, wurde der Überstand S2 für 1 h mit 100.000 x g bei 4 °C ultrazentrifugiert. Das entstandene P3-Pellet wurde wiederum in IM-Ac-Puffer resuspendiert, aliquotiert und schockgefroren. Der Überstand S3 aus dieser Ultrazentrifugation wurde für 1 h mit 400.000 x g bei 4 °C ultrazentrifugiert und das hierbei gewonnene P4-Pellet, das restliche kleine Vesikel und große Proteinkomplexe enthält, ebenfalls in IM-Ac-Puffer resuspendiert aliquotiert und schockgefroren. Auch der zytosolische S4-Überstand wurde aliquotiert und schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Bradford-Reagenz basierte "Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate" (Bio-Rad, München) verwendet.

2.3.2 Koimmunpräzipitation

Für Koimmunpräzipitationen wurden „Dynabeads Protein G“ von Life Technologies (Darmstadt) verwendet, die Waschschrte erfolgten unter Zuhilfenahme des "DynaL MPC" (*DynaL Magnetic Particle Concentrator*). Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. 30 µl Dynabeads wurden 3x mit IP-Puffer gewaschen und anschließend mit 2.5-6 µg Antikörper in 800 µl IP-Puffer über Nacht im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Die Dynabeads mit den immobilisierten Antikörpern wurden 2x mit IP-Puffer und 1x mit IM-Ac-Puffer gewaschen und anschließend mit 500 µl-Aliquots der differenziell zentrifugierten Rattenhirnlysate (2.3.1) inkubiert. Die Hirnlysate waren zuvor über Nacht

im Über-Kopf-Schüttler mit 30 µl Dynabeads und 1% f.c. Triton-X-100 präinkubiert worden, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Das Detergenz solubilisiert dabei vesikuläre Membranen und trennt dadurch Proteine, die nur dasselbe Vesikel, aber nicht denselben Proteinkomplex teilen. Als Negativkontrolle wurden 30 µl Dynabeads mit unspezifischen Immunglobulinen aus der Spezies des immobilisierten Antikörpers beladen und mit dem gleichen Hirnlysate inkubiert. Die Inkubation der Antikörper-gekoppelten Dynabeads mit den Hirnlysaten erfolgte für 30 min im Über-Kopf-Schüttler. Danach wurden die Dynabeads 4x mit modifiziertem RIPA-Puffer gewaschen, wobei jeder Waschschrift für 15 min im Über-Kopf-Schüttler erfolgte. Abschließend wurde einmal kurz mit 1x PBS gewaschen und der Überstand sauber abgenommen. Die Dynabeads wurden in 45 µl 1x PBS aufgenommen, mit 15 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und der Ansatz für 15 min bei 95 °C hitzedenaturiert. Aliquots der Proben wurden durch SDS-PAGE (2.3.4) aufgetrennt und nach Western Blot Verfahren immundetektiert (2.3.5 und 2.3.6).

2.3.3 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Um Zelloberflächenproteine mit Biotin zu markieren und diese anschließend mit Streptavidin zu präzipitieren, wurden 35 mm-Kulturschalen mit kultivierten hippokampalen Neuronen (2.4.2) im Alter von DIV14 zweimal vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und mit 1 mM Biotinylierungsreagenz (Biotinamidohexansäure 3-sulfo-N-hydroxysuccinimidester Natriumsalz, Sigma, Taufkirchen) in HEPES-Puffer für 20 min bei 4 °C inkubiert. Da bei 4 °C keine Endozytose mehr stattfindet, verbleiben die biotinylierten Proteine dabei an der Zelloberfläche. Die Biotinylierungsreaktion wurde durch zweimalige 20-minütige Inkubation bei 4 °C mit 100 mM Glyzin in HEPES-Puffer beendet, wobei die Zellen zwischen den Inkubationschritten 2x vorsichtig mit HEPES-Puffer gewaschen wurden. Anschließend erfolgte die Lyse mit 400 µl Zelllysis-Puffer (2.4.3) und die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce Biotechnology, Rockford, USA).

Zur Isolierung bzw. Präzipitation der biotinylierten Oberflächenproteine wurden „MyOne Streptavidin C1“-Dynabeads von Life Technologies (Darmstadt) verwendet. Die Waschschriffe erfolgten mit Hilfe des “Dynal MPC” (*Dynal Magnetic Particle Concentrator*), alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. 40 µl Dynabeads wurden zweimal mit 1x PBS/1% (v/v) Triton-X-100 gewaschen, für 3 h mit

100 µg biotinyliertem Zelllysate im Über-Kopf-Schüttler inkubiert und anschließend 3x 6 min mit 1x PBS/1% (v/v) Triton-X-100 gewaschen. Abschließend wurde einmal kurz mit 1x PBS gewaschen und der Überstand sauber abgenommen. Die Dynabeads wurden in 45 µl 1x PBS aufgenommen, mit 15 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und der Ansatz für 15 min bei 95 °C hitzedenaturiert. Aliquots der so isolierten Oberflächenproteine und des „Input“-Zelllysates wurden durch SDS-PAGE (2.3.4) aufgetrennt und nach Western Blot Verfahren immunodetektiert (2.3.5 und 2.3.6). Durch Bildung des Quotienten „Oberflächensignal/ Input-Signal“ wurde der relative Oberflächengehalt eines Proteins bestimmt.

2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch denaturierende SDS-PAGE im „Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System“ von Bio-Rad (München). Es wurden 8%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele mit 40% (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamidlösung nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt. Die Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Gel mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 15 min bei 95 °C hitzedenaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von ca. 130 V pro Gel in 1x SDS-Laufpuffer. Anschließend wurden die Proteine durch Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert (2.3.5). Als Größenmarker wurde der „Precision Plus Protein Dual Color Standards“ (Bio-Rad, München) verwendet.

2.3.5 Western Blot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (2.3.4) wurden unter Verwendung des „Mini Trans-Blot Cell“-Systems (Bio-Rad, München) im *Wet Blot*-Verfahren auf eine PVDF-Membran der Porengröße 0.45 µm (Hybond-P, Amersham, Freiburg) transferiert. Vor dem Blot wurden sechs Whatman-Papiere und die Membran passgenau auf die Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurde vor dem Äquilibrieren kurz in Methanol aktiviert. Der Blot wurde ausgehend von der Kathodenseite wie folgt aufgebaut: Schaumstoffpad (Bio-Rad, München), drei Lagen Whatman-Papier, SDS-Gel, Membran, drei Lagen Whatman-Papier, Schaumstoffpad. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 90 min.

2.3.6 Immundetektion

Um auf einer PVDF-Membran immobilisierte Proteine durch spezifische Antikörper nachzuweisen, wurde die Membran zunächst für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer blockiert. Je nach verwendetem Primärantikörper fand die Blockierung dabei mit 5% Magermilchpulver oder 1% BSA (Bovines Serumalbumin) in 1x TBST statt. Die Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte unter leichtem Schütteln im gleichen Puffer, wobei der Primärantikörper in der Regel bei 4 °C über Nacht und der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert wurden. Die Membran wurde nach jedem Inkubationsschritt 3x 15 min mit 1x TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem Chemolumineszenz-basierten „ImmobilonWestern HRP Substrat“-Kit (Millipore, Schwalbach/Ts) nach Angaben des Herstellers. Zur Dokumentation wurden entweder lichtempfindliche Filme (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) oder das CCD-Kamera-basierte System „Intas ChemoCam“ (Intas, Göttingen) verwendet. Die Auswertung der Signalintensitäten zur quantitativen Analyse erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben.

Sollten Proteine ähnlicher Größe auf derselben Membran detektiert werden, wurde die Membran nach der ersten Detektion *gestrippt*, um gebundene Antikörper zu entfernen, und anschließend erneut detektiert. Dazu wurde die Membran in H₂O gewaschen und für 30 min bei 50 °C in *Stripping*-Puffer unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die *gestrippte* Membran wurde in 1x TBST gewaschen, blockiert und erneut mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert, um Restsignale des ersten Primärantikörpers auszuschließen. Erst dann erfolgte wie zuvor beschrieben die Inkubation und Detektion eines zweiten Primärantikörpers. Die verwendeten Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet.

2.3.7 Coomassiefärbungen von PVDF-Membranen

Proteine auf PVDF-Membranen wurden mit Coomassie-Blau angefärbt, um einen gleichmäßigen Proteintransfer beim Western Blot und ein Beladen der SDS-Gele mit gleichen Proteinmengen zu überprüfen. Dazu wurde die Membran für 1h in Coomassie-Färbelösung bei RT geschüttelt und anschließend so lange in Coomassie-Entfärbelösung unter Schütteln inkubiert, bis der Hintergrund klar wurde (ca. 0.5–1 h). Die Membran wurde an der Luft getrocknet und zur Dokumentation eingescannt.

2.4 Zellbiologische Methoden

Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank und unter Verwendung sterilisierter Gefäße und Reagenzien durchgeführt. Alle Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5% (v/v) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

2.4.1 Kultur von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden in HEK293-Medium kultiviert und alle 2 bis 3 Tage je nach Konfluenz im Verhältnis 1:4 bis 1:8 passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und durch 2-3-minütige Inkubation mit 1 ml Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin-EDTA (1x), Life Technologies, Darmstadt) bei 37 °C von der Kulturschale und aus dem Zellverband gelöst. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von HEK293-Medium gestoppt, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und anschließend in entsprechender Verdünnung auf Kulturschalen mit vorgewärmtem Medium verteilt.

2.4.2 Präparation und Kultur primärer hippokampaler Neurone

Zur Kultivierung hippokampaler Neurone wurden neugeborene (P0) Ratten oder Mäuse durch Dekapitation getötet und die Hippokampi in eiskaltem 1x PBS/10 mM Glukose herauspräpariert. Zur Vereinzlung der Zellen wurden die isolierten Hippokampi in 5 ml 1x PBS/10 mM Glukose mit 10 µg/ml DNase I (Roche, Mannheim) und 0.5 mg/ml Papain (Sigma, Taufkirchen) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen in 10 ml DMEM/F-12 complete wurden die Zellen in 2 ml desselben Mediums mit abgeschmolzenen Pasteurpipetten unterschiedlicher Größe vorsichtig trituriert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt und mit DMEM/F-12-complete die gewünschte Zellzahl/ml eingestellt. Folgende Zellzahlen wurden ausgesät: 12 mm-Glasplättchen in 24-well-Zellkulturplatten: 110.000 Zellen/Glasplättchen; 35 mm-Kulturschalen: 600.000 Zellen/Kulturschale; 4-well-Lab-Tek-II-Chambered-Coverglass-Schalen (*Timelapse*-Schalen; Nunc, Langenselbold): 110.000 Zellen/Kammer. Die 35 mm-Kulturschalen und *Timelapse*-Schalen waren zuvor mit 0.01 % (v/v) Ornithin (Sigma, Taufkirchen) über Nacht bei 37 °C beschichtet und anschließend dreimal mit H₂O gewaschen worden. Die Beschichtung der 12 mm-Glasplättchen erfolgte erst mit 1.5 µg/ml

Poly-L-Lysin in PBS und anschließend mit 20 µg/ml Laminin in Tris-gepufferter NaCl-Lösung (beides Sigma, Taufkirchen), wobei die Beschichtungen jeweils bei 4 °C über Nacht erfolgten und 3x mit H₂O gewaschen wurden. Die Kulturen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. 5-6 h nach dem Ausplattieren wurde das Medium abgenommen und durch 1 ml Neurobasalmedium ersetzt. Nach 3-5 weiteren Tagen *in vitro* (DIV3-5) wurde 1.5 µM f.c. (β-D-Arabinofuranosyl)-Cytosin (AraC) (Sigma, Taufkirchen) zu den Kulturen gegeben, um die Proliferation von Astrozyten zu stoppen. An DIV7 wurde ein Drittel des Kulturmediums durch frisches Neurobasalmedium ersetzt.

2.4.3 Lysis kultivierter Zellen

In 10 cm-Schalen kultivierte HEK293-Zellen wurden in 1 ml Zelllysis-Puffer geerntet. Kultivierte hippocampale Neurone, die auf 12-mm-Glasplättchen ausgesät worden waren, wurden in einem Volumen von 125 µl Zelllysis-Puffer geerntet. Es wurde jeweils das Medium abgenommen, die Zellen vorsichtig mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, Zelllysis-Puffer auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht) abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und zur Lyse der Zellmembran für 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min mit 1.000 x g bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce Biotechnology, Rockford, USA).

2.4.4 Cycloheximid-*chase*-Experiment

Zur Bestimmung von Proteinhalbwertszeiten wurden auf 12 mm-Glasplättchen ausgesäte, hippocampale Mausneurone (2.4.2) im Alter von DIV16 nach unterschiedlich langer Inkubation mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid wie unter 2.4.3 beschrieben geerntet. Cycloheximid wurde dabei von Sigma (Taufkirchen) als fertige Lösung bezogen (100 mg/ml in DMSO) und in einer Endkonzentration von 70 µM zum konditionierten Medium auf die Neuronen gegeben. Nach Lysis der Zellen und Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) wurden gleiche Proteinmengen nach Western Blot durch Immundetektion analysiert (2.3.5 und 2.3.6).

2.4.5 Transfektion

HEK293-Zellen wurden mit Hilfe von Kalziumphosphat nach einer Standardmethode transfiziert (Chen und Okayama, 1987). Die Zellen wurden wie beim Passagieren zunächst vereinzelt (2.4.1) und in 10 cm-Kulturschalen ausgesät. Die Transfektion erfolgte dann bei einer Konfluenz von ca. 30-50%. 10 µg Plasmid-DNA wurden mit 75 µl 1 M CaCl₂ versetzt und mit H₂O auf ein Volumen von 300 µl gebracht. Anschließend wurde die DNA-Kalzium-Lösung langsam zu 300 µl 2x HBS hinzupipettiert, wobei die 2x HBS-Lösung vorsichtig gevortext wurde. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde der Transfektionsmix zum Medium über den Zellen hinzutropft und die Zellen bis zum Ernten (2.4.3) bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ kultiviert. Die Expressionsdauer betrug in der Regel 24 h. Bei Doppeltransfektionen wurden 5 µg Plasmid-DNA je Konstrukt eingesetzt.

Die Transfektion neuronaler Primärkulturen (2.4.2) erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll zwischen DIV9 und DIV11. Für die Transfektion von Zellen auf einem 12 mm-Glasplättchen wurden 2 µg Plasmid-DNA mit 6.25 µl 1 M CaCl₂ versetzt und mit H₂O auf ein Volumen von 25 µl gebracht. Anschließend wurde die DNA-Kalzium-Lösung langsam zu 25 µl 2x HBS hinzupipettiert, wobei die 2x HBS-Lösung vorsichtig gevortext wurde. Nach 15 min Inkubation des Transfektionsmixes bei RT wurde das konditionierte Medium auf den Zellen bis auf eine Menge von ca. 300 µl abgenommen und separat aufbewahrt (ca. 600 µl). Der Transfektionsmix wurde nun vorsichtig zu den Zellen getropft und die Kultur für 1 h bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Dann wurde das Transfektionsmedium abgenommen, die Zellen 2x kurz mit vorgewärmten HEPES-Puffer gewaschen, das zuvor separierte Medium zurück auf die Zellen gegeben und mit frischem Neurobasalmedium auf 1 ml aufgefüllt. Bei Doppeltransfektionen mit EGFP-Leervektor wurden 1.5 µg rekombinante Plasmid-DNA und 0.5 µg des Leervektors eingesetzt. Die Expressionsdauer betrug je nach Konstrukt 15 h bis 4 d. Abschließend wurden die transfizierten Zellen durch *Timelapse*-Videomikroskopie (2.4.7) oder mittels Immunzytochemie (2.4.6) analysiert.

2.4.6 Immunzytochemie

Auf 12 mm-Glasplättchen kultivierte hippokampale Neurone wurden vorsichtig mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen durch 12-minütige Inkubation mit Paraformaldehydlösung bei RT. Die fixierten Neurone wurden 3x mit 1x PBS

gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellmembran für 4 min mit 1x PBS/0,25% (v/v) Triton-X-100 inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit 1x PBS wurden die Zellen zur Minimierung unspezifischer Bindungen für 1 h in Blockierungspuffer (1% (w/v) BSA in 1x PBS) bei RT blockiert. Die Zellen wurden dann bei 4 °C über Nacht – oder alternativ für 2 h bei RT - mit entsprechend verdünntem Primärantikörper (siehe Tabelle 1) in Blockierungspuffer inkubiert, wobei transfizierte Zellen, die fluoreszierende Proteine exprimierten, im Dunkeln inkubiert wurden, um ein Ausbleichen zu verhindern. Die Zellen wurden 4x 4 min in 1x PBS gewaschen und für 1 h mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2) bei RT in Blockierungspuffer im Dunkeln inkubiert. Nach 4 Waschschritten in 1x PBS wurden die Glasplättchen mit AquaPoly/Mount (Polysciences, Eppelheim) auf Objektträgern fixiert, und diese über Nacht bei RT im Dunkeln getrocknet. Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4 °C unter Lichtausschluss. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden durch konfokale *Laser-scanning* Mikroskopie mit dem Mikroskop Olympus Fluoview FV1000 (Olympus, Hamburg) und der Software Olympus Fluoview (Version 2.1b) dokumentiert und die Fluoreszenzintensitäten wie unter 2.5.2 beschrieben ausgewertet.

Zur sequenziellen Immunfärbung mit zwei Primärantikörpern aus der selben Wirtsspezies (anti-KIF21B- und anti-TRIM3-Antikörper aus „Kaninchen“) wurden die Zellen wie zuvor beschrieben fixiert und permeabilisiert, die Blockierung und Inkubation der Erst- und Zweitantikörper erfolgte aber in Eseserum-haltigem Blockierungspuffer (2.5% (v/v) Eseserum in 1x PBS). Nach Fixierung und Blockierung der Zellen wurde mit dem ersten Primärantikörper (anti-KIF21B) inkubiert, dann erfolgte die Inkubation mit dem ersten, Cy3-markierten Sekundärantikörper gegen „Kaninchen“. Hierbei ist entscheidend, dass ein monovalenter Sekundärantikörper verwendet wurde, da bei Verwendung eines bivalenten Sekundärantikörpers der zweite Primärantikörper aus „Kaninchen“ an offene Bindestellen des ersten Sekundärantikörpers binden kann. Zudem wurde der erste Sekundärantikörper in hoher Konzentration (1:125 anstatt 1:500) eingesetzt, um möglichst alle Bindestellen des anti-KIF21B-Antikörpers abzusättigen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (anti-TRIM3) und abschließend die Inkubation mit dem zweiten, Cy5-markierten Sekundärantikörper gegen „Kaninchen“. In parallel durchgeführten Kontrollfärbungen wurde anstatt des ersten oder zweiten Primärantikörpers jeweils nur mit Blockierungspuffer inkubiert. So konnte durch Analyse von Cy-Signalen in den

Leerinkubationen abgeschätzt werden, ob der erste Sekundärantikörper auch mit dem zweiten Primärantikörper reagiert (verbleibendes Cy3-Signal ohne anti-KIF21B-Inkubation) oder ob der zweite Sekundärantikörper mit dem ersten Primärantikörper reagiert (verbleibendes Cy5-Signal ohne anti-TRIM3-Inkubation).

2.4.7 *Timelapse*-Videomikroskopie

Für die *Timelapse*-Videomikroskopie wurden hippokampale Mausneurone verwendet, die in 4-well-Lab-Tek-II-Chambered-Coverglass-Schalen ausgesät worden waren (2.4.2). Die Zellen wurden im Alter von DIV8-10 transfiziert (2.4.5) und nach 15-24 h Expression mikroskopiert. Zum Erstellen von *Timelapse*-Aufnahmen wurde das konditionierte Medium durch vorgewärmten HEPES-Puffer ersetzt, die Analyse der Zellen erfolgte dann am inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Jena) bei einer konstanten Temperatur von 37 °C in einer Inkubationskammer (Harnischmacher-Labortechnik, Kassel). Mit Hilfe der Software MetaVue 6.2r6 (Molecular Devices, München) wurden Aufnahmen über einen Zeitraum von 5 min mit einem Intervall von 3-5 sec gemacht und erfasst. Die Auswertung dieser *Timelapse*-Aufnahmen erfolgte dann semi-manuell mit der Software Metamorph Version 6.3r7 (Molecular Devices, München) (2.5.3).

2.4.8 Elektronenmikroskopie

Die *postembedding* Immunogold-Markierungen und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Markierungen wurden von der Servicegruppe Morphologie des ZMNH unter Leitung von Dr. Michaela Schweizer durchgeführt und erfolgten nach einem Protokoll von Slot und Geuze (2007). Adulte Mäuse wurden anästhesiert und durch transkardiale Perfusion mit 4% (w/v) Paraformaldehyd und 0.1% (w/v) Glutaraldehyd in 0.1 M Phosphat-Puffer fixiert. 1 mm³ große hippokampale Gewebestücke der fixierten Gehirne wurden durch 15-minütige Inkubation bei 37 °C in 12% Gelatine in 1x PBS eingebettet und danach über Nacht durch Immersion mit 2.3 M Sucrose in 1x PBS gefriereschützt. So vorbehandelte hippokampale Gewebestücke wurden auf Präparateträger gelegt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden Ultradünnschnitte (80 nm) bei -120 °C an einem Ultramikrotom (Reichert, Seefeld) angefertigt und diese auf Pioloform-befilmte Kupfernetze gezogen. Vor der eigentlichen Immunogold-Markierung wurde die Gelatine durch 20-minütiges Erwärmen auf 1x PBS bei 40 °C im Brutschrank ausgelöst und

die Schnitte daraufhin zuerst mit 0.05 M Glyzin in 1x PBS und danach mit Blockierungslösung von AURION (Wageningen, Niederlande) blockiert. Alle nachfolgenden Waschschritte und Antikörperinkubationen erfolgten in 0.1% (v/v) AURION-BSA-c in 1x PBS. Nach der Blockierung wurden die Schnitte für 5x 2 min gewaschen und dann 1 h bei RT mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach intensivem Waschen (6x 5 min), Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 45 min bei RT und abermaligem Waschen erfolgte die Applikation von 10 nm großem Protein A-Gold (G. Posthuma, Universität Utrecht, Niederlande) für 45 min bei RT in der Konzentrationsangabe des Herstellers. Nach Waschen in 1x PBS und einer 5-minütigen Fixierung in 1% Glutaraldehyd in 1x PBS wurden die markierten Schnitte mit H₂O gewaschen und in einer wässrigen Lösung mit 1.8% (w/v) Methylcellulose und 0.4% (w/v) Uranylacetat für 2 min auf Eis kontrastiert. Die Schnitte wurden mit einer Schlingöse aufgenommen, durch Ziehen über Filterpapier getrocknet und mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop Zeiss EM 902 (Zeiss, Jena) analysiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte über eine digitale Kamera (2K CCD von A. Tröndle) und der ITEM Software (Olympus, Hamburg).

2.5 Quantitative Analyse und Statistik

2.5.1 Auswertung von Western Blot-Signalintensitäten

Für die quantitative Auswertung von Signalintensitäten aus Immundetektionen (2.3.6) wurden die exponierten Filme mit Hilfe eines Scanners mit Durchlichtaufsatz in Graustufen in einer Auflösung von 300 dpi digitalisiert und unter Verwendung der Software ImageJ Version 1.42q (National Institutes of Health, Bethesda, USA) analysiert. Wurden die Immundetektionen mit dem Intas ChemoCam-System (Intas, Göttingen) dokumentiert, konnten die hierbei generierten TIFF-Dateien mit der gleichen ImageJ-Software ausgewertet werden. Alle relativen Signalintensitäten wurden anhand der Signalintensitäten einer entsprechenden Kontrolldetektion normalisiert. Die Verarbeitung der in ImageJ gewonnenen Rohdaten und die statistische Analyse durch Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung, des Standardfehlers des Mittelwertes und der *p*-Werte nach dem *Student's t-Test* erfolgte unter Verwendung des Programms Excel (Microsoft, München). Hierbei wurde ein zweiseitiger und je nach Versuchsanordnung gepaarter oder ungepaarter t-Test mit folgenden Irrtumswahrscheinlichkeiten gewählt: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**),

$p \leq 0,001$ (***)). Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM) von der Anzahl n unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren dementsprechend den SEM.

2.5.2 Auswertung von Signalintensitäten aus Immunfärbungen

Immunfärbungen hippokampaler Neurone (2.4.6) wurden am konfokalen *Laser-scanning* Mikroskop Olympus Fluoview FV1000 (Olympus, Hamburg) in einem sequenziellen Mehrkanal-Aufnahme-Modus dokumentiert. Innerhalb eines Experiments wurden dabei für alle Zellen die gleichen Bildverstärker-Einstellungen verwendet. Die Aufnahmen wurden im TIFF-Format gespeichert und mit Hilfe der Software MetaMorph Version 6.3r7 (Molecular Devices, München) analysiert. Zur Messung der Fluoreszenzintensitäten wurden die Mehrkanal-TIFF-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. Auch hier wurden für alle Bilder eines Experimentes die Einstellungen beibehalten. Mit der Funktion „*Trace Region*“ wurde die somatische Region exklusive Nukleus markiert und anhand der Funktion „*Show Region Statistics*“ die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (totaler Grauwert/Fläche) im markierten Bereich für den jeweiligen Kanal ermittelt. Die Verarbeitung der Rohdaten und die statistische Analyse erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben.

2.5.3 Auswertungen von *Timelapse*-Aufnahmen

Die quantitative Analyse der *Timelapse*-Aufnahmen (2.4.7) erfolgte ebenfalls mit der Software MetaMorph Version 6.3r7 (Molecular Devices, München) und wurde blind durchgeführt, d.h. die Benennung der Aufnahmen von Wildtyp- und *Knockout*-Zellen war so kodiert, dass die Aufnahmen während der Auswertung keinem Genotyp zugeordnet werden konnten. Die Längenmessung der ausgewerteten neuritischen Bereiche erfolgte mit Hilfe der Funktion „*Multi-Line*“. Die Menge mobiler und immobiler Partikel wurde manuell ausgezählt. Die detaillierte Analyse mobiler Partikel erfolgte über die Funktion „*Track Points*“, bei der die Position eines Partikels über die Zeit manuell verfolgt wird und dann verschiedene Parameter wie maximale oder durchschnittliche Geschwindigkeiten durch die Software berechnet werden. Die Verarbeitung der gewonnenen Rohdaten und die statistische Auswertung erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben.

3 Ergebnisse

TRIM3 (*Tripartite Motif Containing 3*) ist ein hauptsächlich neuronal exprimiertes Protein, das sowohl funktionelle Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität besitzt (Hung *et al.*, 2010) als auch an Myosin- und Kinesin-abhängigen Transportprozessen beteiligt ist (El-Husseini und Vincent, 1999; Yan *et al.*, 2005; Kanai *et al.*, 2004). Ausgangspunkt dieser Arbeit war eine neu identifizierte Interaktion von TRIM3 mit dem Mikrotubuli-assoziierten, anterograden Kinesin-Motorprotein KIF21B (Marszalek *et al.*, 1999). TRIM3 wurde bislang lediglich als Bestandteil von Kinesin-transportierten RNA *Granules* beschrieben (Kanai *et al.*, 2004). Seine funktionelle Bedeutung in diesem Kontext oder im Kinesin-abhängigen Transport generell ist jedoch noch ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Funktion von TRIM3 in Kinesin-vermittelten Transportprozessen genauer zu untersuchen.

3.1 Interaktion von TRIM3 und KIF21B

3.1.1 Koimmunpräzipitation von TRIM3 mit KIF21B aus Rattenhirnextrakten

Im Rahmen eines Projektes zur Untersuchung des vorwiegend dendritisch lokalisierten Motorproteins KIF21B (Marszalek *et al.*, 1999) wurden Versuche durchgeführt, die auf eine mögliche Interaktion zwischen KIF21B und der Ubiquitin-E3-Ligase TRIM3 hindeuteten. Um diese Interaktion zu verifizieren, wurden zunächst Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Hierzu wurde KIF21B aus einer mit kleinen Vesikeln und großen Proteinkomplexen angereicherten P4-Fraktion, die durch differenzielle Zentrifugation von Hirnlysaten 10 Tage alter Ratten (P10) gewonnen wurde, immunpräzipitiert (Abb. 3.1).

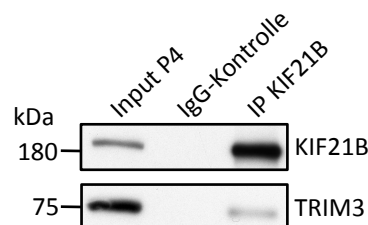


Abb. 3.1: Koimmunpräzipitation von TRIM3 mit KIF21B aus Rattenhirnextrakten. Western Blot Analyse einer Immunpräzipitation (IP) von KIF21B aus der P4-Fraktion von Hirnextrakten aus P10-Ratten. TRIM3 kopräzipitiert mit KIF21B. Als Kontrolle dienten unspezifische Immunglobuline (IgG). Die Immundetektion erfolgte mit KIF21B- und TRIM3-spezifischen Antikörpern. Input P4: mit kleinen Vesikeln und großen Proteinkomplexen angereicherte Fraktion.

In der Koimmunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen KIF21B konnte neben KIF21B auch TRIM3 detektiert werden, während in der Kontrollpräzipitation mit unspezifischen Immunglobulinen keines der beiden Proteine detektiert werden konnte. Eine Immunpräzipitation in umgekehrter Richtung zur Bestätigung der Ergebnisse (Präzipitation von TRIM3 und anschließende Detektion von KIF21B) konnte nicht durchgeführt werden, da mehrere getestete TRIM3-Antikörper auch in Hirnlysaten aus TRIM3-depletierten Mäusen noch Proteine kopräzipitierten, was auf eine Unspezifität dieser Antikörper hindeutet (Daten nicht gezeigt). Homozygote (-/-) *Trim3-Knockout*-Mäuse zur Gewinnung TRIM3-depletierter Hirnlysate stammten ursprünglich aus dem Labor von Dr. Ronald van Kesteren (Freie Universität Amsterdam, Niederlande; siehe auch Kapitel 2.1.4) und wurden als Zuchtlinie im Tierstall des ZMNH gehalten.

3.1.2 Koimmunpräzipitation von heterolog exprimierten KIF21B- und TRIM3-Fusionsproteinen

Zur weiteren Bestätigung der Interaktion von TRIM3 mit KIF21B wurden Koimmunpräzipitationsversuche mit heterolog exprimierten KIF21B- und TRIM3-Fusionsproteinen durchgeführt. Proteine der TRIM-Familie verfügen N-terminal über eine sogenannte „RING-B-Box-Coiled-coil“(RBCC)-Domäne, über die sie Homodimere und Heterodimere mit anderen TRIM-Proteinen bilden können (Reymond *et al.*, 2001; El-Husseini und Vincent, 1999). Für die folgenden Versuche wurde die TRIM3-Deletionsmutante „TRIM3- Δ RBCC“ generiert, bei der die RBCC-Domäne fehlt, so dass keine Homo- oder Heterodimerisierung mehr stattfinden kann (Abb. 3.2A). So sollte vermieden werden, dass in HEK293-Zellen heterolog exprimiertes TRIM3 mit HEK293-spezifischen TRIM-Proteinen interagiert und erst hierdurch eine Interaktion mit KIF21B zustande kommt. Zudem können durch Verwendung dieser Deletionsmutante auch Rückschlüsse auf die mögliche Bindestelle zwischen KIF21B und TRIM3 gezogen werden.

Zunächst wurde die Funktionalität der Deletionsmutante überprüft, indem zum einen EGFP-markiertes Gesamtlänge-TRIM3 (AS 1-744) mit myc-markiertem Gesamtlänge-TRIM3 in HEK293-Zellen koexprimiert wurde. Zum anderen wurde EGFP-markiertes TRIM3- Δ RBCC (AS 283-744) mit myc-markiertem Gesamtlänge-TRIM3 koexprimiert. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation mit GFP-spezifischen Antikörpern und eine Western Blot Analyse,

um zu untersuchen, ob die myc-markierten Proteine mit den EGFP-markierten kopräzipitieren. Hierbei zeigte sich, dass myc-TRIM3 wie erwartet mit TRIM3-EGFP kopräzipitiert (Abb. 3.2B). Bei der Präzipitation von TRIM3- Δ RBCC-EGFP hingegen konnte kein bzw. nur ein sehr schwaches Signal für myc-TRIM3 detektiert werden (Abb. 3.2C). Da diese Ergebnisse darauf hindeuteten, dass die TRIM3-Deletionsmutante tatsächlich nicht mehr in der Lage ist zu dimerisieren, konnte der eigentliche Präzipitationsversuch unter Verwendung dieses Konstruktes durchgeführt werden.

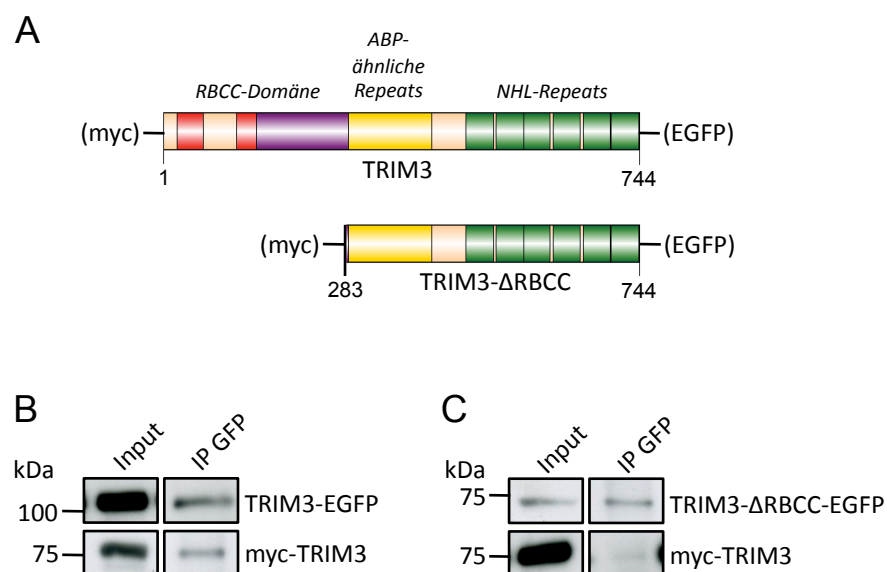


Abb. 3.2 Verlust der TRIM3-Homodimerisierung durch Deletion der RBCC-Domäne. (A) Schematische Darstellung der verwendeten N-terminal myc- oder C-terminal EGFP-markierten TRIM3-Konstrukte. TRIM3-Gesamtlänge-Konstrukt: AS 1-744; TRIM3- Δ RBCC-Deletionskonstrukt: AS 283-744. (B+C) Western Blot Analyse von Koimmunpräzipitationen (IP) aus HEK293-Zelllysaten nach Koexpression von TRIM3-Fusionsproteinen. (B) Myc-fusioniertes Gesamtlänge-TRIM3 kopräzipitiert mit EGFP-fusioniertem Gesamtlänge-TRIM3. (C) Myc-fusioniertes Gesamtlänge-TRIM3 kopräzipitiert nicht mit der EGFP-fusionierten TRIM3- Δ RBCC-Deletionsmutante. Die Detektion erfolgte jeweils mit myc- und GFP-spezifischen Antikörpern. Input: HEK293-Lysat.

Hierzu wurde die myc-fusionierte TRIM3- Δ RBCC-Mutante zusammen mit EGFP-fusioniertem KIF21B in HEK293-Zellen koexprimiert und erneut eine Immunpräzipitation mit myc-spezifischen Antikörpern und anschließender Western Blot Analyse durchgeführt. Als Kontrolle diente ein HEK293-Zelllysate, in dem EGFP-KIF21B zusammen mit unfusionierter myc-Markierung exprimiert wurde. Die Western Blot Analyse zeigte, dass

EGFP-KIF21B mit myc-TRIM3- Δ RBCC kopräzipitiert, während in der Kontrolle kein Signal für EGFP-KIF21B detektiert werden konnte (Abb. 3.3). Dies bestätigt die in der Immunpräzipitation aus Rattenhirnextrakt gefundene Interaktion (siehe Kapitel 3.1.1) und deutet zudem darauf hin, dass die RBCC-Domäne von TRIM3 für die Interaktion der beiden Bindepartner in HEK293-Zellen nicht essentiell ist.

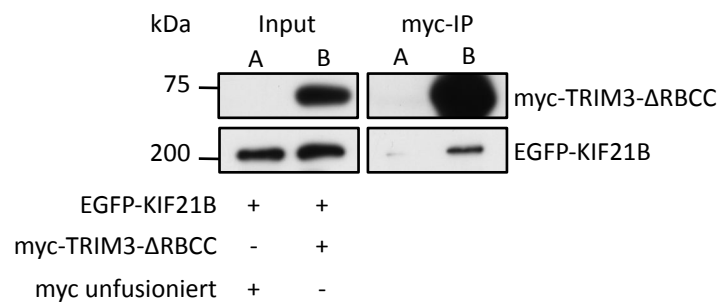


Abb. 3.3 Koimmunpräzipitation von KIF21B mit TRIM3- Δ RBCC nach Koexpression in HEK293-Zellen. EGFP-fusioniertes KIF21B wurde entweder mit unfusionierter myc-Markierung (Input A) oder mit myc-fusioniertem TRIM3- Δ RBCC (Input B) in HEK293-Zellen exprimiert. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation (IP) mit myc-spezifischen Antikörpern und eine Western Blot Analyse. EGFP-KIF21B kopräzipitiert mit myc-TRIM3- Δ RBCC (myc-IP B), jedoch nicht mit unfusionierter myc-Markierung (myc-IP A). Die Detektion erfolgte jeweils mit myc- und GFP-spezifischen Antikörpern.

3.1.3 Interaktion von TRIM3 mit KIF21B im Hefe-2-Hybrid-System

Nach Bestätigung der Interaktion zwischen KIF21B und TRIM3 durch heterologe Expression in HEK293-Zellen (Kapitel 3.1.2) sollte mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems die Frage geklärt werden, ob die Bindepartner direkt oder indirekt miteinander interagieren. Hierzu wurden zunächst verschiedene KIF21B-Köder- und TRIM3-Beute-Konstrukte in die entsprechenden Vektoren des LexA-basierten Hefe-2-Hybrid-Systems DupLEX-A von Origene (Rockville, USA) kloniert (Abb. 3.4, siehe auch Kapitel 2.2.16). Da KIF21B mit 1624 Aminosäuren ein Molekulargewicht von ca. 180 Kilodalton besitzt und große Proteine in Hefezellen oftmals nicht kerngängig sind (persönliche Information von Y. Pechmann, Inst. für Molekulare Neurogenetik, ZMNH, Hamburg), wurde die KIF21B-Sequenz über drei kleinere, putativ kerngängige Konstrukte verteilt. Die Teilung der Gesamtsequenz erfolgte

dabei entsprechend der KIF21B-Sekundärstruktur in *Motor*-, *Stalk*- und *Tail*-Domäne (Abb. 3.4A). Das Beute-Protein TRIM3 wurde aufgrund seiner geringeren Größe (744 Aminosäuren, 75 Kilodalton) in gesamter Länge kloniert. Zusätzlich wurden jedoch auch zwei TRIM3-Teilkonstrukte kloniert (TRIM3-RBCC-Domäne und TRIM3- Δ RBCC), um ein weiteres Eingrenzen einer putativen Bindestelle zu ermöglichen (Abb. 3.4B).

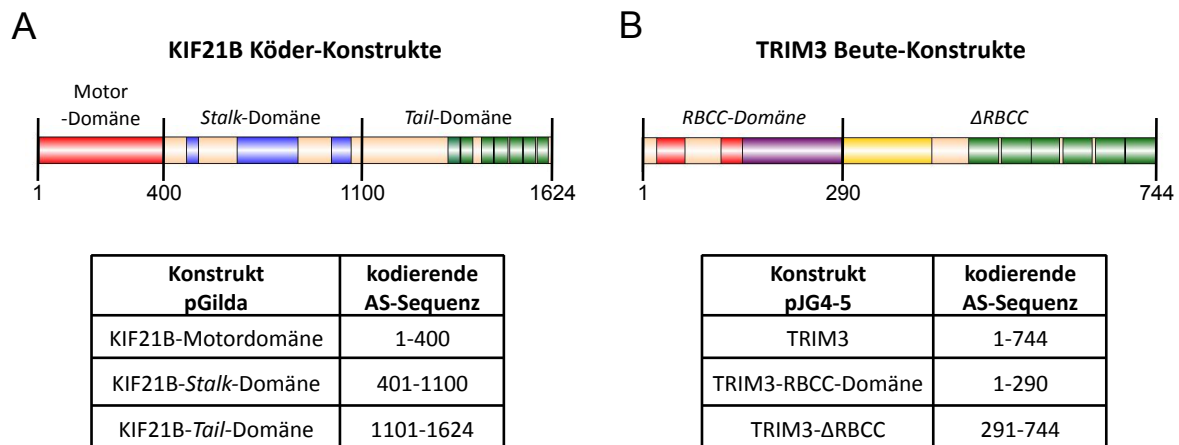


Abb. 3.4: Im Hefe-2-Hybrid-System verwendete KIF21B- und TRIM3-Konstrukte. (A) Schematische Darstellung der drei in den pGilda-Vektor klonierten KIF21B-Köder-Konstrukte. (B) Schematische Darstellung der drei in den pJG4-5-Vektor klonierten TRIM3-Beute-Konstrukte.

Durch Hefetransformationen mit verschiedenen kombinierten Konstrukten wurde dann im β -Galaktosidase-Test die Interaktion der einzelnen Köder- und Beutekonstrukte untersucht. Bei diesem Test kann die Interaktion durch die β -Galaktosidase-vermittelte Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff optisch nachgewiesen werden (siehe 2.2.16.2 für eine detaillierte Methodenbeschreibung). Die Koexpression der KIF21B-*Stalk*-Domäne mit TRIM3 (Gesamtlänge) resultierte in eine deutliche Blaufärbung der Hefenzellen, die auf eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine hinweist (Abb. 3.5). Die KIF21B-Motordomäne und KIF21B-*Tail*-Domäne zeigten hingegen keine Blaufärbung bei Koexpression mit TRIM3. Die direkte Interaktion des Köders mit TRIM3 scheint also nur über die KIF21B-*Stalk*-Domäne vermittelt zu werden. Auch für das Beutekonstrukt konnte die direkte Bindestelle für KIF21B eingegrenzt werden: Während bei Koexpression des TRIM3- Δ RBCC-Konstrukts mit allen drei KIF21B-Konstrukten keine Blaufärbung beobachtet

werden konnte, zeigte die Koexpression der TRIM3-RBCC-Domäne mit der KIF21B-*Stalk*-Domäne eine schwache, aber deutliche Blaufärbung. Die RBCC-Domäne interagiert jedoch weder mit der KIF21B-Motor- noch mit der KIF21B-*Tail*-Domäne. So kann aus diesem Experiment geschlossen werden, dass KIF21B und TRIM3 direkt miteinander interagieren und diese Interaktion zwischen der TRIM3-RBCC-Domäne und der KIF21B-*Stalk*-Domäne stattfindet. Die auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse der zuvor in HEK293-Lysaten identifizierte Bindung über den TRIM3-C-Terminus und der hier identifizierten Bindung über den TRIM3-N-Terminus werden in Kapitel 4.1 eingehender diskutiert.
















Beute \ Köder	KIF21B-Motordomäne	KIF21B- <i>stalk</i> -Domäne	KIF21B- <i>tail</i> -Domäne
TRIM3			
RBCC-Domäne			
TRIM3- Δ RBCC			
Positivkontrolle			
Negativkontrolle			

Abb. 3.5: Direkte Interaktion von KIF21B und TRIM3 im Hefe-2-Hybrid-System. Im β -Galaktosidase-Test wurde eine direkte Protein-Protein-Interaktion verschiedener kombinierter KIF21B-Köder- und TRIM3-Beute-Konstrukte untersucht. Die Blaufärbung zeigt, dass nur die KIF21B-*Stalk*-Domäne direkt mit TRIM3 interagiert und dass diese Interaktion über die N-terminale RBCC-Domäne von TRIM3 und nicht über den C-Terminus (TRIM3- Δ RBCC) erfolgt. Als Negativkontrolle diente unfusionierter Beute-Vektor (pJG4-5), als Positivkontrolle die direkte Interaktion zwischen der GABA_A-Rezeptoruntereinheit α 1 und Muskelin (Heisler *et al.*, 2011).

3.1.4 Kolokalisation von KIF21B und TRIM3 in kultivierten Neuronen

In den zuvor beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass KIF21B und TRIM3 sowohl endogen als auch heterolog exprimiert miteinander interagieren und dass es sich hierbei um eine direkte Interaktion handelt (Kapitel 3.1.1 bis 3.1.3). Nachfolgend wurden Immunfärbungen von kultivierten hippokampalen Neuronen durchgeführt, um diese Interaktion auch intrazellulär zu bestätigen. Da in Vorversuchen manche anti-KIF21B- und anti-TRIM3-Antikörper unspezifische Bindung zeigten, wurde zunächst die Spezifität der verwendeten Antikörper nachgewiesen, um falsch-positive Resultate auszuschließen.

Die Spezifitätskontrolle des anti-KIF21B-Antikörpers erfolgte durch shRNA-vermittelte Reduktion der KIF21B-Expression. Hierzu wurden zunächst gegen die KIF21B-mRNA gerichtete *hairpin*-Oligonukleotide entworfen und diese dann in den pSUPER.neo+GFP-Vektor der Firma Oligoengine (Seattle, USA) kloniert. Dieser Vektor exprimiert zusätzlich zur inserierten shRNA unter einem zweiten Promotor EGFP, so dass transfizierte, die shRNA exprimierende Zellen durch das EGFP-Signal identifiziert werden können (zur detaillierten Methodenbeschreibung siehe Kapitel 2.2.3).

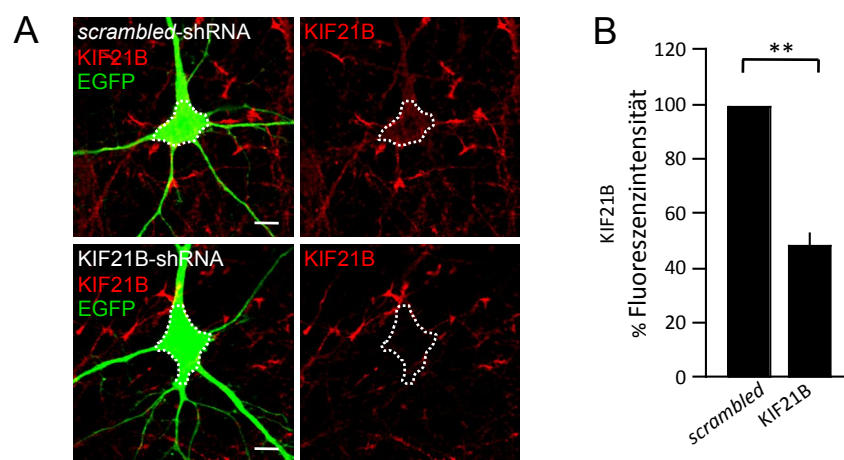


Abb. 3.6: Spezifitätskontrolle des anti-KIF21B-Antikörpers. Kultivierte hippocampale Mausneurone wurden im Alter von DIV14 nach 4 Tagen Expression von Kontroll (*scrambled*) - oder KIF21B-spezifischer shRNA gegen endogenes KIF21B (rot) immungefärbt. Zur Identifizierung transfizierter Zellen kodiert der shRNA-Expressionsvektor zusätzlich EGFP (grün). (A) Die Expression von KIF21B-shRNA führte im Vergleich zur *scrambled*-Kontrolle zur deutlichen Reduktion der KIF21B-Fluoreszenzintensität. Größenbalken: 10 μ m. (B) Quantitative Analyse von jeweils 7-9 transfizierten Zellen aus n=3 Experimenten. Die KIF21B-Signalintensität wurde durch Expression der KIF21B-shRNA um $52 \pm 4.9\%$ reduziert. ** = $p \leq 0,01$. Die Daten sind Mittelwerte. Fehlerbalken= SEM.

Kultivierte hippocampale Mausneurone wurden nach 10 Tagen in Zellkultur (DIV10/10 *days in vitro*) mit dem KIF21B-shRNA-Expressionsvektor transfiziert. Zur Kontrolle wurden parallel Zellen mit einem Vektor transfiziert, der für eine unspezifische shRNA kodiert (*scrambled*-shRNA, siehe auch Kapitel 2.2.3). Nach 4 Tagen Expression wurden die Zellen fixiert und gegen endogenes KIF21B immungefärbt. Hierbei zeigte sich bei Expression der KIF21B-shRNA eine deutliche Minimierung des KIF21B-Signals im Vergleich zu Zellen, die *scrambled*-shRNA exprimierten (Abb. 3.6A). Zur quantitativen Analyse wurde die KIF21B-

Signalintensität des Somas von jeweils ≥ 7 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten mit Hilfe der Software Metamorph (Molecular Devices, München) gemessen (insgesamt ausgewertete Zellen: *scrambled*-shRNA=23, KIF21B-shRNA=21). Es ergab sich im KIF21B-shRNA-*Knockdown* eine statistisch signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität von $52 \pm 4.9\%$, wobei die Kontrolle jeweils auf 100% gesetzt wurde (Abb. 3.6B). Dies zeigt sowohl die Funktionalität des verwendeten *hairpin*-Oligonukleotides als auch die Spezifität des anti-KIF21B-Antikörpers. Ein unspezifischer Antikörper hätte aufgrund falsch-positiver Signale eine weniger starke Signalreduktion ergeben, was aber auch bei nicht funktionierender shRNA hätte beobachtet werden müssen.

Wie in Kapitel 3.1 bereits erwähnt standen für diese Arbeit *Trim3-Knockout*-Mäuse zur Verfügung. Zur Kontrolle des anti-TRIM3-Antikörpers wurden daher kultivierte hippocampale Neurone von wildtypischen (+/+) und homozygoten (-/-) *Trim3-Knockout*-Mäusen im Alter von DIV12 fixiert und gegen TRIM3 (rot) und den synaptischen Marker SV2 (grün) immungefärbt (Abb. 3.7). In den homozygoten (-/-) *Knockout*-Zellen war im Vergleich zu den wildtypischen (+/+) kein TRIM3-Signal zu detektieren. Die Kontrollfärbung gegen SV2 hingegen war bei beiden Genotypen identisch, was auf eine spezifische Reduktion des TRIM3-Signals in homozygoten (-/-) *Trim3-Knockout*-Neuronen schließen lässt.

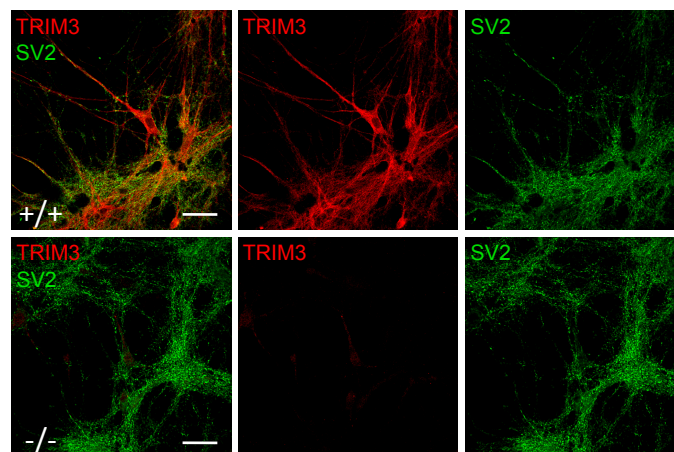


Abb. 3.7: Spezifitätskontrolle des anti-TRIM3-Antikörpers. Kultivierte hippocampale Neurone von wildtypischen (+/+) und homozygoten (-/-) *Trim3-Knockout*-Mäusen wurden im Alter von DIV12 gegen endogenes TRIM3 (rot) und SV2 (grün) immungefärbt. In den homozygoten (-/-) *Knockout*-Zellen kann nur ein sehr schwaches Hintergrund-Signal für TRIM3 detektiert werden, während die SV2-Fluoreszenzintensität in homozygoten (-/-) und wildtypischen (+/+) *Knockout*-Zellen vergleichbar ist. Größenbalken: 50 μm .

Da sowohl der anti-KIF21B- als auch der anti-TRIM3-Antikörper Spezifität aufwiesen (siehe Abb. 3.6 und 3.7), wurde nun eine Koimmunfärbung mit diesen beiden Antikörpern in kultivierten hippokampalen Neuronen durchgeführt, um die Interaktion der beiden Proteine auch auf zellulärer Ebene nachzuweisen. Da beide Antikörper aus dem Wirt „Kaninchen“ stammten und alternative Antikörper aus anderen Wirten aufgrund von Unspezifität nicht benutzt werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurden parallel zur eigentlichen KIF21B-TRIM3-Koimmunfärbung Kontrollfärbungen durchgeführt, um Falschpositive-Signale durch Kreuzreaktion auszuschließen. Die Methodik der sequenziellen Koimmunfärbung und der Kontrollfärbungen ist in Kapitel 2.4.6 detailliert beschrieben.

In den Kontrollfärbungen zeigte sich, dass bei Fehlen des ersten Primärantikörpers (anti-KIF21B) kein Cy3-Signal detektiert werden konnte, der zweite Primärantikörper (anti-TRIM3) also nicht an den Sekundärantikörper der ersten Färbung band (Abb. 3.8A1). Hingegen konnte bei Fehlen des zweiten Primärantikörpers (anti-TRIM3) noch ein Cy5-Signal detektiert werden, was darauf hindeutet, dass nicht alle Bindestellen des ersten Primärantikörpers (anti-KIF21B) in der ersten Färbung abgesättigt wurden (Abb. 3.8A2). Allerdings traten diese Cy5-Signale nur an Stellen mit einem extrem starken KIF21B-Signal auf, die ausschließlich an Strukturen zu finden waren, die Wachstumskegeln ähnelten (Abb. 3.8A2, Pfeile). In den Neuriten, die im Gegensatz zu den Wachstumskegel-ähnlichen Strukturen eine schwache bis mäßige KIF21B-Intensität aufwiesen, wurden in der Kontrolle keine Cy5-Signale detektiert. Darüber hinaus konnte TRIM3 in Einzelimmunfärbungen nicht in Wachstumskegel-ähnlichen Strukturen detektiert werden. Somit konnten in der sequenziellen Koimmunfärbung Kollokationen von Cy5-markierten TRIM3-Signalen mit KIF21B-positiven, Wachstumskegel-ähnlichen Strukturen eindeutig als falsch-positiv bewertet werden. Eine Kollokation in Neuriten hingegen deutete auf ein positives Ergebnis hin.

Wie Abb. 3.8B zeigt sind sowohl KIF21B (rotes Signal) als auch TRIM3 (grünes Signal) in den Neuriten kultivierter hippokampaler Mausneurone in mehr oder weniger definierten Punkten verteilt. Neben nur roten oder nur grünen Punkten (Abb. 3.8B Pfeilköpfe) konnten auch durch Fluoreszenzüberlagerung entstandene gelbe Punkte beobachtet werden, die auf eine Kollokation von KIF21B und TRIM3 in kultivierten Neuronen hindeuten (Abb. 3.8B Pfeile).

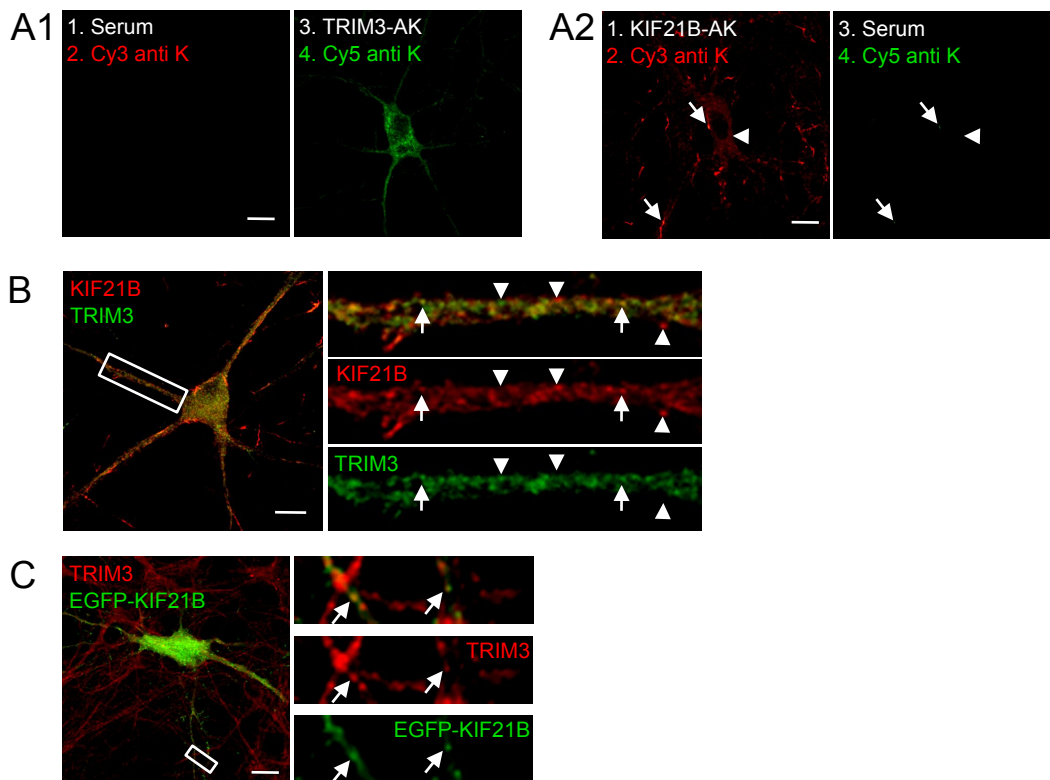


Abb. 3.8: Kolokalisation von KIF21B und TRIM3 in kultivierten Neuronen. (A-B) Kultivierte hippocampale Mausneurone wurden im Alter von DIV22 fixiert und durch sequenzielle Immunfärbung gegen endogenes KIF21B (rot/Cy3) und TRIM3 (grün/Cy5) gefärbt. Das Cy5-Signal ist zur besseren Deutlichkeit als grünes Signal dargestellt. (A1) Bei fehlendem 1. Primärantikörper kann kein rotes Cy3-Signal detektiert werden. (A2) Bei fehlendem 2. Primärantikörper kann nur in Kolokalisation mit sehr starken KIF21B-Signalen ein grünes Cy5-Signal detektiert werden (Pfeile), jedoch nicht in mäßig gefärbten Bereichen (Pfeilkopf). (B) Sowohl KIF21B (rot) als auch TRIM3 (grün) zeigen in Neuriten eine punktförmige Verteilung. Neben gelben Punkten (Pfeile), in denen KIF21B und TRIM3 kolokalisieren, sind auch nur rote oder nur grüne Punkte zu finden, in denen KIF21B und TRIM3 nicht kolokalisieren (Pfeilköpfe). (C) Nach 24 h Expression von EGFP-markiertem KIF21B wurden kultivierte hippocampale Mausneurone im Alter von DIV12 fixiert und gegen endogenes TRIM3 immungefärbt. Definierte gelbe Punkte (Pfeile) weisen auf eine Kolokalisation von EGFP-markiertem KIF21B (grün) und endogenem TRIM3 (rot). Größenbalken: 20 μm .

Als weitere Bestätigung der Interaktion der beiden Proteine auf intrazellulärer Ebene wurde EGFP-markiertes KIF21B in kultivierten hippocampalen Mausneuronen für 24 h überexprimiert. Anschließend erfolgte die Fixierung und Immunfärbung von endogenem TRIM3 (Abb. 3.8C). Auch hier konnten definierte gelbe Punkte beobachtet werden, die aus Kolokalisation des grünen EGFP-KIF21B-Signals mit dem roten TRIM3-Signal entstanden (Abb. 3.8C, Pfeile) und wie die sequenzielle Immunfärbung auf eine Interaktion von KIF21B und TRIM3 in kultivierten Neuronen hindeuten.

Um die funktionelle Bedeutung der Interaktion eingrenzen zu können, wurde anschließend untersucht, ob die Interaktion zwischen KIF21B und TRIM ausschließlich neuronal ist oder auch in Gliazellen stattfindet. Zu diesem Zweck wurden kultivierte hippocampale Mausneurone gegen TRIM3 bzw. KIF21B mit dem neuronalen Marker MAP2 und dem Astrozytenmarker GFAP koimmungefärbt (Abb. 3.9).

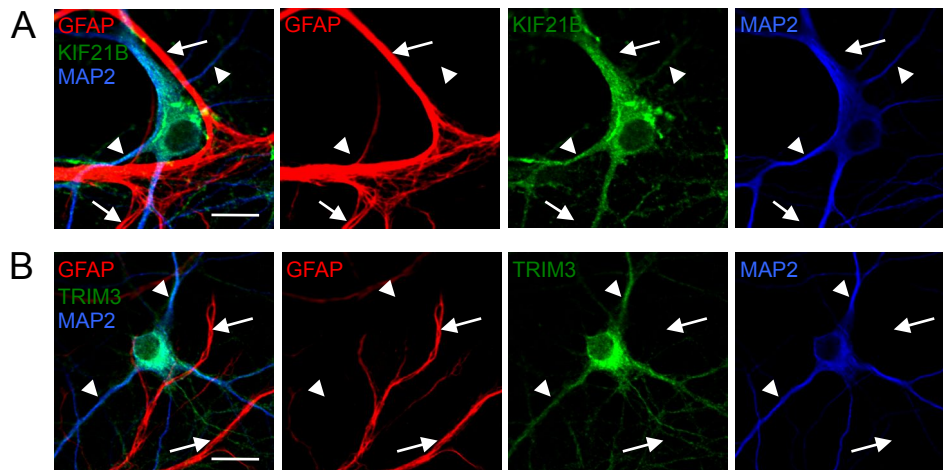


Abb. 3.9: KIF21B und TRIM3 werden in Neuronen, aber nicht in Astrozyten exprimiert. Kultivierte hippocampale Mausneurone wurden im Alter von DIV15 fixiert und zusammen mit dem neuronalen Marker MAP2 und dem Astrozytenmarker GFAP gegen KIF21B bzw. TRIM3 immungefärbt. (A) Das grüne KIF21B-Signal ist nur in blauen, MAP2-positiven Neuronen zu beobachten (Pfeilköpfe), jedoch nicht in roten, GFAP-positiven Astrozyten (Pfeile). (B) Das grüne TRIM3-Signal ist ebenfalls nur in blauen, MAP2-positiven Neuronen zu beobachten (Pfeilköpfe), jedoch nicht in roten, GFAP-positiven Astrozyten (Pfeile). Größenbalken: 20 μm .

Das grüne KIF21B-Signal konnte dabei nur in Zellen beobachtet werden, die blaues MAP2-Signal, aber kein rotes GFAP-Signal aufwiesen (Abb. 3.9A, Pfeilköpfe). In den GFAP-positiven und MAP2-negativen Zellen hingegen konnte kein grünes KIF21B Signal detektiert werden (Abb. 3.9A, Pfeile). Die gleiche Signalverteilung wurde auch für TRIM3 beobachtet (Abb. 3.9B): Grünes TRIM3-Signal konnte nur in MAP2-positiven, GFAP-negativen Zellen detektiert werden (Abb. 3.9B, Pfeilköpfe), während GFAP-positive und MAP2-negative Zellen kein grünes TRIM3-Signal zeigten. Hieraus lässt sich schließen, dass KIF21B und TRIM3 in Zellkulturen im Alter von DIV15 nur in Neuronen, aber nicht in Astrozyten exprimiert werden.

3.2 Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Interaktion von KIF21B und TRIM3

In Kapitel 3.1 konnte die Interaktion zwischen dem Motorprotein KIF21B und der E3-Ligase TRIM3 durch Koimmunpräzipitation aus Rattenhirnlysate (Kapitel 3.1.1) und durch Koimmunfärbung kultivierter hippocampaler Neurone (Kapitel 3.1.4) gezeigt werden. Darüber hinaus wurde im Hefe-2-Hybrid-System eine direkte Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen (Kapitel 3.1.3). Um nun die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion zu klären, wurden zunächst zwei Arbeitshypothesen aufgestellt und untersucht. Diese sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Hypothese I: TRIM3 könnte Teil des KIF21B-Neurologin-Transportkomplexes sein

Schapitz konnte zeigen, dass KIF21B den anterograden Transport des Zelladhäsionsmoleküls Neurologin vermittelt (Schapitz, 2009, Dissertation). In vielen Transportkomplexen bindet der Motor nicht direkt an sein *Cargo*, sondern über sog. Adapter-Proteine (Hirokawa und Takemura, 2004; Kneussel, 2005). Für TRIM3 wurde eine potenzielle Adapterfunktion im Myosin V-abhängigen Transferrinrezeptor-*Recycling* bereits beschrieben (Yan *et al.*, 2005). Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob TRIM3 auch am KIF21B-vermittelten Neurologin-Transport beteiligt ist und hier als Adapter oder als regulatorisches Element eine Rolle spielt.

Hypothese II: KIF21B könnte Substrat der Ubiquitin-E3-Ligase TRIM3 sein

Hung *et al.* konnten zeigen, dass TRIM3 eine funktionelle Ubiquitin-E3-Ligase ist und die Degradation des PSD-Proteins GKAP vermittelt (Hung *et al.*, 2010). Da in dieser Arbeit eine direkte Interaktion von TRIM3 und KIF21B nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.1.3), wurde untersucht, ob TRIM3 bei der Degradation von KIF21B eine Rolle spielt.

3.2.1 Untersuchungen zur möglichen Funktion von TRIM3 im KIF21B-vermittelten Neuroligin-Transport

3.2.1.1 Koimmunpräzipitation von TRIM3 und KIF21B mit Neuroligin aus Rattenhirnextrakten

Zur Überprüfung der Arbeitshypothese I (siehe Kapitel 3.2) wurden zunächst Koimmunpräzipitationen aus Rattenhirnextrakten durchgeführt um zu untersuchen, ob TRIM3 mit Neuroligin kopräzipitiert. Die Präzipitation erfolgte hierbei mit einem anti-Neuroligin-Antikörper, der alle Isoformen des Zelladhäsionsmoleküls erkennt, da KIF21B mit allen Neuroligin-Isoformen interagiert (persönliche Information von E. Thies, Inst. für Molekulare Neurogenetik, ZMNH, Hamburg) und TRIM3 - sollte es Bestandteil des KIF21B-Neuroligin-Komplexes sein - auch mit allen Isoformen interagieren könnte. Wie Abb. 3.10A zeigt kopräzipitierten sowohl TRIM3 als auch KIF21B mit pan-Neuroligin in der S1-Fraktion aus Hirnlysaten 10 Tage alter Ratten, während in der Kontrollpräzipitation mit unspezifischen Immunglobulinen keine Signale detektiert werden konnten. Da die S1-Fraktion ein Volllysat darstellt, das bis auf die Zellkerne alle zytosolischen und Membran-Komponenten einer Zelle enthält, wurden zusätzlich Immunpräzipitationen mit einer Vesikel-angereicherten Fraktion (P3) aus Rattenhirnlysaten durchgeführt. Auch hier konnte eine Kopräzipitation von TRIM3 und KIF21B mit Neuroligin beobachtet werden (Abb. 3.10B).

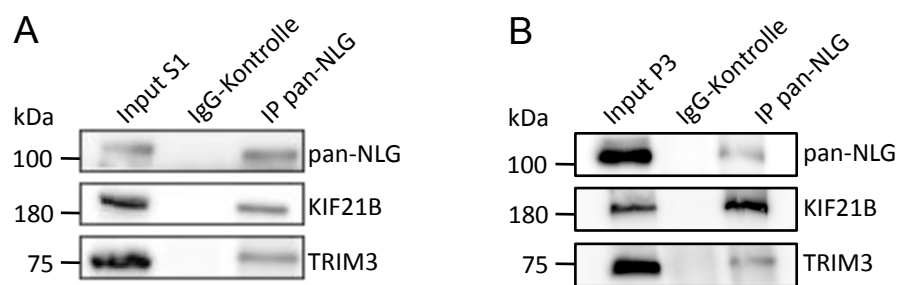


Abb. 3.10: Koimmunpräzipitation von TRIM3 und KIF21B mit Neuroligin aus Rattenhirnextrakten. Western Blot Analyse einer Immunpräzipitation (IP) von pan-Neuroligin (pan-NLG) aus Rattenhirnextrakten. (A) TRIM3 und KIF21B kopräzipitieren mit Neuroligin in S1-Hirnlysaten. (B) TRIM3 und KIF21B kopräzipitieren ebenfalls mit Neuroligin in der P3-Fraktion aus Rattenhirn. Als Kontrolle dienten jeweils unspezifische Immunglobuline (IgG). Die Immundetektion erfolgte mit pan-Neuroligin-, KIF21B und TRIM3-spezifischen Antikörpern. Input S1: Um Kernfraktion reduziertes Volllysat; Input P3: Vesikel-angereicherte Fraktion.

In Anbetracht der zuvor gezeigten Interaktion von KIF21B und TRIM3 (Kapitel 3.1) und der bereits beschriebenen Interaktion von KIF21B und Neuroligin (Schapitz, 2009, Dissertation), könnte die Kopräzipitation von TRIM3 mit Neuroligin darauf hindeuten, dass TRIM3 mit KIF21B und Neuroligin einen Transport-Komplex bildet.

3.2.1.2 Untersuchung der ultrastrukturellen Lokalisation von TRIM3

Einen weiteren Hinweis darauf, dass TRIM3 Bestandteil eines KIF21B-Neuroligin-Komplexes sein könnte, lieferten elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Untersuchung der ultrastrukturellen Lokalisation von TRIM3, die von der Servicegruppe Morphologie am ZMNH angefertigt wurden. Eine Immunogold-Markierung von TRIM3 in Hirnschnitten adulter Mäuse zeigte im Soma hippokampaler Neurone vereinzelt eine deutliche Assoziation von TRIM3 mit kleinen vesikulären Strukturen, die mit einem Durchmesser von ca. 50 nm Transportvesikel sein könnten (Pryer *et al.*, 1992) (Abb. 3.11).

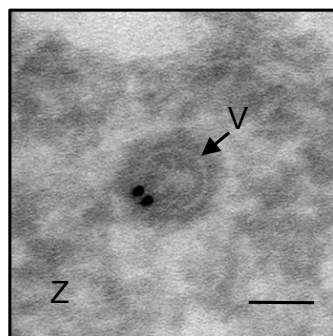


Abb. 3.11: Lokalisation von TRIM3 an vesikulären Strukturen. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hirnschnitten adulter Mäuse nach Immunogold-Markierung von TRIM3. Die Aufnahme zeigt eine deutlich TRIM3-positive, vesikuläre Struktur (Pfeil) innerhalb des Somas eines hippokampalen Neurons. V= Vesikel; Z= Zytoplasma; Größenbalken: 50 nm .

3.2.1.3 Kolokalisation von KIF21B, TRIM3 und Neuroligin in kultivierten Neuronen

Zum weiteren Nachweis der Existenz eines potenziellen TRIM3-KIF21B-Neuroligin-Transportkomplexes wurden erneut Koimmunfärbungen mit kultivierten hippokampalen Mausneuronen durchgeführt, wobei Dreifachfärbungen gegen endogenes TRIM3, KIF21B und Neuroligin erfolgten. Wie zuvor bei der Koimmunpräzipitation (Kapitel 3.2.1.1) wurde auch bei diesem Versuch ein anti-pan-Neuroligin-Antikörper verwendet, der alle Neuroligin-Isoformen erkennt. Zudem wurde - wie zum Nachweis der Kolokalisation von TRIM3 und KIF21B in kultivierten Neuronen (Kapitel 3.1.4) - eine sequenzielle Immunfärbung

durchgeführt, da der anti-TRIM3- und der anti-KIF21B-Antikörper aus dem Wirt „Kaninchen“ stammten. Die parallel zu den eigentlichen Dreifachfärbungen durchgeführten Kontrollfärbungen führten zum gleichen Ergebnis wie die der TRIM3-KIF21B-Kontrollfärbungen: Unspezifische Kollokalisierungssignale von TRIM3 und KIF21B konnten nur in den Wachstumskegel-ähnlichen, stark KIF21B-positiven Strukturen beobachtet werden, nicht jedoch in schwach bis mäßig KIF21B-positiven Bereichen wie Neuriten oder Somata (Daten nicht gezeigt, siehe Abb. 3.8A). Der anti-pan-Neurologin-Antikörper stammte aus dem Wirt „Maus“, so dass hier keine unspezifische Kreuzreaktion mit den anderen Primärantikörpern zu erwarten war.

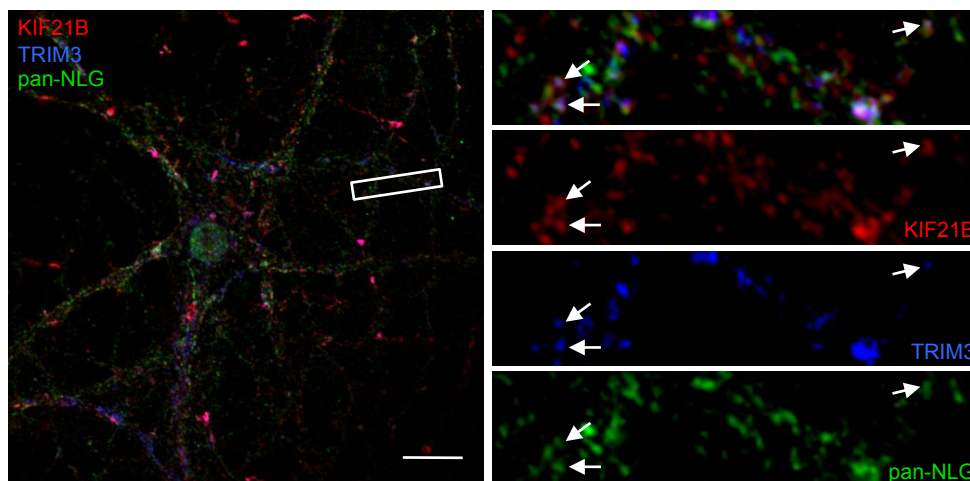


Abb. 3.12: Kollokalisierung von KIF21B, TRIM3 und Neurologin in kultivierten Neuronen. Kultivierte hippocampale Mausneurone wurden im Alter von DIV22 fixiert und durch sequenzielle Immunfärbung gegen endogenes KIF21B (rot), TRIM3 (blau) und pan-Neurologin (pan-NLG, grün) gefärbt. Definierte weiße Punkte (Pfeile) entstehen durch Überlagerung aller drei Fluoreszenzsignale und deuten auf eine Kollokalisierung von TRIM3, KIF21B und Neurologin hin. Größenbalken: 20 µm.

Wie Abb. 3.12 zeigt konnten in den Neuriten kultivierter hippocampaler Mausneurone im Alter von DIV22 klar abgegrenzte weiße Punkte detektiert werden, die durch Überlagerung von roten KIF21B-, blauen TRIM3- und grünen Neurologin-Signalen entstanden. Diese Fluoreszenzüberlagerung deutet auf eine Kollokalisierung von TRIM3, KIF21B und Neurologin hin und stellt ein weiteres Indiz dafür dar, dass TRIM3 Bestandteil des KIF21B-Neurologin-Transportkomplexes sein könnte.

3.2.1.4 Analyse der Zelloberflächenlokalisierung von Neuroligin in *Trim3-Knockout-Mäusen*

In den Kapiteln 3.1 und 3.2.1.1 konnte gezeigt werden, dass TRIM3 sowohl mit KIF21B als auch mit Neuroligin interagiert. Zudem konnte eine Kollokalisierung aller drei Proteine in kultivierten Neuronen und eine Assoziation von TRIM3 mit vesikulären Strukturen gezeigt werden (Kapitel 3.2.1.3 und 3.2.1.2). Sollte TRIM3 in einem KIF21B-Neuroligin-Transportkomplex als Adapter oder Regulator fungieren, so könnte eine Depletion von TRIM3 zu einer Störung der Transportkomplex-Bildung und damit zu einer Veränderung des Neuroligin-Transportes zur Zelloberfläche führen.

Um eine mögliche Änderung des Neuroligin-Gehaltes an der Zelloberfläche durch TRIM3-Depletion zu detektieren, wurden mit Oberflächenmembranen angereicherte Hirnlysate (P2-Fraktion) aus Hippokampi von 10 bis 11 Tage alten Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen durch differenzielle Zentrifugation gewonnen und jeweils gleiche Proteinmengen im Western Blot Verfahren analysiert. Hierbei wurde spezifisch der Hippokampus untersucht, da *Trim3-Knockout*-Mäuse ein im Vergleich zu Wildtypmäusen verändertes Lernverhalten in Hippokampus-assoziierten Verhaltensexperimenten zeigten (persönliche Information von Dr. Ronald van Kesteren, Freie Universität Amsterdam, Niederlande). Wie Abb. 3.13A1 zeigt war zwischen Hippokampusextrakten von Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen keine Veränderung des pan-Neuroligin-Gehaltes in der P2-Fraktion festzustellen. Die Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle. Eine quantitative Analyse von jeweils 5 hippokampalen P2-Lysaten aus Wildtyp- und *Knockout*-Tieren verdeutlicht dieses Ergebnis (Abb. 3.13A2).

Da die P2-Fraktion neben einer Anreicherung der Zellmembran auch große Bruchstücke intrazellulärer Membranstrukturen wie Golgi- oder ER (endoplasmatisches Retikulum)-Fragmente enthält und diese im zuvor beschriebenen Versuch einen potenziellen Effekt an der Oberflächenmembran verdecken könnten, wurde ein Oberflächenbiotinylierungs-experiment durchgeführt, um ausschließlich den Neuroligin-Gehalt der Zelloberfläche zu analysieren. Hierzu wurden die Zelloberflächenproteine von kultivierten hippokampalen Neuronen aus Wildtyp- oder *Trim3-Knockout*-Mäusen im Alter von DIV14 mit Biotin markiert. Anschließend wurden gleiche Proteinmengen zur Präzipitation mit Streptavidin

eingesetzt und diese Präzipitation im Western Blot Verfahren analysiert (Abb. 3.13B1). Auch in diesem Experiment konnte zwischen Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Zellen kein Unterschied im pan-Neurologin-Oberflächengehalt festgestellt werden (Abb. 3.13B2). Insgesamt weisen die Ergebnisse der P2-Fraktionsanalyse und des Oberflächenbiotinylierungsexperimentes darauf hin, dass eine TRIM3-Depletion zu keiner Veränderung des Gehaltes von pan-Neurologin an der Oberfläche führt.

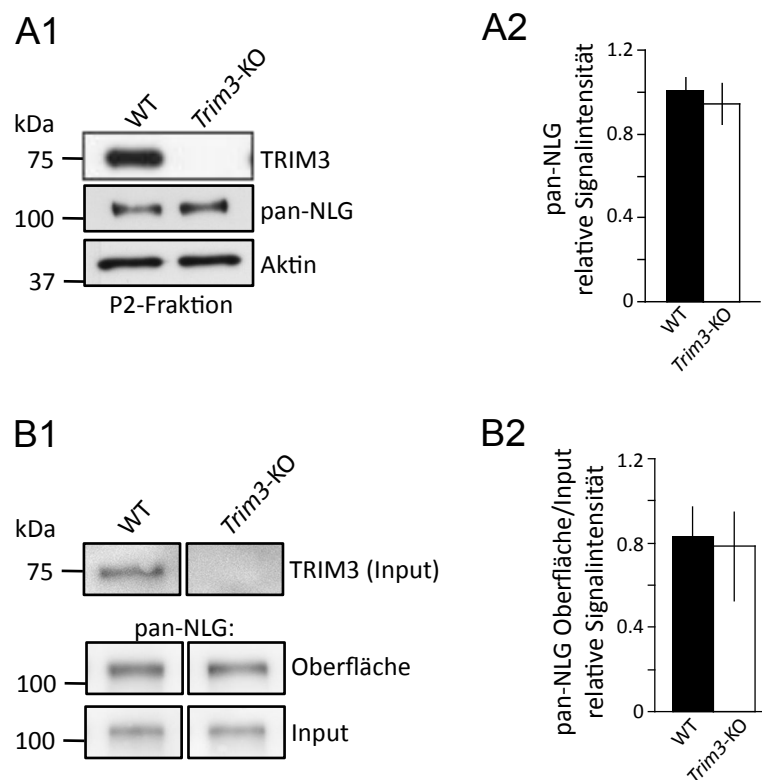


Abb. 3.13: Unveränderte Neurologin-Menge an der Zelloberfläche nach TRIM3-Depletion. (A1) Western Blot Analyse gleicher Proteinmengen von Oberflächenmembran-angereicherter P2-Fraktion aus Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Hippokampuslysaten. Wildtyp- und *Knockout*-Lysate weisen nach Detektion mit einem pan-Neurologin-spezifischen Antikörper ein ähnlich starkes pan-Neurologin-Signal (pan-NLG) auf. Detektionen mit TRIM3- und Aktin-spezifischen Antikörpern dienten als Ladekontrolle. (A2) Quantitative Analyse der in A1 dargestellten Daten aus 5 unabhängigen Experimenten. Die Mittelwerte der zu Aktin normalisierten pan-Neurologin-Signale betragen im WT 1.00 ± 0.06 und im KO 0.95 ± 0.10 . Fehlerbalken=SEM. (B1) Western Blot Analyse von biotinmarkiertem und Streptavidin-präzipitiertem pan-Neurologin aus kultivierten hippocampalen Neuronen (DIV14) von Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen. Wildtyp- und *Knockout*-Zellen weisen ein ähnliches Verhältnis von pan-Neurologin-Oberflächen- zu pan-Neurologin-Input-Signal auf. (B2) Quantitative Analyse der in B1 dargestellten Daten aus 3 unabhängigen Experimenten. Das Verhältnis der Signalintensität Oberfläche/Input beträgt im WT 0.83 ± 0.14 und im KO 0.78 ± 0.21 und ist nicht signifikant unterschiedlich. Fehlerbalken=SEM.

3.2.2 Untersuchung des Einflusses von TRIM3 auf die Degradation von KIF21B

3.2.2.1 Bestimmung der Protein-Halbwertszeit von KIF21B in kultivierten Neuronen

Zur Untersuchung der Arbeitshypothese II (Kapitel 3.2) wurde zunächst durch Cycloheximid-*chase*-Experimente die Proteinstabilität von KIF21B in neuronaler Zellkultur untersucht, da die Halbwertszeit dieses Motorproteins nicht bekannt war. Zu diesem Zweck wurden kultivierte hippocampale Neurone im Alter von DIV16 nach 4- bis 48-stündiger Inkubation mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) lysiert und anschließend jeweils gleiche Proteinmengen der einzelnen Proben im Western Blot Verfahren analysiert. Neben der Detektion von KIF21B erfolgte dabei auch die Detektion von zwei Proteinen mit bekannter Halbwertszeit: Optineurin, dessen Halbwertszeit in der neuronalen Zelllinie RGC5 bei ca. 8 h liegt (Ying *et al.*, 2010), und Aktin, das mit einer Halbwertszeit von über 48 h beschrieben ist (Guruprasad *et al.*, 1990). Die KIF21B-Signalintensitäten nach 4-stündiger CHX-Inkubation wurden als „Nullwert“ gleich 100% gesetzt, da Vorversuche gezeigt hatten, dass KIF21B über 12 h relativ stabil ist. Wie Abb. 3.14A zeigt war die KIF21B-Signalintensität nach 48 h CHX-Behandlung deutlich reduziert, während nach 8 h nur eine schwache Signalabnahme beobachtet werden konnte. Die Veränderung der Signalintensität von Optineurin entsprach in etwa der von KIF21B. Aktin hingegen blieb über 48 h stabil, hier konnte keine Reduktion der Signalintensität beobachtet werden.

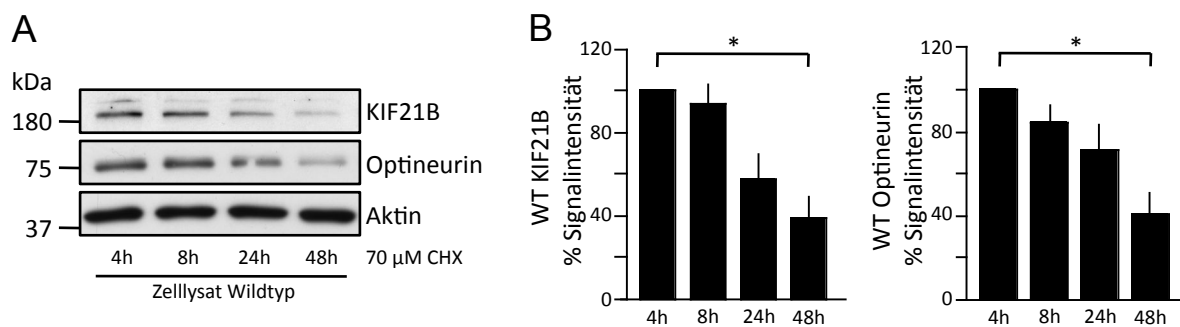


Abb. 3.14: Bestimmung der KIF21B-Stabilität durch CHX-*chase*-Experimente in kultivierten Neuronen. Kultivierte hippocampale Neurone wurden im Alter von DIV16 nach 4-48 h Inkubation mit 70 μ M Cycloheximid (CHX) lysiert und jeweils gleiche Proteinmengen im Western Blot Verfahren analysiert. (A) Die KIF21B-Signalstärke wird innerhalb von 48 h deutlich minimiert und ist im zeitlichen Verlauf der von Optineurin ähnlich. Das Aktin-Signal bleibt unverändert. Die Detektion erfolgte jeweils mit KIF21B-, Optineurin- und Aktin-spezifischen Antikörpern. (B) Quantitative Analyse der in A dargestellten Daten aus 3 unabhängigen Experimenten. Die KIF21B- und Optineurin-Signale wurden zu Aktin normalisiert und die Werte der 4 h-Proben gleich 100% gesetzt. Mittelwerte in % KIF21B: 8h = 93.9 \pm 9.2, 24h = 57.8 \pm 11.5, 48h = 39.4 \pm 10.3. Mittelwerte in % Optineurin: 8h = 84.1 \pm 8.0, 24h = 71.6 \pm 12.0, 48h = 40.3 \pm 13.1. Fehlerbalken=SEM. *: $p \leq 0,05$.

Zur quantitativen Analyse wurden die Signalintensitäten von KIF21B und Optineurin aus drei unabhängigen Experimenten jeweils zum Aktinsignal normalisiert und die 4h-Werte gleich 100% gesetzt (Abb. 3.14B). Auch hier ist die kontinuierliche Abnahme der KIF21B-Signalintensität, die auf eine zunehmende Degradation von KIF21B schließen lässt, sehr deutlich. Innerhalb von 48 h wird das KIF21B-Signal im Vergleich zur 4 h-Probe um ca. 2/3 auf $39.4 \pm 10.3\%$ signifikant reduziert. Die Halbwertszeit von KIF21B liegt damit in kultivierten hippokampalen Neuronen zwischen 24 und 48 h. Die Werte für die Abnahme der Optineurin-Signalintensität weisen auf eine ähnliche Degradationsgeschwindigkeit hin.

Sollte KIF21B durch TRIM3 degradiert werden, so könnte die Depletion von TRIM3 zu einer erhöhten Stabilität von KIF21B führen, da weniger KIF21B der Degradation zugeführt würde. Um nun einen ersten Hinweis darauf zu erhalten, ob TRIM3 tatsächlich am Abbau von KIF21B beteiligt ist, wurden die Cycloheximid-*chase*-Experimente in kultivierten Neuronen aus *Trim3-Knockout*-Mäusen wiederholt.

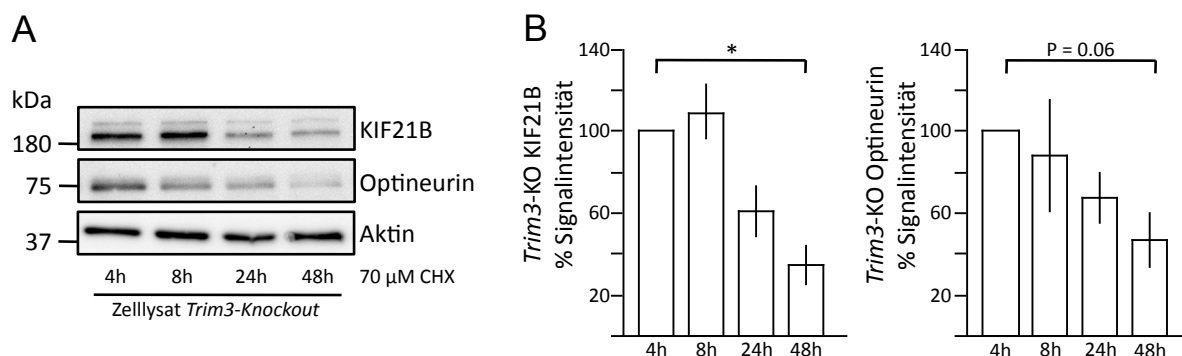


Abb. 3.15: Bestimmung der KIF21B-Stabilität in TRIM3-depletierten kultivierten Neuronen.

Kultivierte hippokampale Neurone aus *Trim3-Knockout*-Mäusen wurden im Alter von DIV16 nach 4-48 h Inkubation mit 70 μM Cycloheximid (CHX) lysiert und jeweils gleiche Proteinmengen im Western Blot Verfahren analysiert. (A) Die KIF21B-Signalstärke wird innerhalb von 48 h deutlich minimiert und ist im zeitlichen Verlauf der von Optineurin ähnlich. Das Aktin-Signal bleibt unverändert. Die Detektion erfolgte jeweils mit KIF21B-, Optineurin- und Aktin-spezifischen Antikörpern. (B) Quantitative Analyse der in A dargestellten Daten aus 3 unabhängigen Experimenten. Die KIF21B- und Optineurin-Signale wurden zu Aktin normalisiert und die Werte der 4 h-Proben gleich 100% gesetzt. Mittelwerte in % KIF21B: 8h = 110.4 ± 12.9 , 24h = 61.5 ± 12.0 , 48h = 35.4 ± 9.6 . Mittelwerte in % Optineurin: 8h = 88.9 ± 26.6 , 24h = 67.9 ± 11.9 , 48h = 46.7 ± 13.7 . Fehlerbalken= SEM. *: $p \leq 0,05$.

Wie zuvor bei den Wildtypzellen wurden kultivierte hippocampale Neurone im Alter von DIV16 nach 4- bis 48-stündiger Inkubation mit Cycloheximid lysiert und jeweils gleiche Proteinmengen der einzelnen Proben im Western Blot Verfahren analysiert. Hierbei zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie bei den Neuronen aus Wildtypmäusen: Das KIF21B-Signal wurde im Laufe von 48 h stark reduziert, während das Aktin-Signal mehr oder weniger unverändert blieb (Abb. 3.15A, vergleiche Abb. 3.14A). Die zeitliche Veränderung des Optineurin-Signals ähnelte wiederum der von KIF21B. Zur quantitativen Analyse wurden wieder die KIF21B- und Optineurin-Signale zur Aktin-Detektion normalisiert und die 4 h-Werte jeweils gleich 100% gesetzt (Abb. 3.15B). Ähnlich wie bei den Wildtyp-Lysaten wird das KIF21B-Signal innerhalb von 48 h im Vergleich zur 4 h-Probe um ca. 2/3 auf $35.4 \pm 9.6\%$ signifikant reduziert. Die Halbwertszeit von KIF21B liegt damit auch in kultivierten hippocampalen, TRIM3-depletierten Neuronen zwischen 24 und 48 h.

Eine direkte Gegenüberstellung der gewonnenen Mittelwerte aus den beiden Cycloheximid-*chase*-Experimenten zeigt deutlich, dass die KIF21B-Stabilität in kultivierten hippocampalen Neuronen aus *Trim3-Knockout*- und Wildtypmäusen identisch ist (Abb. 3.16).

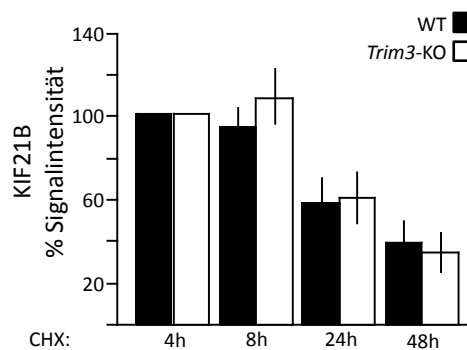


Abb. 3.16: Vergleich der KIF21B-Stabilität in kultivierten Neuronen aus Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen. Gegenüberstellung der in Cycloheximid-*chase*-Experimenten mit kultivierten Neuronen aus Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen erhaltenen Daten. Die Werte der 4 h-Proben wurden jeweils gleich 100% gesetzt. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festzustellen. Normalisierte Mittelwerte in % für KIF21B: 8h= WT 93.9 ± 9.2 , KO 110.4 ± 12.9 ; 24h= WT 57.8 ± 11.5 , KO 61.5 ± 12.0 ; 48h= WT 39.4 ± 10.3 , KO 35.4 ± 9.6 . Fehlerbalken=SEM.

3.2.2.2 KIF21B-Proteingehalt in TRIM3-depletierten Hirnlysaten

In den zuvor beschriebenen Cycloheximid-*chase*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich der zeitliche Verlauf der KIF21B-Degradation durch die Depletion von TRIM3 in kultivierten hippocampalen Neuronen nicht verändert (Kapitel 3.2.2.1). Der Aufbau bzw. die Analyse des Experimentes erlaubt allerdings keine Aussage darüber, ob der KIF21B-Proteingehalt *per se* in *Trim3-Knockout*-Mäusen verändert ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden Hippokampus-Lysate (S1-Fraktion, um Kernfraktion reduziertes Volllysat) aus 15 Tage alten Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen gewonnen und jeweils gleiche Proteinmengen der Lysate durch Western Blot Verfahren analysiert (Abb. 3.17A). Die Detektion der Neuronen-spezifischen Enolase (NSE) diente dabei als Ladekontrolle. Zusätzlich wurde der anterograde Motor KIF5 detektiert, da auch für dieses Protein eine Interaktion mit TRIM3 beschrieben ist (Kanai *et al.*, 2004) und daher zugleich ein potenzieller Einfluss von TRIM3 auf den KIF5-Gehalt untersucht werden sollte.

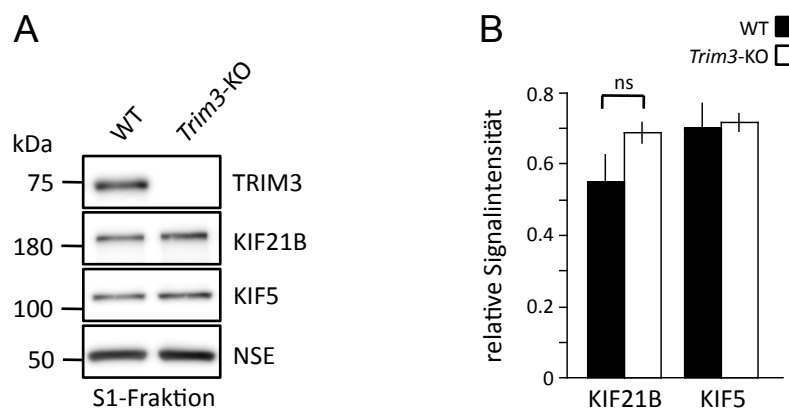


Abb. 3.17: Unveränderter KIF21B-Gehalt nach TRIM3-Depletion. Bestimmung des KIF21B-Gehaltes in hippocampalen S1-Lysaten, die aus 15 Tage alten Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen gewonnen wurden. (A) Western Blot Analyse gleicher Proteinmengen der Wildtyp- und *Knockout*-Lysate. Die Detektion erfolgte jeweils mit TRIM3-, KIF21B-, KIF5- und NSE (Neuronen-spezifische Enolase)-spezifischen Antikörpern. (B) Quantitative Analyse der in A dargestellten Daten aus jeweils 4 Wildtyp- und *Knockout*-Mäusen. Die Mittelwerte der zu NSE normalisierten KIF21B-Signale sind wie die der KIF5-Signale nicht signifikant unterschiedlich (ns) (KIF21B: WT 0.55 ± 0.08 , KO 0.69 ± 0.03 , Signifikanzwert $p=0.24$; KIF5: WT 0.70 ± 0.07 , KO: 0.72 ± 0.03 ; Signifikanzwert $p=0.86$). Fehlerbalken=SEM. S1-Lysat: Um Kernfraktion reduziertes Volllysat.

Im *Trim3-Knockout*-Lysat konnte im Vergleich zum Wildtyp-Lysat ein leichter Anstieg der zum NSE-Signal normalisierten KIF21B-Signalintensität beobachtet werden. Dieser Anstieg war nach quantitativer Analyse von jeweils 4 Wildtyp- und *Knockout*-Lysaten jedoch nicht signifikant (Abb. 3.17B). Die zu NSE normalisierten KIF5-Signalintensitäten waren ebenfalls in beiden Genotypen gleich (Abb. 3.17B).

3.2.2.3 Analyse des KIF21B-Gehaltes nach Überexpression von TRIM3 in kultivierten Neuronen

Wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben, konnte in Hippokampus-Lysaten aus Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen kein Unterschied im KIF21B-Proteingehalt festgestellt werden. TRIM3 gehört zur Familie der TRIM-Proteine, die in der Maus ca. 65 Mitglieder umfasst (Ozato *et al.*, 2008). Aufgrund der Domänenstruktur des C-Terminus bildet TRIM3 zusammen mit TRIM2, TRIM32 und TRIM71 die Subfamilie der sog. TRIM-NHL-Proteine, wobei TRIM3 und TRIM2 die größte Homologie innerhalb dieser Gruppe besitzen (Meroni und Diez-Roux, 2005; Wulczyn *et al.*, 2010; Vergleich der Aminosäuresequenz TRIM3 zu TRIM2 in BLAST: 67% Identität und 82% Ähnlichkeit). Da zudem TRIM2, wie TRIM3, stark im Nervensystem exprimiert wird (Balastik *et al.*, 2008), ist es denkbar, dass die TRIM3-Depletion im *Trim3-Knockout* durch TRIM2 kompensiert wird. Eine Kompensation durch andere TRIM-Proteine ist ebenfalls nicht auszuschließen. Um zu klären, ob der unveränderte KIF21B-Gehalt nach TRIM3-Depletion durch Kompensation zustande kommt oder ob TRIM3 tatsächlich keinen Einfluss auf die KIF21B-Degradation hat, wurde der Versuchsansatz der Überexpression gewählt. Sollte TRIM3 den Abbau von KIF21B als Ubiquitin-E3-Ligase vermitteln, so müsste eine Überexpression zu einer vermehrten Degradation des Substrates KIF21B führen.

Hippokampale Rattenneurone wurden im Alter von DIV10 mit Vektorkonstrukten transfiziert, die für HA-markiertes TRIM3 oder eine HA-markierte TRIM3-Mutante kodieren (Hung *et al.*, 2010). Bei dieser Mutante sind zwei konservierte Cystein-Reste der RING-Domäne zu Serin mutiert, wodurch die für die RING-Struktur und -Funktion notwendige Zinkbindung verloren geht und eine katalytisch inaktive Mutante entsteht (Waterman *et al.*, 1999; Hung *et al.*, 2010). Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen mit einem Vektor

transfiziert, der lediglich für die unfusionierte HA-Markierung kodierte. Da sich in Vorversuchen zeigte, dass die unfusionierte HA-Markierung nicht in der Immunfärbung detektiert werden konnte, wurden zudem alle Zellen mit einem für EGFP kodierenden Vektor kotransfiziert. Nach 4 Tagen Überexpression erfolgte die Fixierung und Immunfärbung gegen endogenes KIF21B und die HA-Markierung.

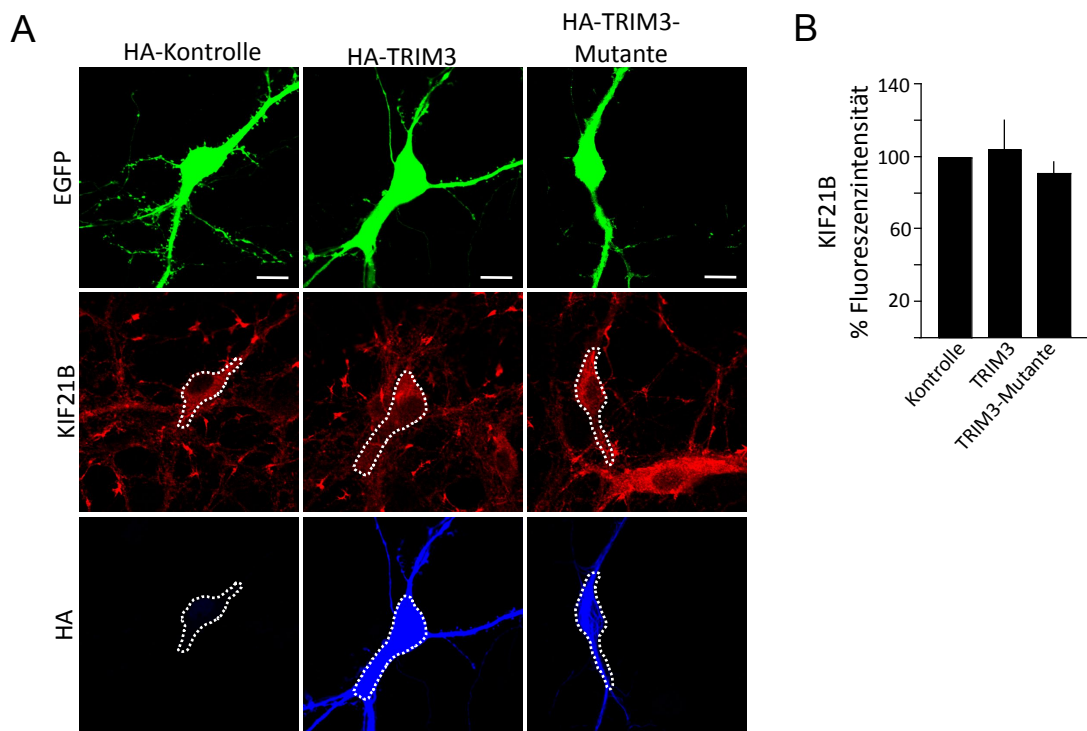


Abb. 3.18: KIF21B-Gehalt nach Überexpression von TRIM3 in kultivierten Neuronen. (A) Kultivierte hippocampale Rattenneurone wurden im Alter von DIV14 nach 4 Tagen Expression von unfusionierter HA-Markierung, HA-TRIM3 oder HA-TRIM3-Mutante fixiert und gegen HA (blau) und endogenes KIF21B (rot) immungefärbt. Zur Identifizierung aller transfizierten Zellen wurde EGFP koexprimiert (grün). Größenbalken: 20 μ m. (B) Quantitative Analyse der in A dargestellten Daten. Es wurde die somatische KIF21B-Fluoreszenzintensität (weiße Markierung in A) aus 3 unabhängigen Experimenten ausgewertet (Gesamtzellzahl n= HA-Kontrolle: 40, HA-TRIM3: 38, HA-TRIM3-Mutante: 36). Die Werte der 3 Experimente wurden gemittelt und die HA-Kontrolle gleich 100% gesetzt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den 3 Versuchsbedingungen (TRIM3= 104 \pm 17%; TRIM3-Mutante=91 \pm 6%). Fehlerbalken=SEM.

Wie Abb. 3.18A zeigt war die KIF21B-Signalintensität (rot) im Soma transfizierter Zellen in allen drei Versuchsbedingungen vergleichbar (weiße Markierung). Zur Quantifizierung wurde die somatische KIF21B-Fluoreszenzintensität von jeweils 12-14 Zellen pro Versuchsbedingung aus drei unabhängigen Experimenten ausgewertet (Abb. 3.18B;

Gesamtzellzahl n: HA-Kontrolle = 40, HA-TRIM3 = 38, HA-TRIM3-Mutante = 36). Die Werte der HA-Kontrolle wurden jeweils gleich 100% gesetzt und die Ergebnisse der drei Experimente gemittelt. Hierbei ergab sich bei Überexpression von HA-TRIM3 ein Wert von $104 \pm 17\%$ und bei Überexpression der HA-TRIM3-Mutante ein Wert von $91 \pm 6\%$ (Abb. 3.18B). Der KIF21B-Gehalt zeigte demnach im Mittel keine Veränderung durch Überexpression von TRIM3 oder der katalytisch inaktiven Mutante. Insgesamt führen die Ergebnisse zu dem Schluss, dass TRIM3 nicht an der Degradation von KIF21B beteiligt ist und KIF21B kein Substrat der E3-Ligase darstellt.

3.3 Einfluss von TRIM3 auf die intrazelluläre Verteilung von KIF21B und KIF5

Die in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Versuche ließen den Schluss zu, dass die Depletion von TRIM3 A) keinen Einfluss auf die Zelloberflächen-Lokalisation von pan-Neurologin hat und B) keinen Einfluss auf die Degradation von KIF21B hat. Da - wie bereits erwähnt - *Trim3-Knockout*-Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen ein verändertes Lernverhalten in Hippokampus-assoziierten Verhaltensexperimenten zeigen, scheint die Depletion von TRIM3 jedoch nicht vollständig kompensiert zu werden.

Es ist bekannt, dass die Bindung von Kinesinen an ihr *Cargo* durch Phosphorylierung des Motorproteins geändert werden kann (Lee und Hollenbeck, 1995; Guillaud *et al.*, 2008). Neben der Phosphorylierung ist die SUMOylierung eine häufige reversible Proteinmodifikation, die wie die Phosphorylierung Protein-Protein-Interaktionen verstärken oder abschwächen kann (Wilkinson und Henley, 2010), und kürzlich wurde die SUMOylierungsaktivität von TRIM-Proteinen gezeigt (Chu und Yang, 2011). Dies führte zu der Hypothese, dass TRIM3 Motorproteine reversibel modifizieren könnte und dies Einfluss auf die Funktion und/oder Lokalisation der Motorproteine haben könnte. Um eine mögliche molekulare Ursache für das veränderte Lernverhalten der *Knockout*-Tiere zu finden, wurde daher nachfolgend untersucht, ob TRIM3 Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung von Motorproteinen hat.

Dazu wurden Hippokampi von jeweils 4 Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen im Alter von P13 bis P14 vereint und differenziell zentrifugiert. Anschließend wurde die relative Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen (P2, P3, P4, S4) bestimmt und - da die Wildtyp- und *Knockout*-Lysate sehr ähnlich konzentriert waren - gleiche Volumina der Extrakte im Western Blot Verfahren analysiert. Abb. 3.19A zeigt das Ergebnis für die KIF21B-Detektion von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

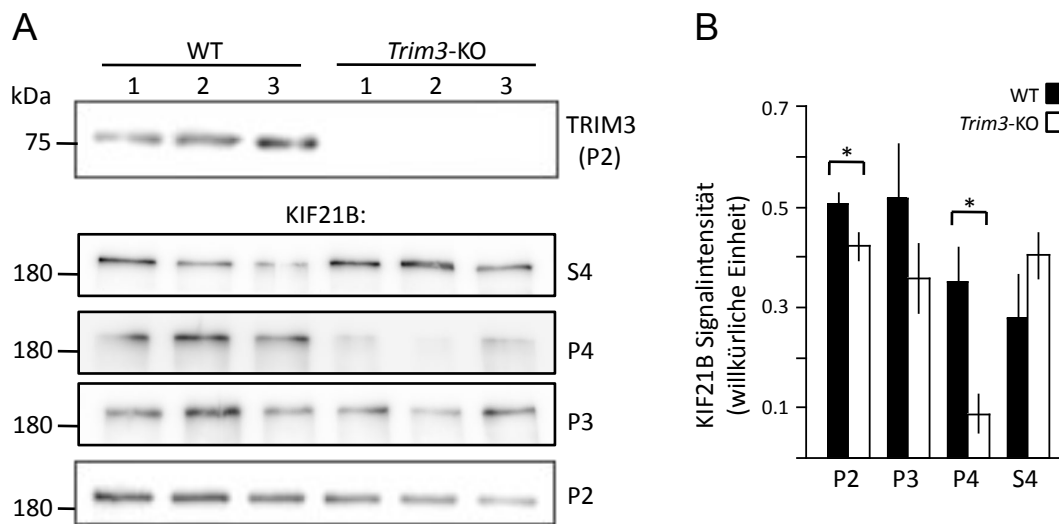


Abb. 3.19: Intrazelluläre Verteilung von KIF21B nach TRIM3-Depletion. Hippokampi von je 4 Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen (P13/14) wurden vereint und differenziell zentrifugiert. Gleiche Volumina der einzelnen Fraktionen (P2/P3/P4/S4) aus 3 unabhängigen Experimenten wurden durch Detektion mit einem KIF21B-spezifischen Antikörper im Western Blot Verfahren analysiert. Die Detektion mit einem TRIM3-spezifischen Antikörper diene als Ladekontrolle. (A) Die Fraktionen P2 und P3 zeigen -verglichen mit dem Wildtyp- im *Knockout*-Lysat eine leichte Reduktion in der KIF21B-Signalstärke. In der P4-Fraktion ist diese Reduktion deutlich zu erkennen. In S4 hingegen kann im *Knockout*-Lysat ein leichter Anstieg der KIF21B-Signalstärke beobachtet werden. (B) Quantitative Analyse der in A dargestellten Daten. Die Mittelwerte der zum relativen Proteingehalt normalisierten KIF21B-Signale betragen: P2: WT 0.51 ± 0.02 , KO 0.42 ± 0.03 ($p=0.04$); P3: WT 0.52 ± 0.11 , KO 0.36 ± 0.07 ($p=0.28$); P4: WT 0.35 ± 0.07 , KO 0.09 ± 0.04 ($p=0.03$); S4: WT 0.28 ± 0.09 , KO 0.41 ± 0.05 ($p=0.27$). Nur die Unterschiede in den P2- und P4-Fractionen sind mit $p \leq 0.05$ (*) signifikant.

Trotz Schwankungen der Signalintensitäten innerhalb der Genotypen ist zu erkennen, dass im Mittel über drei Lysate die KIF21B-Signalintensität in der P2- und P3-Fraktion, besonders aber in der P4-Fraktion in den Wildtyp-Lysaten stärker ist als in den *Trim3-Knockout*-Lysaten. In der S4-Fraktion hingegen verhält es sich umgekehrt: Hier ist im Mittel in den *Knockout*-Lysaten das stärkere KIF21B-Signal zu detektieren. Die in Abb. 3.19B dargestellte

quantitative Analyse der Signalintensitäten verdeutlicht die unterschiedliche KIF21B-Verteilung innerhalb der Fraktionen. Allerdings sind nur die Unterschiede in den P2- und P4-Fractionen statistisch signifikant. In der P3- und S4-Fraktion wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt, hier könnten sich jedoch Tendenzen abzeichnen.

Neben der Detektion von KIF21B wurde im selben Experiment die Verteilung des anterograden Motorproteins KIF5 und der Rezeptor-Untereinheit GABA_Aγ2 untersucht. Diese beiden Proteine wurden gewählt, da TRIM3 zusammen mit KIF5 Bestandteil von RNA *Granules* ist (Kanai *et al.*, 2004) und *Trim3-Knockout*-Mäuse in kortikalen Neuronen eine reduzierte Oberflächen-Lokalisation der GABA_Aγ2-Untereinheit aufweisen (Cheung *et al.*, 2010). Besonders bei der GABA_Aγ2-Untereinheit ist somit ein Unterschied in der Oberflächen-angereicherten P2-Fraktion wahrscheinlich.

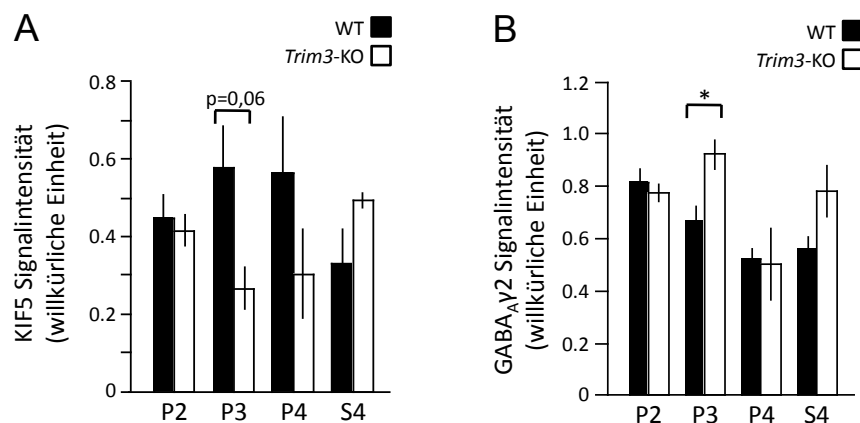


Abb. 3.20: Intrazelluläre Verteilung von KIF5 und GABA_Aγ2 nach TRIM3-Depletion.

Hippokampi von je 4 Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen (P13/14) wurden vereint und differenziell zentrifugiert. Gleiche Volumina der einzelnen Fraktionen (P2, P3, P4, S4) aus 3 unabhängigen Experimenten wurden im Western Blot Verfahren durch Detektion mit KIF5- und GABA_Aγ2-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Signalstärken wurden zum relativen Proteingehalt normalisiert und die Werte aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt. (A) Quantitative Analyse der KIF5-Detektion. Während in der P2-Fraktion kein Unterschied zwischen Wildtyp- und *Knockout*-Lysaten zu beobachten ist, zeigen die Fraktionen P3 und P4 im *Knockout*-Lysat eine Reduktion der Signalstärke, die in P3 eine deutliche Tendenz ist. In S4 kann im *Knockout*-Lysat ein leichter, statistisch aber nicht signifikanter Anstieg der Signalstärke beobachtet werden. (P2: WT 0.45±0.06, KO: 0.42±0.04 ($p=0.65$); P3: WT 0.58±0.11, KO 0.27±0.06 ($p=0.06$); P4: WT 0.57±0.14, KO 0.30±0.11 ($p=0.22$); S4: WT 0.33±0.09, KO 0.49±0.02 ($p=0.15$)). (B) Quantitative Analyse der GABA_Aγ2-Detektion. Die P3-Fraktion zeigt im *Knockout*-Lysat einen signifikanten Anstieg der Signalstärke. (P2: WT 0.82±0.05, KO 0.78±0.03 ($p=0.58$); P3: WT 0.68±0.06, KO 0.93±0.05, ($p=0.03$); P4: WT 0.51±0.04, KO 0.51±0.14 ($p=0.97$); S4: WT: 0.57±0.05, KO: 0.79±0.10 ($p=0.11$)). Fehlerbalken=SEM. *: $p \leq 0,05$.

Abb. 3.20A zeigt die quantitative Analyse der Signalintensität für KIF5. Hier konnten im Gegensatz zu KIF21B keine signifikanten Unterschiede in der P2- und P4-Fraktion festgestellt werden, wobei sich in der P4-Fraktion des *Knockout*-Lysats eine Tendenz zu einer Reduktion des KIF5-Signals abzeichnen könnte. In der P3-Fraktion war eine starke Tendenz zu mehr KIF5 im Wildtyp-Lysat und weniger im *Knockout*-Lysat zu beobachten. In der S4-Fraktion wurde wie bei der KIF21B-Detektion ein etwas stärkeres Signal im *Knockout*- als im Wildtyp-Lysat detektiert. Dieser Unterschied war aber auch hier nicht signifikant und weist höchstens auf eine Tendenz hin (Signifikanzwert $p=0.15$).

Die quantitative Analyse der Signalintensität der Rezeptor-Untereinheit GABA_Aγ2 zeigte einen signifikanten Unterschied in der P3-Fraktion: Hier konnte im *Trim3-Knockout*-Lysat ein deutlich stärkeres Signal im Vergleich zum Wildtyp-Lysat detektiert werden (Abb. 3.20B). In der S4-Fraktion war ebenfalls ein stärkeres Signal in den TRIM3-depletierten Lysaten zu beobachten, allerdings wurde hier keine Signifikanz erreicht, so dass sich lediglich eine Tendenz abzeichnen könnte. In den Fraktionen P2 und P4 wurden sehr ähnliche Signalintensitäten für beide Genotypen gemessen.

Nach erfolgter Detektion wurden die Western Blot Membranen mit Coomassie-Blau gefärbt, um zu bestätigen, dass identische Proteinmengen der einzelnen Proben analysiert wurden. So wurde ausgeschlossen, dass die beobachteten Unterschiede durch Fehler beim Beladen der SDS-Gele verursacht worden waren (Daten nicht gezeigt). Zudem wurden jeweils gleiche Mengen der P2-, P3-, P4- und S4-Fractionen vereint und diese rekonstituierten „Volllysate“ im Western Blot Verfahren analysiert um auszuschließen, dass die beobachteten Unterschiede dadurch zustande kamen, dass der Gesamtgehalt der untersuchten Proteine zwischen *Knockout*- und Wildtyp-Lysat verändert war. Abb. 3.21A zeigt das Ergebnis dieser Western Blot Analyse für die Proteine KIF5 und KIF21B, bei denen die größten Unterschiede zwischen den Fraktionen beobachtet worden waren. Neben den Motorproteinen wurde NSE als Ladekontrolle detektiert. Zur quantitativen Analyse wurden die KIF21B- und KIF5-Signalintensitäten zum NSE-Signal normalisiert (Abb. 3.21B) und das jeweilige Mittel aus den drei Lysaten errechnet. Ein Vergleich der Mittelwerte von Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Lysat zeigte eine Reduktion des KIF21B-Signals bei TRIM3-Depletion, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die KIF5-Signalintensitäten hingegen waren in

beiden Genotypen nahezu identisch. Diese Analyse bestätigt die zuvor beschriebenen Ergebnisse zur Untersuchung des KIF21B- bzw. KIF5-Gehaltes in hippokampalen S1-Lysaten (siehe Abb. 3.17). Hier war die Signalstärke von KIF5 in *Knockout*- und Wildtyp-Lysaten ebenfalls identisch und auch für KIF21B konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Allerdings ist zu beachten, dass in S1-Volllysaten aus *Trim3-Knockout*-Mäusen tendenziell mehr KIF21B detektiert wurde, in den „vereinten Volllysaten“ (P2 bis S4) aus *Trim3-Knockout*-Mäusen hingegen tendenziell weniger.

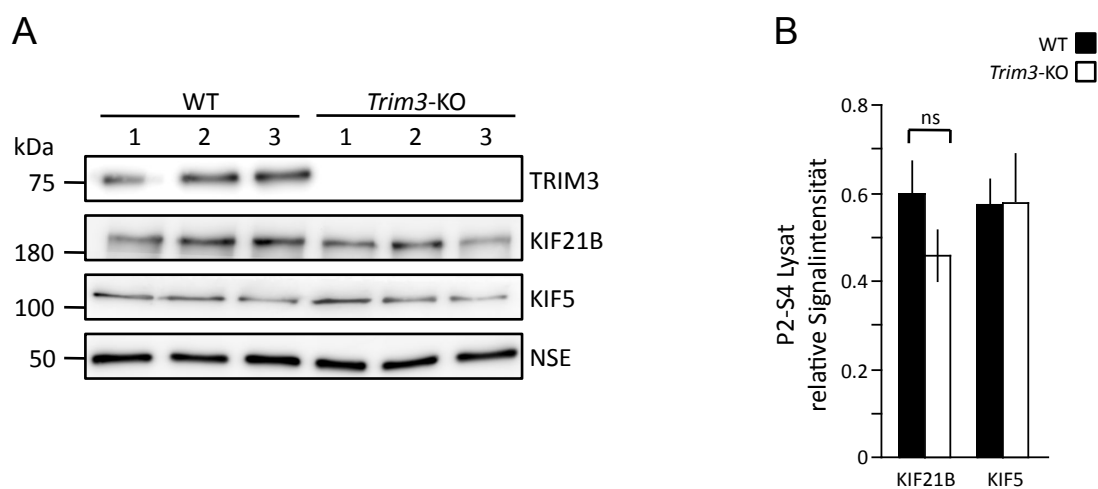


Abb. 3.21: Analyse des Gesamtgehaltes von KIF21B und KIF5 in differenziell zentrifugierten Hippokampus-Lysaten. (A) Gleiche Volumina der einzelnen Fraktionen (P2/P3/P4/S4) der differenziell zentrifugierten Hippokampus-Lysate wurden vereint und gleiche Volumina dieser Proben im Western Blot Verfahren analysiert. Die Detektion erfolgte mit TRIM3-, KIF21B-, KIF5 und NSE (Neuronen-spezifische Enolase)-spezifischen Antikörpern. (B) Quantitative Analyse der in A dargestellten Daten. Die KIF21B- und KIF5-Signale wurden zum NSE-Signal normalisiert und die Mittelwerte aus 3 unabhängigen (P2-S4)-Lysaten errechnet. Im *Knockout*-Lysat ist eine Reduktion der KIF21B-Signalintensität zu beobachten, die jedoch nicht signifikant ist (ns). Bei der KIF5-Detektion kann kein Unterschied zwischen den Lysaten beobachtet werden. (KIF21B: WT 0.60 ± 0.07 , KO 0.46 ± 0.06 , $p=0.22$; KIF5: WT 0.58 ± 0.06 , KO: 0.58 ± 0.11 , $p=0.98$). Fehlerbalken=SEM.

3.4 Einfluss von TRIM3 auf die Kinetik KIF5-vermittelter Transportprozesse

Die in Kapitel 3.3 beschriebene Analyse der intrazellulären Verteilung von KIF5 und KIF21B in differenziell zentrifugierten Hippokampus-Lysaten gab Hinweise darauf, dass nach TRIM3-Depletion weniger KIF5- und KIF21B-Motorproteine in Vesikel-angereicherten Fraktionen zu finden sind. So konnte in *Knockout*-Lysaten im Vergleich zu Wildtyp-Lysaten signifikant weniger KIF21B in der P4-Fraktion detektiert werden und das KIF5-Signal wies

bei TRIM3-Depletion eine sehr starke Tendenz zur Reduktion in der P3-Fraktion auf (Abb. 3.19 und 3.20). Mittels *Timelapse*-Videomikroskopie sollte nun untersucht werden, ob die TRIM3-Depletion auch Einfluss auf die Kinetik intrazellulärer Transportprozesse hat. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde GFP-markiertes Pur- α in kultivierten hippocampalen Neuronen aus Wildtyp- oder *Trim3-Knockout*-Mäusen exprimiert und die Bewegung der Pur- α -Partikel durch *Timelapse*-Aufnahmen dokumentiert. Anschließend erfolgte anhand dieser Aufnahmen die Analyse verschiedener Parameter des Pur- α -Transportes im Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Hintergrund. Pur- α wurde hierbei als „Modell-Cargo“ gewählt, da es zusammen mit TRIM3 in RNA *Granules* auftritt und diese RNA *Granules* wiederum von KIF5 transportiert werden (Kanai *et al.*, 2004). Außerdem sprachen methodische Gründe für dieses Protein: In kultivierten Neuronen exprimiertes GFP-Pur- α weist eine definierte, punktförmige Verteilung auf, die zur genauen Auswertung unabdingbar ist, und zeigt zudem einen relativ hohen Grad an Mobilität. In Abb. 3.22 ist die Bewegung eines solchen Pur- α -Partikels nach ca. 20 h Expression in kultivierten hippocampalen Neuronen aus Wildtyp-Mäusen dargestellt.

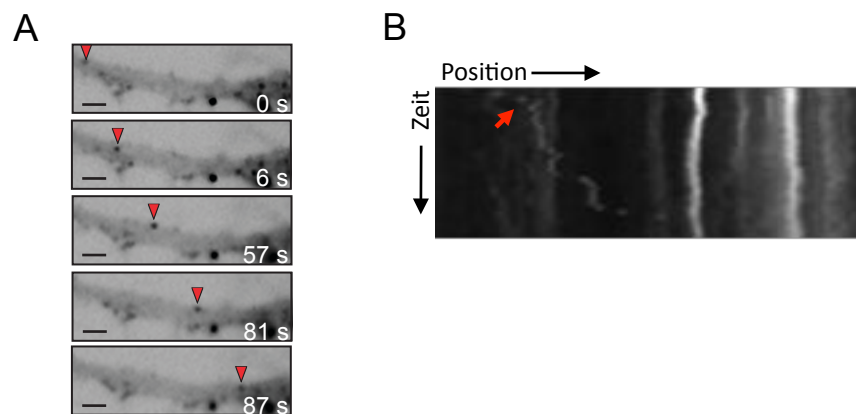


Abb. 3.22: Mobilität von GFP-markierten Pur- α -Partikeln in kultivierten Neuronen. Kultivierte hippocampale Mausneurone wurden im Alter von DIV8-10 mit einem Konstrukt kodierend für GFP-markiertes Pur- α transfiziert. Nach 15-24 h Expression wurden *Timelapse*-Aufnahmen über einen Zeitraum von 5 min mit einem Intervall von 3-5 sec vorgenommen. (A) Exemplarische Ausschnitte eines Neuriten mit einem mobilen GFP-Pur- α -Partikel (rote Pfeilspitze). Die Bewegung erfolgte in retrograde Richtung. Größenbalken: 2 μ m. (B) Kymographische Volldarstellung der Partikelmobilität der in A ausschnittshaft gezeigten *Timelapse*-Aufnahmen. Bei der Auftragung der Position gegen die Zeit werden mobile Partikel als schräg verlaufende Spuren sichtbar, immobile Partikel erscheinen als senkrechte Spuren. Der rote Pfeil markiert den mobilen Partikel aus A.

Um zu untersuchen, ob die Depletion von TRIM3 den Transport von Pur- α bzw. Pur- α -enthaltenden Partikeln verändert, wurden kultivierte hippocampale Neurone von Wildtyp- oder *Trim3-Knockout*-Mäusen im Alter von DIV8-10 mit einem für GFP-Pur- α kodierenden Konstrukt transfiziert. Nach einer Expressionsdauer von 15-24 h wurden *Timelapse*-Aufnahmen der transfizierten Zellen erstellt, wobei sich diese Aufnahmen über einen Zeitraum von 5 min mit einem Intervall von 3-5 sec erstreckten. Anschließend erfolgte die semi-manuelle Auswertung der *Timelapse*-Aufnahmen mit Hilfe der Software Metamorph (Molecular Devices, München).

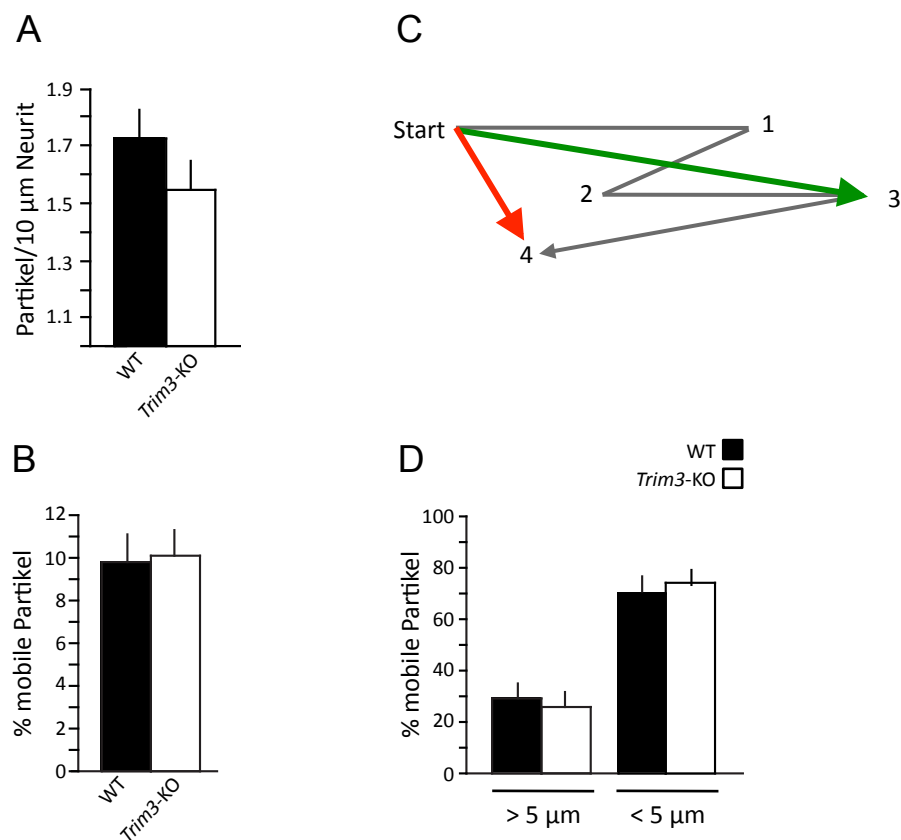


Abb. 3.23 Analyse der Mobilität von GFP-Pur- α -Partikeln in Neuronen aus Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen. (A) GFP-Pur- α wurde in Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Neuronen in vergleichbarer Stärke exprimiert (Partikel pro 10 μm Neurit: WT 1.73 \pm 0,1, KO 1.55 \pm 0,1). (B) In beiden Genotypen zeigten ca. 10% aller GFP-Pur- α -Partikel einer Zelle Mobilität (WT 9,76 \pm 1,37%, KO: 10,01 \pm 1,27%). (C) Schematische Darstellung der Laufstrecke eines GFP-Pur- α -Partikels mit Richtungswechseln. Der rote Pfeil markiert die Entfernung „Start-Endpunkt“, der grüne Pfeil die „maximale Entfernung vom Startpunkt“. Die Gesamtstrecke ist die Summe aller grauen Pfeile. (D) Analyse der Verteilung von Kurzstrecken- und Langstrecken-Partikeln (Kurzstrecke: maximale Entfernung vom Startpunkt < 5 μm , Langstrecke: maximale Entfernung vom Startpunkt > 5 μm). Es konnte keine Änderung des prozentualen Anteils von Kurz- oder Langstreckentransport in *Trim3-Knockout*-Zellen festgestellt werden (> 5 μm : WT 29,6 \pm 5,8%, KO 26,1 \pm 5,8%; < 5 μm : WT 70,4 \pm 5,8%, KO 73,9 \pm 5,8%). Alle Daten sind Mittelwerte. Fehlerbalken=SEM.

Zunächst wurde die gesamte Partikelanzahl gemessen, um die Vergleichbarkeit der Expressionsstärke zwischen den Genotypen zu überprüfen. Dazu wurden insgesamt 7679 μm Neuritenbereich aus 23 Wildtypzellen und 7956 μm Neuritenbereich aus 25 *Trim3-Knockout*-Zellen manuell ausgewertet und die Anzahl aller GFP-Pur- α -Partikel ermittelt. Wie in Abb. 3.23A dargestellt betrug die durchschnittliche Partikelanzahl pro 10 μm Neurit in Wildtyp-Zellen $1.73 \pm 0,1$ und in *Trim3-Knockout*-Zellen $1.55 \pm 0,1$ und war damit in beiden Genotypen ähnlich. Auch im prozentualen Anteil mobiler Partikel je Zelle konnte zwischen den beiden Genotypen kein Unterschied festgestellt werden (Wildtyp $9,76 \pm 1,37\%$, *Knockout* $10.01 \pm 1,27\%$) (Abb. 3.23B).

Außerdem wurde untersucht, ob bei TRIM3-Depletion eine Verschiebung von Lang- und Kurzstreckentransport beobachtet werden kann. Zum Verständnis dieser und auch der nachfolgenden Analysen sei zunächst anhand von Abb. 3.23C die typische „Laufstrecke“ eines GFP-Pur- α -Partikels illustriert. Vom Startpunkt aus kann sich ein Partikel uniform in anterograde oder retrograde Richtung bewegen. Hierbei kann der Partikel zwischenzeitlich pausieren oder aber kontinuierlich in Bewegung bleiben. Ein oftmals beobachtetes Verhalten ist die Umkehr in der Bewegungsrichtung, die innerhalb eines Laufes auch öfter stattfinden kann. Dies ist in Abb. 3.23C schematisch dargestellt. Hier bewegt sich ein Punkt erst anterograd vom Start bis Punkt 1, läuft dann retrograd bis Punkt 2, bewegt sich dann wieder anterograd bis Punkt 3, um in retrograder Bewegung letztlich bei Punkt 4 zu stoppen. Das Laufverhalten wurde nun folgendermaßen kategorisiert: Lag der Punkt mit der größten Distanz zum Start über 5 μm von diesem entfernt, so fiel der Partikel in die Kategorie „Langstrecke“ (grüner Pfeil $> 5 \mu\text{m}$). War die Entfernung kleiner als 5 μm , so fiel der Partikel in die Kategorie Kurzstrecke (grüner Pfeil $< 5 \mu\text{m}$). Das Ende des grünen Pfeils (Punkt 3) markiert somit die maximale Distanz zum Startpunkt. Die Strecke vom Start bis Punkt 4 (roter Pfeil) bezeichnet die Entfernung „Startpunkt bis Endpunkt“. Die Summe aller Teilstrecken (graue Pfeile) ergibt die Gesamtstrecke.

Unter Verwendung dieser Kategorisierung zeigte sich, dass durch TRIM3-Depletion keine Verschiebung von Lang- und Kurzstreckentransport festgestellt werden konnte (Abb. 3.23D). Der prozentuale Anteil der Langstrecken-Partikel ($> 5 \mu\text{m}$ maximale Entfernung vom Start) betrug in Wildtyp-Zellen $29.6 \pm 5.8\%$ und in *Trim3-Knockout*-Zellen $26.1 \pm 5.8\%$ und war

damit in beiden Genotypen ähnlich. Dementsprechend konnte auch bei dem weitaus größeren Anteil der Kurzstreckenpartikel ($< 5 \mu\text{m}$ maximale Entfernung vom Start) kein Unterschied zwischen Wildtyp- und *Knockout*-Zellen festgestellt werden (Wildtyp $70.4 \pm 5.8\%$, *Knockout* $73.9 \pm 5.8\%$).

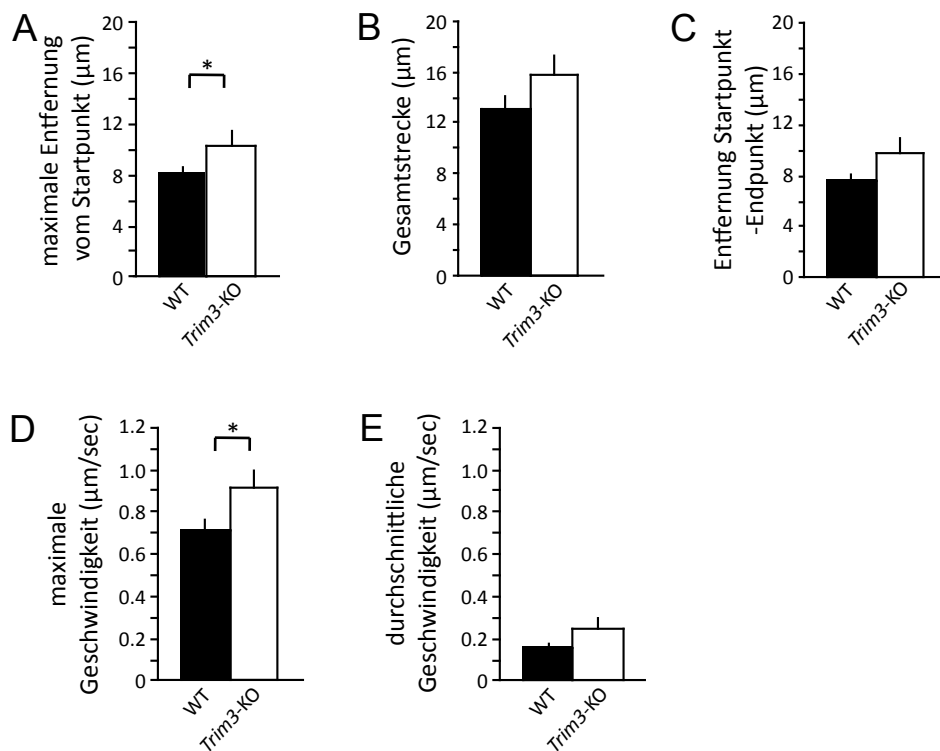


Abb. 3.24 Vergleich kinetischer Parameter der GFP-Pur- α -Bewegung in kultivierten Neuronen aus Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen. (A) Die maximale Entfernung der GFP-Pur- α -Partikel vom Startpunkt war in *Trim3-Knockout*-Zellen signifikant erhöht (WT $8.15 \pm 0.43 \mu\text{m}$, KO $10.39 \pm 1.16 \mu\text{m}$). (B) GFP-Pur- α -Partikel zeigten in *Trim3-Knockout*-Zellen eine leichte Tendenz zu längerer Gesamtstrecke (WT $13.15 \pm 0.86 \mu\text{m}$, KO $15.77 \pm 1.57 \mu\text{m}$, $p=0,12$). (C) Die Entfernung „Startpunkt bis Endpunkt“ war in *Trim3-Knockout*-Zellen ebenfalls tendenziell erhöht (WT $7.64 \pm 0.50 \mu\text{m}$, KO $9.75 \pm 1.23 \mu\text{m}$, $p=0,08$). (D) Die maximale Geschwindigkeit der GFP-Pur- α -Partikel war in *Trim3-Knockout*-Zellen signifikant erhöht (WT $0.72 \pm 0.04 \mu\text{m/sec}$, KO $0.91 \pm 0.09 \mu\text{m/sec}$, $p=0,03$). (E) Die durchschnittliche Geschwindigkeit der GFP-Pur- α -Partikel war im *Knockout*-Hintergrund tendenziell erhöht (WT $0.15 \pm 0.02 \mu\text{m/sec}$, KO $0.25 \pm 0.05 \mu\text{m/sec}$, $p=0,09$). Alle Daten sind Mittelwerte. Fehlerbalken=SEM. $*=p \leq 0,05$.

Die Analyse von insgesamt 67 mobilen Langstrecken-Partikeln (Wildtyp $n=40$, *Trim3-Knockout* $n=27$) zeigte jedoch im *Trim3-Knockout*-Hintergrund einen signifikanten Anstieg der „maximalen Entfernung vom Startpunkt“ (Abb. 3.24A). So betrug diese Distanz im Wildtyp-Hintergrund im Mittel $8.15 \pm 0.43 \mu\text{m}$ und im *Knockout*-Hintergrund $10.39 \pm 1.16 \mu\text{m}$.

Auch die „Gesamtstrecke“ und die „Entfernung Startpunkt-Endpunkt“ waren in TRIM3-depletierten Zellen leicht erhöht (Abb. 3.24B, 3.24C). Diese Unterschiede sind zwar nicht signifikant, deuten mit Signifikanzwerten von $p \leq 0.1$ jedoch auf deutliche Tendenzen hin. Die Analyse der Partikel-Geschwindigkeiten weist ebenfalls auf einen Einfluss von TRIM3 auf aktive Transportprozesse. So war die maximale Geschwindigkeit der GFP-Pur- α -Partikel in *Trim3-Knockout*-Zellen - verglichen mit Wildtypzellen - signifikant erhöht (WT: 0.72 ± 0.04 $\mu\text{m}/\text{sec}$, KO: 0.91 ± 0.09 $\mu\text{m}/\text{sec}$, Signifikanzwert $p=0.03$) (Abb. 3.24D). Auch die durchschnittliche Geschwindigkeit zeigte im *Trim3-Knockout*-Hintergrund einen Anstieg, der mit einem Signifikanzwert von $p=0.09$ eine Tendenz aufweist (WT: 0.15 ± 0.02 $\mu\text{m}/\text{sec}$, KO: 0.25 ± 0.05 $\mu\text{m}/\text{sec}$; Abb. 3.24E). Eine Analyse der Nettotransportrichtung (Endpunkt in antero- oder retrograde Richtung vom Startpunkt, vergl. Abb. 3.23C) zeigte hingegen keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Der prozentuale Anteil von anterogradem und retrogradem Transport lag in Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Zellen jeweils bei ca. 50% (27 Partikel im KO: 14 anterograd, 13 retrograd; 40 Partikel im WT: 18 anterograd, 20 retrograd, 2 ohne eindeutig definierbare Richtung).

Eine detaillierte Analyse von 156 Kurzstrecken-Partikeln (Wildtyp $n=76$, *Trim3-Knockout* $n=80$) zeigte in allen untersuchten Parametern (maximale und durchschnittliche Geschwindigkeit, Gesamtstrecke, „maximale Entfernung vom Startpunkt“, „Entfernung Startpunkt-Endpunkt“, prozentualer Anteil von anterogradem und retrogradem Transport) keinerlei Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Zellen (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

Neurone sind morphologisch und funktionell stark polarisierte Zellen und sind zur Ausbildung und Aufrechterhaltung ihrer Funktion auf aktive intrazelluläre Transportprozesse angewiesen (Hirokawa *et al.*, 2010). Die meisten Proteine werden im Soma synthetisiert und müssen daher über gezielte aktive Transportprozesse zu ihrem Bestimmungsort gebracht werden. Selbst lokale Proteinsynthese in Neuriten (z.B. in *Spines*) ist von aktivem Transport abhängig, da auch die mRNA vom Soma in die Zellperipherie gebracht werden muss (Martin und Zukin, 2006). Dies erfolgt über Proteine der Motorprotein-Familien Myosin, Kinesin/KIF und Dynein. Diese Motoren binden ihr *Cargo* - wie RNA *Granules* oder Oberflächenproteine tragende Vesikel - entweder direkt oder über Adapterproteine und nutzen das Aktin- oder Mikrotubulizytoskelett als molekulare Straßen (Hirokawa *et al.*, 2010). Für das *Tripartite-Motif*-Protein TRIM3 konnte im Myosin V-vermittelten Transport, der über Aktinfilamente erfolgt, bereits eine potenzielle Adapterfunktion gezeigt werden (Yan *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist TRIM3 Bestandteil von RNA *Granules*, die von dem Mikrotubuli-abhängigen Motor KIF5 transportiert werden, doch die genaue Art dieser Interaktion und ihre Funktion ist nicht bekannt (Kanai *et al.*, 2004). Anhand einer neu identifizierten Interaktion zwischen TRIM3 und dem Mikrotubuli-abhängigen Motorprotein KIF21B sollte daher in dieser Arbeit untersucht werden, ob und welchen Einfluss TRIM3 auf Mikrotubuli-abhängige Transportprozesse hat. Dabei standen zunächst zwei Fragestellungen im Vordergrund (siehe auch Kapitel 3.2):

Zum einen sollte untersucht werden, ob TRIM3 Bestandteil des KIF21B-Neurologin-Transportkomplexes ist. Das Zelladhäsionsmolekül Neurologin ist das einzige bislang bekannte KIF21B-*Cargo* und wird von dem anterograden Motorprotein zur Zelloberfläche transportiert (siehe Kapitel 1.3.2) (Schapitz, 2009, Dissertation). Für KIF21B und Neurologin ist nicht geklärt, ob die Interaktion direkt oder indirekt erfolgt. Wie bereits erwähnt übernimmt TRIM3 im Myosin-abhängigen Transport wahrscheinlich Adapterfunktion und ist darüber hinaus auch Bestandteil von KIF5-Transportkomplexen. Vor diesem Hintergrund lag die Hypothese nahe, dass TRIM3 als Adapter oder regulatorischer Faktor auch Bestandteil des KIF21B-Neurologin-Transportkomplexes sein könnte.

TRIM-Proteine stellen eine der größten Gruppe von Ubiquitin-RING-E3-Ligasen dar (Sardiello *et al.*, 2008) und kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch TRIM3 funktionelle

Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität besitzt (Hung *et al.*, 2010) (siehe auch Kapitel 1.4.2 und 1.4.3). Daher sollte zum anderen die Frage geklärt werden, ob TRIM3 die Ubiquitin-abhängige Degradation von KIF21B vermittelt und es sich demnach bei der identifizierten Interaktion um einen Substrat-Enzym-Komplex handeln könnte. Im Folgenden werden die Versuchsergebnisse zum Nachweis der KIF21B-TRIM3-Bindung im Hinblick auf diese beiden Arbeitshypothesen diskutiert.

4.1 Die Interaktion von KIF21B und TRIM3

Die hier erstmals beschriebene Interaktion von KIF21B und TRIM3 wurde in Koimmunpräzipitationen aus Rattenhirnextrakten identifiziert. Dabei wurde die sogenannte P4-Fraktion verwendet, die neben großen Proteinkomplexen auch Membranorganellen enthält, die nicht in der Vesikel-angereicherten P3-Fraktion pelletiert worden sind (Saito *et al.*, 1997). Da diese Fraktion somit auch kleine Transportvesikel enthalten sollte, könnte eine Kopräzipitation von TRIM3 und KIF21B aus diesem Extrakt auf eine Transport-assoziierte Funktion von TRIM3 hindeuten. Darüber hinaus enthält die P4-Fraktion aber auch große Proteinkomplexe und TRIM3 könnte als Bestandteil dieser Proteinkomplexe sowohl eine Transport- als auch eine Degradations-assoziierte Funktion haben. Für TRIM-Proteine wurde die Eigenschaft zur Bildung hochmolekularer Proteinkomplexe durch Multimerisierung beschrieben (Reymond *et al.*, 2001; Napolitano und Meroni, 2012). Diese multimeren Komplexe sollten in der P4-Fraktion angereichert sein. Für TRIM3 wurde bislang zwar nur eine Homodimerisierung nachgewiesen (El-Husseini und Vincent, 1999; Reymond *et al.*, 2001), doch ist aufgrund der TRIM3-Domänen-Struktur eine Integration in größere neuronale Proteinkomplexe sehr wahrscheinlich. Um die vielfältigen TRIM3-Interaktionsmöglichkeiten zu verdeutlichen, wird in Abb. 4.1 nochmals die TRIM3-Domänen-Struktur schematisch gezeigt. So binden TRIM-Proteine über die RING-Domäne die Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyme und über die B-Boxen und *Coiled-coil*-Domänen andere TRIM-Proteine und/oder Substrate. Die C-terminale β -Propeller-Struktur von TRIM3 ist in vielen Proteinen als Plattform für vielseitige Protein-Protein-Wechselwirkungen beschrieben (Napolitano und Meroni, 2012; Smith, 2008). In HeLa-Zellen konnte zudem bereits durch Identifizierung des sog. CART-Komplexes - bestehend aus Hrs, Actinin-4, TRIM3 und Myosin V- gezeigt werden, dass TRIM3 in größere Proteinkomplexe mit Transportfunktion integriert sein kann (Yan *et al.*, 2005).

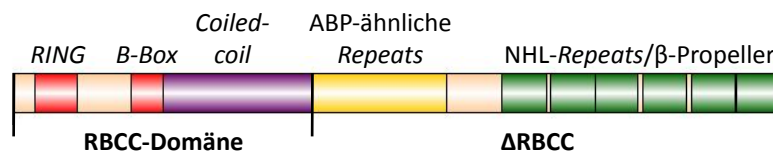


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der TRIM3-Domänen-Struktur. Das N-terminale RBCC-Motiv besteht aus einer RING-, B-Box und *Coiled-coil*-Domäne. Der C-Terminus enthält Aktin-Bindeprotein (ABP)-ähnliche *Repeats* und *NHL-Repeats*, die sich zu einer β -Propeller-Struktur falten.

Die Interaktion von KIF21B und TRIM3 konnte durch Koimmunpräzipitationen mit heterolog exprimierten Fusionsproteinen in HEK293-Lysaten bestätigt werden. Dabei wurde gezeigt, dass KIF21B mit dem C-Terminus von TRIM3 interagiert (Δ RBCC, Abb.4.1). Im Hefe-2-Hybrid-System konnte hingegen nachgewiesen werden, dass die KIF21B-*Stalk*-Domäne direkt mit der N-terminalen TRIM3-RBCC-Domäne und nicht mit dem TRIM3-C-Terminus interagiert. Diese Ergebnisse sind nur auf den ersten Blick widersprüchlich, da die direkte Bindung von der KIF21B-*Stalk*-Domäne an die TRIM3-RBCC-Domäne eine zusätzliche indirekte Interaktion über weitere Domänen nicht ausschließt. So bindet auch das Protein *Sundriver Driver* den Motor KIF5 entweder direkt oder - unabhängig von der direkten Interaktion - indirekt über KIF5-assoziierte Ketten (Sun *et al.*, 2011). Damit deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass TRIM3 sowohl direkt als auch indirekt an KIF21B binden kann. Bei der Überexpression in HEK293-Zellen wurde bewusst ein TRIM3-Deletionskonstrukt ohne die N-terminale RBCC-Domäne verwendet, da TRIM-Proteine wie bereits erwähnt insbesondere über die *Coiled-coil*-Domäne mit sich selbst oder anderen TRIM-Proteinen di- und multimerisieren können (Reymond *et al.*, 2001). Da HEK293-Zellen mindestens 5 verschiedene TRIM-Proteine exprimieren (Uchil *et al.*, 2008), sollte durch Verwendung des Deletionskonstruktes ausgeschlossen werden, dass eine Bindung von KIF21B und TRIM3 durch „unspezifische“ Interaktion über andere TRIM-Proteine zustande kommt. Für TRIM3 wurden heterophile Interaktionen mit anderen TRIM-Proteinen zwar noch nicht gezeigt, sind bei insgesamt ca. 70 Familienmitgliedern aber sehr wahrscheinlich. Dass TRIM3 und KIF21B in HEK293-Lysaten auch in Abwesenheit der direkten Bindestelle der RBCC-Domäne interagieren, könnte durch die C-terminale Domänen-Struktur der beiden Proteine begründet sein. Beide verfügen am C-Terminus über eine β -Propeller-Struktur, wodurch die Wahrscheinlichkeit für eine indirekte Interaktion über gemeinsame Bindepartner sehr hoch ist. Da HEK293-Zellen auch neuronale Proteine exprimieren (He und Soderlund,

2010), wird die beobachtete Interaktion in HEK293-Lysaten vermutlich indirekt durch gemeinsame (neuronal) Bindepartner vermittelt. Die Frage, ob KIF21B auch endogen sowohl mit dem TRIM3-C- als auch N-Terminus interagiert, könnte in weiterführenden *Pulldown*-Versuchen geklärt werden, indem TRIM3-Deletionskonstrukte immobilisiert und mit Hirnlysaten inkubiert werden und anschließend die Interaktion mit endogenem KIF21B analysiert wird.

Die im Hefe-2-Hybrid-System identifizierten Bindestellen zwischen TRIM3 und KIF21B stimmen gut mit den Ergebnissen der einzigen Studie überein, die ebenfalls eine direkte Bindung von Kinesin-Motoren und einem TRIM-Protein beschrieben hat (Huang *et al.*, 2012). Diese Studie zeigte die Interaktion des Testis-spezifischen Proteins TRIM60 mit dem heterodimeren Kinesin KIF3A/B. Huang und Kollegen konnten im Hefe-2-Hybrid-System zeigen, dass TRIM60 sowohl über die RBCC-Domäne als auch über den C-Terminus an die Motoren bindet und dass die KIF3-Motoren entweder über die *Stalk*- oder über die *Tail*-Domäne mit TRIM60 interagieren.

Viele N-Kinesine binden ihr *Cargo* über die C-terminale *Tail*-Domäne, doch auch *Cargo*-Rekrutierung über die *Stalk*-Domäne wurde bereits beschrieben (Hirokawa *et al.*, 2010). So bindet z.B. KIF21A, der Motor mit der größten Homologie zu KIF21B, sein *Cargo* Kank1 über die *Stalk*-Domäne (Kakinuma und Kiyama, 2009). Demnach könnte die Bindung von TRIM3 an die KIF21B-*Stalk*-Domäne ein weiterer Hinweis darauf sein, dass TRIM3 in einen KIF21B-assoziierten Transportvorgang involviert ist. In diesem Zusammenhang könnte überlegt werden, die genaue KIF21B-Bindestelle in der TRIM3-RBCC-Domäne im Hefe-2-Hybrid-System weiter einzugrenzen, um so weitere Hinweise zur möglichen Funktion der Bindung zu erhalten. Hier ist aber zu bedenken, dass sich generell über die identifizierte Bindestelle im TRIM-Protein nur sehr begrenzt Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion ziehen lassen, was durch die Komplexität und Variabilität der TRIM-Interaktionen begründet ist. So ist bereits die Substraterkennung nicht in allen TRIM-E3-Ligasen identisch. Beispielsweise bindet TRIM18 sein Substrat, die Phosphataseuntereinheit $\alpha 4$, über die erste von zwei B-Boxen (Trockenbacher *et al.*, 2001). In die Bindung von TRIM11 an sein Substrat Humanin hingegen sind sowohl die *Coiled-coil*-Domäne als auch die C-terminale B30.2-Domäne involviert (Niikura *et al.*, 2003). Für die Bindung von TRIM2 an sein Substrat Neurofilament NF-L ist die RBCC-Domäne wiederum gar nicht notwendig, sie

erfolgt über die C-terminalen Filamin- und NHL-*Repeats* (Balastik *et al.*, 2008). Für die enzymatische Aktivität dieser E3-Ligasen ist die RING-Domäne unerlässlich, da über sie die Rekrutierung der Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyme stattfindet (Napolitano *et al.*, 2011). Bei einer direkten Bindung zwischen KIF21B und der TRIM3-RING-Domäne wäre eine E3-Ligase-Funktion von TRIM3 beeinträchtigt, da die nötige E2-Interaktion nicht mehr ungehindert stattfinden könnte. Dies ließe wiederum eine Degradations-assoziierte Funktion auf den ersten Blick unwahrscheinlich erscheinen. Da TRIM-Proteine aber zu multimeren Komplexen assemblieren können und TRIM3 dadurch Bestandteil eines Proteinkomplexes mit neuen Substrat-Enzym-Interaktionen sein könnte, könnte trotz blockierter E2-Bindestelle eine KIF21B-Ubiquitylierung stattfinden (Napolitano und Meroni, 2012).

An dieser Stelle sei auch auf die große funktionelle Variabilität selbst innerhalb der TRIM-Subfamilien hingewiesen. So bildet TRIM2 zusammen mit TRIM3, TRIM32 und TRIM71 die Subfamilie der TRIM-NHL-Proteine (Ozato *et al.*, 2008). TRIM2, TRIM3 und TRIM32 werden alle stark im Gehirn exprimiert (Balastik *et al.*, 2008; El-Husseini und Vincent, 1999; Kudryashova *et al.*, 2009). Sowohl TRIM2- als auch TRIM32-Depletion verändern den zellulären Gehalt der Neurofilament-Isoform NF-L, doch während TRIM2-Depletion zu einer Akkumulation von NF-L führt, hat TRIM32-Depletion eine Reduktion von NF-L zur Folge (Balastik *et al.*, 2008; Kudryashova *et al.*, 2009). Die funktionelle Komplexität der TRIM-Proteine wird auch durch die unterschiedlichen Auswirkungen von Mutationen in ein und demselben Protein deutlich. So führen Mutationen in den NHL-*Repeats* von TRIM32 zu speziellen Formen von Muskeldystrophie, Mutationen im TRIM32-B-Box-Motiv hingegen verursachen das Bardet-Biedl-Syndrom, eine multisystemische Erkrankung, die u.a. zu kognitiver Beeinträchtigung, Adipositas und Nierenerkrankungen führt (Kudryashova *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass KIF21B und TRIM3, die beide bereits embryonal exprimiert werden (Hung *et al.*, 2010; Silverman *et al.*, 2010), *in vitro* nur in kultivierten Neuronen, aber nicht in Astrozyten exprimiert werden. Hung und Kollegen konnten TRIM3 in einer Neuronen-Glia-Kokultur ebenfalls nicht in Gliazellen detektieren (Hung *et al.*, 2010). Eine Studie von Silverman und Kollegen deutet indirekt darauf hin, dass auch KIF21B im Hippokampus hauptsächlich neuronal exprimiert wird (Silverman *et al.*, 2010). Die hier bestätigte spezifisch neuronale Expression der beiden Bindepartner KIF21B

und TRIM3 schließt eine Expression in anderen Zelltypen zwar nicht aus, ermöglicht es aber, die funktionelle Charakterisierung der Interaktion im Hippokampus auf eine neuronale Ebene zu begrenzen.

Die Interaktion von TRIM3 und KIF21B konnte durch Koimmunfärbungen hippokampaler Neurone auch auf zellulärer Ebene bestätigt werden. KIF21B wurde dabei wie von Schapitz beschrieben (Schapitz, 2009, Dissertation) besonders stark in Wachstumskegel-ähnlichen Strukturen detektiert. In Einzelimmunfärbungen konnte TRIM3 nie in ähnlichen Strukturen detektiert werden, was nahe legt, dass die bislang ungeklärte Funktion von KIF21B in diesem zellulären Kompartiment von TRIM3 unabhängig ist. In Neuriten wurden TRIM3 und KIF21B in definierten, punktförmigen Strukturen detektiert, die zum Teil auch kolokalisiert waren. Eine punktförmige Verteilung ist typisch für Motorproteine in Assoziation mit Membranorganellen (Leopold *et al.*, 1992) und könnte dementsprechend auch für eine Transport-assoziierte Funktion der KIF21B-TRIM3-Interaktion sprechen. Unterstützt wird diese Annahme durch die in dieser Arbeit gezeigte ultrastrukturelle Lokalisation von TRIM3, da TRIM3 im Soma hippokampaler Neurone an vesikulären Strukturen detektiert werden konnte, die mit einer Größe von ca. 50 nm Transportvesikel sein können (Pryer *et al.*, 1992).

4.2 Funktion von TRIM3 im KIF21B-vermittelten Neuroligin-Transport

Wie zuvor beschrieben deuten die Versuchsergebnisse zum Nachweis der TRIM3-KIF21B-Interaktion darauf hin, dass TRIM3 in den KIF21B-vermittelten Transport involviert ist. Da Neuroligin das einzig bislang bekannte KIF21B-Cargo ist, wurde untersucht, ob TRIM3 Bestandteil des KIF21B-Neuroligin-Transportkomplexes ist. KIF21B interagiert in Koimmunpräzitationsversuchen sowohl mit Neuroligin (Schapitz, 2009, Dissertation) als auch mit TRIM3, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Tatsächlich konnten in Übereinstimmung mit der Existenz eines Triple-Komplexes bei Immunpräzipitation von Neuroligin sowohl KIF21B als auch TRIM3 kopräzipitiert werden. In diesem Versuch wurde neben S1-„Volllysaten“ gezielt die P3-Fraktion differenziell zentrifugierter Hirnlysate verwendet, da in dieser Vesikel-Fraktion auch intrazelluläre Transportvesikel angereichert sind (Lee *et al.*, 2001). Auch die Immunfluoreszenzfärbungen deuten auf eine Interaktion von TRIM3, KIF21B und Neuroligin hin, da in Neuriten kultivierter hippokampaler Neurone definierte, punktförmige Signalüberlagerungen aller drei Proteine detektiert wurden.

Um zu untersuchen, ob TRIM3 ein essenzieller Adapter im KIF21B-vermittelten Neuroligin-Transport zur Zelloberfläche ist, wurde der Neuroligin-Oberflächengehalt im Hippokampus von *Trim3-Knockout*-Mäusen analysiert. AMPA-Rezeptoren, die die GluR2-Untereinheit enthalten, binden über den Adapter GRIP1 an den Motor KIF5 und werden in Dendriten transportiert (Setou *et al.*, 2002). Eine Reduktion der GRIP1-Expression führt zu einer Reduktion von GluR2 an der Zelloberfläche (Hoogenraad *et al.*, 2005). Entsprechend könnte auch TRIM3-Depletion zu einer Reduktion von Neuroligin an der Zelloberfläche führen. Allerdings konnten in dieser Arbeit weder in der Oberflächenmembran-angereicherten P2-Fraktion aus Hippokampusgewebe noch in Biotinylierungsexperimenten mit hippokampalen Neuronen Unterschiede im Neuroligin-Oberflächengehalt zwischen Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen festgestellt werden. Diesen Ergebnissen können verschiedene Ursachen zugrunde liegen.

So könnte TRIM3 zwar im KIF21B-Neuroligin-Transport eine Adapterfunktion haben, die TRIM3-Depletion aber in der *Knockout*-Maus durch andere TRIM-Proteine kompensiert werden. Hier ist eine Kompensation durch TRIM2 am wahrscheinlichsten. Beide Proteine werden stark im Hippokampus exprimiert und sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 67% identisch und zu 82% ähnlich (Balastik *et al.*, 2008; BLAST-Vergleich, NCBI). Eine für TRIM3 kompensatorische Funktion von TRIM2 wurde zwar noch nicht beschrieben, doch deutet zumindest der Phänotyp der *Trim2-Knockout*-Maus auf solch kompensatorische Effekte hin. TRIM2 vermittelt die Ubiquitin-abhängige Degradation der Neurofilament-Isoform NF-L und *Trim2-Knockout*-Mäuse zeigen eine mit Ataxie verbundene Neurodegeneration, die im Cerebellum besonders stark ausgeprägt ist (Balastik *et al.*, 2008). Hier entwickeln vor allem die Purkinjezellen durch die NF-L-Akkumulation axonale Anschwellungen, die dann zur Zelldegeneration führen. Interessanterweise sind die Purkinjezellen ein Zelltyp, der zwar TRIM2, aber nicht TRIM3 exprimiert (persönliche Information von Dr. Ronald van Kesteren, Freie Universität Amsterdam, Niederlande). Im Hippokampus hingegen, wo beide Proteine stark exprimiert werden, wurde keine NF-L-Akkumulation beobachtet. So könnte die hippokampale TRIM3-Expression die TRIM2-Depletion kompensieren, während in den Purkinje-Zellen des Cerebellums keine Kompensation stattfinden kann.

Zum anderen könnten Neuroligin-Isoform-spezifische Effekte in dieser Arbeit durch die Verwendung eines pan-Neuroligin-spezifischen Antikörpers überdeckt worden sein. Schapitz

ging in ihrer Arbeit von einer spezifischen Interaktion zwischen KIF21B und Neuroligin 1 aus (Schapitz, 2009, Dissertation). In anfänglichen Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte in P2-Fractionen differenziell zentrifugierter Cerebellum-Extrakte kein Unterschied im Neuroligin 1-Oberflächengehalt zwischen Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen detektiert werden, während die selben Extrakte aber einen signifikanten Unterschied im pan-Neuroligin-Gehalt zeigten (Daten nicht gezeigt). Zudem ist inzwischen durch weitere Koimmunpräzipitationsversuche und Verwendung anderer Neuroligin-Isoform-spezifischer Antikörper deutlich, dass KIF21B mit allen Neuroligin-Isoformen (1 bis 4) interagieren kann (persönliche Information von E. Thies, Inst. für Molekulare Neurogenetik, ZMNH, Hamburg). Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein pan-Neuroligin-Antikörper verwendet. Es ist nun jedoch denkbar, dass TRIM3 nur an eine Subpopulation der KIF21B-Neuroligin-Komplexe bindet. Da KIF21B alle Neuroligin-Isoformen binden kann, die Isoformen aber spezifisch an inhibitorischen und/oder exzitatorischen Synapsen lokalisieren (siehe Kapitel 1.2.3), muss eine synapsenspezifische *Cargo*-Zielsteuerung reguliert werden. TRIM3 könnte ein regulatorischer Faktor sein, der z.B. spezifisch an Neuroligin-2-Komplexe bindet, die an inhibitorischen Synapsen angereichert sind (Varoqueaux *et al.*, 2004). In diesem Fall wäre die selektive Veränderung des Neuroligin 2-Oberflächengehaltes vielleicht nicht ausreichend, um auch auf pan-Neuroligin-Ebene Veränderungen hervorzurufen. TRIM3-Depletion könnte in diesem Kontext aber auch eine Umverteilung von Neuroligin an der Oberfläche zur Folge haben und z.B. dazu führen, dass Neuroligin 2 nicht nur an inhibitorischen, sondern auch an exzitatorischen Synapsen lokalisiert ist. Ein solcher Effekt würde sich in den hier durchgeführten Experimenten ebenfalls nicht nachweisen lassen, da sich der Oberflächengehalt *per se* nicht ändern müsste. Um eindeutig zu klären, ob TRIM3 für den anterograden Neuroligin-Transport essenziell ist, sollten die Versuche zur Oberflächenlokalisierung mit Neuroligin-Isoform-spezifischen Antikörpern wiederholt werden. Kann dann für eine der Isoformen ein Effekt gezeigt werden, wäre es sinnvoll, zusätzliche Experimente zur physischen Zusammensetzung des potenziellen Triple-Komplexes durchzuführen. Hier könnten *Pulldown*-Versuche mit prokaryotisch exprimierten Fusionsproteinen klären, wie die Proteine genau miteinander interagieren. Darüber hinaus sind auch Koimmunpräzipitationsversuche mit *Trim3-Knockout*-Lysaten sinnvoll. Ist TRIM3 als essenzieller Adapter an der Motor-*Cargo*-Bindung beteiligt, so sollten bei einer KIF21B-Immunpräzipitation aus *Trim3-Knockout*-Lysaten weniger

Neurologin-Mengen kopräzipitieren als aus Wildtyp-Lysaten. Auch *Timelapse*-Videomikroskopie-Aufnahmen könnten zeigen, ob KIF21B und TRIM3 und/oder TRIM3 und Neurologin tatsächlich kotransportiert werden. Zudem sollte der KIF21B-Neurologin-Kotransport in TRIM3-depletierten Zellen durch *Timelapse*-Videomikroskopie analysiert werden. Ist TRIM3 ein essenzieller Adapter, müsste -bei unkompensierter TRIM3-Depletion kein bzw. stark reduzierter Kotransport stattfinden. Darüber hinaus könnte *Timelapse*-Videomikroskopie Auskunft darüber geben, ob TRIM3 nicht als essenzieller Adapter sondern als regulierender Kofaktor den Transport beeinflusst. So könnte TRIM3-Depletion die kinetischen Parameter des Neurologin-Transportes modifizieren wie es für GFP-markierte Pur- α -Partikel festgestellt werden konnte (vergleiche Kapitel 3.4).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass TRIM3 zwar potenziell Bestandteil eines KIF21B-Neurologin-Transportkomplexes ist, jedoch keine essenzieller Adapter im generellen Neurologintransport zu sein scheint, da TRIM3-Depletion keine Auswirkung auf die pan-Neurologin-Oberflächenlokalisation hat. Weitere Versuche sind notwendig, um a) Kompensationseffekte auszuschließen, b) Neurologin-Isoform-spezifische Effekte zu analysieren und c) die genaue physische Zusammensetzung eines potenziellen Triple-Komplexes zu untersuchen.

4.3 KIF21B als potenzielles Substrat der Ubiquitin-E3-Ligase TRIM3

Hung und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass TRIM3 eine funktionelle Ubiquitin-E3-Ligase ist und die Degradation des PSD-Proteins GKAP vermittelt (Hung *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde eine direkte Interaktion von TRIM3 und KIF21B nachgewiesen, die man auch bei einer Substrat-Enzym-Interaktion erwarten würde (siehe Kapitel 1.4.2). Da über die Degradation von Kinesinen bislang wenig bekannt ist, wurde untersucht, ob TRIM3 die Ubiquitin-abhängige Degradation von KIF21B vermittelt.

Im Zuge dieser Fragestellung wurde erstmalig die Stabilität eines Transport-vermittelnden neuronalen Kinesin-Motors untersucht. In Cycloheximid-*chase*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Proteinhalbwertszeit von KIF21B zwischen 24 und 48 h liegt und eine ähnliche Stabilität aufweist wie Optineurin. Nach 24-stündiger Cycloheximid-Inkubation wurden nur noch ca. 58% der anfänglichen KIF21B-Menge detektiert. Damit ist die Stabilität von KIF21B in kultivierten Neuronen der KIF3A-Stabilität in HeLa-Zellen ähnlich (Brown *et*

al., 2005). Hier konnten nach 24-stündiger Cycloheximid-Inkubation noch 70% der anfänglichen KIF3A-Menge detektiert werden. Für Kinesine, die intrazellulären Transport vermitteln, sind keine weiteren Vergleichsdaten publiziert, doch deuten zumindest die KIF21B- und KIF3A-Daten auf eine relativ hohe Stabilität dieser Motoren hin. Für Optineurin wurde eine Halbwertszeit von 8 h beschrieben (Ying *et al.*, 2010), was deutlich unter der hier beobachteten Halbwertszeit für Optineurin zwischen 24 und 48 h liegt. Die Diskrepanz ist wahrscheinlich in der Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme begründet. Während in dieser Arbeit primäre hippocampale Neurone verwendet wurden, wurde die Optineurin-Degradationsstudie in einer immortalisierten Zelllinie durchgeführt, die durch Transformation retinaler Ganglienzellen gewonnen worden war (Krishnamoorthy *et al.*, 2001).

In TRIM3-depletierten Neuronen konnte im Vergleich zu Wildtypneuronen keine Änderung des zeitlichen Verlaufs der KIF21B-Degradation festgestellt werden. Zudem wiesen TRIM3-depletierte Hippokampuslysate den gleichen KIF21B-Gehalt auf wie Wildtyp-Lysate. Würde TRIM3 die Ubiquitin-abhängige KIF21B-Degradation vermitteln, sollte unkompenzierte TRIM3-Depletion jedoch zu einem Anstieg des KIF21B-Gehaltes führen, da KIF21B nicht mehr abgebaut werden könnte. So akkumuliert das TRIM2-Substrat NF-L bei TRIM2-Depletion in Axonen von Purkinje-Zellen (Balastik *et al.*, 2008) und eine RNAi-vermittelte Reduktion der TRIM3-Expression führt zu einer Akkumulation von GKAP (Hung *et al.*, 2010). Kompensationseffekte im *Trim3-Knockout*-Hintergrund können auf den ersten Blick als Ursache für diese Ergebnisse ausgeschlossen werden, da auch nach Überexpression von TRIM3 in Neuronen kein Unterschied im KIF21B-Gehalt detektiert werden konnte. Hierbei wurden TRIM3-Konstrukte verwendet, die von Prof. Morgan Sheng (MIT, Cambridge, USA) zur Verfügung gestellt worden waren und in GKAP-Degradationsstudien bereits funktionelle Aktivität gezeigt hatten.

Auffällig ist die relativ große Variabilität zwischen den Überexpressionsexperimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Der Standardfehler des Mittels betrug bei Verwendung des TRIM3-Wildtyp-Konstruktes 17%. Die Ursache hierfür könnte in der variierenden Qualität der Neuronenkulturen liegen. Ehlers konnte zeigen, dass neuronale Aktivität zu einer verstärkten Ubiquitylierung von PSD-Proteinen führt (Ehlers, 2003), und auch die TRIM3-vermittelte GKAP-Degradation scheint von neuronaler Aktivität beeinflusst

zu werden (Hung *et al.*, 2010). Des Weiteren zeigt die RING-E3-Ligase *Mind Bomb 2* eine aktivitätsregulierte Ubiquitylierung von NMDA-Rezeptoren, da die Bindung von *Mind Bomb 2* an den NMDA-Rezeptor durch aktivitätsabhängige Phosphorylierung der NR2B-Untereinheit erfolgt (Jurd *et al.*, 2008). Entsprechend könnte auch die KIF21B-Degradation durch neuronale Aktivität reguliert werden. Da die Dichte kultivierter hippocampaler Neurone erfahrungsgemäß von Kultur zu Kultur schwankt, die Neuronendichte aber die spontane neuronale Aktivität entscheidend beeinflusst (Ivenshitz und Segal, 2010), könnte dies die Unterschiede zwischen den Versuchsergebnissen erklären. So würde TRIM3-Überexpression in dichter, neuronal aktiver Kultur zu KIF21B-Degradation führen, während die Überexpression in einer weniger dichten Kultur keinen Effekt zeigen würde. Um eine aktivitätsabhängige Regulation der KIF21B-Degradation nachzuweisen, sollten die Überexpressionsstudien unter kontrollierter Aktivitätsinduzierung (z.B. durch Applikation von GABA_A-Rezeptor-Antagonisten wie Bicucullin) wiederholt werden.

4.4 Einfluss von TRIM3 auf die intrazelluläre Kinesin-Verteilung

Da TRIM3-Depletion weder den generellen Neuroligin-Transport zur Zelloberfläche beeinträchtigte noch zu einer Veränderung des endogenen KIF21B-Gehaltes führte, wurde in anschließenden Experimenten untersucht, ob TRIM3 die intrazelluläre Verteilung von KIF21B beeinflusst.

Western Blot Analysen differenziell zentrifugierter Hippokampus-Lysate aus Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen zeigten, dass TRIM3-depletierte Lysate signifikant weniger KIF21B-Signalintensität in der P2- und P4-Fraktion aufwiesen als Wildtyp-Lysate. Dies lässt auf einen reduzierten KIF21B-Gehalt in diesen Fraktionen schließen. Auch die P3-Fraktion zeigte einen tendenziell reduzierten KIF21B-Gehalt im *Trim3-Knockout*-Hintergrund. Wie in vorangegangenen Experimenten wurde im KIF21B-Gesamtgehalt jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass bei TRIM3-Depletion nur noch eine reduzierte Menge des KIF21B-Motors an Komponenten der Membranorganellen-haltigen Fraktionen (P2, P3, P4) binden kann. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass sich in der S4-Fraktion, die die zytosolischen Proteine enthält, bei TRIM3-Depletion eine leichte Tendenz zu einem erhöhten KIF21B-Gehalt abzeichnete. Die Ergebnisse könnten dadurch erklärt werden, dass TRIM3 die Assoziation von KIF21B mit bestimmten (Transport-) Vesikeln ermöglicht und der Motor bei TRIM3-

Depletion im Zytosol akkumuliert, da er sein *Cargo* nicht mehr binden kann (siehe Abb. 4.2). Interessanterweise konnte für den Motor KIF5 nach TRIM3-Depletion eine ähnliche Umverteilung wie für KIF21B detektiert werden. KIF5 war im *Trim3-Knockout*-Hintergrund in der P3-Fraktion tendenziell deutlich reduziert ($p=0.06$), während die S4-Fraktion zumindest eine leichte Tendenz zu einem erhöhten KIF5-Gehalt zeigte ($p=0.15$). Die reduzierte Assoziation mit membranhaltigen subzellulären Fraktionen (P2-P4) bei TRIM3-Depletion scheint für KIF-Proteine spezifisch zu sein, da die $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors in der P3-Fraktion aus *Trim3-Knockout*-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen nicht reduziert, sondern signifikant erhöht war.

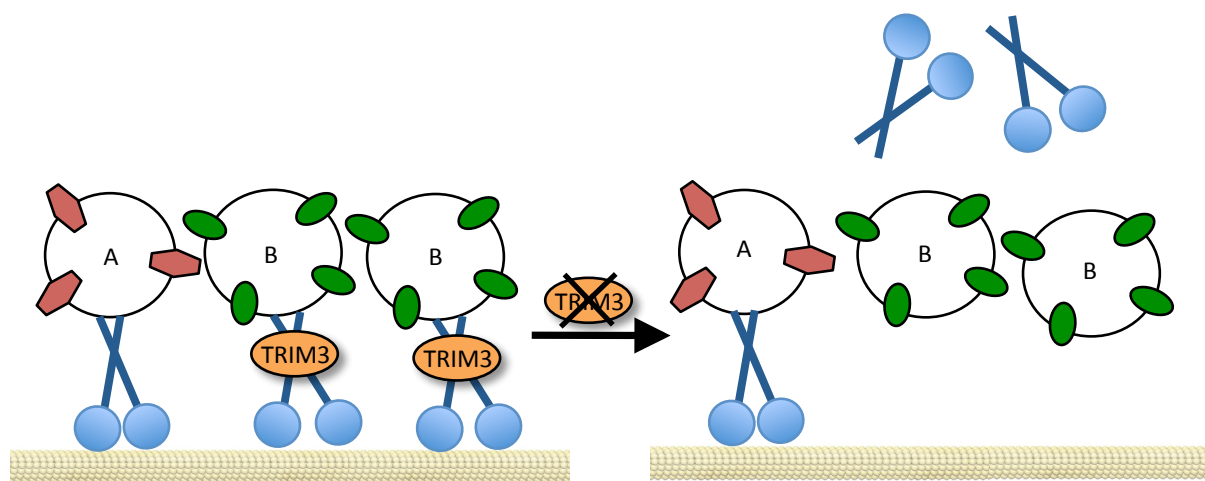


Abb. 4.2: Schematische Darstellung einer möglichen TRIM3-Funktion im Kinesin-vermittelten Transport. Ein KIF-Motor (blau) transportiert Vesikeltyp A und B entlang von Mikrotubuli (beige), wobei nur die Bindung an Vesikeltyp B TRIM3-abhängig ist. TRIM3-Depletion könnte die Assoziation des KIF-Motors mit Vesikeltyp B verhindern, so dass der Motor in der zytosolischen Fraktion akkumuliert und Vesikeltyp B nicht mehr transportiert wird. Der Transport von Vesikeltyp A wäre durch die TRIM3-Depletion nicht gestört.

Die hier beobachteten Effekte der subzellulären Umverteilung von KIF5 und der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors durch TRIM3-Depletion könnten einen publizierten Phänotyp der *Trim3-Knockout*-Maus erklären. Der heteropentamere GABA_A-Rezeptor wird von KIF5 zur Zelloberfläche transportiert (Twelvetrees *et al.*, 2010), wobei die meisten GABA_A-Rezeptoren im Gehirn die $\gamma 2$ -Untereinheit enthalten (Farrant und Nusser, 2005) (siehe auch Kapitel 1.2.1 und 1.3.3). Kortikale Neurone aus *Trim3-Knockout*-Mäusen haben einen reduzierten Oberflächengehalt der $\gamma 2$ -Untereinheit und zeigen entsprechend weniger inhibitorische postsynaptische Ströme (Cheung *et al.*, 2010). Diese reduzierte $\gamma 2$ -

Oberflächenlokalisierung in *Trim3-Knockout*-Mäusen könnte nun dadurch zustande kommen, dass nur noch eine reduzierte Menge des Motors KIF5 an die $\gamma 2$ -haltigen Vesikel bindet und zur Oberfläche transportiert. Dies würde auch den Anstieg der $\gamma 2$ -Untereinheit in der P3-Fraktion erklären. Wenn $\gamma 2$ -haltige GABA_A-Rezeptoren nicht mehr zur Oberfläche transportiert würden, müsste ein intrazellulärer Rückstau entstehen, der bereits im ER beginnen könnte, wo die Rezeptoruntereinheiten assemblieren (Tretter und Moss, 2008) (siehe Kapitel 1.3.3). Die P3-Fraktion enthält neben Transportvesikeln auch Golgi- und ER-Fragmente (Ginkel und Wordeman, 2000), so dass eine $\gamma 2$ -Anreicherung am ER oder Golgi-Apparat auch in dieser Fraktion festgestellt werden müsste. Eine $\gamma 2$ -Anreicherung am ER oder Golgi-Apparat würde zudem erklären, warum die publizierte Reduktion der $\gamma 2$ -Oberflächenlokalisierung in *Trim3-Knockout*-Mäusen in dieser Arbeit nicht auch in der Oberflächenmembran-angereicherten P2-Fraktion detektiert wurde. Die P2-Fraktion enthält neben Oberflächenmembranen auch große Fragmente von ER und Golgi-Apparat, so dass sich eine Reduktion an der Zelloberfläche und eine Akkumulation im ER oder am Golgi-Apparat insgesamt nivellieren könnten. Auch der in der S4-Fraktion beobachtete tendenzielle Anstieg im Gehalt der $\gamma 2$ -Untereinheit könnte durch Rückstaueffekte erklärt werden. So führt Proteinakkumulation am ER zur Auslösung des sog. ERAD-Signalweges (endoplasmatisches-Retikulum-assoziierte Degradation) (Kaneko *et al.*, 2010). Durch die ERAD-Signalkaskade können Transmembranproteine, die normalerweise über Lysosomen degradiert werden, vom ER ins Zytosol verlagert und dort durch Ubiquitin-abhängige Degradation über den Proteasomen-Komplex abgebaut werden (Conti und Vandenberg, 2005; Smith *et al.*, 2011). Da die $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors als Transmembranprotein nach Endozytose ebenfalls über das Lysosom abgebaut wird (Kittler *et al.*, 2004), bei TRIM3-Depletion aber vermehrt in der zytolischen S4-Fraktion auftritt, könnte der GABA_A-Rezeptor-Transportrückstau zur Auslösung der ERAD-Signalkaskade und einer zytosolischen Degradation der GABA_A-Rezeptoren führen.

Die Ergebnisse der subzellulären Umverteilung von KIF21B nach TRIM3-Depletion werfen dieselben Fragen auf wie die Ergebnisse zur Funktion von TRIM3 im KIF21B-vermittelten Neuroligin-Transport. Die Umverteilung von KIF21B deutet darauf hin, dass TRIM3-Depletion die Assoziation von KIF21B mit vesikulären Strukturen verhindert. Da Neuroligin als Transmembranprotein ebenfalls über Vesikel transportiert wird (Chubykin *et al.*, 2005),

ist es erstaunlich, dass die Oberflächenlokalisierung von Neuroligin trotz reduzierter KIF21B-Assoziation mit (Transport-) Vesikeln in der *Trim3-Knockout*-Maus nicht verändert ist (vergl. Kapitel 4.2). Auch in diesem Zusammenhang sollte daher die Isoform-spezifische Oberflächenlokalisierung von Neuroligin analysiert werden, da eventuell nur eine Subpopulation von KIF21B-Neuroligin-Komplexen durch die TRIM3-Depletion betroffen ist (vergl. Abb. 4.2) und ein Isoform-spezifischer Effekt bei Analyse des pan-Neuroligin-Oberflächengehaltes nicht identifiziert werden könnte. Die pan-Neuroligin-Verteilung war zudem in den P2- und P3-Fractionen zwischen den Genotypen unverändert (Daten nicht gezeigt). Dies spricht ebenfalls dafür, dass der generelle Neuroligin-Oberflächentransport durch TRIM3-Depletion nicht gestört wird, da keine durch Transportrückstau verursachte pan-Neuroligin-Akkumulation in P2- oder P3-Fractionen beobachtet werden konnten. Für die P4- und S4- Fraktion lag die Neuroliginkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze und konnte daher nicht analysiert werden. So lässt sich auch aus diesen Ergebnissen schließen, dass TRIM3-Depletion den pan-Neuroligin-Transport durch KIF21B nicht beeinträchtigt. In weiterführenden Versuchen sollte jedoch geklärt werden, ob TRIM3-Depletion einen Neuroligin-Isoform-spezifischen Effekt bewirkt.

Da keine weiteren KIF21B-*Cargoes* bekannt sind, war es nicht möglich, weitere potenzielle Effekte eines gestörten KIF21B-Transportes in *Trim3-Knockout*-Mäusen gezielt zu analysieren. Insgesamt sind bei TRIM3-Depletion eher Transportstörungen spezifischer Motor-*Cargo*-Komplexe als eine generelle Transportstörung des Motorproteins zu erwarten. So werden auch nach TRIM3-Depletion immer noch KIF21B- und KIF5-Motoren in den Membranorganellen-haltigen Fractionen detektiert, was darauf hindeutet, dass TRIM3 nur spezifisch für einzelne *Cargoes* als Adapter oder regulatorischer Faktor fungiert. Zudem könnte die reduzierte Oberflächenlokalisierung des GABA_A-Rezeptors in der *Trim3-Knockout*-Maus zwar durch einen generell gestörten KIF5-Transport verursacht werden, allerdings konnte auch gezeigt werden, dass TRIM3-Depletion die Oberflächenlokalisierung von AMPA-Rezeptoren nicht beeinträchtigt (Cheung *et al.*, 2010). Da dieser Rezeptor ebenfalls von KIF5 transportiert wird (Setou *et al.*, 2002), hier nach TRIM3-Depletion im Gegensatz zum GABA_A-Rezeptor aber keine Hinweise auf einen gestörten Transport vorliegen, deutet auch dies auf eine Einflussnahme von TRIM3 auf nur bestimmte Transportkomplexe hin.

Die Ergebnisse zur KIF21B-Umverteilung nach TRIM3-Depletion sollten in weiterführenden Experimenten erhärtet und verifiziert werden. Zum einen sollte durch Erhöhung der Versuchsanzahl, die bislang $n=3$ beträgt, gezeigt werden, ob die zytosolische KIF21B-Anreicherung nach *Trim3-Knockout* lediglich eine Tendenz bleibt oder ob sich ein signifikanter Unterschied abzeichnet. Dabei sollte auch die subzelluläre Verteilung weiterer Motorproteine in *Trim3-Knockout*-Mäusen analysiert werden, um die Spezifität der beobachteten Effekte beurteilen zu können. Zum anderen sollten „Extraktionsexperimente“ durchgeführt werden. In Anlehnung an eine bereits publizierte Methode könnten kultivierte Neurone kurz mit Detergenz inkubiert werden, um alle zytosolischen Komponenten ins extrazelluläre Medium zu entlassen (Cho und Johnson, 2004). Die Inkubation darf dabei nur so kurz sein, dass das Zytosol zwar ausfließen kann, aber keine intrazellulären Vesikelstrukturen durch das Detergenz zerstört werden. Anschließend erfolgt die Analyse des KIF21B-Gehaltes im zytosolischen Überstand und in den übrigen nicht-zytosolischen Zellkomponenten. Verhindert TRIM3-Depletion tatsächlich die Assoziation des Motors mit membranhaltigen Kompartimenten und führt dadurch zur Anreicherung des Motors im Zytosol, sollte in TRIM3-depletierten Neuronen das Verhältnis vom KIF21B-Gehalt „Zytosol zu Nicht-Zytosol“ auf die zytosolische Seite verschoben sein.

Darüber hinaus müsste die molekulare Ursache der KIF21B- und KIF5-Umverteilung geklärt werden. Hier sind verschiedene Szenarien denkbar. Zum einen könnte TRIM3 die Vesikelassoziation bestimmter KIF21B- oder KIF5-Transportkomplexe beeinflussen, indem es ähnlich dem Lipid-bindenden Protein Centaurin $\alpha 1$ als Vesikel-Adapter fungiert (Tong *et al.*, 2010). Im Axon werden Phosphoinositol-3,4,5-Triphosphat/PIP3-haltige Vesikel von dem Kinesin KIF13 transportiert, wobei die Motorbindung nicht direkt, sondern über Centaurin $\alpha 1$ erfolgt, das als Adapter sowohl den Motor als auch die sauren Lipide in der Vesikelmembran bindet. Transportvesikel enthalten generell saure Lipide (Williams *et al.*, 2009). Interessanterweise wurde TRIM2, das Protein mit der größten Homologie zu TRIM3, ebenfalls als Bindepartner saurer Lipide identifiziert (Tsujita *et al.*, 2010). Die Autoren konnten in ihrer Analyse zwar nicht klären, ob die identifizierten Proteine direkt oder indirekt an saure Lipide binden, doch liefert die Studie in Bezug auf diese Arbeit zumindest einen weiteren Hinweis darauf, dass TRIM-NHL-Proteine wie TRIM2 -und damit eventuell auch TRIM3- durch Assoziation mit vesikulären Strukturen Motorprotein-vermittelten Transport

beeinflussen könnten. Neben einer Adapterfunktion könnte auch eine SUMOylierungsaktivität von TRIM3 die subzelluläre KIF21B-Verteilung beeinflussen (siehe auch Kapitel 1.4.2). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass viele TRIM-Proteine nicht nur Ubiquitin-, sondern auch SUMO-E3-Ligase-Aktivität besitzen (Chu und Yang, 2011). In dieser Studie wurde die SUMOylierungsaktivität verschiedener TRIM-Subfamilienproteine *in vitro* getestet und dabei zeigte auch das TRIM-NHL-Protein TRIM32 enzymatische Aktivität. Die TRIM3-Aktivität wurde zwar nicht untersucht, doch ist eine TRIM3-SUMOylierungsfunktion nicht unwahrscheinlich, da diese in der TRIM-Proteinfamilie weit verbreitet zu sein schien (Chu und Yang, 2011). So konnten in der Studie 8 von 15 getesteten TRIM-Proteinen das gleiche Substrat *in vitro* SUMOylieren. Sollte TRIM3 tatsächlich SUMOylierungsfunktion haben, könnte KIF21B Substrat dieser SUMO-E3-Ligase sein. Eine Suche nach KIF21B-SUMOylierungsstellen unter Verwendung der Freeware SUMOsp 2.0 (Ren *et al.*, 2009) zeigte, dass KIF21B -bei hochstringenten Suchkriterien- über 4 potenzielle SUMOylierungsstellen verfügt. Posttranslationale Modifikationen haben großen Einfluss auf die Regulation von Motorproteinen. So kann z.B. Phosphorylierung die Autoinhibition von Kinesinen aufheben oder ihre Loslösung vom *Cargo* bewirken (Verhey und Hammond, 2009; Hirokawa *et al.*, 2009). Für das mitotische Kinesin CENPE konnte gezeigt werden, dass SUMOylierung seine Rekrutierung an Kinetochore bewirkt (Zhang *et al.*, 2008). Vor diesem Hintergrund wäre denkbar, dass KIF21B-SUMOylierung durch TRIM3 die Assoziation des Motors mit bestimmten vesikulären Kompartimenten ermöglicht, die bei TRIM3-Depletion nicht stattfinden kann. Um zu klären, ob TRIM3 tatsächlich SUMOylierungsaktivität besitzt und KIF21B sein Substrat darstellt, wären *in vitro*-SUMOylierungsexperimente mit KIF21B und TRIM3 sinnvoll. Zudem könnte der SUMOylierungsstatus von KIF21B in Wildtyp-Mäusen untersucht und mit dem in *Trim3-Knockout*-Mäusen verglichen werden. Sollten hier Unterschiede festgestellt werden, könnten z.B. Experimente mit KIF21B-Konstrukten, in denen die SUMOylierungsstellen mutiert sind, klären, ob diese posttranslationale Modifikation die subzelluläre KIF21B-Verteilung beeinflusst.

4.5 Einfluss von TRIM3 auf Kinesin-vermittelten Transport

Neben der Analyse der subzellulären Kinesin-Verteilung nach TRIM3-Depletion wurde untersucht, ob TRIM3 Einfluss auf kinetische Parameter des Kinesin-vermittelten Transportes hat. Dazu wurde die Mobilität von GFP-markierten Pur- α -Partikeln in

kultivierten Neuronen aus *Trim3-Knockout*- und Wildtypmäusen durch *Timelapse*-Videomikroskopie analysiert. Pur- α scheint eine Kernkomponente unterschiedlicher RNA *Granules* zu sein (Bramham und Wells, 2007) und ist gemeinsam mit TRIM3 Bestandteil von RNA *Granules*, die von KIF5 transportiert werden (Kanai *et al.*, 2004). Wie in Kapitel 4.4 diskutiert führt TRIM3-Depletion zu einer reduzierten Assoziation von KIF5 mit Komponenten der Vesikel-haltigen P3-Fraktion, in der auch Pur- α angereichert ist (Li *et al.*, 2001; Kanai *et al.*, 2004). Somit wäre zu erwarten, dass in *Trim3-Knockout*-Zellen weniger Pur- α -haltige Partikel (potenzielle RNA-*Granules*) transportiert werden als in Wildtypzellen, da weniger Transport-vermittelnde Motoren an dieses *Cargo* gebunden sind. In dieser Arbeit konnte jedoch kein Unterschied in der Anzahl mobiler Pur- α -Partikel festgestellt werden. In beiden Genotypen waren ca. 10% aller Pur- α -Partikel mobil und auch im Verhältnis von Langstrecken- zu Kurzstreckentransport gab es keine Unterschiede.

Dass trotz der beobachteten Effekte in der subzellulären KIF5-Verteilung keine Effekte in der generellen Pur- α -Mobilität festgestellt wurden, könnte daran liegen, dass der KIF5-vermittelte Transport von Pur- α -haltigen Partikeln von TRIM3 unabhängig ist (vergl. Abb. 4.2). Außerdem könnte die TRIM3-Depletion wie bereits diskutiert von anderen TRIM-Proteinen kompensiert werden. Dies ist im hier analysierten Transportprozess durchaus wahrscheinlich, da sowohl TRIM3 als auch TRIM2 Bestandteil von Pur- α -haltigen RNA *Granules* sind (Kanai *et al.*, 2004). An dieser Stelle wäre es sinnvoll, die Mobilität weiterer KIF5-*Cargoes* in *Trim3-Knockout*- und Wildtypzellen zu vergleichen. Hier könnte insbesondere die Mobilität der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit $\gamma 2$ aufschlussreich sein. Wäre - wie in Kapitel 4.4 diskutiert - tatsächlich ein gestörter GABA_A-Rezeptor-Transport in *Trim3-Knockout*-Mäusen Ursache für die reduzierte Oberflächenlokalisation der $\gamma 2$ -Untereinheit (Cheung *et al.*, 2010), sollte die Rezeptoruntereinheit in TRIM3-depletierten Zellen weniger mobil sein als in Wildtypzellen. Auch eine Analyse der Mobilität der Motorproteine KIF21B und KIF5 selbst sollte durchgeführt werden. Wenn TRIM3-Depletion die Assoziation von KIF-Motoren mit ihrem *Cargo* verhindert, sollte die Anzahl mobiler Motorproteine im *Trim3-Knockout*-Hintergrund zumindest tendenziell reduziert sein, da Kinesine, die nicht an ein *Cargo* gebunden sind, offenbar eine autoinhibierte, inaktive Konformation einnehmen (Verhey und Hammond, 2009).

Trotz der unveränderten Gesamtmobilität der Pur- α -Partikel bei TRIM3-Depletion scheint die E3-Ligase dennoch ihren Transport zu beeinflussen. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass sich Pur- α -Partikel im *Trim3-Knockout*-Hintergrund signifikant schneller bewegten als in Wildtypzellen. Zudem entfernten sich die Pur- α -Partikel in TRIM3-depletierten Zellen signifikant weiter vom Startpunkt und ihre zurückgelegte Gesamtstrecke war tendenziell erhöht.

Die Ursache für die veränderten kinetischen Parameter liegt vermutlich nicht in der beobachteten subzellulären KIF-Umverteilung nach TRIM3-Depletion. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass die Kinesingeschwindigkeit von der Anzahl Mikrotubuli-gebundener Kinesine unabhängig ist oder aber unter bestimmten Versuchsbedingungen durch mehr Mikrotubuli-gebundene Kinesine erhöht wird (Kural *et al.*, 2005). In den hier durchgeführten Versuchen war die Motorgeschwindigkeit jedoch trotz potenziell reduziertem KIF5-Gehalt erhöht. Da die prozentualen Anteile von anterogradem und retrogradem Langstrecken-transport in *Trim3-Knockout*- und Wildtyp-Zellen sehr ähnlich waren, ist zudem unwahrscheinlich, dass eine vermehrte Bindung an Dynein das unterschiedliche Laufverhalten verursachte. Wahrscheinlicher ist hingegen ein Pur- α -Transport durch ein kompensatorisch wirkendes, alternatives KIF-Protein. So werden z.B. Mitochondrien in Neuronen sowohl von KIF5 als auch von KIF1B α transportiert (Hirokawa *et al.*, 2010). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen KIF-Proteine unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen (Hirokawa und Takemura, 2004). Daher ist es durchaus möglich, dass Pur- α -Partikel in TRIM3-depletierten Zellen durch einen alternativen, schnelleren Motor anterograd transportiert werden.

Eine weitere mögliche Ursache für die Veränderung der kinetischen Parameter ist, dass TRIM3 im KIF5-vermittelten Transport als negativer Regulator fungiert. Der KIF5-Transport wird durch akzessorische Proteine moduliert. So ist das Adapterprotein *Sunday Driver* ein positiver KIF5-Regulator, indem *Sunday Driver*-Bindung die KIF5-Geschwindigkeit und -Prozessivität erhöht (Sun *et al.*, 2011). Die Autoren führen diese Modulation darauf zurück, dass die direkte Interaktion der beiden Proteine zu einer Konformationsänderung von KIF5 führt und dadurch eine „gebremste“ Motor-Konformation gelöst werden könnte. Ähnlich könnte TRIM3-Bindung die KIF5-Transportgeschwindigkeit drosseln. Dies könnte ebenfalls durch Konformationsänderung erfolgen, die durch eine bloße KIF5-TRIM3-Interaktion oder aber durch SUMOylierung zustande kommen könnte (Geiss-Friedlander und Melchior,

2007). An dieser Stelle müssten abermals *in vitro*-SUMOylierungsstudien zeigen, ob TRIM3 tatsächlich eine SUMO-E3-Ligase ist und KIF5 ihr Substrat. Auch der SUMOylierungsstatus von KIF5 in Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen und weiterführende Mutagenese-Studien könnten klären, ob (TRIM3-vermittelte) SUMOylierung das Laufverhalten von KIF5 bzw. Pur- α -Partikeln beeinflusst.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die E3-Ligase TRIM3 Einfluss auf die subzelluläre Kinesin-Verteilung und potenziell Kinesin-vermittelten Transport hat. So verhindert TRIM3-Depletion die subzelluläre Assoziation von KIF21B und KIF5 mit Komponenten membranhaltiger Fraktionen aus Hippokampuslysaten. Darüber hinaus führt TRIM3-Depletion zu einer erhöhten Geschwindigkeit potenziell KIF5-transportierter Pur- α -Partikel. Ein Vergleich mit der Literatur legt zunächst nahe, dass diese Effekte auf die Kinesin-Motoren unabhängig voneinander sind. In weiterführenden Experimenten müsste die Analyse kinetischer Parameter der Motoren KIF5 und KIF21B sowie weiterer *Cargoes* folgende Fragen klären: 1. Ist die Geschwindigkeit von KIF5 selbst nach TRIM3-Depletion erhöht? Dies würde die erhöhte Pur- α -Geschwindigkeit erklären und auf einen direkten Einfluss von TRIM3 auf kinetische Transportparameter hindeuten. 2. Ist die Anzahl mobiler Motoren nach TRIM3-Depletion reduziert? Dies würde auf eine größere Anzahl ungebundener, autoinhibierter Motoren hindeuten und die Hypothese stützen, dass TRIM3 zur *Cargo*-Assoziation notwendig ist. 3. Ist der Transport der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit $\gamma 2$ oder spezifischer Neuroligin-Isoformen nach TRIM3-Depletion verändert? Sollte TRIM3 zur *Cargo*-Assoziation notwendig sein, müssten der Transport potenzieller *Cargoes* inhibiert werden, wobei jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein *Cargo* durch einen kompensatorisch wirkenden, alternativen Motor transportiert wird.

Des Weiteren muss die hier festgestellte KIF-Umverteilung nach TRIM3-Depletion in unabhängigen Experimenten verifiziert und ihre molekulare Ursache erforscht werden. Hierbei sollte insbesondere die potenzielle SUMOylierungsaktivität von TRIM3 untersucht werden. Eine Analyse des SUMOylierungsstatus von KIF5 und KIF21B in Wildtyp- und *Trim3-Knockout*-Mäusen könnte dabei erste Hinweise darauf geben, ob diese posttranslationale Modifikation in der KIF-TRIM3-Interaktion eine Rolle spielt.

Zudem sollte abschließend geklärt werden, welchen Einfluss TRIM3 auf den KIF21B-vermittelten Neuroligin-Transport hat. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf die Existenz eines Triple-Komplexes bestehend aus KIF21B, Neuroligin und TRIM3 hin, doch scheint TRIM3 nicht den allgemeinen pan-Neuroligin-Transport zur Zelloberfläche zu beeinflussen. Hier sollte geklärt werden, ob TRIM3 nur an einer Subpopulation von KIF21B-Neuroligin-Komplexen beteiligt ist und ob TRIM3-Depletion zu einem gestörten Oberflächentransport spezifischer Neuroligin-Isoformen führt.

In nachfolgenden Experimenten sollte auch verstärkt untersucht werden, inwieweit der hier gezeigte Einfluss von TRIM3 auf Kinesine und Kinesin-vermittelten Transport eine Rolle in der molekularen Etablierung von Lernen und Gedächtnis spielt. *Trim3-Knockout*-Mäuse haben ein im Vergleich zu Wildtypmäusen verändertes Hippokampus-assoziiertes Lernverhalten (persönliche Information von Dr. Ronald van Kesteren, Freie Universität Amsterdam, Niederlande). Zudem ist TRIM3 als phosphoryliertes Protein der postsynaptischen Dichte beschrieben (Trinidad *et al.*, 2006) und Phosphorylierung reguliert in vielen RING-E3-Ligasen ihre enzymatische Aktivität (Deshaies und Joazeiro, 2009). So sollte bei der Identifizierung des molekularen Mechanismus, mit dem TRIM3 auf die subzelluläre Kinesin-Verteilung und den Kinesin-vermittelten Transport einwirkt, ein besonderes Augenmerk auf die aktivitätsabhängige Regulation der E3-Ligase gelegt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Adhikari, A., and Chen, Z.J. (2009). Diversity of polyubiquitin chains. *Dev Cell* 16, 485-486.
- Anwyl, R. (2009). Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology* 56, 735-740.
- Baas, P.W., Deitch, J.S., Black, M.M., and Banker, G.A. (1988). Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8335-8339.
- Baer, K., Waldvogel, H.J., Faull, R.L., and Rees, M.I. (2009). Localization of glycine receptors in the human forebrain, brainstem, and cervical spinal cord: an immunohistochemical review. *Front Mol Neurosci* 2, 25.
- Balastik, M., Ferraguti, F., Pires-da Silva, A., Lee, T.H., Alvarez-Bolado, G., Lu, K.P., and Gruss, P. (2008). Deficiency in ubiquitin ligase TRIM2 causes accumulation of neurofilament light chain and neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12016-12021.
- Bannerman, D.M., and Sprengel, R. (2007). Neuroscience. Remembering the subtle differences. *Science* 317, 50-51.
- Belelli, D., Harrison, N.L., Maguire, J., Macdonald, R.L., Walker, M.C., and Cope, D.W. (2009). Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci* 29, 12757-12763.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bliss, T.V., and Gardner-Medwin, A.R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 357-374.
- Bottos, A., Rissone, A., Bussolino, F., and Arese, M. (2011). Neurexins and neuroligins: synapses look out of the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 68, 2655-2666.
- Boyer, C., Schikorski, T., and Stevens, C.F. (1998). Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. *J Neurosci* 18, 5294-5300.
- Bramham, C.R., and Wells, D.G. (2007). Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 8, 776-789.
- Bridgman, P.C. (2004). Myosin-dependent transport in neurons. *J Neurobiol* 58, 164-174.
- Brose, N. (1999). Synaptic cell adhesion proteins and synaptogenesis in the mammalian central nervous system. *Naturwissenschaften* 86, 516-524.
- Brown, C.L., Maier, K.C., Stauber, T., Ginkel, L.M., Wordeman, L., Vernos, I., and Schroer, T.A. (2005). Kinesin-2 is a motor for late endosomes and lysosomes. *Traffic* 6, 1114-1124.

-
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Budreck, E.C., and Scheiffele, P. (2007). Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *Eur J Neurosci* 26, 1738-1748.
- Burkhardt, J.K., Echeverri, C.J., Nilsson, T., and Vallee, R.B. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol* 139, 469-484.
- Cai, D., McEwen, D.P., Martens, J.R., Meyhofer, E., and Verhey, K.J. (2009). Single molecule imaging reveals differences in microtubule track selection between Kinesin motors. *PLoS Biol* 7, e1000216.
- Campbell, N.A., Reece, J.B. (2007). Biology, 8th Edition. Benjamin Cummings/Pearson Education, San Francisco, USA.
- Castillo, P.E., Chiu, C.Q., and Carroll, R.C. (2011). Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Curr Opin Neurobiol* 21, 328-338.
- Chebib, M. (2004). GABAC receptor ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 800-804.
- Chen, C., and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-2752.
- Chen, D.Y., Liu, H., Takeda, S., Tu, H.C., Sasagawa, S., Van Tine, B.A., Lu, D., Cheng, E.H., and Hsieh, J.J. (2010). Taspase1 functions as a non-oncogene addiction protease that coordinates cancer cell proliferation and apoptosis. *Cancer Res* 70, 5358-5367.
- Chen, L., Chetkovich, D.M., Petralia, R.S., Sweeney, N.T., Kawasaki, Y., Wenthold, R.J., Brecht, D.S., and Nicoll, R.A. (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408, 936-943.
- Chen, X., Vinade, L., Leapman, R.D., Petersen, J.D., Nakagawa, T., Phillips, T.M., Sheng, M., and Reese, T.S. (2005). Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11551-11556.
- Cheung, C.C., Yang, C., Berger, T., Zaugg, K., Reilly, P., Elia, A.J., Wakeham, A., You-Ten, A., Chang, N., Li, L., et al. (2010). Identification of BERP (brain-expressed RING finger protein) as a p53 target gene that modulates seizure susceptibility through interacting with GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11883-11888.
- Chih, B., Afridi, S.K., Clark, L., and Scheiffele, P. (2004). Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Hum Mol Genet* 13, 1471-1477.
- Chih, B., Engelman, H., and Scheiffele, P. (2005). Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307, 1324-1328.
- Chih, B., Gollan, L., and Scheiffele, P. (2006). Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. *Neuron* 51, 171-178.

- Cho, J.H., and Johnson, G.V. (2004). Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *J Neurochem* 88, 349-358.
- Chu, Y., and Yang, X. (2011). SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene* 30, 1108-1116.
- Chubykin, A.A., Atasoy, D., Etherton, M.R., Brose, N., Kavalali, E.T., Gibson, J.R., and Sudhof, T.C. (2007). Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron* 54, 919-931.
- Chubykin, A.A., Liu, X., Comoletti, D., Tsigelny, I., Taylor, P., and Sudhof, T.C. (2005). Dissection of synapse induction by neuroligins: effect of a neuroligin mutation associated with autism. *J Biol Chem* 280, 22365-22374.
- Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18-41.
- Colonnier, M. (1968). Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res* 9, 268-287.
- Conti, L.R., and Vandenberg, C.A. (2005). ERADication of ion channels destined for the plasma membrane. Focus on "Role of ubiquitin-proteasome degradation pathway in biogenesis efficiency of {beta}-cell ATP-sensitive potassium channels". *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1072-1074.
- Contractor, A., Mulle, C., and Swanson, G.T. (2011). Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. *Trends Neurosci* 34, 154-163.
- Crouse, G.F., Frischauf, A., and Lehrach, H. (1983). An integrated and simplified approach to cloning into plasmids and single-stranded phages. *Methods Enzymol* 101, 78-89.
- Danoy, P., Pryce, K., Hadler, J., Bradbury, L.A., Farrar, C., Pointon, J., Ward, M., Weisman, M., Reveille, J.D., Wordsworth, B.P., et al. (2010). Association of variants at 1q32 and STAT3 with ankylosing spondylitis suggests genetic overlap with Crohn's disease. *PLoS Genet* 6, e1001195.
- Dean, C., Scholl, F.G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., and Scheiffele, P. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci* 6, 708-716.
- Derkach, V.A., Oh, M.C., Guire, E.S., and Soderling, T.R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 8, 101-113.
- Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78, 399-434.
- Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelieres, F.P., King, S.J., Humbert, S., and Saudou, F. (2007). Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 27, 3571-3583.
- Dosemeci, A., Tao-Cheng, J.H., Vinade, L., Winters, C.A., Pozzo-Miller, L., and Reese, T.S. (2001). Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10428-10432.

-
- Dugas, J.C., Tai, Y.C., Speed, T.P., Ngai, J., and Barres, B.A. (2006). Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* 26, 10967-10983.
- Ehlers, M.D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* 6, 231-242.
- El-Husseini, A.E., and Vincent, S.R. (1999). Cloning and characterization of a novel RING finger protein that interacts with class V myosins. *J Biol Chem* 274, 19771-19777.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Essrich, C., Lorez, M., Benson, J.A., Fritschy, J.M., and Luscher, B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1, 563-571.
- Etherton, M.R., Tabuchi, K., Sharma, M., Ko, J., and Sudhof, T.C. (2011). An autism-associated point mutation in the neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus. *EMBO J* 30, 2908-2919.
- Farley, A.R., and Link, A.J. (2009). Identification and quantification of protein posttranslational modifications. *Methods Enzymol* 463, 725-763.
- Farrant, M., and Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6, 215-229.
- Feng, G., Tintrup, H., Kirsch, J., Nichol, M.C., Kuhse, J., Betz, H., and Sanes, J.R. (1998). Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science* 282, 1321-1324.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Foth, B.J., Goedecke, M.C., and Soldati, D. (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3681-3686.
- Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T.H., Hedderich, J., May, S., Lu, T., Schuldt, D., Nikolaus, S., Rosenstiel, P., Krawczak, M., et al. (2008). Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet* 40, 713-715.
- Gareau, J.R., and Lima, C.D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 861-871.
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 947-956.
- Ginkel, L.M., and Wordeman, L. (2000). Expression and partial characterization of kinesin-related proteins in differentiating and adult skeletal muscle. *Mol Biol Cell* 11, 4143-4158.

- Gorchetchnikov, A., and Grossberg, S. (2007). Space, time and learning in the hippocampus: how fine spatial and temporal scales are expanded into population codes for behavioral control. *Neural Netw* 20, 182-193.
- Goris, A., Boonen, S., D'Hooghe M, B., and Dubois, B. (2010). Replication of KIF21B as a susceptibility locus for multiple sclerosis. *J Med Genet* 47, 775-776.
- Graf, E.R., Zhang, X., Jin, S.X., Linhoff, M.W., and Craig, A.M. (2004). Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119, 1013-1026.
- Greer, P.L., Hanayama, R., Bloodgood, B.L., Mardinly, A.R., Lipton, D.M., Flavell, S.W., Kim, T.K., Griffith, E.C., Waldon, Z., Maehr, R., et al. (2010). The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell* 140, 704-716.
- Greger, I.H., Ziff, E.B., and Penn, A.C. (2007). Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends Neurosci* 30, 407-416.
- Guillaud, L., Wong, R., and Hirokawa, N. (2008). Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: a molecular model of kinesin-cargo release. *Nat Cell Biol* 10, 19-29.
- Guruprasad, K., Reddy, B.V., and Pandit, M.W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng* 4, 155-161.
- Haglund, K., and Dikic, I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* 24, 3353-3359.
- Hammond, J.W., Huang, C.F., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G., and Verhey, K.J. (2010). Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Mol Biol Cell* 21, 572-583.
- Hammond, S.M. (2005). Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 579, 5822-5829.
- Han, X., Du, H., and Massiah, M.A. (2011). Detection and characterization of the in vitro e3 ligase activity of the human MID1 protein. *J Mol Biol* 407, 505-520.
- Hartman, M.A., Finan, D., Sivaramakrishnan, S., and Spudich, J.A. (2011). Principles of unconventional Myosin function and targeting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 133-155.
- He, B., and Soderlund, D.M. (2010). Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Na v 1.7 sodium channels. *Neurosci Lett* 469, 268-272.
- Heisler, F.F., Loeblich, S., Pechmann, Y., Maier, N., Zivkovic, A.R., Tokito, M., Hausrat, T.J., Schweizer, M., Bähring, R., Holzbaur, E.L., et al. (2011). Muskelnin regulates actin filament- and microtubule-based GABA(A) receptor transport in neurons. *Neuron* 70, 66-81.
- Henley, J.M., Barker, E.A., and Glebov, O.O. (2011). Routes, destinations and delays: recent advances in AMPA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 34, 258-268.
- Hering, H., and Sheng, M. (2003). Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci* 23, 11759-11769.

-
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68, 610-638.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 682-696.
- Hirokawa, N., and Takemura, R. (2004). Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res* 301, 50-59.
- Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17, 31-108.
- Hoogenraad, C.C., Milstein, A.D., Ethell, I.M., Henkemeyer, M., and Sheng, M. (2005). GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nat Neurosci* 8, 906-915.
- Huang, C.J., Huang, C.C., and Chang, C.C. (2012). Association of the testis-specific TRIM/RBCC protein RNF33/TRIM60 with the cytoplasmic motor proteins KIF3A and KIF3B. *Mol Cell Biochem* 360, 121-131.
- Hung, A.Y., Sung, C.C., Brito, I.L., and Sheng, M. (2010). Degradation of postsynaptic scaffold GKAP and regulation of dendritic spine morphology by the TRIM3 ubiquitin ligase in rat hippocampal neurons. *PLoS One* 5, e9842.
- Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., and Sudhof, T.C. (1995). Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81, 435-443.
- Ichtchenko, K., Nguyen, T., and Sudhof, T.C. (1996). Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *J Biol Chem* 271, 2676-2682.
- IMSGC (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium) (2010). Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 19, 953-962.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Isaacson, J.S., Solis, J.M., and Nicoll, R.A. (1993). Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* 10, 165-175.
- Ivenshitz, M., and Segal, M. (2010). Neuronal density determines network connectivity and spontaneous activity in cultured hippocampus. *J Neurophysiol* 104, 1052-1060.
- Janke, C., and Kneussel, M. (2010). Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* 33, 362-372.
- Jiang, Y.H., Armstrong, D., Albrecht, U., Atkins, C.M., Noebels, J.L., Eichele, G., Sweatt, J.D., and Beaudet, A.L. (1998). Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* 21, 799-811.

- Johnston, G.A., Chebib, M., Hanrahan, J.R., and Mewett, K.N. (2010). Neurochemicals for the investigation of GABA(C) receptors. *Neurochem Res* 35, 1970-1977.
- Jurd, R., Thornton, C., Wang, J., Luong, K., Phamluong, K., Kharazia, V., Gibb, S.L., and Ron, D. (2008). Mind bomb-2 is an E3 ligase that ubiquitinates the N-methyl-D-aspartate receptor NR2B subunit in a phosphorylation-dependent manner. *J Biol Chem* 283, 301-310.
- Kakinuma, N., and Kiyama, R. (2009). A major mutation of KIF21A associated with congenital fibrosis of the extraocular muscles type 1 (CFEOM1) enhances translocation of Kank1 to the membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 639-644.
- Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43, 513-525.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. (2000). Principles Of Neural Science, 4th Edition. *McGraw-Hill*, Columbus, USA.
- Kaneko, M., Koike, H., Saito, R., Kitamura, Y., Okuma, Y., and Nomura, Y. (2010). Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation. *J Neurosci* 30, 3924-3932.
- Kapitein, L.C., Schlager, M.A., Kuijpers, M., Wulf, P.S., van Spronsen, M., MacKintosh, F.C., and Hoogenraad, C.C. (2010). Mixed microtubules steer dynein-driven cargo transport into dendrites. *Curr Biol* 20, 290-299.
- Kardon, J.R., and Vale, R.D. (2009). Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 854-865.
- Kerchner, G.A., and Nicoll, R.A. (2008). Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci* 9, 813-825.
- Kessels, H.W., and Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61, 340-350.
- Kim, E., Naisbitt, S., Hsueh, Y.P., Rao, A., Rothschild, A., Craig, A.M., and Sheng, M. (1997). GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol* 136, 669-678.
- Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771-781.
- Kim, E., and Sheng, M. (2009). The postsynaptic density. *Curr Biol* 19, R723-724.
- Kittler, J.T., Thomas, P., Tretter, V., Bogdanov, Y.D., Haucke, V., Smart, T.G., and Moss, S.J. (2004). Huntingtin-associated protein 1 regulates inhibitory synaptic transmission by modulating gamma-aminobutyric acid type A receptor membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12736-12741.
- Kneussel, M. (2005). Postsynaptic scaffold proteins at non-synaptic sites. The role of postsynaptic scaffold proteins in motor-protein-receptor complexes. *EMBO Rep* 6, 22-27.
- Kneussel, M., and Betz, H. (2000). Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci* 23, 429-435.

- Kneussel, M., Brandstatter, J.H., Gasnier, B., Feng, G., Sanes, J.R., and Betz, H. (2001). Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABA(A) receptor subtypes. *Mol Cell Neurosci* 17, 973-982.
- Kneussel, M., Brandstatter, J.H., Laube, B., Stahl, S., Muller, U., and Betz, H. (1999). Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* 19, 9289-9297.
- Kornau, H.C., Seeburg, P.H., and Kennedy, M.B. (1997). Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol* 7, 368-373.
- Krishnamoorthy, R.R., Agarwal, P., Prasanna, G., Vopat, K., Lambert, W., Sheedlo, H.J., Pang, I.H., Shade, D., Wordinger, R.J., Yorio, T., et al. (2001). Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 86, 1-12.
- Kudryashova, E., Wu, J., Havton, L.A., and Spencer, M.J. (2009). Deficiency of the E3 ubiquitin ligase TRIM32 in mice leads to a myopathy with a neurogenic component. *Hum Mol Genet* 18, 1353-1367.
- Kural, C., Kim, H., Syed, S., Goshima, G., Gelfand, V.I., and Selvin, P.R. (2005). Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement? *Science* 308, 1469-1472.
- Lee, H.K., Takamiya, K., He, K., Song, L., and Huganir, R.L. (2010). Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus. *J Neurophysiol* 103, 479-489.
- Lee, K.D., and Hollenbeck, P.J. (1995). Phosphorylation of kinesin in vivo correlates with organelle association and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 270, 5600-5605.
- Lee, S.H., Valtschanoff, J.G., Kharazia, V.N., Weinberg, R., and Sheng, M. (2001). Biochemical and morphological characterization of an intracellular membrane compartment containing AMPA receptors. *Neuropharmacology* 41, 680-692.
- Leopold, P.L., McDowall, A.W., Pfister, K.K., Bloom, G.S., and Brady, S.T. (1992). Association of kinesin with characterized membrane-bounded organelles. *Cell Motil Cytoskeleton* 23, 19-33.
- Lewis, T.L., Jr., Mao, T., Svoboda, K., and Arnold, D.B. (2009). Myosin-dependent targeting of transmembrane proteins to neuronal dendrites. *Nat Neurosci* 12, 568-576.
- Li, Y., Koike, K., Ohashi, S., Funakoshi, T., Tadano, M., Kobayashi, S., Anzai, K., Shibata, N., and Kobayashi, M. (2001). Pur alpha protein implicated in dendritic RNA transport interacts with ribosomes in neuronal cytoplasm. *Biol Pharm Bull* 24, 231-235.
- Liu, F., and Walters, K.J. (2010). Multitasking with ubiquitin through multivalent interactions. *Trends Biochem Sci* 35, 352-360.
- Luscher, B., Fuchs, T., and Kilpatrick, C.L. (2011). GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70, 385-409.
- Maas, C., Belgardt, D., Lee, H.K., Heisler, F.F., Lappe-Siefke, C., Magiera, M.M., van Dijk, J., Hausrat, T.J., Janke, C., and Kneussel, M. (2009). Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8731-8736.

- Mabb, A.M., and Ehlers, M.D. (2010). Ubiquitination in postsynaptic function and plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 179-210.
- Marszalek, J.R., Weiner, J.A., Farlow, S.J., Chun, J., and Goldstein, L.S. (1999). Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B. *J Cell Biol* 145, 469-479.
- Martin, K.C., and Zukin, R.S. (2006). RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci* 26, 7131-7134.
- Meroni, G., and Diez-Roux, G. (2005). TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* 27, 1147-1157.
- Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H., and Langosch, D. (1995). Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* 15, 563-572.
- Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J.C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R.J., Worley, P.F., and Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23, 569-582.
- Napolitano, L.M., Jaffray, E.G., Hay, R.T., and Meroni, G. (2011). Functional interactions between ubiquitin E2 enzymes and TRIM proteins. *Biochem J* 434, 309-319.
- Napolitano, L.M., and Meroni, G. (2012). TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life* 64, 64-71.
- Niethammer, M., Kim, E., and 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, 2157-2163.
- Niikura, T., Hashimoto, Y., Tajima, H., Ishizaka, M., Yamagishi, Y., Kawasumi, M., Nawa, M., Terashita, K., Aiso, S., and Nishimoto, I. (2003). A tripartite motif protein TRIM11 binds and destabilizes Humanin, a neuroprotective peptide against Alzheimer's disease-relevant insults. *Eur J Neurosci* 17, 1150-1158.
- Ohkawa, N., Kokura, K., Matsu-Ura, T., Obinata, T., Konishi, Y., and Tamura, T.A. (2001). Molecular cloning and characterization of neural activity-related RING finger protein (NARF): a new member of the RBCC family is a candidate for the partner of myosin V. *J Neurochem* 78, 75-87.
- Opazo, P., and Choquet, D. (2011). A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors. *Mol Cell Neurosci* 46, 1-8.
- Osterweil, E., Wells, D.G., and Mooseker, M.S. (2005). A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J Cell Biol* 168, 329-338.
- Ozato, K., Shin, D.M., Chang, T.H., and Morse, H.C., 3rd (2008). TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 8, 849-860.
- Ozawa, S., Kamiya, H., and Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54, 581-618.

-
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., and Conklin, D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948-958.
- Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33, 1351-1365.
- Papadopoulos, T., and Soykan, T. (2011). The role of collybistin in gephyrin clustering at inhibitory synapses: facts and open questions. *Front Cell Neurosci* 5, 11.
- Perouansky, M., and Pearce, R.A. (2011). How we recall (or don't): the hippocampal memory machine and anesthetic amnesia. *Can J Anaesth* 58, 157-166.
- Pizzarelli, R., and Cherubini, E. (2011). Alterations of GABAergic signaling in autism spectrum disorders. *Neural Plast* 2011, 297153.
- Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., Zhang, M., Paarmann, I., Fuchs, C., Harvey, K., et al. (2009). Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63, 628-642.
- Pryer, N.K., Wuestehube, L.J., and Schekman, R. (1992). Vesicle-mediated protein sorting. *Annu Rev Biochem* 61, 471-516.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A-S., McNamara, J.O., White, L.E. (2008). Neuroscience, 4th Edition. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Qian, N., and Sejnowski, T.J. (1990). When is an inhibitory synapse effective? *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 8145-8149.
- Rafols, J.A., Cheng, H.W., and McNeill, T.H. (1989). Golgi study of the mouse striatum: age-related dendritic changes in different neuronal populations. *J Comp Neurol* 279, 212-227.
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., and Verhey, K.J. (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16, 2166-2172.
- Ren, J., Gao, X., Jin, C., Zhu, M., Wang, X., Shaw, A., Wen, L., Yao, X., and Xue, Y. (2009). Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics* 9, 3409-3412.
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., et al. (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* 20, 2140-2151.
- Rice, S., Lin, A.W., Safer, D., Hart, C.L., Naber, N., Carragher, B.O., Cain, S.M., Pechatnikova, E., Wilson-Kubalek, E.M., Whittaker, M., et al. (1999). A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402, 778-784.
- Roma-Mateo, C., Moreno, D., Vernia, S., Rubio, T., Bridges, T.M., Gentry, M.S., and Sanz, P. (2011). Lafora disease E3-ubiquitin ligase malin is related to TRIM32 at both the phylogenetic and functional level. *BMC Evol Biol* 11, 225.
- Ross, J.L., Ali, M.Y., and Warshaw, D.M. (2008). Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 20, 41-47.

- Rudolf, R., Bittins, C.M., and Gerdes, H.H. (2011). The role of myosin V in exocytosis and synaptic plasticity. *J Neurochem* 116, 177-191.
- Rumbaugh, G., Adams, J.P., Kim, J.H., and Huganir, R.L. (2006). SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4344-4351.
- Saito, N., Okada, Y., Noda, Y., Kinoshita, Y., Kondo, S., and Hirokawa, N. (1997). KIFC2 is a novel neuron-specific C-terminal type kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles. *Neuron* 18, 425-438.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning I/II/III. A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sanchez-Carbente Mdel, R., and Desgroseillers, L. (2008). Understanding the importance of mRNA transport in memory. *Prog Brain Res* 169, 41-58.
- Sanderson, D.J., Good, M.A., Seeburg, P.H., Sprengel, R., Rawlins, J.N., and Bannerman, D.M. (2008). The role of the GluR-A (GluR1) AMPA receptor subunit in learning and memory. *Prog Brain Res* 169, 159-178.
- Sardiello, M., Cairo, S., Fontanella, B., Ballabio, A., and Meroni, G. (2008). Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. *BMC Evol Biol* 8, 225.
- Schafer, D.A. (2004). Cell biology: barbed ends rule. *Nature* 430, 734-735.
- Schapitz, I. (2009). Mikrotubuli-assoziiertes Transport von postsynaptischem NLG1 in *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) und *Mus musculus* (Linnaeus, 1758). Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., and Serafini, T. (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101, 657-669.
- Schliwa, M., and Woehlke, G. (2003). Molecular motors. *Nature* 422, 759-765.
- Segref, A., and Hoppe, T. (2009). Think locally: control of ubiquitin-dependent protein degradation in neurons. *EMBO Rep* 10, 44-50.
- Setou, M., Hayasaka, T., and Yao, I. (2004). Axonal transport versus dendritic transport. *J Neurobiol* 58, 201-206.
- Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D.H., and Hirokawa, N. (2000). Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288, 1796-1802.
- Setou, M., Seog, D.H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M., and Hirokawa, N. (2002). Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* 417, 83-87.
- Shen, X., Meza-Carmen, V., Puxeddu, E., Wang, G., Moss, J., and Vaughan, M. (2008). Interaction of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein (BIG) 1 and kinesin motor protein KIF21A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18788-18793.

-
- Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76:823-47.
- Sheng, M., and Kim, E. (2000). The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 1851-1856.
- Short, K.M., and Cox, T.C. (2006). Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J Biol Chem* 281, 8970-8980.
- Silverman, M.A., Kaech, S., Ramser, E.M., Lu, X., Lasarev, M.R., Nagalla, S., and Banker, G. (2010). Expression of kinesin superfamily genes in cultured hippocampal neurons. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 784-795.
- Slack, F.J., and Ruvkun, G. (1998). A novel repeat domain that is often associated with RING finger and B-box motifs. *Trends Biochem Sci* 23, 474-475.
- Slot, J.W., and Geuze, H.J. (2007). Cryosectioning and immunolabeling. *Nat Protoc* 2, 2480-2491.
- Smith, M.H., Ploegh, H.L., and Weissman, J.S. (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 334, 1086-1090.
- Smith, T.F. (2008). Diversity of WD-repeat proteins. *Subcell Biochem* 48, 20-30.
- Sola, M., Bavro, V.N., Timmins, J., Franz, T., Ricard-Blum, S., Schoehn, G., Ruigrok, R.W., Paarmann, I., Saiyed, T., O'Sullivan, G.A., et al. (2004). Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *EMBO J* 23, 2510-2519.
- Song, J.Y., Ichtchenko, K., Sudhof, T.C., and Brose, N. (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1100-1105.
- Squire, L.R., Stark, C.E., and Clark, R.E. (2004). The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 27, 279-306.
- Stipursky, J., Romao, L., Tortelli, V., Neto, V.M., and Gomes, F.C. (2011). Neuron-glia signaling: Implications for astrocyte differentiation and synapse formation. *Life Sci* 89, 524-531.
- Sudhof, T.C. (2008). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455, 903-911.
- Sun, F., Zhu, C., Dixit, R., and Cavalli, V. (2011). Sunday Driver/JIP3 binds kinesin heavy chain directly and enhances its motility. *EMBO J* 30, 3416-3429.
- Tai, H.C., and Schuman, E.M. (2008). Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 9, 826-838.
- Tamminga, C.A., Stan, A.D., and Wagner, A.D. (2010). The hippocampal formation in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 167, 1178-1193.
- Tan, S.C., Scherer, J., and Vallee, R.B. (2011). Recruitment of dynein to late endosomes and lysosomes through light intermediate chains. *Mol Biol Cell* 22, 467-477.

- Tong, Y., Tempel, W., Wang, H., Yamada, K., Shen, L., Senisterra, G.A., MacKenzie, F., Chishti, A.H., and Park, H.W. (2010). Phosphorylation-independent dual-site binding of the FHA domain of KIF13 mediates phosphoinositide transport via centaurin alpha1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20346-20351.
- Trepel, M. (2004). Neuroanatomie – Struktur und Funktion, 3. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München
- Tretter, V., and Moss, S.J. (2008). GABA(A) Receptor Dynamics and Constructing GABAergic Synapses. *Front Mol Neurosci* 1, 7.
- Trinidad, J.C., Specht, C.G., Thalhammer, A., Schoepfer, R., and Burlingame, A.L. (2006). Comprehensive identification of phosphorylation sites in postsynaptic density preparations. *Mol Cell Proteomics* 5, 914-922.
- Trockenbacher, A., Suckow, V., Foerster, J., Winter, J., Krauss, S., Ropers, H.H., Schneider, R., and Schweiger, S. (2001). MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet* 29, 287-294.
- Tsujita, K., Itoh, T., Kondo, A., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Irino, Y., Hasegawa, J., and Takenawa, T. (2010). Proteome of acidic phospholipid-binding proteins: spatial and temporal regulation of Coronin 1A by phosphoinositides. *J Biol Chem* 285, 6781-6789.
- Twelvetrees, A.E., Yuen, E.Y., Arancibia-Carcamo, I.L., MacAskill, A.F., Rostaing, P., Lumb, M.J., Humbert, S., Triller, A., Saudou, F., Yan, Z., et al. (2010). Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron* 65, 53-65.
- Tyagarajan, S.K., and Fritschy, J.M. (2010). GABA(A) receptors, gephyrin and homeostatic synaptic plasticity. *J Physiol* 588, 101-106.
- Uchil, P.D., Quinlan, B.D., Chan, W.T., Luna, J.M., and Mothes, W. (2008). TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle. *PLoS Pathog* 4, e16.
- Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R.L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Sudhof, T.C., and Brose, N. (2006). Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51, 741-754.
- Varoqueaux, F., Jamain, S., and Brose, N. (2004). Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol* 83, 449-456.
- Veigel, C., and Schmidt, C.F. (2011). Moving into the cell: single-molecule studies of molecular motors in complex environments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 163-176.
- Verhey, K.J., and Hammond, J.W. (2009). Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 765-777.
- Vert, J.P., Foveau, N., Lajaunie, C., and Vandenbrouck, Y. (2006). An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics* 7, 520.
- Vessey, J.P., and Karra, D. (2007). More than just synaptic building blocks: scaffolding proteins of the post-synaptic density regulate dendritic patterning. *J Neurochem* 102, 324-32.

- Washbourne, P., Dityatev, A., Scheiffele, P., Biederer, T., Weiner, J.A., Christopherson, K.S., and El-Husseini, A. (2004). Cell adhesion molecules in synapse formation. *J Neurosci* 24, 9244-9249.
- Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., and Yarden, Y. (1999). The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 274, 22151-22154.
- Wei, Z., and Zhang, M. (2010). A structural approach to decipher the neurexin and neuroligin splice isoform code. *Neuron* 67, 1-2.
- Westermann, S., and Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 938-947.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., and Bear, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093-1097.
- Wilkinson, K.A., and Henley, J.M. (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 428, 133-145.
- Williams, D., Vicogne, J., Zaitseva, I., McLaughlin, S., and Pessin, J.E. (2009). Evidence that electrostatic interactions between vesicle-associated membrane protein 2 and acidic phospholipids may modulate the fusion of transport vesicles with the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 20, 4910-4919.
- Wright, G.J., and Washbourne, P. (2011). Neurexins, neuroligins and LRRTMs: synaptic adhesion getting fishy. *J Neurochem* 117, 765-778.
- Wulczyn, F.G., Cuevas, E., Franzoni, E., and Rybak, A. (2010). miRNA need a TRIM regulation of miRNA activity by Trim-NHL proteins. *Adv Exp Med Biol* 700, 85-105.
- Yamauchi, T. (2005). Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol Pharm Bull* 28, 1342-1354.
- Yan, Q., Sun, W., Kujala, P., Lotfi, Y., Vida, T.A., and Bean, A.J. (2005). CART: an Hrs/actinin-4/BERP/myosin V protein complex required for efficient receptor recycling. *Mol Biol Cell* 16, 2470-2482.
- Ying, H., Shen, X., Park, B., and Yue, B.Y. (2010). Posttranslational modifications, localization, and protein interactions of optineurin, the product of a glaucoma gene. *PLoS One* 5, e9168.
- Zhang, X.D., Goeres, J., Zhang, H., Yen, T.J., Porter, A.C., and Matunis, M.J. (2008). SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis. *Mol Cell* 29, 729-741.
- Ziff, E.B. (1997). Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* 19, 1163-1174.
- Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64, 355-405.

Anhang

A Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung neuronaler Reizweiterleitung an chemischen Synapsen	8
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung der postsynaptischen Spezialisierung einer glutamatergen exzitatorischen Synapse	12
Abb. 1.3:	Unidirektionaler Informationsfluss im Hippokampus	17
Abb. 1.4:	NMDA-Rezeptor vermittelte synaptische Plastizität	18
Abb. 1.5:	Schematische Darstellung Zytoskelett-assoziiierter molekularer Motoren	19
Abb. 1.6:	Rezeptor-Adapter-Motor-Modell und intrazelluläre Transportwege des GABA _A -Rezeptors	23
Abb. 1.7:	Die Enzymkaskade der Substrat-Ubiquitylierung	26
Abb. 1.8:	Die TRIM-Protein-Familie	28
Abb. 2.1:	Insertion von Oligonukleotiden in pSUPER-Vektoren und Prozessierung transkribierter shRNA zu funktioneller siRNA	45
Abb. 3.1:	Koimmunpräzipitation von TRIM3 mit KIF21B aus Rattenhirnextrakten	64
Abb. 3.2:	Verlust der TRIM3-Homodimerisierung durch Deletion der RBCC-Domäne	66
Abb. 3.3:	Koimmunpräzipitation von KIF21B mit TRIM3- Δ RBCC nach Koexpression in HEK293-Zellen	67
Abb. 3.4:	Im Hefe-2-Hybrid-System verwendete KIF21B- und TRIM3-Konstrukte	68
Abb. 3.5:	Direkte Interaktion von KIF21B und TRIM3 im Hefe-2-Hybrid-System	69
Abb. 3.6:	Spezifitätskontrolle des anti-KIF21B-Antikörpers	70
Abb. 3.7:	Spezifitätskontrolle des anti-TRIM3-Antikörpers	71
Abb. 3.8:	Kolokalisation von KIF21B und TRIM3 in kultivierten Neuronen	73
Abb. 3.9:	KIF21B und TRIM3 werden in Neuronen, aber nicht in Astrozyten exprimiert	74
Abb. 3.10:	Koimmunpräzipitation von TRIM3 und KIF21B mit Neuroligin aus Rattenhirnextrakten	76
Abb. 3.11:	Lokalisation von TRIM3 an vesikulären Strukturen	77
Abb. 3.12:	Kolokalisation von KIF21B, TRIM3 und Neuroligin in kultivierten Neuronen	78
Abb. 3.13:	Unveränderte Neuroligin-Menge an der Zelloberfläche nach TRIM3-Depletion	80
Abb. 3.14:	Bestimmung der KIF21B-Stabilität durch CHX- <i>chase</i> -Experimente in kultivierten Neuronen	81
Abb. 3.15:	Bestimmung der KIF21B-Stabilität in TRIM3-depletierten kultivierten Neuronen	82
Abb. 3.16:	Vergleich der KIF21B-Stabilität in kultivierten Neuronen aus Wildtyp- und <i>Trim3-Knockout</i> -Mäusen	83

Abb. 3.17:	Unveränderter KIF21B-Gehalt nach TRIM3-Depletion	84
Abb. 3.18:	KIF21B-Gehalt nach Überexpression von TRIM3 in kultivierten Neuronen	86
Abb. 3.19:	Intrazelluläre Verteilung von KIF21B nach TRIM3-Depletion	88
Abb. 3.20:	Intrazelluläre Verteilung von KIF5 und GABA _A γ2 nach TRIM3-Depletion	89
Abb. 3.21:	Analyse des Gesamtgehaltes von KIF21B und KIF5 in differenziell zentrifugierten Hippokampus-Lysaten	91
Abb. 3.22:	Mobilität von GFP-markierten Pur-α-Partikeln in kultivierten Neuronen	92
Abb. 3.23:	Analyse der Mobilität von GFP-Pur-α-Partikeln in Neuronen aus Wildtyp- und <i>Trim3-Knockout</i> -Mäusen	93
Abb. 3.24:	Vergleich kinetischer Parameter der GFP-Pur-α-Bewegung in kultivierten Neuronen aus Wildtyp- und <i>Trim3-Knockout</i> -Mäusen	95
Abb. 4.1:	Schematische Darstellung der TRIM3-Domänen-Struktur	99
Abb. 4.2:	Schematische Darstellung einer möglichen TRIM3-Funktion im Kinesin-vermittelten Transport	108

B Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Primärantikörper	39
Tabelle 2	Verwendete Sekundärantikörper	40
Tabelle 3	Verwendete Vektoren	40
Tabelle 4	Verwendete Oligonukleotide	42

C Abkürzungsverzeichnis

α	anti	BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
Abb.	Abbildung	BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
ABP	Aktin-Bindeprotein	BERP	<i>Brain-Expressed RING Finger Protein</i>
ad	auffüllen bis	bidest.	bidestilliert
AMP	Adenosinmonophosphat	BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
AMPA	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure	bp	Basenpaare
AraC	(β-D-Arabinofuranosyl)-Cytosin	BSA	Bovines Serumalbumin
AS	Aminosäure	bzw.	beziehungsweise
ASD	<i>Autism Spectrum Disorder</i>	CA	Cornu ammonis
ATP	Adenosintriphosphat	ca.	circa

CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Protein Kinase II	FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
		f.c.	<i>final concentration</i>
CART	<i>Cytoskeleton-Associated Recycling or Transport</i>	FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
CC	<i>Coiled-coil</i>	g	Erdbeschleunigung
CCD	<i>Charged-Coupled Device</i>	GABA	γ-Aminobuttersäure
CENPE	<i>Centromere-associated Protein E</i>	GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
		GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
CHX	Cyloheximid	GKAP	<i>Guanylate Kinase Associated Protein</i>
Cre	<i>Causes recombination</i>		
C-terminal	carboxyterminal	GluR	Glutamat-Rezeptoruntereinheit
Cy3	Indocarbocyanin	G-Protein	GTP-bindendes Protein
Cy5	Indodicarbocyanin	GRIP1	<i>Glutamate Receptor Interacting Protein 1</i>
d.h.	das heißt	GTP	Guanosintriphosphat
DIV	<i>Days In Vitro</i>	HA	Hämagglutinin
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	HAP1	<i>Huntingtin Associated Protein 1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	HBS	<i>HEPES Buffered Saline</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	HECT	<i>Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus</i>
DNase	Desoxyribonuklease	HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
dpi	<i>dots per inch</i>	HeLa	Henrietta Lacks
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat	HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
DTT	Dithiothreitol	HPSF	<i>High Purity Salt Free</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Hrs	<i>Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	ICC	<i>Immunocytochemistry</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>	IgG	Immunglobulin G
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat	IP	Immunpräzipitation
EM	Elektronenmikroskopie	Inst.	Institut
ER	Endoplasmatisches Retikulum		
ERAD	<i>ER associated Protein Degradation</i>	JSAP1	<i>Jun N-terminal protein kinase /Stress-activated protein kinase-Associated Protein 1</i>
et al.	und andere (et alii)		
Exp.	Experimente		

K	Lysinrest	PBS	Phosphate buffered saline
Kap.	Kapitel	PC12	<i>Pheochromocytoma</i>
kb	Kilobasenpaare	PCR	<i>Polymerasechainreaction</i>
kDa	Kilodalton	PEG	Polyethylenglykol
KIF	Kinesin-Superfamilie	pH	- log [H ⁺]
KO	<i>Knockout</i>	PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
KO-IP	Koimmunpräzipitation	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
LB	<i>Lysogeny Broth</i>	PNS	Peripheres Nervensystem
loxP	<i>locus of cross-over (x) in P1</i>	PPi	Pyrophosphat
LTD	<i>Longterm Depression</i>	PP1	Protein Phosphatase 1
LTP	<i>Longterm Potentiation</i>	PSD	Postsynaptische Dichte
MAP	<i>Microtubule Associated Protein</i>	PSD95	<i>Postsynaptic Density-95</i>
mRFP	<i>monomeric Red Fluorescent Protein</i>	PTM	Posttranslationale Modifikation
mRNA	<i>messenger RNA</i>	PTZ	Pentylentetrazol
myc	<i>myelocytomatosis oncogene</i>	PVDF	Polyvinylidenfluorid
n	Versuchsanzahl	Rab	<i>Ras related in brain</i>
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>	Ras	<i>Rat sarcoma</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	RBCC	RING-B-Box-Coiled-coil
NF-L	<i>Neurofilament Light Protein</i>	RGC5	<i>Retinal Ganglion Cell line 5</i>
NHL	<i>NCL-1, HT2A, Lin-41</i>	RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
NLG	Neurologin	RIPA	<i>RadioImmunoPrecipitation Assay</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat	RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
NR	NMDA-Rezeptoruntereinheit	RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
Nr.	Nummer	RNAi	RNA Interferenz
NSE	Neuronenspezifische Enolase	RNase	Ribonuklease
N-terminal	aminoterminal	rpm	<i>rounds per minute</i>
OD	Optische Dichte	RT	Raumtemperatur
ORF	<i>Open Reading Frame</i>	S1/4	<i>Supernatant 1/4</i>
<i>p</i>	Signifikanzwert <i>p</i>	SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
P1-3	Pellet 1-3	SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
Px	Postnataltag <i>x</i>	shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese		

siRNA	<i>short/small interfering RNA</i>	ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	ZNS	Zentrales Nervensystem
sog.	sogenannt		
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>		
SV2	<i>Synaptic Vesicle Protein 2</i>	Einheiten	
SynGAP	<i>Synaptic GTPase-Activating Protein</i>	°C	Grad Celsius
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer	d	Tag
TB	<i>Terrific Broth</i>	h	Stunde
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>	L	Liter
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween</i>	m	Meter
TE	Tris-EDTA-Puffer	M	Molar
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>	min	Minute
TRIM	<i>Tripartite Motif</i>	sec	Sekunde
U	<i>Unit</i>	V	Volt
u.a.	unter anderem		
Ub	Ubiquitin	Präfixe	
UBE3A	<i>Ubiquitin-Protein Ligase E3A</i>	f	Femto (10 ⁻¹⁵)
UV	Ultraviolett	p	Piko (10 ⁻¹²)
V	Vesikel	n	Nano (10 ⁻⁹)
vergl.	vergleiche	μ	Mikro (10 ⁻⁶)
v/v	<i>volume/volume</i>	m	Milli (10 ⁻³)
WB	Western Blot	c	Zenti (10 ⁻²)
WD	Tryptophan/W-Aspartat/D	h	Hekto (10 ²)
w/o	<i>without</i>	k	Kilo (10 ³)
WT	Wildtyp	M	Mega (10 ⁶)
w/v	<i>weight/volume</i>	G	Giga (10 ⁹)
x	-fach	T	Tera (10 ¹²)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	P	Peta (10 ¹⁵)
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>		
z.B.	zum Beispiel		
Z	Zytosol		