

Aus dem Institut für Pathophysiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

CKAMP59 und sein Einfluss auf die Funktion des AMPA-Rezeptors

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Dominique Alya Messerle
aus St. Wendel

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jakob von Engelhardt
2. Gutachter: Prof. Dr. Werner Kilb

Tag der Promotion: 06. März 2024

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	II
TABELLENVERZEICHNIS.....	IV
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURDISKUSSION	3
2.1 Die chemische Synapse	3
2.2 Der AMPA-Rezeptor	4
2.3 Die auxiliären Proteine	6
2.3.1 Die CKAMP-Familie	8
2.4 Synaptische Plastizität.....	11
2.4.1 Kurzzeitplastizität	11
2.4.2 Langzeitplastizität und Langzeitpotenzierung	12
2.5 Hirnregionen	13
2.5.1 Der Hippocampus.....	13
2.5.2 Das Corpus striatum.....	16
2.6 Ziel der Studie	17
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Versuchstiere und Tierhaltung.....	19
3.1.1 Das „Knockout-first“-Prinzip	19
3.2 Lösungen	20
3.2.1 Sucrose-Lösung	20
3.2.2 Extrazelluläre Lösung.....	21
3.2.3 Intrazelluläre Lösung.....	22
3.2.4 Chemikalien.....	23
3.3 Genotypisierung	24
3.4 Herstellung der Hirnschnitte	26
3.5 Messtechnik Patch-Clamp.....	28
3.5.1 Set up	32
3.6 Miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC)	33
3.7 AMPA/NMDA-Ratios	34
3.8 Kurzzeitplastizität: Paired-Pulse Facilitation.....	34
3.9 Langzeitplastizität: Long Term Potentiation.....	35
3.10 Statistik	36
4. ERGEBNISSE	37

4.1 mEPSCs	37
4.2 AMPA/NMDA-Ratios	41
4.3 Kurzzeitplastizität: Paired-Pulse-Ratio	42
4.4 Langzeitpotenzierung LTP	43
5. DISKUSSION	46
5.1 CKAMP59 beeinflusst die Kinetik von AMPA-Rezeptoren unter basalen Konditionen nur gering	46
5.2 CKAMP59 beeinflusst die Kurzzeitplastizität in den Körnerzellen des Gyrus dentatus.....	49
5.3 CKAMP59 Knockout reduziert die Langzeitpotenzierung in den Körnerzellen des Gyrus dentatus.....	51
5.4 Vergleich der potenziellen CKAMP59-Funktion mit anderen Mitgliedern der CKAMP-Familie ..	52
5.4.1 Die Proteine der CKAMP-Familie beeinflussen die Kinetik der AMPA-Rezeptoren unter basalen Konditionen unterschiedlich.....	53
5.4.2 Die Kurzzeitplastizität	54
5.4.3 Langzeitpotenzierung	56
5.4.4 Strukturelle Eigenschaften der CKAMP-Familie.....	56
5.5 Knockout.....	58
5.6 Auxiliäre Proteine können als Angriffspunkt von Medikamenten helfen, die Therapien von Erkrankungen des ZNS zu verbessern.....	59
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	62
7. LITERATURVERZEICHNIS	64
8. DANKSAGUNG	71
9. TABELLARISCHER LEBENSLAUF	72

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
CA	Cornu Ammonis
DG	Gyrus dentatus
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
KO	Knockout
mEPSC	miniature excitatory postsynaptic currents
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
Striatum	Corpus striatum
TTX	Tetrodotoxin
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der regionalen Unterschiede der Expression verschiedener auxiliärer Proteine im Hirn einer Maus.....	7
Abbildung 2: Eine In-situ-Hybridisierung von Farrow et al. 2015 zeigt das Expressionsmuster von CKAMP59 im Gehirn einer adulten Maus.....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der hippocampalen Verbindungen nach „Role of the hippocampus in mediating interference as measured by pattern separation processes“ Behavioural Processes	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung des "Knockout-first"-Prinzips nach Skarnes et al.2011.....	20
Abbildung 5: Beispiel einer Genotypisierung nach PCR mehrerer Mausschwanzspitzen.....	26
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Konfigurationen aus dem Kapitel Elektrophysiologische Methoden aus dem Buch „Der Experimentator: Neurowissenschaften“	30
Abbildung 7: Aufnahme einer gesunden Körnerzelle im Gyrus dentatus mit aufliegender Patch-Pipette.....	32
Abbildung 8: mEPSC Messungen in Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen.....	39
Abbildung 9: mEPSC Messungen in Projektionsneuronen des Striatums von jungen Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen.....	40
Abbildung 10: AMPA/NMDA-Messungen in den Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen.....	42
Abbildung 11: Kurzzeitplastizität in den Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen.....	43

Abbildung 12: Langzeitpotenzierung in den Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen.....	45
Abbildung 13: Schematische Darstellung der CKAMP-Familie.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Sucrose-Ringer.....	21
Tabelle 2: Zusammensetzung der extrazellulären Ringer-Lösung.....	22
Tabelle 3: Zusammensetzung der intrazellulären Lösung	23
Tabelle 4: Konzentrationsangaben der Chemikalien	24
Tabelle 5: Auflistung der PCR-Primer	25
Tabelle 6: PCR-Protokoll	25

1. Einleitung

Die synaptische Transmission über chemische Synapsen bildet den hauptsächlichsten Anteil der neuronalen Kommunikation im zentralen Nervensystem. Für den größten Teil dieser schnellen exzitatorischen Übertragungen sind die AMPA-Rezeptoren (AMPA) zuständig, die ligandengesteuerte Kationenkanäle bilden.

Sie gehören zusammen mit den NMDA- und Kainat-Rezeptoren zu den ionotropen Glutamat-Rezeptoren und spielen vor allem für synaptische Plastizität und die neuronalen Schaltkreise im Hippocampus und Kortex eine Rolle. Somit sind sie maßgeblich an Lernprozessen und Gedächtnisbildung beteiligt.

AMPA-Rezeptoren sind Heterotetramere, die aus den vier Untereinheiten GluA1 bis GluA4 bestehen. Die Konstellation dieser Untereinheiten bestimmt die grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors und kann zwischen synaptischer und extrasynaptischer sowie zwischen Synapsen desselben Neurons unterschiedlich ausfallen. Außerdem binden AMPA-Rezeptoren an verschiedene Proteine, die als auxiliäre Untereinheiten die Eigenschaften des Rezeptors modulieren sowie ihren Transport zu den Synapsen beeinflussen können. Somit gibt es im zentralen Nervensystem eine große Vielfalt an AMPA-Rezeptoren, die sich regional und zellspezifisch in ihrer Zusammensetzung und ihren Eigenschaften unterscheiden können.

Neben den schon länger bekannten Proteinen aus der TARP-Familie wird auch die Familie der „cystine-knot AMPAR modulating proteins“ (CKAMPs) zu den auxiliären Proteinen gezählt. Die Vertreter dieser Genfamilie besitzen die gleichen strukturellen Eigenschaften. Zu ihnen gehört das 2015 von Farrow et al. beschriebene CKAMP59. Es konnte bisher schon gezeigt werden, dass dieses Protein im Gehirn in vielen Regionen exprimiert wird und seine Abwesenheit unter anderem einen großen Einfluss auf die Plastizität der Synapsen der Schaffer-Kollaterale auf die CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus hat. Im Einklang mit diesem Befund zeigten CKAMP59-defiziente Mäuse eine Störung des kontextuellen Angstgedächtnisses.

Es wird vermutet, dass AMPA-Rezeptoren und ihre auxiliären Untereinheiten eine große Rolle in der Entstehung neurologischer und psychiatrischer Krankheiten wie

zum Beispiel der Epilepsie und der Depression sowie von neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer spielen. So gibt es schon Ansätze in der spezifischen pharmakologischen Therapie der Epilepsie mit dem auxiliären Protein TARP γ -8 als Angriffspunkt.

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist, mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden eine detaillierte Analyse des Effektes einer CKAMP59-Defizienz auf die synaptische Transmission und Plastizität in zwei verschiedenen Hirnregionen durchzuführen.

2. Literaturdiskussion

2.1 Die chemische Synapse

Synapsen dienen der Übertragung von Signalen von einem Neuron zum anderen oder von einem Neuron zu einem Zielorgan. Chemische Synapsen übertragen ihre Erregungen nur unidirektional über Neurotransmitter innerhalb weniger als 0,5 Millisekunden. Ankommende Aktionspotentiale lösen an der Präsynapse einen spannungsabhängigen Einstrom von Kalzium-Ionen aus, welche zur Fusion der mit Neurotransmittern gefüllten Vesikeln mit der präsynaptischen Membran führt und darauffolgend zur Exozytose der Vesikel in den synaptischen Spalt, der zwischen 20 bis 30 nm weit ist (Gabbiani und Cox, 2010). Die Neurotransmitter diffundieren daraufhin zur Membran der Postsynapse und binden dort an Rezeptoren, die zusammen mit assoziierten Proteinen die „postsynaptic density“, kurz PSD, bilden. Die Bindung der Transmitter an die Rezeptoren führt zum Öffnen von Kanälen und damit durch Überschreiten des Schwellenpotentials zur Auslösung eines Aktionspotentials. Damit wird das chemische Signal von der Präsynapse in ein elektrisches Signal an der Postsynapse umgewandelt. Die Transmitter werden danach aus dem synaptischen Spalt wieder in die Präsynapse aufgenommen.

Je nachdem, ob die Synapsen exzitatorisch oder inhibitorisch auf die Postsynapse wirken oder welcher Transmitter übertragen wird, kann man die Synapsen weiter unterscheiden. Ein EPSP ist ein exzitatorisches postsynaptisches Signal, welches durch Neurotransmitter wie Glutamat oder Dopamin übertragen wird und durch Öffnung eines Kationenkanals zur Depolarisation an der Postsynapse führt. Eine Summe von EPSP löst ein Aktionspotential an der Nervenzelle aus. Ein IPSP ist wiederum ein inhibitorisches postsynaptisches Potential, welches durch Neurotransmitter wie GABA (gamma-Aminobuttersäure) oder Glycin und durch Öffnung eines Anionenkanals zur Hyperpolarisation an der Postsynapse führt.

Die Aminosäure Glutamat ist der häufigste und wichtigste erregende Neurotransmitter im Gehirn, während sein nach Spaltung durch die Decarboxylase entstehendes Produkt GABA (auch eine Aminosäure) der häufigste inhibitorische Transmitter ist.

Glutamat wirkt an zwei verschiedenen Arten von Rezeptoren: an metabotropen Glutamat-Rezeptoren, welche ihre Wirkung über G-gekoppelte Proteine ausübt und an ionotropen Glutamat-Rezeptoren (Simeone et al. 2004, Palmer et al. 2005), auf welchen der Fokus dieser Studie liegt. Die ionotropen Rezeptoren (kurz: iGluR) können in mehrere Gruppen unterteilt werden. Zu den Hauptgruppen zählen der AMPA-Rezeptor (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure), dessen Untereinheiten in GluA1 bis GluA4 eingeteilt werden, der NMDA-Rezeptor (N-methyl-D-Aspartat), welcher aus den Einheiten GluN1 mit GluN2A-GluN2D und GluN3A-GluN3B besteht und der Kainat-Rezeptor, der aus den Untereinheiten GluK1 bis GluK5 besteht (Kumar und Mayer 2013, Reiner und Levitz 2018). Im Folgenden wird auf die AMPA-Rezeptoren als Gegenstand dieser Studie im Detail eingegangen.

2.2 Der AMPA-Rezeptor

Der AMPA-Rezeptor ist der prädominante Überträger schneller exzitatorischer Ströme an chemischen Synapsen im zentralen Nervensystem von Säugetieren und ist wichtig für die Formierung neuronaler Signalwege und synaptischer Plastizität (Simeone et al. 2004, Farrow et al. 2015, Henley und Wilkinson 2016). Der Rezeptor besteht meist aus einem Heterotetramer, bestehend aus zwei der oben bereits genannten vier Subtypen GluA1 bis GluA4. Es können sich aber auch Homomere bilden (Greger et al. 2017).

Die Konstellation der Untereinheiten bestimmt die Eigenschaften des Rezeptors wie die Deaktivierung, Desensitisierung und seine Erholung von der Desensitisierung sowie die Kalzium-Permeabilität (von Engelhardt 2019). So sind zum Beispiel AMPA-Rezeptoren, die die GluA2-Untereinheit enthalten, impermeabel für Kalzium-Ionen, ihre Strom-Spannungskurve verläuft linear und ihre Einzelkanalleitfähigkeit fällt eher klein aus (Monyer und von Engelhardt 2015).

Neben der Untereinheitenkonstellation bestimmen die Amino- und Carboxy-Termini der Rezeptoren über ihre Funktion und Lage. Den extrazellulären Teil des Proteins bildet der Amino-Terminus, welcher wichtig für die Lokalisierung der Rezeptoren in der Synapse ist (Jacobi und von Engelhardt 2021). Am intrazellulär gelegenen Carboxy-Terminus können posttranslationale Modifikationen erfolgen, die Einfluss auf den für

die jeweilige Untereinheit spezifischen Transport haben (Henley und Wilkinson 2016). Außerdem bildet er die Bindestelle für auxiliäre Proteine, die mit dem Rezeptor interagieren und so ebenfalls seine Modifikation, seinen Transport sowie seine Eigenschaften beeinflussen können. Somit kann durch die genannten Variablen wie die Bindung verschiedener auxiliärer Proteine oder die Untereinheitenkonstellation des Rezeptors Einfluss auf die Zahl und Funktion der AMPA-Rezeptoren und darüber Einfluss auf die synaptische Stromstärke genommen werden (Greger und Esteban 2007).

Es gibt große regionale sowie entwicklungsbedingte Unterschiede in der Expression der GluA-Untereinheiten. So ist die Rezeptorkomposition zwischen synaptischer und extrasynaptischer Lokalisation sowie zwischen verschiedenen Synapsen desselben Neurons unterschiedlich (Jacobi und von Engelhardt 2017).

Im Hippocampus scheinen AMPA-Rezeptoren aus den Untereinheiten GluA1 und GluA2 sowie GluA2 und GluA3 vorherrschend zu existieren (Wenthold et al. 1996). GluA4 wird in Synapsen von auditorischen Nervenzellen exprimiert und GluA1 in den Synapsen der Nervenbahnen von der Retina zum Corpus geniculatum laterale (Kielland et al. 2009). Die Kombination der Untereinheiten im AMPA-Rezeptor beeinflusst seine basalen elektrophysiologischen Eigenschaften wie zum Beispiel die Öffnungseigenschaften (Jacobi und von Engelhardt 2021).

Vor dem Transport zur Zelloberfläche muss der Rezeptor einige Modifikationen durch verschiedenen Zellorganellen wie zum Beispiel dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat durchlaufen. Ebenso unterliegt er einer Qualitätskontrolle. Dabei wird vor dem Verlassen des ER kontrolliert, ob die Rezeptoren richtig gefaltet, zusammengebaut und posttranslational phosphoryliert oder glykosyliert worden sind (Jacobi und von Engelhardt 2017). Auch die Bindung der oben bereits genannten auxiliären Proteine sind beim Transport der Rezeptoren an die Zelloberfläche beteiligt (Bredt und Nicoll 2003). Auf auxiliäre Proteine der AMPA-Rezeptoren und deren Funktion wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

2.3 Die auxiliären Proteine

Seit den frühen 90er Jahren ist die Existenz auxiliärer Proteine bekannt, die an spannungsabhängige Ionenkanäle binden. Erst in den 2000ern entdeckte man Proteine, die als auxiliäre Untereinheiten einen Teil von ligandengesteuerten Kanälen bilden (Yan und Tomita 2012).

Nach Yan und Tomita gibt es vier Kriterien, die ein auxiliäres Protein erfüllen muss, um sich von anderen interagierenden Proteinen zu unterscheiden. Demnach muss es (1) keinen Teil der porenformenden Untereinheiten des Rezeptors darstellen oder darf allein Kanal-ähnliche Eigenschaften besitzen, (2) mit einer porenformenden Rezeptoruntereinheit eine direkte und stabile Verbindung eingehen, (3) in heterologen Zellen die Eigenschaften und/oder die Übertragung eines Ionenkanals beeinflussen und (4) notwendig für bestimmte Funktionen von nativen Rezeptoren in vivo sein.

Stargazin war das erste bekannte auxiliäre Protein der AMPA-Rezeptoren. Durch eine Mutation im Chromosom 15 fehlt in der sogenannten Stargazer-Maus das Protein Stargazin, welches für den Transport von AMPA-Rezeptoren auf die Zellmembran der cerebellären Körnerzellen verantwortlich ist. Dies resultiert in einer gestörten AMPAR-vermittelten synaptischen Übertragung der Körnerzellen im Cerebellum und einer Dysfunktion im vestibulären System (Letts et al. 1998, Chen et al. 1999, Khan et al. 2004). Die Maus leidet daher an epileptischen Anfällen, Dyskinesie und Ataxie. Die für die Mutation typische Bewegung, bei der die Maus ihren Kopf nach hinten neigt und nach oben zu starren scheint als würde sie zu den Sternen aufblicken, gibt der Maus ihren charakteristischen Namen. Heute weiß man, dass Stargazin (auch TARP γ -2 genannt) ein Mitglied der TARP-Familie („transmembrane AMPA receptor regulatory proteins“) ist (Jackson und Nicoll 2011, Monyer und von Engelhardt 2015).

Seit der Entdeckung von Stargazin ist die Gruppe der bekannten auxiliären Proteine gewachsen. So gibt es nun mehrere voneinander unterscheidbare Familien: TARPs (Tomita et al. 2003), Cornichons (Schwenk et al. 2009), GSG1L (Shanks et al. 2012), Porcn (Erlenhardt et al. 2016) und CKAMPs (von Engelhardt et al. 2010, Farrow et al. 2015). Die Expression der auxiliären Proteine ist ähnlich wie auch die Expression der Untereinheiten des iGluR regions-, entwicklungs- und zelltypspezifisch (Schwenk et al. 2014).

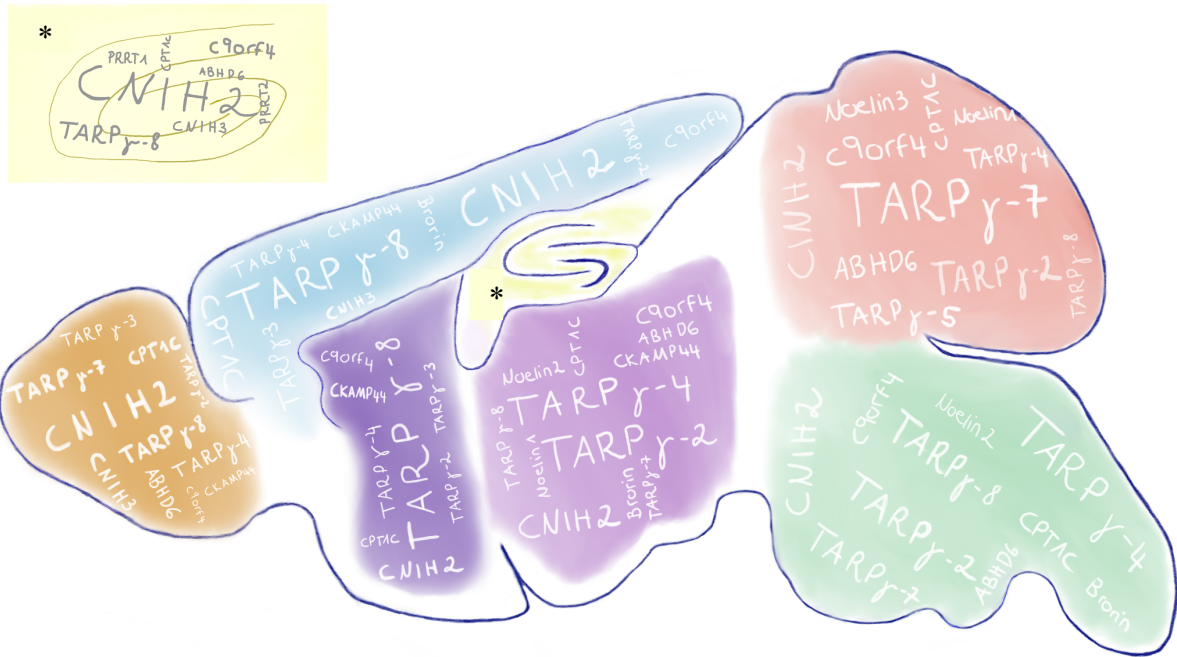


Abbildung 1: Schematische Darstellung der regionalen Unterschiede der Expression verschiedener auxilärer Proteine im Hirn einer Maus. Nachempfunden nach „Diversity in AMPA receptor complexes in the brain“ (Jacobi und von Engelhardt 2017).

Einige auxiliäre Proteine (z.B. TARPs) interagieren schon im endoplasmatischen Retikulum mit AMPA-Rezeptoren und fördern den Transport der Rezeptoren zur Zelloberfläche. Auxiliäre Proteine wie zum Beispiel CKAMPs und TARPs interagieren mit „membrane-associated guanylate kinases“ (kurz MAGUKs), vor allem mit PSD95 („postsynaptic density protein 95“). Durch diese Verbindungen werden AMPA-Rezeptoren in der Synapse stabilisiert. Auxiliäre Proteine können so die Zahl der synaptischen AMPA-Rezeptoren modulieren. Über diesen Mechanismus spielen auxiliäre Proteine auch bei einer aktivitätsabhängigen Anpassung der Anzahl von AMPA-Rezeptoren in der Synapse eine Rolle (z.B. bei der LTP siehe unten) (Jacobi und von Engelhardt 2021).

Durch die Interaktion mit auxiliären Proteinen werden die Stromeigenschaften der AMPA-Rezeptoren (z.B. Deaktivierung, Desensitisierung, Erholung von der Desensitisierung, Leitfähigkeit, Glutamat-Affinität) moduliert. Damit üben auxiliäre Proteine einen Einfluss auf die Amplitude und Kinetik AMPAR-vermittelter Ströme aus. Die große Anzahl der auxiliären Proteine erklärt die große Variabilität der

Rezeptoreigenschaften in den verschiedenen Synapsen des zentralen Nervensystems (Yan und Tomita 2012, Greger et al. 2017, Schmitz et al. 2017).

2.3.1 Die CKAMP-Familie

Die CKAMP-Familie ist eine Gruppe auxiliärer Proteine, über die bisher vergleichsweise wenig bekannt ist. 2010 wurde CKAMP44 als erstes Mitglied dieser Familie beschrieben (von Engelhardt et al. 2010). CKAMP44 ist ein Typ I Transmembranprotein, welches eine intrazelluläre Domäne mit einem PDZ-Typ II Motiv am C-Terminus und eine extrazelluläre Cystein-reiche Region nahe des N-Terminus enthält. Cystin-Verbindungen scheinen ähnlich wie bei Wachstumsfaktoren die Struktur einer extrazellulären Domäne (Cystin-Knoten) zu stabilisieren (Farrow et al. 2015). Diese für die Funktion des Proteins notwendige Domäne sowie das molekulare Gewicht von 44 kD gab dem Protein den Namen CKAMP44 für „cystine-knot AMPAR modulating protein“. Das zugehörige Gen befindet sich in der Maus und im Menschen auf Chromosom 16 und zeigt die Expression des Proteins in Hippocampus, zerebralen Cortex, Thalamus, Striatum, Cerebellum und Bulbus olfactorius (von Engelhardt et al. 2010).

Farrow et al. beschrieben 2015 weitere Proteine, die zur CKAMP-Familie gehören: CKAMP39, CKAMP52 und CKAMP59. Aufgrund der genetischen Ähnlichkeit der CKAMP-Proteine zu den Shisa-Proteinen gehören sie zu dieser größeren Gen-Familie und sind auch unter den Namen Shisa 6 (CKAMP52), Shisa 7 (CKAMP59), Shisa 8 (CKAMP39) und Shisa 9 (CKAMP44) bekannt (Farrow et al. 2015).

All die bisher genannten Proteine der CKAMP-Familie ähneln sich in bestimmten Eigenschaften, vor allem der Bindestelle mit dem AMPA-Rezeptor, und kommen nur im Gehirn vor, auch wenn ihre Expression und Funktion unterschiedlich sind. Außer dem oben genannten gemeinsamen Cystein-Knoten bilden sie mutmaßlich eine ähnliche beta-Strangstruktur im extrazellulären Bereich (Farrow et al. 2015). Die Transmembranregion besteht aus 18-19 Aminosäuren und hat unter den Proteinen eine sehr hohe Ähnlichkeit (Farrow et al. 2015). Ein Arginin-reicher Bereich in der Transmembran-Domäne scheint wichtig für die Interaktion mit der GluA1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors zu sein. Es hat sich gezeigt, dass das PDZ-Typ II Motiv für alle Proteine der CKAMP-Familie die Interaktion mit PSD95 ermöglicht (von Engelhardt

2019). Diese Interaktion spielt wie bereits erwähnt eine Rolle bei der synaptischen Verankerung der AMPA-Rezeptoren (Khodosevich et al. 2014).

Da CKAMP59 (wegen der Ähnlichkeit der Gene zu den Genen der Shisa-Proteine auch Shisa7 genannt) das Hauptthema dieser Studie ist, wird im Folgenden auf die zum heutigen wissenschaftlichen Stand bereits bekannten Eigenschaften dieses Proteins eingegangen.

CKAMP59 besitzt wie CKAMP52 und CKAMP44 zwei Splicing-Varianten und wird im ganzen Gehirn außer im Cerebellum exprimiert, vor allem in der CA1-CA3 Region sowie im Gyrus dentatus des Hippocampus, Kortex, Striatum, Amygdala und Bulbus olfactorius (Farrow et al. 2015, Schmitz et al. 2017). Im Hippocampus liegt CKAMP59 glycosyliert vor, was das molekulare Gewicht erhöht, ähnlich wie bei CKAMP52 (Klaassen et al. 2016). Das Protein ist schon pränatal stark in diesen Hirnregionen vertreten. Postnatal erfolgt eine Runterregulierung in Thalamus und Hirnstamm (Farrow et al. 2015).

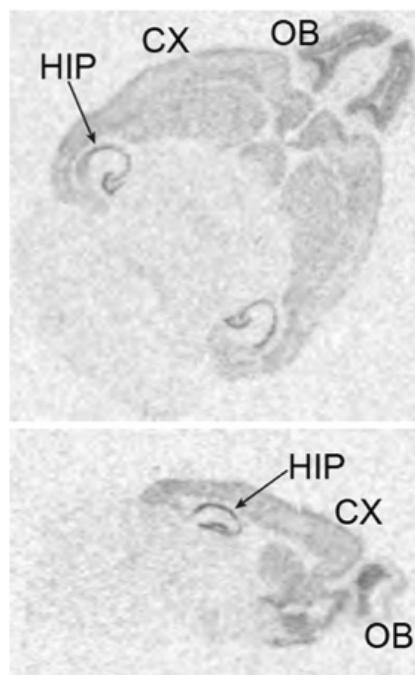


Abbildung 2: Eine In-situ-Hybridisierung von Farrow et al. 2015 zeigt das Expressionsmuster von CKAMP59 im Gehirn einer adulten Maus im transversalen (oben) und sagittalen (unten) Hirnschnitt. Es zeigt sich ein hohes Expressionsmuster im Hippocampus (HIP), Kortex (CX) und Bulbus olfactorius (OB).

Schmitz et al. zeigten 2017, dass in heterologen embryologischen Nierenzellen („human embryonic kidney cells“, HEK293-Zellen) CKAMP59 unabhängig von der Konstellation der Untereinheiten an AMPA-Rezeptoren bindet. Außerdem zeigt es eine starke Anreicherung an der postsynaptischen Densität und bindet wie CKAMP44 an PSD-95. Diese Interaktion ist abhängig von dem bereits erwähnten Typ II PDZ-Ligandenmotiv. Farrow et al. zeigten 2015 bereits, dass CKAMP59 keine Änderungen der Kinetiken des AMPA-Rezeptors bewirkt, was möglicherweise an den unterschiedlichen Spleiß-Varianten oder an der Hochregulation anderer auxiliärer Proteine bei einer CKAMP59-Defizienz liegen könnte.

In HEK293-Zellen bewirkt CKAMP59 eine Erhöhung der Desensitisierungsrate, einen niedrigeren erhaltenen Strom in der verlängerten Anwesenheit von Glutamat und eine reduzierte Erholung von der Desensitierung, so wie alle Proteine der Familie. Die Rate der Deaktivierung der Rezeptoren zeigte sich nicht verändert, im Gegensatz zu ex vivo Messungen in Hippocampus-Schnitten. Hier führte der Knockout von CKAMP59 zu einer verkürzten Decay Time von mEPSCs (minimaler exzitatorischer postsynaptischer Ströme) sowie der Decay und Rise Time von evozierten AMPAR-Strömen. NMDA-Ströme waren nicht beeinflusst. Die Kurzzeitplastizität wird durch CKAMP59 ebenfalls nicht beeinflusst (Schmitz et al. 2017).

In CA1-Neuronen des Hippocampus hat der Knockout von CKAMP59 keinen Effekt auf die Amplitude von mEPSCs und elektrisch evozierten Strömen, was dafürspricht, dass dieses Protein unter normalen Umständen nicht für die synaptische Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren benötigt wird und sich somit in CKAMP59 Knockout-Mäusen keine Veränderungen in der basalen AMPAR-Expression an den Synapsen zeigt.

Langzeitpotenzierung von AMPAR-vermittelten Strömen in Schaffer-Kollateral-Synapsen ist allerdings in CKAMP59 Knockout-Mäusen stark reduziert, was vermuten lässt, dass CKAMP59 AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Densität nach LTP-Induktion stabilisiert (Schmitz et al. 2017).

Im Hippocampus ist CKAMP59 ausschlaggebend an der glutamatergen synaptischen Plastizität und dem kontextuellen Angstgedächtnis beteiligt (Schmitz et al. 2017). Lu und Han zeigten 2019 außerdem, dass CKAMP59 ebenfalls an GABA-Rezeptoren bindet und die Wirkung von Benzodiazepinen beeinflussen kann.

2.4 Synaptische Plastizität

Die Stärke synaptischer Verbindungen ist modulierbar. So kann eine wiederholte gemeinsame Aktivität zweier oder mehrerer Neurone zu einer aktivitätsabhängigen Verknüpfung dieser Zellen führen. Die Signalübertragung über die Präsynapse des einen Neurons stärkt dabei die Verbindung zur Postsynapse des anderen Neurons und es können sich so ganze Netzwerke bilden, deren Verbindungen und synaptische Übertragung immer stärker werden, je öfter ihre Neuronen zusammen aktiviert werden. Erstmals beschrieben wurde diese Theorie 1949 von Donald Hebb (Magee und Grienberger 2020). Synaptische Plastizität spielt eine zentrale Rolle im Rahmen von Gedächtnis- und Lernprozessen sowie der Adaptierung zukünftigen Verhaltens (Mansvelder et al. 2019, Magee und Grienberger 2020). Synaptische Verbindungen können auch schwächer werden, wenn sie nicht so häufig genutzt werden.

Synaptische Plastizität kann unterteilt werden in Kurzzeitplastizität und Langzeitplastizität. Die Veränderungen der synaptischen Stärke im Rahmen der Kurzzeitplastizität normalisiert sich innerhalb von Minuten wieder. Dagegen kann die Änderung der synaptischen Stärke bei Langzeitpotenzierung (LTP) oder Langzeitdepression (LTD) von mehreren Stunden bis zu Jahre andauern (Deperrois und Graupner 2020).

Nach Khodosevich et al. (2014) können auxiliäre Untereinheiten von AMPA-Rezeptoren sowohl die Kurzzeit- als auch die Langzeitplastizität modulieren.

2.4.1 Kurzzeitplastizität

Neurone leiten mit einer Frequenz von einem bis mehrere hundert Hertz Signale an andere Neurone weiter. Durch die wiederholte Überleitung können sich Verbindungen zwischen Neuronen verstärken, während es durch eine verminderte Überleitung auch zu einer Reduktion der Verbindung kommen kann. Diesen Prozess aktivitätsabhängiger Veränderung der postsynaptischen Amplitude nennt man Kurzzeitplastizität (Dutta Roy et al. 2014).

Man kann zwischen Fazilitation und Depression, die jeweils von wenigen bis zu mehreren Sekunden andauern kann, und posttetanischer Potenzierung, die bis zu 30

Sekunden andauert, unterscheiden (Xu et al. 2007, Dutta Roy et al. 2014). Es spielen dabei sowohl prä- als auch postsynaptische Mechanismen eine Rolle (Zucker und Regehr 2002, de Jong und Fioravante 2014, Dutta Roy et al. 2014). Die zunehmende Erhöhung der präsynaptischen Kalziumkonzentration bei hochfrequenter Aktivität kann z.B. die Vesikel-Freisetzung erhöhen und damit zu einer Kurzzeit-Fazilitation der synaptischen Verbindungsstärke führen. Auf der anderen Seite führt eine Depletion des schnell freisetzbaren Vesikelpools oder auch eine Desensitisierung der postsynaptischen Rezeptoren zu Kurzzeit-Depression (Xu et al. 2007, Jackman und Regehr 2017).

2.4.2 Langzeitplastizität und Langzeitpotenzierung

Langzeitplastizität ist die Grundlage für die Ausbildung von Lernen, Gedächtnis und der Adaptierung von Verhalten. Langzeitplastizität kann in Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) unterschieden werden und unterscheidet sich von der Kurzzeitplastizität in ihrer längeren Dauer. Während kurzzeitige synaptische Veränderungen in einigen Minuten wieder abklingen, halten langfristige Veränderungen Stunden bis lebenslang an (Deperrois und Graupner 2020). Studien haben gezeigt, dass LTP und LTD eine zentrale Rolle bei kognitiven Funktionen wie Lernen und Erinnerung (Gecz 2010, Brosnan und Brosnan 2013) sowie in der Pathogenese von Schizophrenie, neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Autismus und der Drogensucht spielen (Monday et al. 2018).

Erstmals wurde die Existenz von Langzeitplastizität in den Moosfasern des Hippocampus beobachtet. Mittlerweile wurde Langzeitplastizität in mehreren Hirnregionen nachgewiesen wie zum Beispiel im zerebralen Cortex und der Amygdala (Giap et al. 2000, Yang und Calakos 2013). Die Induktion von Langzeitplastizität hängt von der Stimulationsfrequenz der prä- und postsynaptischen Neurone, sowie von den präzisen zeitlichen Abfolgen von prä- und postsynaptischen Aktionspotentialen ab (Deperrois und Graupner 2020). Die synaptische Stärke ändert sich vor allem durch eine Änderung der Zahl der postsynaptischen AMPA-Rezeptoren (Thiagarajan et al. 2007). Wird zum Beispiel über eine bestimmte Synapse frequentiert Glutamat ausgeschüttet, erhöht sich daraufhin die Anzahl der AMPA-Rezeptoren an der Postsynapse (Farrow et al. 2015). Dies vereinfacht die Übertragung von Informationen

in dieser Synapse (Farrow et al. 2015, Jacobi und von Engelhardt 2021). Es konnte gezeigt werden, dass GluA1-enthaltende Rezeptoren aktivitätsabhängig während LTP in die Synapsen eingefügt werden (Greger und Esteban 2007). Ebenso trägt eine Änderung der Phosphorylierung der GluA1-Untereinheit der Rezeptoren und eine damit einhergehende Änderung der Leitfähigkeit zur Langzeitplastizität bei (Park 2018, Diaz-Alonso und Nicoll 2021). Schließlich spielt die Phosphorylierung auxiliärer Proteine wie zum Beispiel TARP γ -8 und die damit verbundene Änderung der lateralen Mobilität der AMPA-Rezeptoren ebenfalls eine Rolle für die Ausbildung der Langzeitplastizität (Opazo et al. 2010).

2.5 Hirnregionen

Die Messungen dieser Studie erfolgten in zwei verschiedenen Hirnregionen: im Gyrus dentatus des Hippocampus und im Corpus striatum der Basalganglien. Farrow et al. wiesen 2015 mit der Durchführung einer In-Situ-Hybridisierung (s. Abbildung 2) die starke Expression von CKAMP59 unter anderem in diesen Hirnregionen nach. Beide Regionen sind wichtige Strukturen exekutiver Funktionen des Gehirns und spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie zum Beispiel dem Morbus Alzheimer. Auf die Anatomie und Funktion der beiden Regionen wird im Folgenden näher eingegangen.

2.5.1 Der Hippocampus

Die Hippocampusformation (Formatio hippocampi) gehört mit ihren Strukturen zum limbischen System und ist dabei maßgeblich an der Gedächtnisbildung sowie dem Lernen und räumlichen Denken beteiligt (Scoville und Milner 1957, Giap et al. 2000, Olsen et al. 2012, Strange et al. 2014, Kesner und Rolls 2015, Palacios-Filardo und Mellor 2019). Sie besteht aus Gyrus dentatus, Cornu ammonis (auch Ammonshorn genannt) und Subiculum und befindet sich im medialen kaudalen Anteil des Temporallappens im sogenannten Archicortex („ältester Cortex“). Die Hippocampusformation ist paarig in beiden Hemisphären angelegt. Das Cornu ammonis selbst kann weiter in drei Regionen unterteilt werden: CA1, CA2 und CA3.

Diese Unterteilung erfolgt anhand der unterschiedlichen Dichte und Größe der Pyramidenzellen. So enthält die CA1-Region viele kleine Pyramidenzellen und die CA2-Region sehr große, dicht gepackte Pyramidenzellen. In der CA3-Region sind die Pyramidenzellen ähnlich groß wie in der CA2-Region nur sehr locker angeordnet (Trepel 2015). Im Vergleich zum sechsschichtigen Neokortex besteht der zum Archicortex zählende Hippocampus aus drei bis vier Schichten. Diese werden in den Regionen des Cornu ammonis von außen nach innen wie folgt bezeichnet: Stratum moleculare, Stratum radiatum, Stratum pyramidale und Stratum oriens. Dem Subiculum fehlt das Stratum radiatum. Der Gyrus dentatus (engl. Dentate gyrus, kurz DG) besteht aus den Schichten Stratum moleculare, Stratum granulosum und Stratum plexiforme (Giap et al. 2000, Bartsch und Wulff 2015).

Der Hippocampus erhält den Hauptteil seiner kortikalen Informationen vom entorhinalen Kortex. Die Verbindungen zwischen entorhinalem Kortex und Hippocampus ist topographisch angelegt, d.h. bestimmte Kortexschichten des entorhinalen Kortex besitzen spezifische Leitungsbahnen, über die sie Kontakt zu bestimmten Subregionen des Hippocampus aufnehmen. Die Neuronen der zweiten Schicht des entorhinalen Kortex senden ihre Informationen über den Tractus perforans (engl. perforant path) zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus, sowie zu den Pyramidenzellen von CA2 und CA3. Der Tractus perforans kann in einen lateralen (LPP) und einen medialen (MPP) Anteil unterschieden werden, je nachdem ob der Ursprung der Fasern im lateralen oder medialen Teil des entorhinalen Kortex liegt. Die dritte Schicht des entorhinalen Kortex projiziert außerdem über den temporo-ammonischen Signalweg zur CA1-Region und zum Subiculum.

Den Hippocampus und seinen Schaltkreis passiert im Gegensatz zu vielen anderen kortikalen Strukturen der Hauptanteil der Informationen nur unidirektional (Amaral et al. 2007, Stepan et al. 2015). Der bekannte „Trisynaptic circuit“ des Hippocampus beschreibt vereinfacht einen Schaltkreis über drei exzitatorische glutamaterge Synapsen innerhalb des Hippocampus, welcher der Informationsweitergabe innerhalb des Hippocampus dient. Er projiziert von Schicht II des entorhinalen Kortex zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus, über die Moosfasern zu den Pyramidenzellen der CA3-Region und von dort über die Schaffer-Kollateralen zu den Pyramidenzellen der CA1-Region. Von dort gelangen Informationen zurück zu den tiefer gelegenen Schichten des entorhinalen Kortex. Der trisynaptische Kreislauf stellt neben weiteren

Schaltkreisen im Hippocampus den Hauptfluss der Informationen durch ihn hindurch dar (Toni und Schinder 2015). Weitere Verbindungen des Hippocampus bestehen unter anderem auch zu Amygdala, Hypothalamus sowie zum kontralateralen Hippocampus (Stepan et al. 2015). Walling und Harely zeigten 2004 außerdem, dass eine Aktivierung des Locus coeruleus eine Langzeitpotenzierung an Synapsen des Tractus perforans auslösen kann.

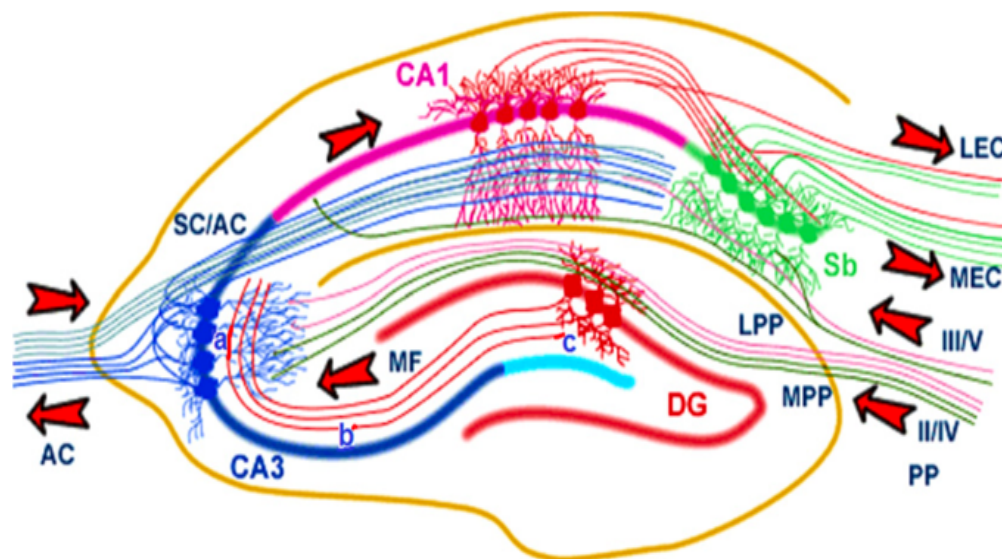


Abbildung 3: Schematische Darstellung der hippocampalen Verbindungen nach „Role of the hippocampus in mediating interference as measured by pattern separation processes“ Behavioural Processes 93, Seite 149 (Kesner 2013). Medialer entorhinaler Cortex (MEC) und lateraler entorhinaler Cortex (LEC) sowie lateraler Tractus perforans (LPP) und medialer Tractus perforans (MPP).

Der Gyrus dentatus ist eine V-förmige Struktur des Hippocampus. Die Körnerzellschicht besteht zum größten Teil aus den dicht gepackten Körnerzellen. Er enthält als einer der wenigen Orte im zentralen Nervensystem Stammzellen, die auch noch im adulten Gehirn zur Neurogenese fähig sind. So können aus der subgranularen Zone des Gyrus dentatus noch junge Körnerzellen generiert werden (Toni und Schinder 2015, Kesner 2018, Abbott und Nigussie 2020). Die adulte Neurogenese im Gehirn eines Nagetiers wurde erstmals 1965 von Altman und Das beschrieben (Kempermann et al. 2015). Der Prozess der Neurogenese kann durch erhöhten Stress beeinträchtigt und durch gute Umwelteinflüsse sowie körperliche Aktivität verbessert werden (Anacker et al. 2018, Doan et al. 2019).

Der Hippocampus spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Manifestation verschiedener Krankheiten (Bartsch und Wulff 2015). Zum Beispiel scheinen bei Patienten mit Epilepsie die elektrophysiologischen Eigenschaften der Körnerzellen des Gyrus dentatus verändert zu sein (Dietrich et al. 1999). Und auch bei Patienten mit Schizophrenie zeigen sich Veränderungen im Hippocampus (Gothelf et al. 2000). Daher ist der Hippocampus das Objekt vieler Studien und auch in dieser Studie von großer Bedeutung.

2.5.2 Das Corpus striatum

Das Corpus striatum (kurz auch Striatum genannt) ist ein Teil der Basalganglien und gehört damit zum Telencephalon. Seine charakteristische gestreifte Form erhält es in der embryonalen Entwicklung durch das Trennen von Putamen und Nucleus caudatus durch das Durchwachsen der Capsula interna. Danach sind die beiden nur noch über dünne Streifen grauer Substanz miteinander verbunden. Zusammen bilden diese beiden Einheiten das Corpus striatum. Als Teil des extrapyramidalen Systems hat es einen hohen Stellenwert in der Kontrolle und Initiation von Bewegungsabläufen. Außerdem spielt es noch eine zentrale Rolle bei prozeduralem Gedächtnis und Erinnerung sowie Motivation und Emotion (Calabresi et al. 2000, Kreitzer und Malenka 2008). Seine Afferenzen erhält das Striatum vom zerebralen Kortex, Thalamus und den Kernen der Substantia nigra. Das Striatum enthält zwei Sorten von Neuronen: Interneurone und Projektionsneurone. Letztere werden auch "medium-sized spiny neurons" oder Stachelneurone genannt, aufgrund ihrer dornenartigen Fortsätze. Sie machen um die 90% der Neurone im Striatum aus (Prager und Plotkin 2019). Sie sind GABAerge inhibitorische Neurone und erhalten exzitatorische glutamaterge Signale vom Kortex (Fazi und Fleisher 2018). Über den Tractus nigrostriatalis erhalten die Projektionsneurone von der Pars compacta der Substantia nigra auch dopaminerge exzitatorische Signale. Hier unterscheiden sich je nachdem, welche Rezeptoren die Neurone ausbilden, D1 oder D2, der indirekte vom direkten Signalweg. Der direkte Signalweg beschreibt die Projektion zur Pars reticulata der Substantia nigra und zur Pars interna des Globus pallidus. Die Neurone dieses Signalwegs exprimieren vorwiegend D1-Rezeptoren sowie Substanz P. Er wirkt über eine Disinhibition zu einer Aktivierung des Thalamus und Kortex und ist somit fördernd für die Bewegung. Der indirekte Signalweg beschreibt die Projektion zur Pars externa vom Globus pallidus.

Seine Neurone exprimieren vorwiegend D2-Rezeptoren und Enkephalin. Dieser Signalweg führt zur Hemmung der Bewegung (Cepeda et al. 2008, Prager und Plotkin 2019). Die Interneurone bilden den Rest der im Striatum vorhandenen Neurone.

Im homogen aussehenden Striatum kann man immunhistochemisch zwei anatomische Untereinheiten voneinander unterscheiden. Die sogenannten Striosomen sind Bereiche, denen eine schwache Aktivität der Acetylcholinesterase sowie eine starke Immunreaktivität gegen Enkephalin, Substanz P, GABA und Neurotensin zu eigen ist. Die Matrix zeigt hingegen eine starke Aktivität der Acetylcholinesterase und eine Immunreaktivität gegen Parvalbumin und Calbindin. Die Dendriten der Striosomen und Matrix bleiben stets in ihren anatomischen Bereichen und haben unterschiedliche Input- und Output-Muster (Fazi und Fleisher 2018, Prager und Plotkin 2019).

Das Striatum spielt eine zentrale Rolle in der Krankheitsentwicklung von Bewegungsstörungen wie zum Beispiel dem Morbus Parkinson und der Chorea Huntington (Kreitzer und Malenka 2008). So könnte eine Veränderung in der Funktion des AMPA-Rezeptors und/oder seiner auxiliären Untereinheiten einen Effekt auf die Entstehung solcher Krankheiten haben.

2.6 Ziel der Studie

AMPA-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei synaptischer Plastizität. Ihre Anzahl, Untereinheiten-Komposition und biophysikalischen Eigenschaften haben einen großen Einfluss auf die Stärke neuronaler Verbindungen (Diering und Hugarir 2018). All diese Eigenschaften können, wie in Kapitel 2.3 bereits beschrieben, von auxiliären Proteinen moduliert werden, weshalb diese eine große Rolle bei der Ausbildung neuronaler Verbindungen und deren Stärke spielen.

Da bisher nur sehr wenig über den Einfluss von CKAMP59 auf die synaptische Funktion im Gehirn bekannt ist, ist es das Ziel dieser Studie, mit Hilfe elektrophysiologischer Verfahren den Einfluss von CKAMP59 auf die Funktion des AMPA-Rezeptors weiter zu beleuchten.

Hierfür fanden die Messungen hauptsächlich im Gyrus dentatus des Hippocampus als Zentrum des Gedächtnisses und Lernens sowie im Striatum statt, da bisher noch nichts über die Funktion des Proteins in diesen beiden Hirnregionen bekannt ist.

Es wurde der Einfluss des CKAMP59 Knockouts auf die mEPSCs, die AMPA/NMDA-Ratio und Paired-Pulse-Ratio und somit auf Kurzzeitplastizität und die Langzeitpotenzierung vor allem im Gyrus dentatus betrachtet.

- Mit der Messung von mEPSCs sollte der Einfluss von CKAMP59 auf die Synapsenstärke unter Ruhebedingungen untersucht werden. Lu et al. konnten erst kürzlich zeigen, dass CKAMP59 auch ein auxiliäres Protein von GABA-Rezeptoren zu sein scheint. Dies wirft die Frage auf, ob und wenn ja wie genau CKAMP59 AMPAR-Ströme moduliert. Da CKAMP59 in den Körnerzellen des Gyrus dentatus hoch exprimiert wird, habe ich seine Funktion in diesen Zellen analysiert.
- Änderungen der mEPSC Frequenz und Amplitude können auch immer präsynaptische Ursachen haben. Demnach analysierte ich zusätzlich auch AMPA/NMDA-Ratios, bei der die Amplitude der AMPAR-Ströme auf die der NMDAR-Ströme normalisiert wurde.
- Zur zusätzlichen Kontrolle von (kompensatorischen) Änderungen präsynaptischer Funktionen führte ich eine Paired-Pulse-Ratio-Analyse durch. Diese gibt Aufschlüsse über Änderungen der Freisetzungswahrscheinlichkeit präsynaptischer Transmittervesikel.
- Der Einfluss auf die Zahl der AMPA-Rezeptoren auf HEK293-Zellen (Reduktion) und die Reduktion von LTP in CKAMP59 Knockout-Mäusen erlaubt noch keine konklusive Aussage über den Einfluss von CKAMP59 auf die Zahl der AMPA-Rezeptoren in Synapsen. Die Lu Publikation deutet zusätzlich darauf hin, dass CKAMP59 möglicherweise kein AMPA-Rezeptor auxiliäres Protein ist. Daher analysierte ich LTP in Körnerzellen.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

In dieser Studie wurden Wildtyp- und Knockout-Mäuse der CKAMP59-Linie (C57BL/6N Shisa7^{tm1a(KOMP)^{wtsi}}) im Alter von 28 bis 35 Tagen untersucht.

Alle Versuche wurden entsprechend den Vorgaben und Gesetzen des Bundeslandes Rheinland-Pfalz durchgeführt. Des Weiteren wurden die ARRIVE-Leitlinien (Percie du Sert et al. 2020) für die Durchführung und Dokumentation von Tierversuchen eingehalten.

Gezüchtet und gehalten wurden die Tiere im „Translational Animal Research Center“ (TARC) der Universitätsmedizin Mainz. Sie wurden dort in Standardkäfigen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser sowie Rückzugsmöglichkeiten in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Raumtemperatur lag kontinuierlich um die 22-24 °C und die Luftfeuchtigkeit bei 55 ± 10%. Geschulte Tierpfleger kümmerten sich regelmäßig um das Wohlergehen der Tiere. Am Versuchstag wurden die Tiere durch den internen Transportdienst in das Institut für Pathophysiologie gebracht.

3.1.1 Das „Knockout-first“-Prinzip

Der Knockout des Gens erfolgte nach dem „Knockout first“-Prinzip. Abbildung 3 zeigt schematisch die Herstellung eines solchen Knockouts. Das „Knockout-first“-Allel (tm1a) enthält in dem Intron des betreffenden Gens eine LacZ- und eine gefloخته Promotor-gesteuerte Neomycin-Resistenz-Kassette, welche die Funktion des Gens stören. Ebenso vorhanden sind die Erkennungssequenzen loxP der Cre-Rekombinase und FRT der Rekombinase Flippase. Die Flippase konvertiert das „Knockout-first“-Allel zu einem konditionierten Allel (tm1c) mit wiederhergestellter Genfunktion, während die Cre-Rekombinase die Neomycin-Kassette aus dem Allel löscht (tm1b) oder aus dem tm1c-Allel das gefloخته Exon entfernt und somit eine Frame-Shift-Mutation mit funktionellem Knockout des Proteins verursacht (Skarnes et al. 2011).

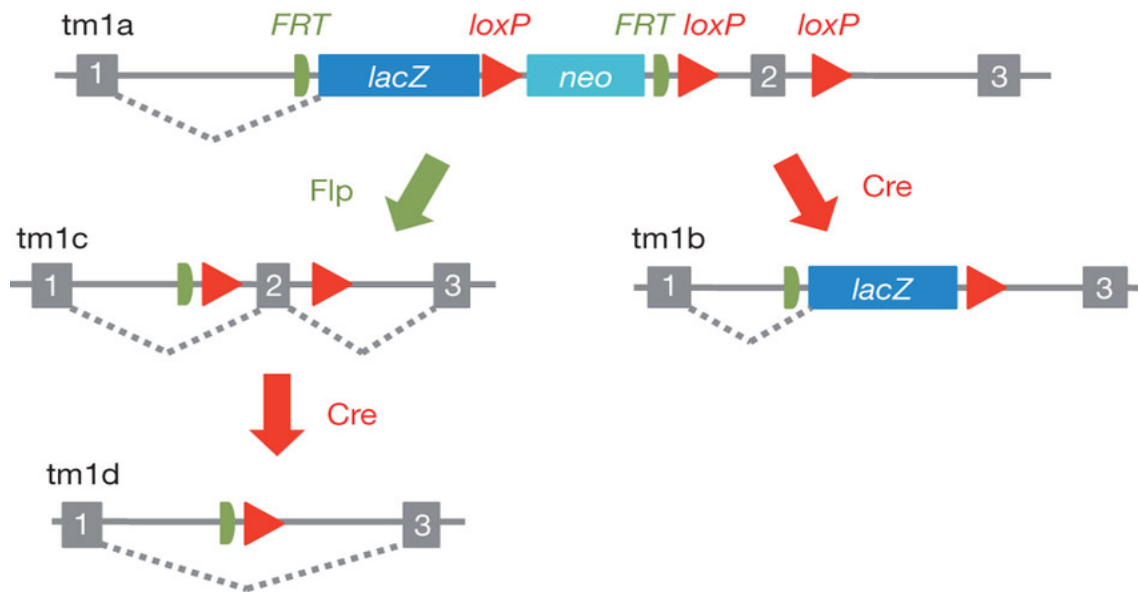


Abbildung 4: Schematische Darstellung des "Knockout-first"-Prinzips nach Skarnes et al. 2011

3.2 Lösungen

Alle hier verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bzw. Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) erworben. Nur das hier in der intrazellulären Lösung (Tabelle 3) verwendete Hepes wird von der Firma Roth (Roth Chemie GmbH, Karlsruhe, Deutschland) hergestellt.

3.2.1 Sucrose-Lösung

Die Sucrose-Lösung (Tabelle 1) wurde während der Tierpräparation und Schnitthanfertigung verwendet, um die Vitalität des in ihr enthaltenen Gewebes zu gewährleisten. Aufbewahrt wurde sie vor und nach der Präparation im Kühlschrank bei 4°Celsius. Vor der Präparation wurden 250 ml der Lösung mit 40 µl CaCl₂ angereichert. Um das Gewebe während der Präparation zu kühlen, wurde die Lösung mit flüssigem Stickstoff gekühlt und ein Eis-/Flüssigkeitsgemisch hergestellt. So kann eine Temperatur der Sucrose-Lösung von 0-4°C während der Präparation der Hirnschnitte gewährleistet werden. Danach wurde die Lösung circa 15 Minuten vor der Präparation mit Carbogen (95%O₂/5%CO₂) begast, um einen optimalen pH um 7,2 zu erreichen und die Lösung mit O₂ zur Versorgung der Zellen anzureichern. Mittels Lagerung auf Eis wurde sie danach weiter kontinuierlich gekühlt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Sucrose-Ringer

Chemikalie	Konzentration (mmol/l)
Glucose	10
NaHCO ₃	26
MgCl ₂	7
NaH ₂ PO ₄	1.25
KCl	3
Sucrose	212

3.2.2 Extrazelluläre Lösung

Die akuten Gehirnschnitte wurden nach der Präparation in Ringer-Lösung (Tabelle 2) aufbewahrt. Diese extrazelluläre Lösung wurde auch während der Durchführung der elektrophysiologischen Messungen zur kontinuierlichen Perfusion der Messkammer genutzt. Eine Stocklösung ohne Glucose, CaCl₂ und MgCl₂ wurde bei Raumtemperatur gelagert und unmittelbar vor dem Experiment wurden die genannten Stoffe hinzugegeben. Während der Zugabe der Stoffe wurde die Lösung kontinuierlich mittels eines Magnetrührers vermischt. Anschließend wurde sie ebenfalls für circa 15 Minuten mit Carbogen begast. Die vollständige Lösung wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und nach wenigen Tagen verworfen.

Tabelle 2: Zusammensetzung der extrazellulären Ringer-Lösung

Chemikalie	Konzentration (mmol/l)
NaCl	125
NaHCO ₃	25
KCl	2.5
NaH ₂ PO ₄	1.25
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1
Glucose	25

3.2.3 Intrazelluläre Lösung

Als intrazelluläre Lösung in der Patch-Pipette kam untenstehende Lösung (Tabelle 3) zum Einsatz. Die Lösung enthält unter anderem ATP, GTP und Phosphocreatin als Energielieferanten und Substrate für die Phosphorylierung von Proteinen in der Zelle. Aufbewahrt wurden Aliquotes der intrazellulären Lösung bei -18°C .

Tabelle 3: Zusammensetzung der intrazellulären Lösung

Chemikalie	Konzentration (mmol/l)
CS-Methanesulfon	120
CsCl	10
Hepes	10
Phosphocreatin	10
EGTA	0.2
ATP-Mg-Salt	2
NaCl	8
GTP	0.3
pH (CsOH)	7.3
Osmolalität	295 mOsm

3.2.4 Chemikalien

Bei allen durchgeführten Experimenten wurden der extrazellulären Lösung der selektive allosterische Antagonist Gabazin (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland) hinzugefügt, um die inhibitorischen GABA_A-Ströme zu blockieren.

Bei der Messung minimaler exzitatorischer postsynaptischer Ströme (mEPSCs) wurden der extrazellulären Lösung zusätzlich Tetrodotoxin (TTX, Biotrend) zur Blockierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle sowie 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (APV, Biotrend) zur selektiven Blockierung der NMDA-Ströme beigefügt.

Die Blockierung der GABA_A- und NMDA-Rezeptoren ermöglicht die isolierte Analyse von AMPAR-vermittelten Strömen. Die Blockierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen verhindert die Entstehung von Aktionspotentialen. Damit kann es nicht zu einer durch ein Aktionspotential ausgelösten zeitgleichen Fusion mehrerer Transmitter-Vesikeln mit der präsynaptischen Membran kommen. Ein mEPSC ist demnach ein Strom, der durch Freisetzung des Glutamats eines Vesikels in einer einzelnen Synapse und der damit zusammenhängenden Öffnung postsynaptischer

AMPA-Rezeptoren zustande kommt. Die Messung der mEPSCs dient demnach der Analyse der Funktion einzelner Synapsen.

Für alle Messungen wurden der extrazellulären Lösung Stocklösungen der oben genannten Inhibitoren zugesetzt, um die in Tabelle 4 genannten Konzentrationen zu erhalten. Alle Chemikalien wurden bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und innerhalb von wenigen Tagen nach Anbruch und Aufbewahrung im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ verworfen.

Tabelle 4: Konzentrationsangaben der Chemikalien

Chemikalie	Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)
Gabazin	10
APV	50
TTX	1

3.3 Genotypisierung

Die Genotypen der Mäuse wurden aus Gewebeproben (Schwanzspitzen) mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) spezifisch für die möglichen Genotypen und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte bestimmt. Dazu wurde den Tieren nach der Geburt die Schwanzspitze durch einen geschulten Mitarbeiter des Translational Animal Research Center, Mainz (TARC) entnommen und bereitgestellt. Diese Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Zuerst erfolgte die Lyse des Gewebes mit Hilfe von $200\ \mu\text{l}$ NaOH (50mM) bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für maximal 30 Minuten auf dem Heizblock. Danach wurden $50\ \mu\text{l}$ Tris-HCl (1M , $\text{pH } 8,0$) hinzugegeben, um die Lyse zu stoppen. Für die PCR wurde ein Mastermix bestehend aus H_2O , MgCl_2 und Taq-Polymerase nach Schema angesetzt und die in Tabelle 5 aufgelisteten Primer als Paare (1+2, 2+3) hinzu pipettiert. Alle Proben sowie alle weiteren Substrate, insbesondere die Taq-Polymerase, wurden während der Vorbereitung auf Eis gekühlt.

Tabelle 5: Auflistung der PCR-Primer

CK59-1	GATTCATCCTCAACCACGATCC
CK59-2	GACCTAGGATTCAGACCCCAACC
CK59-3	GGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCG

Auf dem Eis wurden danach jeweils 1 µl DNA-Lysat zu 20 µl Mastermix pipettiert. Nach Zentrifugation (Galaxy Mini-Star, Avantor/VWR, Deutschland) wurde die PCR im Mastercycler nexus GX2 (Eppendorf flexid, Hamburg) nach dem in Tabelle 6 aufgeführten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 6: PCR-Protokoll

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
94	2 min	
94	30 s	x 3
64	30 s	
72	2 min	
94	30 s	x 5
60	30 s	
72	2 min	
94	30 s	x 35
57	30 s	
72	2 min	
72	10 min	
10	Soak	

Erwartete Resultate:

581 bp (KO)
251 bp (WT)

Nach der PCR wurden 2 µl Loading Buffer zu jeder Probe zugegeben, welcher die DNA denaturiert und linearisiert. Dieser Buffer enthält außerdem den Farbstoff Ethidiumbromid, welches in der DNA interkaliert und sie bei Anregung unter UV-Licht durch Leuchten sichtbar macht.

Nach der Zugabe des Loading Buffers wurden jeweils 10 µl pro Probe in die Geltaschen des Agarosegels aufgetragen. Zur genauen Bestimmung des Genotyps und Ausschließen einer Verunreinigung der Proben liefen außer der zu bestimmenden Gewebeproben zusätzlich eine bekannte Wildtypprobe (+/+), eine Heterozygotenprobe (+/d), eine Knockout-Probe (d/d) und eine Negativkontrolle (nur Mastermix, ohne DNA) in der PCR und Elektrophorese mit. Am Anfang und am Ende der Reihe wurden jeweils 100 µl Marker aufgetragen.

Die Elektrophorese lief auf einem 2%igen Agarosegel für circa 30 Minuten bei 160 V in der Elektrophoresekammer (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland). Danach wurde mittels BioVision 3026 (Vilber Lourmat, Collégien, Frankreich) unter UV-Licht ein Foto des Gels aufgenommen und mit der zugehörigen Software digitalisiert und dokumentiert.



Abbildung 5: Beispiel einer Genotypisierung nach PCR mehrerer Mausschwanzspitzen. Zu Beginn und Ende der Reihe wurde der Marker aufgetragen. Darauf folgten die mit Zahlen gekennzeichneten Proben mit den jeweiligen Primerpaaren sowie die Negativkontrolle (neg.), Wildtypprobe (+/+), Heterozygotenprobe (+/d) und Knockout-Probe (d/d). Somit wurde ersichtlich, dass die Mäuse E497 und E498 dem Genotyp Wildtyp und die Maus E501 dem Genotyp Knockout zugeordnet werden konnten.

3.4 Herstellung der Hirnschnitte

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte immer nach den Vorgaben der zuständigen Behörden des Landes Rheinland-Pfalz und des Kreises Mainz-Bingen. Das Versuchstier wurde aus dem Käfig in eine kleine Kammer gesetzt, in der mit Hilfe von 0,5 ml einer 3%igen Isofluran-Lösung die Narkose eingeleitet wurde.

Nach circa 1-2 Minuten wurde durch Auslösen des Schmerzreizes am Schwanz des Tieres überprüft, ob die Anästhesie ausreichend tief war.

Sobald keine Reaktion mehr auf Schmerz ausgelöst werden konnte, wurde die Maus mit einer Schere dekapitiert und der Kopf in eine Petrischale mit gekühlter Sucrose-Lösung überführt. Dort wurde mit einer kurzen Schere vom Foramen magnum nach frontal das Schädeldach median entlang der Sutura sagittalis durchtrennt.

Es wurde der Schädel mit einer gekrümmten Pinzette eröffnet, mit einem leicht gekrümmten Spatel das Gehirn entnommen und in eine weitere Petrischale mit gekühlter Sucrose-Lösung transferiert. In dieser funktionierte ein Filterpapier als Unterlage für die Präparation.

Für Messungen im Gyrus dentatus des Hippocampus wurden Sagittalschnitte benötigt. Hierzu wurde das Cerebellum mit einer scharfen Rasierklinge abgetrennt und die beiden Hemisphären voneinander getrennt. Zusätzlich wurde rostral der Bulbi olfactorii ein koronarer Schnitt durchgeführt und diese somit abgetrennt. Von kranial erfolgte zusätzlich ein Schnitt in einem Winkel von 10°. Das Gehirn wurde an dieser Schnittfläche mittels flüssigen Sekundenklebers (UHU, Bühl, Deutschland) auf eine Metallplatte geklebt. Diese wurde in eine kleine Wanne überführt, die im Anschluss mit kalter carbogenisierter Sucrose-Lösung gefüllt wurde, sodass das Gehirn komplett von ihr umgeben war. Die kleinere Wanne kam in eine größere Kammer umgeben von Eis, um die Lösung kühl zu halten. Mittels eines Vibrationsmikrotoms (VT1200 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden mit einer eingespannten Rasierklinge die Hirnschnitte angefertigt. Die Schnittdicke betrug hierbei 250 µm und die Vorschubgeschwindigkeit 0,08 mm/s.

Die angefertigten Schnitte der betreffenden Hirnregion wurden mit Hilfe einer Transferpipette aufgefangen und in einen speziellen Auffangbehälter verbracht, der mit stetig carbogenisierter Extrazellulär-Lösung gefüllt war. In diesem Behälter wurden die Schnitte auf einem durchlässigen Netz gelagert. Dieses gewährleistete eine umfassende Umspülung mit oxygenierter Extrazellulär-Lösung. In diesen Auffangbehältern inkubierten die Schnitte dann für 15-20 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C (Thermostatic Water Bath-WBS, Fried Electric, Haifa, Israel), um die Regeneration und Vitalität der Zellen nach Entnahme zu gewährleisten. Danach wurden die Behälter aus dem Wasserbad genommen und bei Raumtemperatur gelagert.

Für Messungen im Striatum wurden Koronarschnitte benötigt. Die Hemisphären mussten dafür nicht voneinander getrennt werden. Die weitere Vorgehensweise unterschied sich nicht von der Anfertigung der Schnitte für die Messungen im Gyrus dentatus.

3.5 Messtechnik Patch-Clamp

Zur Aufnahme der Messdaten wurde die Patch-Clamp-Technik verwendet. Diese Technik wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt und im Laufe der vergangenen Jahrzehnte perfektioniert (Colquhoun 1991). Mit ihrer Hilfe können Ströme von einzelnen Ionenkanälen bis zu Ganzzellströmen gemessen werden. Es gibt mehrere Patch-Clamp-Konfigurationen: den Cell-attached-Modus, den Inside-out-Modus, den Whole-Cell-Modus und den Outside-out-Modus. Die Whole-Cell-Konfiguration erlaubt die Analyse von Strömen oder Spannungsänderungen einer Zelle wie z.B. eines Neurons. Mit den drei anderen Modi analysiert man nur Ströme oder Spannungsänderungen des kleinen Membranflecks (patch), der an der Pipette direkt anliegt.

Gestartet wird im Cell-attached-Modus. Nähert man sich mit der Mikropipette nach Anlegen eines Überdrucks mit Hilfe von Mikromanipulatoren der Membran einer intakten Zelle steigt der Überdruck an, was darauf zurückzuführen ist, dass die Membran die Öffnung der Pipette verschließt. Dieser Teil der Membran wird „Patch“ genannt. Wenn der Druck ansteigt, wird durch Ablassen des Überdrucks und gleichzeitiges vorsichtiges Saugen an der Pipette ein Unterdruck angelegt, um einen guten Verschluss der Pipette mit der Membran zu erreichen, den sogenannten „Gigaseal“. Hiervon spricht man ab einem Widerstand von $> 1\text{G}\Omega$.

Diese Konfiguration beschreibt den Cell-attached-Modus. Hier ist die Zellmembran intakt und der Verschluss (Seal) der Pipette durch die Membran sehr fest. Das bedeutet, es kann kein Austausch zwischen Zellinnerem und dem Inneren der Pipette stattfinden. Dadurch kann zum Beispiel untersucht werden, wie Neurotransmitter auf die Kanäle wirken, jedoch kann die Zusammensetzung des Zytoplasmas nicht kontrolliert werden. Ebenso ist das Ruhemembranpotenzial der Zelle unbekannt.

Der Inside-out-Modus kann aus dem Cell-attached-Modus heraus erreicht werden, indem die Pipette von der Zelle abgezogen und damit ein Stück der Membran herausgerissen wird, ohne ihn dabei zu zerstören. Es bleibt an der Pipettenöffnung hängen und verschließt sie.

Bei der Outside-out-Konfiguration wird im Whole-Cell-Modus gestartet, dann wird die Mikropipette ebenfalls von der Zelle abgezogen wie beim Inside-out-Modus. Jedoch wird im Gegensatz dazu nun die Öffnung der Pipette mit der Außenseite der Membran nach außen verschlossen.

Beide Konfigurationen ermöglichen es, Effekte intra- bzw. extrazellulärer Einflussfaktoren auf die Ionenkanäle zu untersuchen.

In der Whole-Cell-Konfiguration wird die Membran, die in der Pipettenöffnung steckt, durch einen starken Unterdruck zerstört. Dabei vermischen sich das Zellinnere und das Innere der Pipette miteinander. Es kann also durch die Lösung in der Pipette die intrazelluläre Lösung beliebig verändert werden.

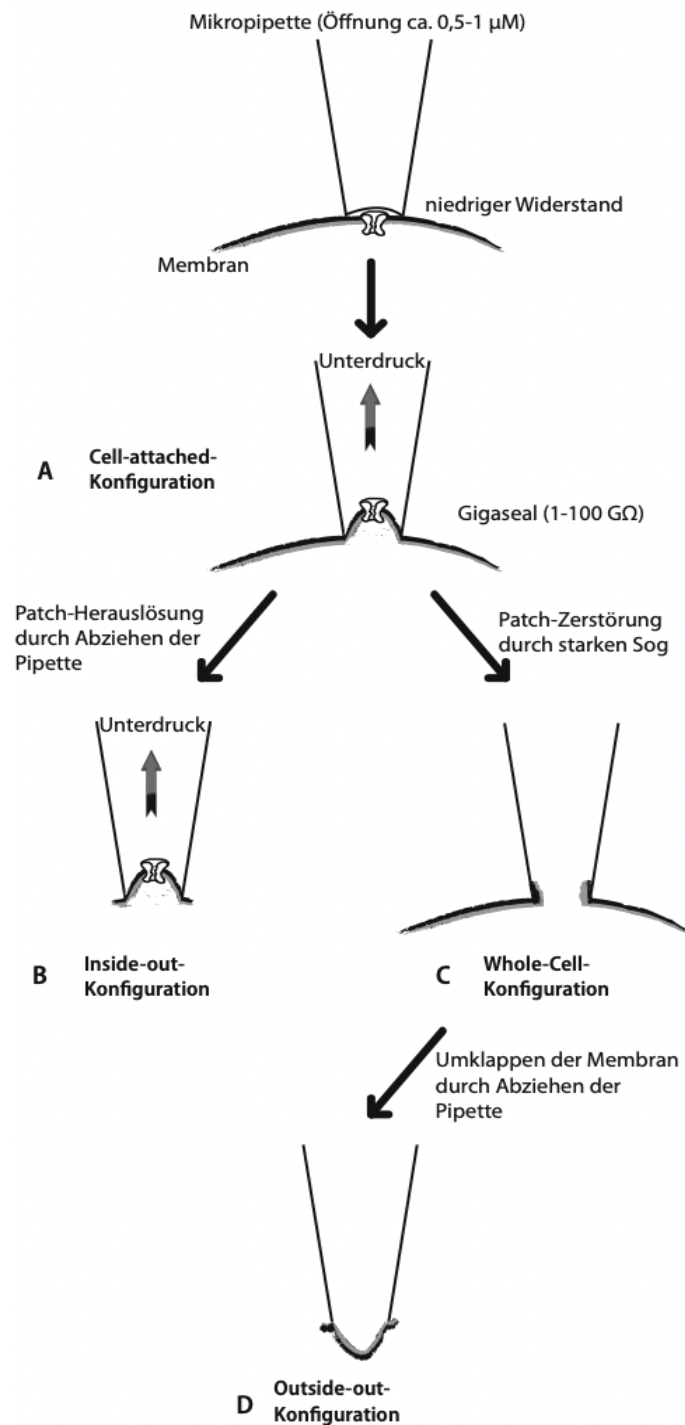


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Konfigurationen aus dem Kapitel Elektrophysiologische Methoden aus dem Buch „Der Experimentator: Neurowissenschaften“ , Seite 113 (Hervey et al. 2010). **A** Cell-attached-Konfiguration. Sie entsteht bei einem Seal zwischen Pipette und Zellmembran. **B** Inside-out-Konfiguration. Sie entsteht aus der Cell-attached-Konfiguration, wenn die Pipette von der Zelle abgezogen und damit ein Stück ihrer Membran rausgerissen wird. **C** Whole-Cell-Konfiguration. Durch Anlegen eines starken Unterdrucks in der Pipette im Cell-attached-Modus, wird die Membran, die die Pipette umschließt, zerrissen. **D** Outside-out-Konfiguration. Durch Abziehen der Pipette im Whole-Cell-Modus.

Um die Patch-Clamp-Technik bei den Messungen im Labor anzuwenden, benötigte man Mikropipetten mit einem elektrischen Widerstand von 3,2-5 M Ω , die mit Hilfe eines Pullers (Flaming/Brown Micropipette Puller P-1000-906, Sutter Instrument, USA) aus Borosilikatröhrchen hergestellt werden, sowie ein elektrophysiologisches Set-Up (Aufbau s. 3.5.1).

Gestartet wurde im Cell-attached-Modus, woraufhin man sich nach Anlegen eines Überdrucks in der Pipette mit Hilfe von Mikromanipulatoren (Luigs & Neumann, Deutschland) der Membran einer intakten Zelle näherte. Sobald eine kleine Vertiefung auf der Membran sichtbar wurde, die Pipette also der Membran sehr nahe war, wurde durch Ablassen des Überdrucks und gleichzeitiges vorsichtiges Saugen an der Pipette ein Unterdruck angelegt. Dadurch wurde ein sehr enger Kontakt von Pipette mit der Membran erreicht. Die elektrische Dichtigkeit dieses Kontakts konnte über eine Quantifizierung des Leck-Stroms bzw. des Widerstands analysiert werden. Messungen wurden nur durchgeführt bei einem Widerstand > 1G Ω , dem sogenannten „Gigaseal“. Danach erfolgte der Übergang in die Whole-Cell-Konfiguration.

Hierbei vermischten sich das Innere der Zelle mit der intrazellulären LTP 2-Lösung in der Pipette. Daraufhin wurde im „voltage-clamp“-Modus (Spannungsklemme) eine Spannung von -70 mV angelegt und die verschiedenen Messungen gestartet.

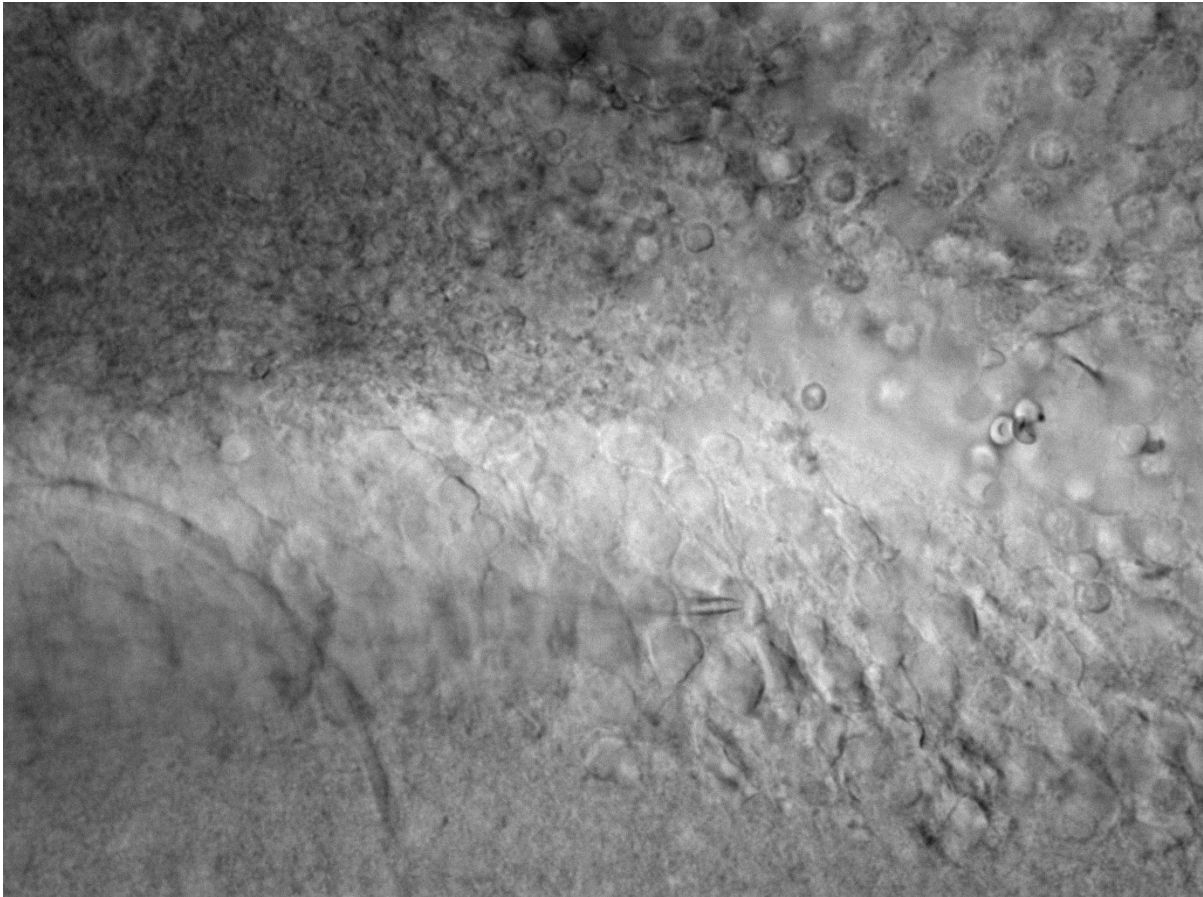


Abbildung 7: Aufnahme einer gesunden Körnerzelle im Gyrus dentatus mit aufliegender Patch-Pipette unter 40-fach-Wasserimmersionsobjektiv (Olympus).

3.5.1 Set up

Die Patch-Clamp-Messungen wurden an einem elektrophysiologischen Messstand durchgeführt, der aus folgenden Komponenten bestand:

Einem durch Druckluft schwingungsgedämpften Tisch (Newport, Irvine, USA), welcher Erschütterungen reduzieren soll, elektrischen Mikromanipulatoren (Luigs & Neumann), mit dem man mit Hilfe von Controllern (Remote Control System, Luigs & Neumann) die Patch- und Stimulationspipetten exakt zur ausgewählten Stelle im Schnitt steuern kann, sowie einem Faraday'schen Käfig, der elektrische Felder und somit Störsignale abschirmen soll. Um die gemessenen Ströme aufnehmen zu können, benötigt man einen Patch-Clamp Verstärker (EPC10, HEKA-Elektronik, Reutlingen, Deutschland).

Ein Mikroskop mit 5-fach-Übersichtsobjektiv und 40-fach-Wasserimmersionsobjektiv (Olympus, Tokio, Japan) zur Orientierung bzw. Identifikation einzelner Zellen.

Für die Messungen wurden die akuten Gehirnschnitte in eine Messkammer mit gläsernem Boden überführt und kontinuierlich mit der carbogenisierten extrazellulären Lösung mit Hilfe einer Schlauchpumpe (IP31, Watson Marlow, Cornwall, Großbritannien) umspült (2-3 ml/min). Die Hirnschnitte wurden mit Hilfe einer sogenannten „Harfe“ im Wasserbad fixiert. Diese Harfe besteht aus einem kleinen dreiseitigen Platinrahmen, auf den drei bis vier kleine Nylonfäden gespannt werden. Die Visualisierung der Gehirnschnitte und Zellen erfolgte über ein computergestütztes Kamerasystem (SciCam Pro, Scientifica, East Sussex, Großbritannien).

Die elektrische Stimulation afferenter Fasern erfolgte mittels eines Pulsgenerators (WPI, Stimulus Isolator A 365R, World Precision Instruments, Sarasota, USA) über einen chlorierten Silberdraht in einer mit extrazellulärer Lösung gefüllten Stimulationspipette. Die Patch-Pipette enthielt ebenfalls einen chlorierten Silberdraht, über den die Ströme an der Zelle gemessen und über den Verstärker aufgenommen und verstärkt werden. Ein weiterer Silberchlorid-Draht befand sich im Wasserbad als Referenzelektrode.

Die Temperatur im Wasserbad wurde über einen Temperatur-Controller (MTC-20-25D, NPI Electronic, Tamm, Deutschland) entsprechend den untenstehenden Angaben bei den jeweiligen Experimenten eingestellt.

Für die Steuerung der Stimulatoren, sowie für die Digitalisierung der unterschiedlichen Experimente wurde die Software PatchMaster (Heka) verwendet.

3.6 Miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC)

Kleine exzitatorische postsynaptische Ströme, die aufgrund einer spontanen Freisetzung von Vesikeln an der Präsynapse und nicht aufgrund eines Aktionspotentials ausgelöst werden, werden miniature excitatory postsynaptic currents genannt (mEPSCs).

Die Messungen der mEPSCs erfolgte bei einer Temperatur von $33^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und bei einem Haltepotential von -70 mV über 5 Minuten. GABA_A-Rezeptoren, NMDA-Rezeptoren und Natriumkanäle wurden mit Gabazin, APV und TTX blockiert.

Die Detektion der mEPSCs erfolgte mit Hilfe der „template matching“-Methode der ClampFit Software (MolecularDevices, San Jose, USA).

Die Analyse der Frequenz, Rise Time, Decay Time und Amplitude der mEPSCs erfolgte ebenfalls mit der ClampFit Software.

3.7 AMPA/NMDA-Ratios

Die Normalisierung der AMPA-Stromamplitude auf die NMDA-Stromamplitude (AMPA/NMDA-Ratio) erlaubt eine Abschätzung von Änderungen der AMPA-Rezeptorzahl in der Synapse. Die Messung der AMPA/NMDA-Ratio erfolgte ebenfalls bei einer Temperatur von $33 \pm 1^\circ\text{C}$, jedoch nur unter Zugabe von Gabazin zur extrazellulären Lösung.

Die Stimulationspipette wurde mit extrazellulärer Flüssigkeit gefüllt, die Spitze etwas aufgebrochen und im Tractus perforans des Gyrus dentatus platziert. Daraufhin erfolgte die Stimulation der perforant-path Synapsen. Im Whole-Cell-Modus erfolgte zuerst nach Stimulation die Messung des ausgelösten AMPAR-Stroms bei einem Haltepotential von -70 mV . Die Stimulationsstärke wurde so eingestellt, dass ein gut isolierter Strom von circa $100\text{-}150\text{ pA}$ evoziert wurde.

Danach wurde zur Messung des NMDAR-Stroms an der Zellmembran eine Spannung von $+40\text{ mV}$ angelegt. Aufgrund dieser Depolarisierung öffnen sich spannungsabhängige Natrium- und Kalium-Kanäle, die an der Zelle einen hohen Haltestrom erforderlich machen. Daher wurde circa $1\text{-}3$ Minuten vor dem Start der Messung gewartet, bis die refraktäre Phase erreicht und der Membranwiderstand der Zelle wieder hoch war.

3.8 Kurzzeitplastizität: Paired-Pulse Facilitation

Die Paired-Pulse-Ratio gibt eine Auskunft über die präsynaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit von Transmittern und die Kurzzeitplastizität von Synapsen. Wird die Präsynapse der Zelle zwei Mal kurz hintereinander mit einem gleichstarken Reiz stimuliert, so erhöht sich die Amplitude des zweiten evozierten exzitatorischen postsynaptischen Stroms (eEPSC) im Fall einer Kurzzeitfaszilitierung.

Das bedeutet, die zweite Transmitterfreisetzung wird durch die erste gebahnt. Dies ist häufig auf eine erhöhte Konzentration freier Kalzium-Ionen in der Präsynapse nach dem ersten Stimulus zurückzuführen. Ist das zweite eEPSC kleiner als das erste, spricht man von einer Kurzzeitdepression, die meist auf eine reduzierte Zahl freisetzbarer Vesikel nach einmaliger Stimulation zurückführbar ist, und in manchen Synapsen auch auf die Desensitisierung postsynaptischer Rezeptoren (Khodosevich et al. 2014)

Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von $33 \pm 1^\circ\text{C}$ und der alleinigen Zugabe von Gabazin zur extrazellulären Lösung. Bei einem Haltepotential von -70 mV wurden bei 50 Hz zwei gleichhohe Stimulations-Pulse abgegeben und die Ströme an der Zelle gemessen. Die Stimulationsstärke wurde so eingestellt, dass ein gut isolierter Strom von circa $100\text{-}150\text{ pA}$ evoziert wurde.

3.9 Langzeitplastizität: Long Term Potentiation

Die experimentelle Messung der Langzeitpotenzierung (LTP) dient der Untersuchung der Langzeitplastizität von Synapsen. Die Messungen im Gyrus dentatus erfolgten im Whole-Cell-Modus bei Raumtemperatur unter Zugabe von Gabazin zur extrazellulären Lösung. Es wurde eine zusätzliche Stimulationspipette benötigt. Die Stimulationsstärke wurde so eingestellt, dass ein gut isolierter Strom von circa $100\text{-}150\text{ pA}$ evoziert wurde.

EPSCs wurden bei einer Frequenz von $0,1\text{ Hz}$ durch die Stimulation des medialen Tractus perforans (MPP=Test Pathway) evoziert. Jeweils 500 ms nach Stimulation des MPP wurde der laterale Tractus perforans (LPP=non-induced) als Kontroll-Pathway stimuliert. Die angelegte Membranspannung lag bei -70 mV .

Die Baseline der beiden Afferenzen wurde über fünf Minuten hinweg aufgenommen. Danach wurde die Langzeitplastizität durch eine postsynaptische Depolarisation auf 0 mV für 2 Minuten und Niedrigfrequenzstimulation der MPP-Fasern (120 Pulse bei 2 Hz) induziert. Zweck der Depolarisierung der Membran auf 0 mV während der Induktion der Langzeitplastizität ist die Aufhebung des Mg-Blocks der NMDA-Rezeptoren, deren Aktivierung für synaptische Plastizität notwendig ist. Nach Induktion erfolgte eine Messung der EPSCs des induzierten und Kontroll-Pathways für weitere 30 Minuten bei -70 mV .

3.10 Statistik

Die Analyse der Messdaten und Erstellung der Beispielströme erfolgte für die mEPSCs mittels ClampFit (MolecularDevices), für AMPA/NMDA-Ratios, Paired-Pulse-Ratios sowie die LTP-Messungen wurde IgorPro (WaveMetrix, Oregon, USA) verwendet. Die Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) weiterverarbeitet.

Die statistischen Berechnungen sowie die Erstellung der Diagramme wurden mit dem Programm GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Bei unabhängigen und normalverteilten Daten wurden Gruppenvergleiche mittels T-Test durchgeführt. War diese Bedingung nicht erfüllt, wurde der Mann-Whitney Test genutzt. Als Normalitätstests für alle Daten dienten der Shapiro-Wilk Test sowie der Kolmogorov-Smirnov Test für die LTP-Messungen. Das Signifikanzlevel wurde auf $P \leq 0.05$ festgelegt, wobei ein Stern (*) ein Signifikanzlevel $\leq 0,05$, zwei Sterne (**) ein Signifikanzlevel $\leq 0,01$ und drei Sterne (***) ein Signifikanzlevel $\leq 0,001$ anzeigt. Es wurden neben dem Signifikanzniveau die Mittelwerte sowie die Standardabweichung ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 mEPSCs

Um den Einfluss von CKAMP59 auf die synaptische Funktion zu analysieren, wurden spontane exzitatorische postsynaptische Ströme, sogenannte mEPSCs, in den Körnerzellen des Gyrus dentatus und in den Stachelneuronen des Striatums von Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen aufgenommen.

Die Messungen fanden bei einem Haltepotential von -70 mV und einer Temperatur von $33 \pm 1^\circ\text{C}$ statt sowie unter der Zugabe von APV, Gabazin und TTX zur extrazellulären Lösung, um selektiv AMPAR-vermittelte Ströme zu detektieren.

Es wurden Rise Time, Decay Time, Frequenz und Amplitude der mEPSCs der beiden Genotypen miteinander verglichen.

Die Rise Time der mEPSCs war signifikant vermindert in Körnerzellen des Gyrus dentatus und in Stachelneuronen des Striatums von CKAMP59 Knockout-Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen (Gyrus dentatus WT = $0,67 \pm 0,19$; KO = $0,53 \pm 0,06$; $p = 0,0012$; Striatum WT = $0,44 \pm 0,02$; KO = $0,42 \pm 0,04$; $p = 0,0435$).

Vorarbeiten hatten gezeigt, dass CKAMP59 die Rise Time von AMPAR-vermittelten Strömen in HEK293-Zellen nicht beeinflusst (Farrow et al. 2015). Die veränderte Rise Time könnte demnach für eine Redistribution der AMPA-Rezeptoren von distalen zu proximalen Synapsen in Neuronen in Knockout-Mäusen sprechen. Kompensatorische Änderung der Expression anderer auxiliärer Proteine, die einen Einfluss auf die Rise Time ausüben, wäre eine alternative Erklärung.

Wie durch vorangegangene Messungen bereits gezeigt wurde, hat das Fehlen von CKAMP59 in den Pyramidenzellen der CA1-Region eine verminderte Decay Time zur Folge (Schmitz et al. 2017). Dies kann zum Beispiel erklärt werden durch die Interaktion des Proteins mit unterschiedlichen AMPA-Rezeptoruntereinheiten oder den Effekt anderer auxiliärer Proteine auf den Rezeptor in Abwesenheit von CKAMP59.

Die Decay Time der mEPSCs wurde durch den Knockout von CKAMP59 in den Körnerzellen des Gyrus dentatus und des Striatums nicht verändert, was gegen die oben genannten Erklärungen spricht (Gyrus dentatus WT = $4,12 \pm 0,49$; KO = $4,14 \pm 0,4$; $p = 0,7496$; Striatum WT = $3,46 \pm 0,38$; KO = $3,3 \pm 0,48$; $p = 0,2725$).

Eine Veränderung der Anzahl funktioneller Synapsen oder die erhöhte Wahrscheinlichkeit der präsynaptischen Freisetzung von Vesikeln können sich in einer Veränderung der Frequenz von mEPSCs zeigen.

Die mEPSC Frequenz war jedoch in beiden Hirnregionen durch den Knockout von CKAMP59 nicht signifikant verändert (Gyrus dentatus WT = $1,04 \pm 0,43$; KO = $1,21 \pm 0,41$; $p = 0,12$; Striatum WT = $5,52 \pm 1,22$; KO = $6,78 \pm 3,15$; $p = 0,1968$).

Die Amplitude kann bei gleichbleibender Menge an freigesetztem Transmitter einen Hinweis auf die Anzahl der in der Postsynapse befindlichen AMPA-Rezeptoren liefern. Der Knockout zeigte in diesem Fall keine Auswirkung auf die Amplituden der mEPSCs in beiden Hirnregionen, was für eine unveränderte Anzahl von Rezeptoren an der Postsynapse spricht (Gyrus dentatus WT = $7,9 \pm 0,98$; KO = $8,41 \pm 0,91$; $p = 0,0864$; Striatum WT = $11,5 \pm 1,7$; KO = $12,1 \pm 1,8$; $p = 0,3243$).

Gyrus dentatus

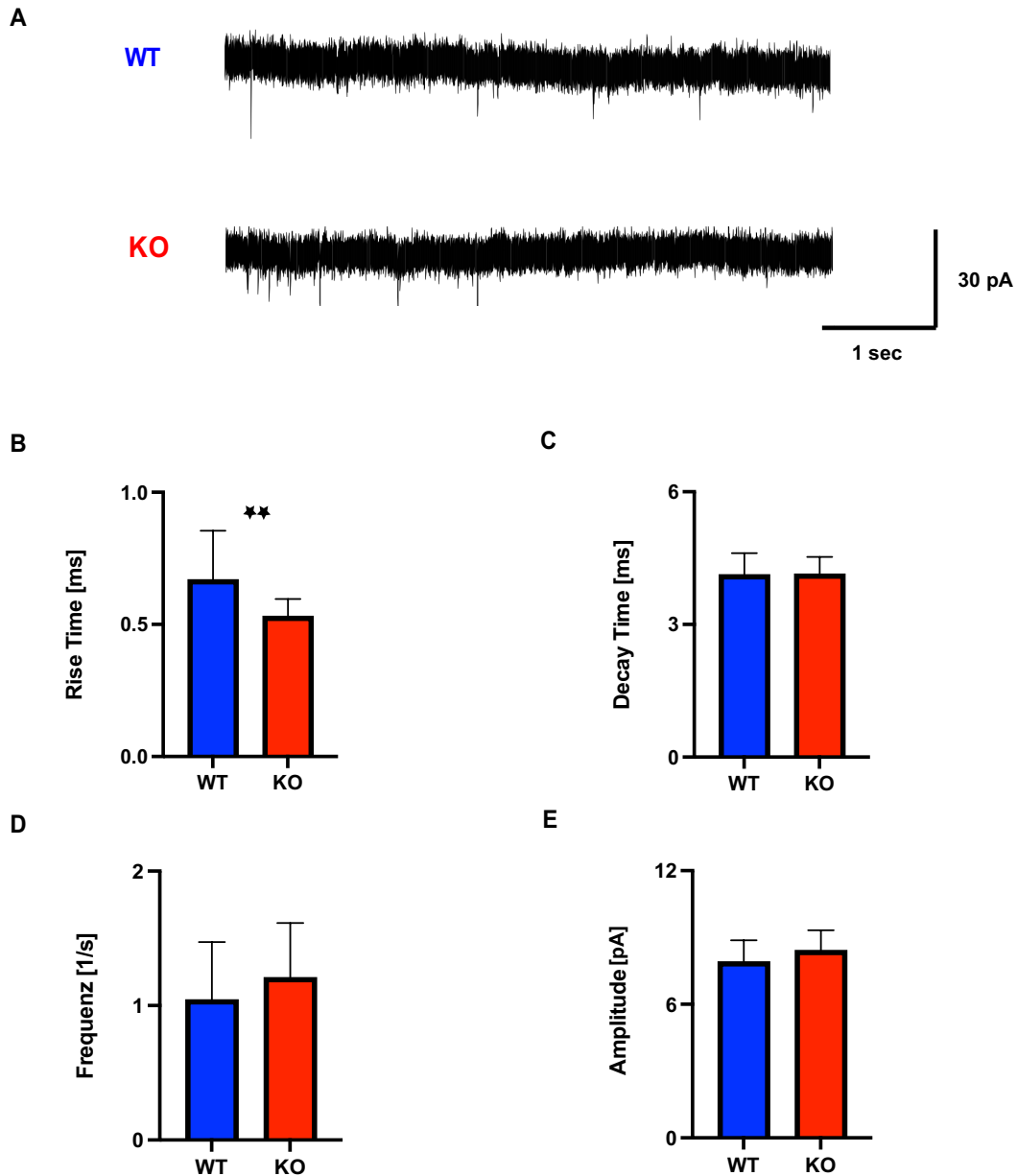


Abbildung 8: mEPSC Messungen in Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen

A Beispielaufnahmen von Wildtyp- und Knockout-Mäusen. **B** Säulendiagramm der Rise Time (Mittelwerte \pm SD). Es zeigt sich eine signifikante Veränderung in Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Mann-Whitney Test; $p = 0,0012$). **C** Säulendiagramm der Decay Time (Mittelwerte \pm SD). Der Knockout von CKAMP59 zeigt keinen Einfluss auf die Decay Time (Mann-Whitney Test; $p = 0,75$). **D** Säulendiagramm der Frequenz (Mittelwerte \pm SD). Die Frequenz der mEPSC in Knockout-Mäusen ist nicht verändert (Ungepaarter T-Test; $p = 0,12$). **E** Säulendiagramm der Amplitude (Mittelwerte \pm SD). Die Amplitude zeigt keine signifikante Veränderung zwischen den beiden Gruppen (Mann-Whitney Test; $p = 0,09$). ($n_{WT} = 38$; $n_{KO} = 29$)

Striatum

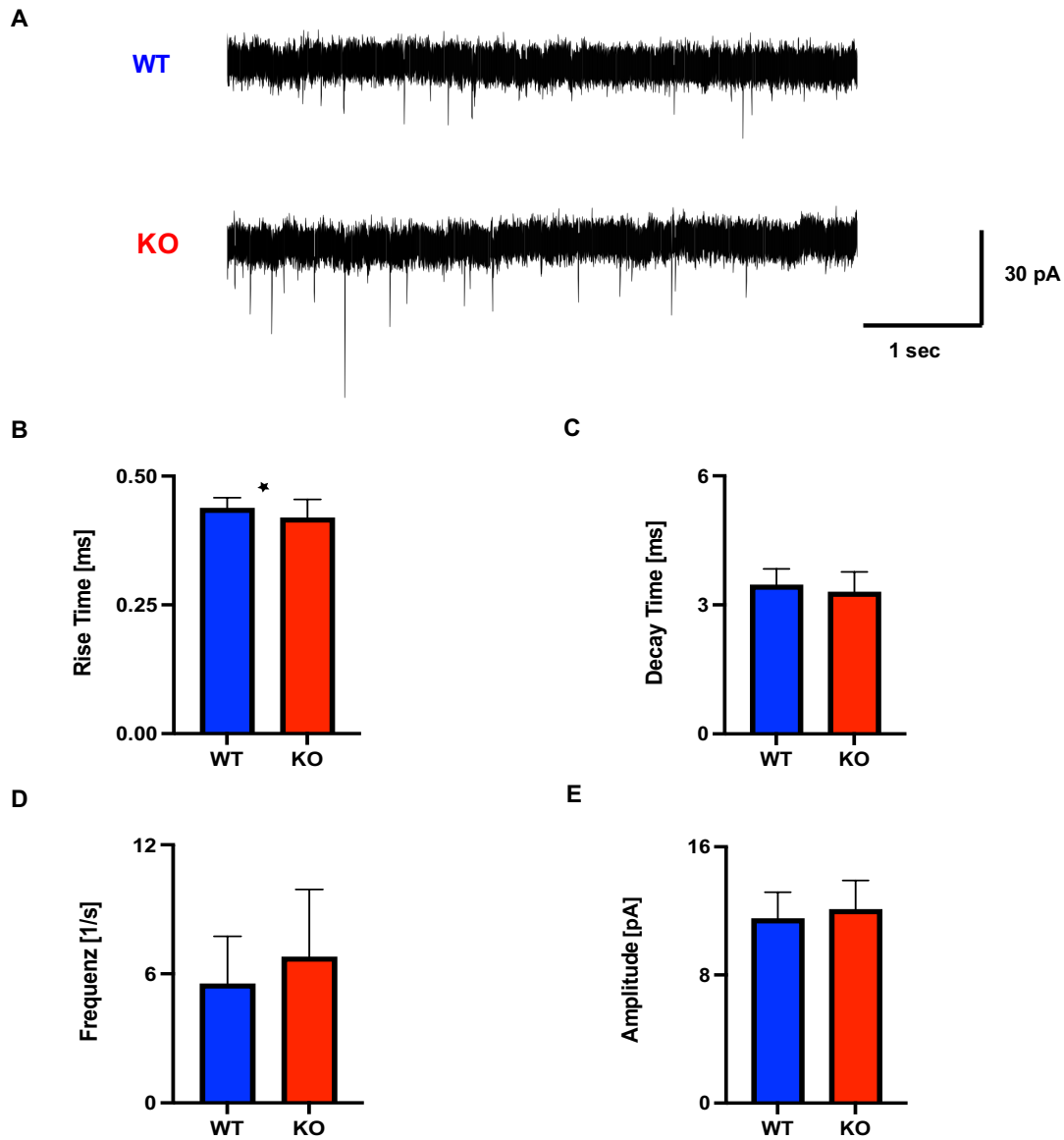


Abbildung 9: mEPSC Messungen in Projektionsneuronen des Striatums von jungen Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen

A Beispielaufnahmen von Wildtyp- und Knockout-Mäusen. **B** Säulendiagramm der Rise Time (Mittelwerte ± SD). Es zeigt sich keine signifikante Veränderung in Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Mann-Whitney Test; $p = 0,0435$). **C** Säulendiagramm der Decay Time (Mittelwerte ± SD). Der Knockout von CKAMP59 zeigt keinen Einfluss auf die Decay Time (Mann-Whitney Test; $p = 0,28$). **D** Säulendiagramm der Frequenz (Mittelwerte ± SD). Die Frequenz der mEPSC in Knockout-Mäusen ist nicht verändert (Ungepaarter T-Test; $p = 0,12$). **E** Säulendiagramm der Amplitude (Mittelwerte ± SD). Die Amplitude zeigt keine signifikante Veränderung zwischen den beiden Gruppen (Ungepaarter T-Test; $p = 0,32$). ($n_{WT} = 13$; $n_{KO} = 30$)

4.2 AMPA/NMDA-Ratios

Die Analyse der AMPA/NMDA-Ratio ist eine Untersuchungsmethode, mit der Informationen über eine Änderung der Anzahl von AMPA-Rezeptoren in den Synapsen einer Zelle ermittelt wird. Da die Amplitude der AMPAR-vermittelten Ströme mit der Stimulationsstärke und damit der Anzahl der aktivierten Synapsen variiert, wird sie auf die Amplitude der NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme normalisiert. Eine Erhöhung der AMPA/NMDA-Ratio würde für eine erhöhte Anzahl von AMPA-Rezeptoren sprechen und umgekehrt. Diese Schlussfolgerung trifft natürlich nur zu, wenn sich die Zahl der synaptischen NMDA-Rezeptoren durch die Manipulation nicht ändert.

Die Aufnahme der AMPAR-vermittelten Strömen erfolgte bei einem Haltepotential von -70 mV. Bei diesem Potential sind NMDA-Rezeptoren durch Magnesium-Ionen blockiert. Die Messungen der NMDA-Ströme erfolgt bei einem Haltepotential von +40 mV. Die Quantifizierung der Amplitude der NMDA-Ströme erfolgte ca. 25 Millisekunden nach dem Stimulus-Artefakt, da so eine mögliche Kontamination bei der Messung durch einen noch bestehenden AMPAR-vermittelten Strom vermieden werden kann.

Um auch hier keine GABA_A-vermittelten inhibitorischen Ströme aufzunehmen, erfolgte die Messung nach Zugabe von Gabazin zur extrazellulären Lösung.

Die Messung der Ströme wurde an den Körnerzellen des Gyrus dentatus nach Stimulation der Fasern des lateralen Tractus perforans durchgeführt.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Gyrus dentatus WT = $3,7 \pm 1,5$; KO = $3,8 \pm 1,3$; $p = 0,8237$), was gegen eine veränderte Anzahl an AMPA-Rezeptoren sprechen würde. Die basale Expression von AMPA-Rezeptoren an der Postsynapse wird demnach nicht wesentlich durch CKAMP59 verändert.

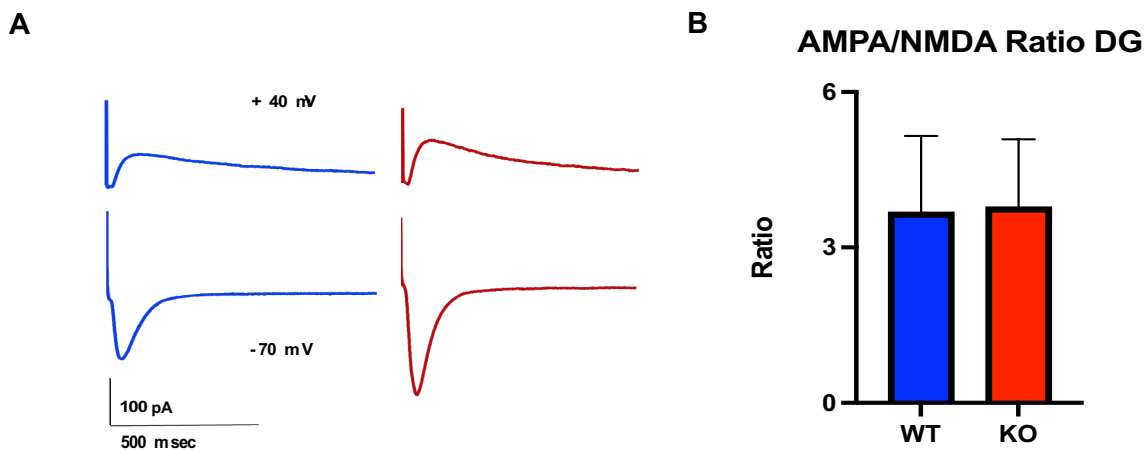


Abbildung 10: AMPA/NMDA-Messungen in den Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen

A Beispielaufnahmen von AMPA- und NMDA-Strömen der Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen. AMPAR-vermittelte Ströme wurden bei einem Haltepotenzial von -70mV abgeleitet, die NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme bei einem Haltepotenzial von +40mV.

B Säulendiagramm der AMPA/NMDA-Ratio (Mittelwerte \pm SD). Es zeigt sich keine signifikante Veränderung (Ungepaarter T-Test; $p = 0,82$). ($n_{WT} = 21$; $n_{KO} = 17$)

4.3 Kurzzeitplastizität: Paired-Pulse-Ratio

Es ist bekannt, dass auxiliäre Untereinheiten synaptische Kurzzeitplastizität durch eine Modulation der Stromeigenschaften (Desensitisierung, Deaktivierung) und der lateralen Mobilität der AMPA-Rezeptoren beeinflussen können (Rouach et al. 2005, von Engelhardt et al. 2010, Khodosevich et al. 2014). Da solch ein Effekt für CKAMP59 bisher nicht untersucht wurde, habe ich die Paired-Pulse-Ratio in Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen analysiert.

Die Messungen wurden bei einer Temperatur von $33 \pm 1^\circ\text{C}$ nach Zugabe von Gabazin zur extrazellulären Lösung bei einer Stimulation von 50 Hz und einem Interstimulus-Intervall von 20 ms aufgenommen.

Tatsächlich zeigte sich bei der Messung eine signifikante Verminderung der Paired-Pulse-Ratio in Körnerzellen von CKAMP59 Knockout-Mäusen (Gyrus dentatus WT: $1,95 \pm 0,5$; KO: $1,6 \pm 0,5$; $p = 0,0392$). Dieses Ergebnis könnte für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der präsynaptischen Freisetzung von Vesikeln in Knockout-Mäusen sprechen.

Da aber die postsynaptischen Mechanismen und insbesondere die Desensibilisierung der AMPA-Rezeptoren ebenfalls die Kurzzeitplastizität beeinflussen (Khodosevich et al. 2014), könnte es auch auf eine veränderte Desensibilisierung oder Geschwindigkeit der Erholung von der Desensibilisierung in Neuronen von CKAMP59 Knockout-Mäusen hinweisen.

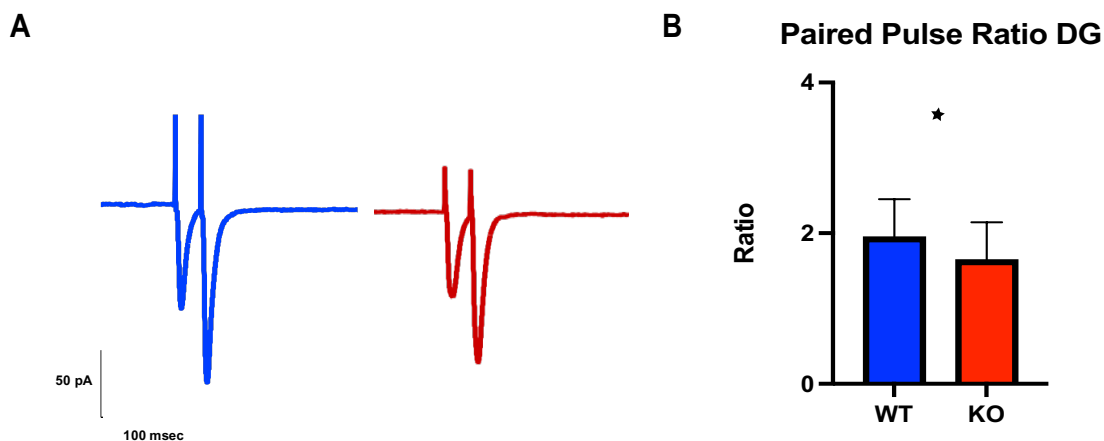


Abbildung 11: Kurzzeitplastizität in den Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen

A Beispielströme durch 50 Hz Stimulation des lateralen Tractus perforans in Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen. **B** Säulendiagramm der Paired-Pulse-Ratio (Mittelwerte \pm SD). Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der Ratio in Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Mann-Whitney Test; $p = 0,0392$). ($n_{WT} = 21$; $n_{KO} = 17$)

4.4 Langzeitpotenzierung LTP

Der Knockout von CKAMP59 reduziert in Schaffer-Kollateral-Synapsen von Pyramidenzellen der CA1-Region die Amplitude und Dauer der LTP (Schmitz et al. 2017). Meine Versuche haben gezeigt, dass CKAMP59 die Amplitude der mEPSCs und die AMPA/NMDA-Ratio in Körnerzellen des Gyrus dentatus nicht verändert, was darauf hindeutet, dass CKAMP59 in diesem Zelltyp die Zahl der AMPA-Rezeptoren unter basalen Bedingungen nicht verändert. In HEK293-Zellen wurde allerdings ein negativer Einfluss von CKAMP59 auf die Anzahl der AMPA-Rezeptoren beobachtet (Farrow et al. 2015). Das deutet darauf hin, dass CKAMP59 die Anzahl der AMPA-Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich reguliert.

Ich habe deshalb eine Messung der Langzeitpotenzierung in Körnerzellen des Gyrus dentatus durchgeführt.

Die Messung erfolgte nach Zugabe von Gabazin zur extrazellulären Lösung. Die beiden Stimulationselektroden wurden in LPP und MPP positioniert. Die Stimulation des LPP erfolgte 500 ms nach Stimulation des MPP. Die angelegte Membranspannung lag bei -70 mV.

LTP wurde durch eine postsynaptische Depolarisation auf 0 mV für 3 Minuten induziert. Es folgte eine Minute lang eine Niedrigfrequenzstimulation der MPP-Fasern (120 Pulse bei 2 Hz). Daraufhin erfolgte die Messung für weitere 30 Minuten bei -70 mV.

Die mittlere EPSP-Amplitude der Baseline der Knockout-Mäuse betrug fünf Minuten vor der Induktion $99,25 \pm 1,9$ pA. Danach stieg sie während der Messung (30 Minuten nach Induktion) auf $144,98 \pm 9,61$ pA bzw. um 46,1 % an.

Die mittlere EPSP-Amplitude der Baseline der Wildtyp-Mäuse hingegen stieg von $97,944 \pm 5,62$ pA (fünf Minuten vor Induktion) nach 30-minütigen Aufnahme nach LTP-Induktion auf $233,76 \pm 25,93$ pA und damit um ganze 138,67 % an.

Der Knockout von CKAMP59 reduzierte die LTP signifikant um 37,98 % (Baseline WT = $97,944 \pm 5,62$ pA; KO = $99,25 \pm 1,9$ pA; nach Induktion WT = $233,76 \pm 25,93$ pA; KO = $144,98 \pm 9,61$ pA; $p = 0,03$).

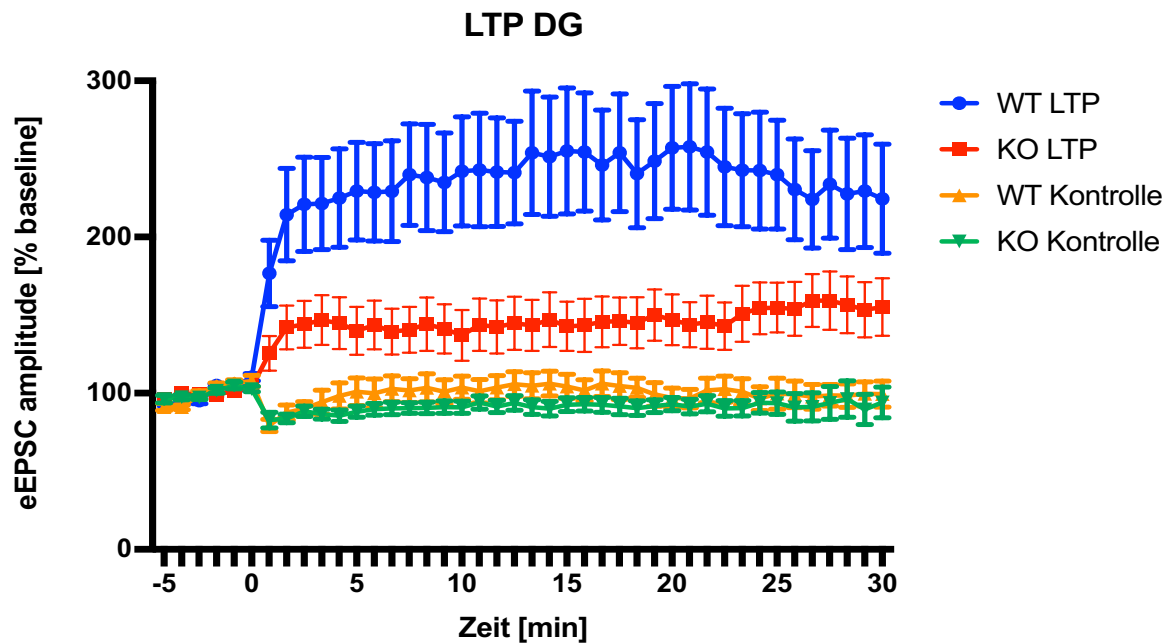


Abbildung 12: Langzeitpotenzierung in den Körnerzellen des Gyrus dentatus von Wildtyp- und CKAMP59 Knockout-Mäusen

Das Diagramm zeigt die mittlere eEPSC Amplitude in Prozent der Baseline Amplitude in Wildtyp- sowie CKAMP59 Knockout-Mäusen (Mittelwerte \pm SD). Es wurde 500 ms nach Stimulation des medialen und lateralen Tractus perforans stimuliert. Die Induktion der LTP erfolgte für zwei Minuten, danach wurden für weitere 30 Minuten die eEPSCs gemessen. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der eEPSC Amplitude in Verhältnis zur Baseline in CKAMP59 Knockout-Mäusen (Mann-Whitney Test; $p = 0,03$). ($n_{WT} = 13$; $n_{KO} = 19$)

5. Diskussion

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Modulation der glutamatergen synaptischen Übertragung durch das AMPAR-bindende Protein CKAMP59 untersucht. Mittels elektrophysiologischer Untersuchungen konnte ein geringer Einfluss von CKAMP59 auf die Kinetik AMPAR-vermittelter Ströme im Hippocampus und im Striatum unter basalen Konditionen gezeigt werden. Darüber hinaus konnten Hinweise erbracht werden, dass CKAMP59 die synaptische Plastizität im Hippocampus beeinflusst. So zeigte sich im Gyrus dentatus sowohl ein Effekt auf die Kurzzeitplastizität als auch die Langzeitplastizität.

5.1 CKAMP59 beeinflusst die Kinetik von AMPA-Rezeptoren unter basalen Konditionen nur gering

Auxiliäre Untereinheiten können die Funktion von AMPA-Rezeptoren auf unterschiedliche Weise beeinflussen. So können sie die Öffnungseigenschaften, die Komposition der Rezeptor-Untereinheiten und den Transport zur Zelloberfläche sowie die subzelluläre Lokalisation der ionotropen Glutamat-Rezeptoren modulieren (Chen et al. 1999, Schwenk et al. 2009, von Engelhardt et al. 2010, Khodosevich et al. 2014, Jacobi und von Engelhardt 2017).

Der potenzielle Effekt von CKAMP59 auf die basale synaptische Übertragung wurde in der vorliegenden Studie in den Körnerzellen des Gyrus dentatus und in den Stachelneuronen des Striatums untersucht, da in beiden Gehirnregionen eine hohe CKAMP59-Expression nachgewiesen wurde (Farrow et al. 2015).

In CKAMP59 Knockout-Mäusen zeigte sich in beiden Hirnregionen eine geminderte Rise Time der gemessenen mEPSC, wohingegen kein Effekt auf die Amplitude, Frequenz sowie die Deaktivierung der AMPAR-vermittelten Ströme gefunden wurde. Veränderungen der Rise Time können auf eine veränderte Öffnungskinetik der Rezeptoren hindeuten oder auf eine veränderte subzelluläre Lokalisation der Rezeptoren. Die spezifischen Kabeleigenschaften der Dendriten führen dazu, dass die synaptischen Signale auf ihrem Weg in das Soma gefiltert werden und somit der zeitliche Verlauf der Signale verändert wird (Kleppe und Robinson 1999, Sourdet und

Debanne 1999). Daher können Änderungen in der Kinetik von Rezeptorströmen in Whole-Cell Patch-clamp-Analysen auch auf Veränderungen der Kabeleigenschaften und der Morphologie der Dendriten beruhen oder durch eine veränderte Verteilung von AMPA-Rezeptoren bedingt sein. So kann eine beschleunigte Rise Time, wie sie hier gefunden wurde, auf eine Umverteilung von somafernen zu somanahen Synapsen hindeuten.

Passend zu der unveränderten Amplitude und Frequenz der mEPSC wurde auch keine Veränderung der AMPA/NMDA-Ratio nach Stimulation der Fasern des lateralen Tractus perforans gefunden. In der Zusammenschau deutet dies darauf hin, dass in CKAMP59-defizienten Mäusen weder die Zahl der glutamatergen Synapsen noch die Zahl an AMPA-Rezeptoren pro Synapse verändert ist. Ebenso lässt es keine veränderte Freisetzungswahrscheinlichkeit von Vesikeln in der Präsynapse vermuten.

Dieser Befund scheint überraschend, wenn man den negativen Einfluss von CKAMP59 auf AMPAR-vermittelte Ströme und die Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren in heterologen Expressionssystemen in Betracht zieht (Farrow et al. 2015).

Solche Unterschiede zwischen dem Effekt eines auxiliären AMPAR-Proteins in einem heterologen Expressionssystem und den Beobachtungen in Synapsen sind aber nicht ungewöhnlich und beruhen oftmals darauf, dass innerhalb einer Synapse viele verschiedene auxiliäre Proteine auf die AMPA-Rezeptoren wirken (Jacobi und von Engelhardt 2021). Khodosevich et al. 2014 konnten beispielsweise zeigen, dass CKAMP44 im Gyrus dentatus einen positiven Effekt auf die Amplitude von mEPSCs ausübt, während unveröffentlichte Daten des Labors zeigten, dass CKAMP44 in HEK293-Zellen die Amplitude von AMPAR-vermittelten Strömen vermindert. In der CA1-Region hat CKAMP44 kaum einen Effekt, was in diesem Fall jedoch mit der im Vergleich zum Gyrus dentatus schwachen Expression erklärt werden kann.

Die unterschiedliche Komposition aus auxiliären Untereinheiten führt jedoch dazu, dass die augenscheinliche Funktion des gleichen Proteins in unterschiedlichen Hirnregionen und Zelltypen unter basalen Konditionen bei Fehlen des Proteins sehr divers ausfallen kann. So konnten Khodosevich et al. 2014 beispielsweise für CKAMP44 in HEK293-Zellen zeigen, dass das C-terminale Ende des auxiliären Proteins für die Kontrolle des Transports zur Zelloberfläche wichtig ist. In Körnerzellen von CKAMP44 Knockout-Mäusen hatte ein Fehlen dieser Domäne aber keinen

Einfluss auf die CKAMP44-Funktion. Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich auf dem Mitwirken anderer auxiliärer Einheiten wie zum Beispiel den TARPs. In HEK293-Zellen und im Hippocampus wurden AMPAR-vermittelte Ströme gemessen, die zeigten, dass CKAMP44 zusammen mit TARP γ -8 zwar an unterschiedliche Bindestellen, aber an den gleichen AMPAR-Komplex binden und miteinander agieren können. Es hat sich ebenfalls gezeigt, dass beim Fehlen von TARP γ -8 CKAMP44 auch an AMPAR/TARP γ -2 und γ -4 Komplexe bindet.

Ähnliche Unterschiede zwischen der Zusammensetzung der auxiliären Untereinheiten könnten auch erklären, warum Schmitz et al. 2017 in Pyramidenzellen der CA1-Region von CKAMP59-defizienten Mäusen eine verkürzte Decay Time gefunden haben, der hier in den Körnerzellen des Gyrus dentatus so nicht beobachtet wurde. Eine weitere Erklärung für diese Diskrepanz könnte auch die unterschiedliche technische Durchführung der Untersuchungen sein. Vor allem die ungewöhnlich langsame Rise Time von ca. 1,5 ms für die mEPSC in der Publikation von Schmitz et al. 2017 deuten auf eine suboptimale Durchführung der Ableitungen hin. Dies könnte eventuell auch zu den Diskrepanzen bei den beobachteten Veränderungen der zeitlichen Verläufe der AMPAR-vermittelten Ströme beitragen, da hier unerwünschte Filtereffekte den Signalverlauf stark beeinflussen können.

All diese Daten lassen vermuten, dass abgesehen von der Verteilung des AMPA-Rezeptors seine Eigenschaften unter basalen Bedingungen in beiden Hirnregionen beim Fehlen von CKAMP59 unbeeinträchtigt bleiben. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass andere auxiliäre Untereinheiten wie CKAMP44 in diesen Neuronen eine übergeordnete Rolle im Transport und der Kinetik des AMPA-Rezeptors spielen. Wobei das Fehlen von CKAMP59 nicht zur kompensatorischen Hochregulation anderer auxiliärer Untereinheiten in den Pyramidenzellen der CA1-Region führt (Schmitz et al. 2017).

Der zeitliche Verlauf der Änderung der postsynaptischen Leitfähigkeit ist sehr wichtig für die neuronale Funktion und die zeitliche und räumliche Integration elektrischer Signale an den Synapsen. Deshalb unterscheidet sich die Komposition der Untereinheiten des AMPA-Rezeptors sogar innerhalb derselben Hirnregion auch unterhalb der verschiedenen Zelltypen eines Schaltkreises.

Die Rise Time und die Decay Time werden hiervon beeinflusst, was wichtig für das richtige Timing bei der Erregung von Aktionspotenzialen in der Postsynapse verschiedener Neurone ist (Jonas 2000).

5.2 CKAMP59 beeinflusst die Kurzzeitplastizität in den Körnerzellen des Gyrus dentatus

Unter Kurzzeitplastizität versteht man die zeitlich begrenzte Veränderung der synchronen synaptischen Übertragung in Abhängigkeit der zeitlich kurz vorher beobachteten oder experimentell induzierten synaptischen Aktivität. Sie wird durch prä- sowie durch postsynaptische Eigenschaften der beobachteten Synapsen beeinflusst (Zucker und Regehr 2002, Taschenberger et al. 2005, de Jong und Fioravante 2014, Dutta Roy et al. 2014). Zu den postsynaptischen Mechanismen gehören zum Beispiel die Desensibilisierung und die Erholung aus dem desensibilisierten Zustand der AMPA-Rezeptoren (Chen et al. 2002). Auf präsynaptischer Seite haben die Zahl der freisetzbaren Vesikel, die Freisetzungswahrscheinlichkeit und die Geschwindigkeit des Vesikelrecyclings einen großen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität.

Zur Analyse des Einflusses von CKAMP59 auf die Kurzzeitplastizität in den Körnerzellen des Gyrus dentatus, wurden hier Paired-Pulse-Messungen durchgeführt. Die berechnete Ratio der Amplituden nach wiederholter Stimulation mit kurzem zeitlichem Abstand erlaubt dabei eine Aussage über die Kurzzeitplastizität.

Im Gegensatz zu den von Schmitz et al. 2017 publizierten Daten in der CA1-Region scheint die Ratio bei CKAMP59-Defizienz signifikant vermindert, was auf eine geringere Fazilitation hindeutet. Wie oben beschrieben kann eine solche Veränderung präsynaptisch durch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Freisetzung von Vesikeln oder durch eine geminderte Zahl freisetzbarer Vesikel hervorgerufen werden. Da sich aber kein Effekt auf die Frequenz der mEPSCs gezeigt hat, wäre das eher unwahrscheinlich. Da aber auch die postsynaptischen Begebenheiten und Mechanismen der Desensibilisierung ebenfalls verantwortlich für die Kurzzeitplastizität sind, könnte es auch ein Hinweis auf den negativen Einfluss des Knockouts von

CKAMP59 auf die Zeit der Erholung des Rezeptors und dementsprechend eine verminderte Erregbarkeit sein (Cho et al. 2007, von Engelhardt et al. 2010). Interessanterweise war dies nach den publizierten Daten so nicht zu erwarten. Während Farrow et al. 2015 keinen Effekt von CKAMP59 auf das Desensitisierungsverhalten in heterologen Expressionssystemen gefunden haben, beschrieben Schmitz et al. 2017 eine beschleunigte Desensitierung und eine verlangsamte Erholung des desensitisierten Zustandes bei Koexpression von CKAMP59 und GluA1 in HEK-Zellen. Nach diesen Ergebnissen wäre bei CKAMP59-Defizienz eher eine schnelle Erholung desensitisierte AMPA-Rezeptoren und dementsprechend eine gesteigerte Facilitation zu erwarten gewesen.

Da sich in heterologen Systemen Unterschiede zur Desensitierung zeigen, ist es fraglich, ob die AMPA-Rezeptoren im extrasynaptischen Raum und anderer benachbarter Synapsen eine Rolle in der Kurzzeitplastizität spielen. Das sogenannte „Glutamate-Spillover“ beschreibt ein Diffundieren des Transmitters aus dem synaptischen Spalt heraus, was theoretisch zur Desensitierung der dort vorhandenen AMPA-Rezeptoren führen könnte (Asztely et al. 1997). Die Dichte der Synapsen, die Struktur des Neuropil sowie die Anzahl der Glutamattransporter beeinflussen, ob es überhaupt zu einem „Spillover“ kommen kann (Rusakov und Kullmann 1998, Marcaggi et al. 2003, Huang und Bordey 2004). Im Signalweg des Tractus perforans zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus sind die Synapsen so dicht gepackt, dass AMPA-Rezeptoren benachbarter Synapsen durch ein Übertreten des Glutamats prinzipiell desensitisiert werden können (Rusakov und Kullmann 1998). Das lässt darauf schließen, dass hier die PPR durch eine kürzliche Aktivität der AMPA-Rezeptoren benachbarter Synapsen und somit die Kurzzeitplastizität auch auf diesem Wege durch CKAMPs beeinflusst werden kann.

Um herauszufinden, ob der extrasynaptische Anteil von Rezeptoren und CKAMP59 im Gyrus dentatus wie CKAMP44 eine Rolle in der Glutamat-Affinität und somit in der Ausbildung von Kurzzeitplastizität spielt, könnten in Zukunft Outside-Out-Patch Experimente an den Körnerzellen des Gyrus dentatus durchgeführt werden.

Daneben könnte auch hier der unterschiedliche Befund in CA1 und Gyrus dentatus durch die unterschiedliche Komposition und Interaktion anderer auxiliärer Untereinheiten in den unterschiedlichen Hirnregionen erklärt werden.

5.3 CKAMP59 Knockout reduziert die Langzeitpotenzierung in den Körnerzellen des Gyrus dentatus

Man nimmt an, dass Langzeitplastizität im Hippocampus und im ganzen Gehirn eine Grundlage für Gedächtnisbildung, Lernen, Adaptierung von Verhalten und kontextuellen Angstgedächtnis bildet (Bliss und Collingridge 1993, Hayashi 2022). Verschiedene auxiliäre Untereinheiten beeinflussen neben der basalen synaptischen Transmission und der Kurzzeitplastizität auch die Langzeitpotenzierung (Schmitz et al. 2017, Abraham et al. 2019, Jeong et al. 2021). Daher erschien es interessant zu untersuchen, ob CKAMP59 in den Körnerzellen des Gyrus dentatus die Ausbildung von Langzeitplastizität beeinflusst. Dafür wurden hier durch Stimulation im medialen und lateralen Tractus perforans LTP induziert und die Veränderungen der eEPSC-Amplituden über die Zeit analysiert.

Während CKAMP44 in den Körnerzellen des Gyrus dentatus keinen Einfluss auf LTP zu haben scheint (von Engelhardt et al. 2010, Khodosevich et al. 2014), konnte hier gezeigt werden, dass das Fehlen von CKAMP59 nach Induktion der LTP konstant zu geminderten Amplituden über den gesamten Analysezeitraum führt. Dies spricht dafür, dass CKAMP59 sowohl für die Induktion als auch den Erhalt der Potenzierung von Bedeutung ist. Dies deckt sich mit der beschriebenen Reduktion des LTP in der CA1-Region von CKAMP59 Knockout-Mäusen. Zugleich zeigt es wieder, dass sich die Funktion von CKAMP59 im Vergleich zu den anderen Proteinen der CKAMP-Familie deutlich unterscheidet, da für diese bisher noch kein Effekt auf die Langzeitpotenzierung nachgewiesen werden konnte (Schmitz et al. 2017).

Die Induktionsphase von LTP ist charakterisiert durch einen Anstieg an intrazellulärem Kalzium und der Reduktion der Mobilität der AMPA-Rezeptoren innerhalb der Synapse. Letzteres führt dazu, dass mehr Rezeptoren im Bereich der aktiven Zone festgehalten werden und trägt so zur Steigerung der Amplituden nach LTP-Induktion bei. Es ist denkbar, dass CKAMP59 hier eine Rolle spielt, da es ein C-terminales intrazelluläres PDZ-Domänen-Bindungsmotiv (EVTV) besitzt über welches es mit PSD-95 interagieren kann. Dies könnte zur beschriebenen verminderten AMPAR-Mobilität innerhalb der postsynaptischen Dichte beitragen. Es scheint dabei wahrscheinlich, dass diese Interaktion stark reguliert ist, sodass unter basalen Bedingungen CKAMP59 AMPA-Rezeptoren nicht in der Synapse hält.

Posttranslationale Veränderungen von CKAMP59 während der Ausbildung von LTP könnten dann zu einer stärkeren Bindung an PDS-95 und in der Folge zu einem verstärkten Festhalten der assoziierten AMPA-Rezeptoren in der Synapse führen. Denkbar wäre zum Beispiel, dass Phosphorylierung, wie bei vielen Plastizitäts-assoziierten Proteinen, zu einer solchen Funktionsveränderung führt. Es wäre aber auch möglich, dass die posttranslationale SUMOylierung (SUMO = Small Ubiquitin-like Modifier) von CKAMP59 eine Rolle spielt, da CKAMP59 über eine entsprechende Bindungsstelle verfügen könnte, wie Sequenzanalysen in unserem Labor zeigen. Die SUMOylierung von synaptischen Proteinen spielt eine Rolle in der Regulation von aktivitätsabhängigem AMPAR-Trafficking sowie der Expression von AMPA-Rezeptoren an der Zelloberfläche. Beides ist von herausragender Bedeutung für die LTP-Ausbildung und könnte somit die Rolle von CKAMP59 für die Langzeitpotenzierung erklären (Jaafari et al. 2013).

Die reduzierte LTP könnte für eine Veränderung des extrasynaptischen Pools an AMPA-Rezeptoren sprechen, da die AMPA/NMDA-Ratio und somit die basale synaptische Übertragung unverändert geblieben ist. Ebenso könnte eine reduzierte LTP mit einem reduzierten Transport der AMPA-Rezeptoren zur Synapse beim Fehlen von CKAMP59 zusammenhängen (Schmitz et al. 2017).

Um die Funktion von CKAMP59 bei LTP in Zukunft noch genauer zu untersuchen, könnten Outside-out-Patch Experimente durchgeführt werden, um die Rolle des extrasynaptischen Pools an AMPA-Rezeptoren zu quantifizieren. Ebenfalls könnten Experimente durchgeführt werden, bei denen die Funktion des Proteins bei LTP in Abwesenheit seines PDZ-Bindungsmotivs untersucht wird, der verschiedenen Phosphorylierungsstellen oder der SUMO-Bindungsstelle.

5.4 Vergleich der potenziellen CKAMP59-Funktion mit anderen Mitgliedern der CKAMP-Familie

Wie oben beschrieben unterscheidet sich die Funktion von CKAMP59 erheblich von den anderen bekannten Mitgliedern der CKAMP-Familie: CKAMP39, CKAMP44 und CKAMP52. Aufgrund der genetischen Ähnlichkeit der CKAMP-Proteine zur größeren Gen-Familie der Shisa-Proteinen sind die Proteine auch unter folgenden alternativen

Namen bekannt: Shisa 6 (CKAMP52), Shisa 7 (CKAMP59), Shisa 8 (CKAMP39) und Shisa 9 (CKAMP44) (Farrow et al. 2015, von Engelhardt 2019).

5.4.1 Die Proteine der CKAMP-Familie beeinflussen die Kinetik der AMPA-Rezeptoren unter basalen Konditionen unterschiedlich

Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit unterscheiden sich die Proteine der CKAMP-Familie in ihrem Einfluss auf die Kinetik AMPAR-vermittelter Ströme im Hippocampus und im Striatum unter basalen Konditionen.

Im Hippocampus konnte bereits ein Effekt von CKAMP44 auf den Transport der AMPA-Rezeptoren auf die Oberfläche der Körnerzellen im Gyrus dentatus nachgewiesen werden, wo beide Proteine hochkonzentriert vorkommen (Tomita et al. 2003, Khodosevich et al. 2014). Dadurch können die beiden auxiliären Proteine die Anzahl der AMPA-Rezeptoren auf der Zelloberfläche maßgeblich beeinflussen.

Es zeigte sich ebenfalls eine erniedrigte Amplitude und Frequenz von mEPSCs in der Abwesenheit von CKAMP44 (Khodosevich et al. 2014). Da die Amplitude der mEPSCs maßgeblich von der Anzahl der AMPA-Rezeptoren in der Synapse abhängig ist, könnte dies ein Hinweis auf eine gestörte Lokalisierung und somit eine verminderte Anzahl der Rezeptoren in den Synapsen sein. Der erniedrigte synaptische Strom in Knockout-Mäusen könnte ebenso für eine Reduktion der Spines und damit der Morphologie der Neurone verantwortlich sein.

Eine gesteigerte Affinität der Rezeptoren zu Glutamat kann auch eine Veränderung in der Amplitude zur Folge haben. CKAMP44 zum Beispiel erhöht die Glutamat-Affinität und die Leitfähigkeit der Rezeptoren (von Engelhardt et al. 2010). Jedoch konnte gezeigt werden, dass diese Eigenschaft nicht die reduzierte Amplitude beim Fehlen von CKAMP44 erklärt (Khodosevich et al. 2014).

Im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten zeigte sich in der Studie von Khodosevich et al. 2014 ebenfalls, dass sich die AMPA/NMDA-Ratio bei Stimulation des lateralen und medialen Tractus perforans in Abwesenheit von CKAMP44 verringert. Folglich können diese beiden Proteine im Gegensatz zu CKAMP59 die Anzahl der Rezeptoren an LPP- und MPP-Synapsen verändern.

Die Interaktion von CKAMP44 mit PSD-95 scheint ebenfalls notwendig für den durch das Protein vermittelten Transport zur Synapse und damit für die Erhöhung der

synaptischen AMPA-Rezeptoranzahl unter basalen Konditionen zu sein (Jacobi und von Engelhardt 2021).

CKAMP59-Defizienz hat in der CA1-Region eine starke Verkürzung der Decay Time von mEPSCs zur Folge (Schmitz et al. 2017). Wie oben bereits beschrieben zeigt CKAMP59 in dieser Studie im Gyrus dentatus sowie im Striatum unter basalen Konditionen einen geringen Effekt auf die Rise Time und scheint somit allenfalls Einfluss auf die Verteilung der Rezeptoren zu nehmen.

5.4.2 Die Kurzzeitplastizität

Ebenso wie bei der Kinetik AMPAR-vermittelter Ströme im Hippocampus und im Striatum unter basalen Konditionen variiert auch der Effekt der verschiedenen auxiliären Untereinheiten der AMPA-Rezeptoren auf die Kurzzeitplastizität innerhalb der CKAMP-Familie (Rouach et al. 2005, von Engelhardt et al. 2010, Khodosevich et al. 2014).

Der Knockout von CKAMP44 reduziert die synaptische AMPAR-Stromamplitude ähnlich, die extrasynaptischen Ströme werden anscheinend jedoch mehr durch den TARP-Verlust reduziert. Diese Tatsache wurde auch in der CA1-Region schon beobachtet (Rouach et al. 2005). Bei einem kombinierten Knockout der Proteine zeigte sich die extrasynaptische Anzahl der Rezeptoren stark eingeschränkt (> 90%), die synaptische aber nur zu ca. 60%. Das weist darauf hin, dass auch andere Untereinheiten im Hippocampus vorhanden sind, wie zum Beispiel CNIH-2 und 3 und GSG1L, die den Transport zur Synapse kompensatorisch übernehmen können.

In Knockout-Mäusen zeigte sich, dass beide Proteine die Oberflächenexpression und Kanaleigenschaften beeinflussen und dadurch an den Synapsen zwischen entorhinalen Kortex und den Körnerzellen des Gyrus dentatus die Kurzzeitplastizität verändern (Khodosevich et al. 2014). Da in dieser Studie die CKAMP59-Defizienz eine geringere Fazilitation zeigte, könnten in Zukunft ähnliche Messungen auch in Bezug auf CKAMP59 durchgeführt werden, um seiner tatsächlichen Rolle in der Kurzzeitplastizität weiter auf den Grund zu gehen.

CKAMP44 scheint GluA1/TARP γ -8 Komplexe zu stabilisieren. Es könnte bei einer schnelleren Erholung von der Desensitisierung also auch eine veränderte Komposition der auxiliären Untereinheiten eine Rolle spielen. Eine kompensatorische Hochregulation und beeinträchtigte Expression anderer Untereinheiten konnte beim

Fehlen von CKAMP59 bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Farrow et al. 2015). Außerdem scheint es außer milde Effekte auf die Kinetik der AMPAR-vermittelten Ströme, keinen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität in den Pyramidenzellen von CA1 zu haben, obwohl es in HEK293-Zellen eine verlangsamte Erholung von der Desensibilisierung zur Folge hatte (Schmitz et al. 2017).

CKAMP39, CKAMP52 und CKAMP59 reduzieren die Nummer der Oberflächenrezeptoren in HEK293-Zellen im Gegensatz zu CKAMP44 in Körnerzellen. Das ist die Folge einer Reduktion der totalen AMPAR-Anzahl in der Zelle. Das Verhältnis der Oberflächenanzahl zur totalen Anzahl zeigt, dass diese Proteine den Transport zu oder die Stabilität der Rezeptoren auf der Zelloberfläche beeinflussen (Farrow et al. 2015).

Desensibilisierte AMPA-Rezeptoren scheinen außerdem eine hohe Mobilität zu besitzen. Sie diffundieren daher aus der Synapse und können durch nicht-desensibilisierte Rezeptoren ersetzt werden. Dies könnte damit erklärt werden, dass sich die Rezeptoren im desensibilisierten Zustand von ihren auxiliären Untereinheiten lösen, die sie im nicht-desensibilisierten Zustand in der Synapse stabilisieren (Jacobi und von Engelhardt 2021).

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit aller CKAMPs eine schnellere Erholung von der Desensibilisierung zur Folge haben (von Engelhardt et al. 2010, Khodosevich et al. 2014, Jacobi und von Engelhardt 2021). CKAMP44 erniedrigt die Paired-Pulse-Ratio an den Synapsen des Tractus perforans und erschwert somit die Ausbildung von Kurzzeitplastizität (von Engelhardt et al. 2010).

Klaasen et al. zeigten 2016, dass auxiliäre Untereinheiten ebenfalls durch die Beeinflussung der Decay Time der AMPAR-vermittelten Ströme die Kurzzeitplastizität beeinflussen können. So führt die Abwesenheit von CKAMP52 in der CA1-Region zu einer reduzierten Kurzzeitplastizität (Klaassen et al. 2016, Jacobi und von Engelhardt 2021). CKAMP59 beeinflusst sie in dieser Region jedoch nicht (Schmitz et al. 2017), im Gegensatz zum Gyrus dentatus, wie die hier erhobenen Daten zeigen.

CKAMP59 ähnelt strukturell mehr CKAMP52, zeigt aber wie CKAMP44 einen Effekt auf die Desensibilisierung, indem es sie erhöht (Farrow et al. 2015). Jedoch scheint CKAMP59 zusammen mit CKAMP52 und TARP γ -8 Komplexe zu bilden, welches den gegenteiligen Effekt hat.

5.4.3 Langzeitpotenzierung

Es konnte gezeigt werden, dass CKAMP44 keinerlei Einfluss auf die Ausbildung von LTP zu haben scheint (Khodosevich et al. 2014, Schmitz et al. 2017). Tatsächlich konnten Schmitz et al. 2017 schon zeigen, dass CKAMP59 in der CA1-Region eine Reduktion in der Erhaltung von LTP in Knockout-Mäusen zur Folge hat, ebenso wie es in dieser Studie für die Körnerzellen im Gyrus dentatus gezeigt werden konnte. Dies unterstreicht nochmals die einzigartige Rolle von CKAMP59 im Vergleich zu den anderen Proteinen der CKAMP-Familie, da diesen bisher noch kein Effekt auf die Langzeitpotenzierung nachgewiesen werden konnte.

5.4.4 Strukturelle Eigenschaften der CKAMP-Familie

Alle bisher genannten Proteine der CKAMP-Familie ähneln sich in bestimmten Sequenzeigenschaften, vor allem der AMPAR-Bindestelle, und kommen nur im Gehirn vor. Ihre Expressionsmuster unterscheiden sich jedoch und einige Sequenzunterschiede könnten die unterschiedlichen Funktionen, wie sie oben beschrieben wurden, erklären.

Alle CKAMPs sind Typ I Transmembranproteine und besitzen unter anderem ein Signalpeptid, eine Cystein-reiche Extrazellulärregion am N-Terminus sowie eine Transmembrandomäne (von Engelhardt 2019). Sie unterscheiden sich funktionell von den übrigen Shisa-Proteinen, da sie im Gegensatz zu Shisa 1 bis Shisa 5 eine AMPAR-Interaktionsregion sowie ein intrazelluläres C-terminales PDZ Typ II Bindungsmotiv EVTV besitzen (Farrow et al. 2015, von Engelhardt 2019). Trotz ihrer ähnlichen genetischen Eigenschaften unterscheiden sie sich also in ihrer Funktion von den Shisa-Proteinen und gründen daher ihre eigene Familie.

Außer dem oben genannten gemeinsamen Cystein-Knoten bilden die Proteine der CKAMP-Familie mutmaßlich eine ähnliche beta-Strangstruktur im extrazellulären Bereich, ihre Transmembranregion besteht aus 18-19 Aminosäuren und hat unter allen CKAMP-Proteinen eine sehr hohe Ähnlichkeit (Farrow et al. 2015). Direkt unterhalb dieser Region befindet sich ein 20 Aminosäuren langer Arginin-reicher Bereich, der sich bei allen CKAMPs sehr ähnelt und wichtig für die Interaktion mit der GluA1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors zu sein scheint (Farrow et al. 2015, von Engelhardt 2019).

Die funktionalen Domänen der auxiliären Proteine spielen also eine entscheidende Rolle. Zum Beispiel ist die Struktur des extrazellulären Cystein-Knotens für CKAMP44 wichtig, um die AMPAR-Funktion beeinflussen zu können; die Mutation nur eines Cysteins kann also große Auswirkungen haben (Khodosevich et al. 2014).

Es hat sich ebenso gezeigt, dass das PDZ Typ II Motiv die Interaktion von CKAMP44 und CKAMP59 mit PSD95 ermöglicht (Schmitz et al. 2017). Dies ist wie bereits erwähnt wichtig, um die AMPA-Rezeptoren in der Membran der Synapsen von den Körnerzellen des Hippocampus zu verankern (Khodosevich et al. 2014). Da das EVTIV-Motiv bei allen CKAMPs übereinstimmt, scheint dies für alle zuzutreffen (Farrow et al. 2015).

Alle Proteine durchlaufen im endoplasmatischen Retikulum eine Qualitätskontrolle. Veränderungen der Öffnungseigenschaften und der Glutamat-Affinität haben einen großen Einfluss auf die Entlassung aus dem endoplasmatischen Retikulum und damit auf den Transport zur Zelloberfläche (Greger und Esteban 2007, Khodosevich et al. 2014, Farrow et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass TARPs den Export der AMPA-Rezeptoren aus dem endoplasmatischen Retikulum vereinfachen können, indem sie die Konformation des Rezeptors beeinflussen. So könnte auch die Bindung an Proteine anderer Familien, die die Öffnungseigenschaften und die Glutamataffinität des AMPA-Rezeptors beeinflussen, den Export des Rezeptors aus dem endoplasmatischen Retikulum vereinfachen (Jacobi und von Engelhardt 2017).

Wie oben schon mal erwähnt spielen posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierung und SUMOylierung eine große Rolle in der Synapsenphysiologie und der Regulation der AMPAR-Funktion (Lin et al. 2011, Widagdo et al. 2015, Henley et al. 2021). So werden AMPA-Rezeptoren selbst zwar nicht sumoyliert, jedoch konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von LTP abhängig von der SUMOylierung bestimmter, bisher nicht näher identifizierter Proteine ist (Jaafari et al. 2013). Wie erwähnt enthält CKAMP59 eine solche Bindungsstelle, die in keinem der anderen CKAMP-Proteine vorkommt. Dies legt nahe, dass hier möglicherweise eine Erklärung für die andere Rolle von CKAMP59 während der LTP begründet liegt.

Die Ubiquitinierung residueller Lysine im intrazellulären C-terminalen Ende von GluA1-Untereinheiten der AMPA-Rezeptoren scheint die Oberflächenexpression der Rezeptoren zu reduzieren und in der aktivitätsabhängigen Sortierung und dem AMPAR-Trafficking eine große Rolle zu spielen (Lin et al. 2011).

Diese Ubiquitinierung wird teilweise über die Ubiquitin-Ligase E3 Nedd4 („neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4“) vermittelt. Interessanterweise verfügen die AMPAR-Untereinheiten selbst über keine geeignete Interaktionsstelle. Daher wird spekuliert, dass andere synaptische Proteine hier gleichsam als Plattform dienen könnten und so die Ubiquitinierung von AMPA-Rezeptoren ermöglichen.

Anscheinend weist CKAMP59 als einziges Protein der CKAMP-Familie eine potenzielle Bindestelle für die Ubiquitin-Ligase E3 Nedd4 auf. In Zusammenschau mit dem Einfluss, den SUMOylierung und Ubiquitinierung auf AMPAR-Trafficking, synaptische Plastizität und Lernen und Gedächtnis zu haben scheint, könnte dies darauf hindeuten, dass die auxiliären Proteine sumoyliert und ubiquitiniert werden (Widagdo et al. 2015, Henley et al. 2021). SUMOylierung und Ubiquitinierung könnten also eine nicht unbedeutende Rolle in der Funktion der AMPA-Rezeptoren und seiner auxiliären Proteine spielen.

Han et al. konnten außerdem zeigen, dass CKAMP59 im Gegensatz zu den anderen Proteinen der Familie auch an GABA-Rezeptoren bindet, was nahelegt, dass es eine entsprechende Bindestelle hierfür besitzt.

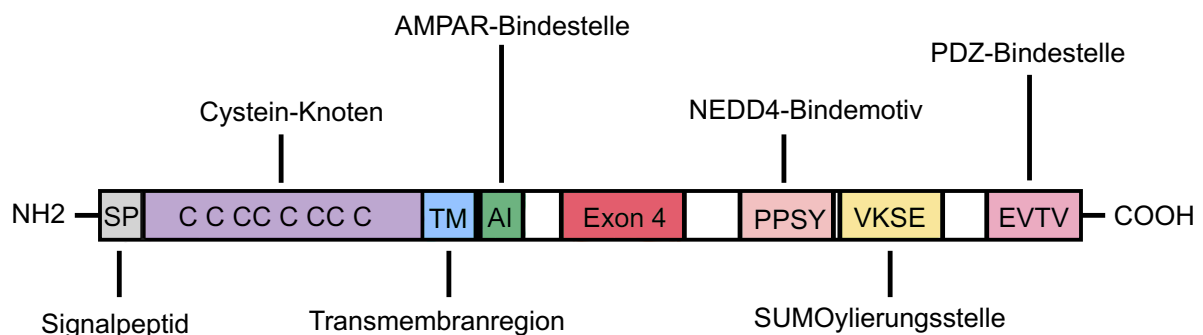


Abbildung 13: Schematische Darstellung der CKAMP-Familie mit Signalpeptid (SP), Cysteinen (C) des Cystein-Knotens, der Transmembranregion (TM), AMPAR-Interaktionsregion, dem NEDD4-Bindemotiv (PPSY), der SUMOylierungsstelle (VKSE) und dem PDZ Typ II Bindemotiv (EVTV)

5.5 Knockout

Um die Funktion des Proteins ex vivo an Neuronen in Hirnschnitten zu untersuchen, wurden hier Wildtyp- und Knockout-Mäuse der CKAMP59-Linie verwendet. Der Knockout erfolgte nach dem „knock-out first“-Prinzip, welches zu einer Frameshift-

Mutation und zu einem Knockout auf RNA-Level führt und dadurch die Herstellung eines funktionsfähigen Proteins verhindern soll (Testa et al. 2004).

Da so ein Knockout die Entwicklung beeinflussen kann, stellt sich die Frage, ob es auf neuronaler Ebene Veränderungen im Netzwerk sowie kompensatorische Mechanismen gibt, die in Abwesenheit eines funktionstüchtigen Proteins eventuell greifen können und somit der Knockout nicht vollständig ist.

Um dies zu überprüfen, könnten Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) durchgeführt werden, die durch die Markierung des Proteins mit fluoreszierenden Antikörpern anzeigen könnten, ob noch ein Signal von CKAMP59 nach dem Knockout detektiert werden kann.

Sollte dies der Fall sein, müssten die hier beschriebenen Folgerungen zur potenziellen Funktion des Proteins anhand der gewonnenen Daten überdacht werden.

5.6 Auxiliäre Proteine können als Angriffspunkt von Medikamenten helfen, die Therapien von Erkrankungen des ZNS zu verbessern

AMPA-Rezeptoren sowie ihre auxiliären Untereinheiten spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Krankheiten des zentralen Nervensystems.

Deshalb kann gerade die Kenntnis der Funktion dieser Proteine, ihr Zusammenspiel untereinander und den verschiedenen Konstellationen der Rezeptoren helfen, die Mechanismen zu verstehen, die zu neuronaler Dysfunktion und damit zur Ausbildung verschiedener Krankheiten führen kann. So wissen wir bereits, dass zahlreiche Erkrankungen wie beispielsweise Epilepsie, Bewegungsstörungen, sowie Störungen aus dem autistischen Formenkreis durch diese auxiliären Proteine beeinflusst werden können.

Der Hippocampus zum Beispiel spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Manifestation solcher Krankheiten (Bartsch und Wulff 2015) und ist deshalb das Objekt vieler Studien und auch in meiner Doktorarbeit von großer Bedeutung. Zum Beispiel beim Morbus Alzheimer, einer neurodegenerativen Erkrankung, die mit Gedächtnisschwund einhergeht, zeigt sich eine Atrophie des Hippocampus (Balestrieri, Nonato et al. 2020). Bei Patienten mit Epilepsie scheinen die elektrophysiologischen Eigenschaften der Körnerzellen des Gyrus dentatus verändert

zu sein (Dietrich et al. 1999) und es gibt Hinweise darauf, dass AMPA-Rezeptoren eine große Rolle in der Pathogenese und somit bei der Behandlung spielen können (Yang et al. 2021).

Daher kann das Wissen über die Diversität der AMPA-Rezeptoren einen neuen Ansatz in der Therapie solcher Krankheiten liefern. Somit könnten Medikamente entwickelt werden, die zielgerichteter und nebenwirkungsärmer verabreicht werden, wie zum Beispiel das Medikament *LY3130481* bei Epilepsie. Es ist ein Antagonist spezifisch für TARP γ -8 enthaltende AMPA-Rezeptoren. Da dieses Protein in bestimmten Regionen exprimiert wird, blockiert das Medikament vor allem hippocampale und kortikale Rezeptoren, was im Gegensatz zu anderen antikonvulsiven Medikamenten nicht zu motorischen Nebenwirkungen und Benommenheit führt (Kato et al. 2016, Jacobi und von Engelhardt 2017).

Außerdem konnten Han et al. 2019 zeigen, dass CKAMP59 auch dem GABA_A-Rezeptor als auxiliäre Untereinheit dient. Der GABA_A-Rezeptor ist im Gegensatz zum AMPA-Rezeptor für die schnelle inhibitorische Transmission zuständig. Von daher könnte auch für diesen Rezeptor CKAMP59 eine große Rolle beim Transport zu den Synapsen und der Modulation der Kanaleigenschaften sowie der Pharmakologie spielen. Das auxiliäre Protein scheint ebenfalls eine Rolle in der Regulierung der Exozytose der GABA_A-Rezeptoren sowie der tonischen Inhibition in CA1-Neuronen von jungen Mäusen zu spielen (Wu et al. 2021).

Eine Dysfunktion der tonischen Form der Inhibition kann ursächlich für einige neurologische und psychiatrische Erkrankungen sein. Sie ist für die Modulation neuronaler Erregbarkeit, die Funktion neuronaler Schaltkreise und Verhalten und Lernen (anscheinend auch im Schlaf) verantwortlich.

Die GABA_A-Rezeptoren sind außerdem der Angriffspunkt für die sedativ und anxiolytisch wirkende Medikamentengruppe der Benzodiazepine, wie zum Beispiel Diazepam, die in der Therapie der Depression sowie der Epilepsie eingesetzt werden (Wu et al. 2021).

CKAMP59 scheint den Einfluss und die Wirkung von Benzodiazepinen auf den GABA_A-Rezeptor zu beeinflussen, was daraufhin deutet, dass es sehr wahrscheinlich auch die therapeutischen Effekte dieser Medikamentengruppe in vivo beeinflussen kann. Diese Erkenntnis kann in Zukunft dazu dienen, die psychopharmakologischen

Therapien von bestimmten neuropsychiatrischen Krankheiten zu verbessern, indem Rezeptor-assoziierte Proteine als Angriffspunkt dienen. Das kann vor allem bei den regional unterschiedlichen neurobiologischen Prozessen in verschiedenen Hirnregionen hilfreich sein (Jacobi und von Engelhardt 2017, Maher et al. 2017).

6. Zusammenfassung

AMPA-Rezeptoren sind die Hauptüberträger schneller synaptischer Ströme im zentralen Nervensystem und spielen daher eine bedeutende Rolle bei synaptischer Kurz- und Langzeitplastizität, Lernen und Gedächtnisbildung und somit auch in der Ausbildung verschiedener Krankheiten.

Der AMPA-Rezeptor ist ein ionotroper Glutamat-Rezeptor und Ionenkanal, der sich aus den Untereinheiten GluA1 bis GluA4 zusammensetzt, die sich für den Zelltyp und die Hirnregion spezifisch in ihrer Komposition und Funktion unterscheiden. An ihn binden zusätzliche Proteine als auxiliäre Untereinheiten, die seine Eigenschaften weitergehend modulieren, seinen Transport zur Zelloberfläche beeinflussen können und eine unglaubliche Vielfalt dieses Rezeptors im Gehirn von Säugetieren zur Folge haben.

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Funktion des auxiliären Proteins CKAMP59 in zwei wichtigen Hirnregionen: dem Striatum und dem Hippocampus. Beide Hirnstrukturen sind bei verschiedenen neurodegenerativen sowie neuropsychiatrischen Erkrankungen betroffen und wichtig für höhere Funktionen des Gehirns wie Willkürmotorik oder Erinnerung, Lernen und Gedächtnis. Um die Funktion des Proteins analysieren zu können, wurden die Messungen mittels der elektrophysiologischen Patch-Clamp-Methode in der sogenannten Whole-Cell-Konfiguration durchgeführt.

Die Deletion von CKAMP59 resultierte in einer verkürzten Rise Time der AMPAR-vermittelten Ströme in den Körnerzellen des Gyrus dentatus sowie in den Stachelneuronen des Striatums, was auf eine Umverteilung der AMPA-Rezeptoren von fernen zu nahen Synapsen sprechen könnte. Jedoch blieben die Decay Time sowie die Amplitude und Frequenz unbeeinträchtigt durch den Knockout. Ebenso wie die AMPA/NMDA-Ratio, was darauf hinweist, dass die Anzahl der Rezeptoren sich ebenfalls nicht bei der Abwesenheit von CKAMP59 verändert.

Es zeigte sich jedoch eine veränderte Paired-Pulse-Ratio und somit ein Einfluss von CKAMP59 auf die Kurzzeitplastizität in den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Ebenfalls war die Erhaltung der Langzeitpotenzierung gestört.

Diese Studie konnte zeigen, dass CKAMP59 abhängig von der synaptischen Aktivität die AMPAR-Funktion unterschiedlich beeinflusst, was darauf hindeutet, dass CKAMP59 eine gesonderte Rolle innerhalb der CKAMP-Familie einnimmt.

Nicht abschließend geklärt werden konnte jedoch, ob die hier beobachteten Ergebnisse durch die direkte Interaktion von CKAMP59 mit den AMPA-Rezeptoren zu erklären sind oder Folge sekundärer Effekte infolge der CKAMP59-Defizienz sind. Hier gilt vor allem zu beachten, dass CKAMP59 möglicherweise auch die GABAerge, synaptische Übertragung direkt beeinflusst. Außerdem sind die beobachteten Veränderungen bei Mangel eines auxiliären Proteins immer auch von den weiteren vorhandenen Proteinen innerhalb der spezifischen Synapse abhängig.

Die Beschreibung der Folgen des CKAMP59-Mangels in diesem Modell beeinflusst unser Verständnis von der Funktion von CKAMP59 im ZNS und damit genauere Analysen in geplanten Folgestudien. Darüber hinaus könnten die Erkenntnisse Bedeutung haben für die Entwicklung medikamentöser Therapien für kognitive Störungen oder neurodegenerative Erkrankungen.

Um den Effekt von CKAMP59 auf die Funktion des AMPA-Rezeptors in den Körnerzellen des Gyrus dentatus noch genauer zu analysieren, wären Messungen im Outside-out-Modus hilfreich, um zu bestimmen, ob und wenn ja welchen Einfluss das Protein auf den extrasynaptischen Pool der Rezeptoren hat.

Ebenso könnte das Zusammenspiel von CKAMP59 mit den unterschiedlichen Untereinheiten des Rezeptors näher beleuchtet werden. Experimente mit TARP γ -8 und PSD-95 könnten ebenfalls durchgeführt werden, um ihre Mitwirkung bei der Induktion und Erhaltung der Langzeitpotenzierung genauer zu beleuchten. Hier könnte auch die Rolle posttranslationaler Modifikationen wie der Ubiquitinierung und SUMOylierung einen großen Einfluss haben. Weiterhin könnten die synaptische Übertragung und Plastizität in den anderen Hirnregionen, in denen CKAMP59 exprimiert wird, weiter untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

Abbott, L. C. and F. Nigussie (2020). "Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus." Anat Histol Embryol **49**(1): 3-16.

Abraham, W. C., et al. (2019). "Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage?" npj Science of Learning **4**(1): 9.

Amaral, D. G., et al. (2007). "The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies)." Prog Brain Res **163**: 3-22.

Anacker, C., et al. (2018). "Hippocampal neurogenesis confers stress resilience by inhibiting the ventral dentate gyrus." Nature **559**(7712): 98-102.

Asztely, F., et al. (1997). "Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: dependence on temperature and the role of active glutamate uptake." Neuron **18**(2): 281-293.

Bartsch, T. and P. Wulff (2015). "The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability." Neuroscience **309**: 1-16.

Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.

Bredt, D. S. and R. A. Nicoll (2003). "AMPA receptor trafficking at excitatory synapses." Neuron **40**(2): 361-379.

Brosnan, J. T. and M. E. Brosnan (2013). "Glutamate: a truly functional amino acid." Amino Acids **45**(3): 413-418.

Calabresi, P., et al. (2000). "Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration." Prog Neurobiol **61**(3): 231-265.

Cepeda, C., et al. (2008). "Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons." Eur J Neurosci **27**(3): 671-682.

Chen, C., et al. (2002). "Contributions of receptor desensitization and saturation to plasticity at the retinogeniculate synapse." Neuron **33**(5): 779-788.

Chen, L., et al. (1999). "Impaired cerebellar synapse maturation in waggler, a mutant mouse with a disrupted neuronal calcium channel gamma subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 12132-12137.

Cho, C. H., et al. (2007). "Two families of TARP isoforms that have distinct effects on the kinetic properties of AMPA receptors and synaptic currents." Neuron **55**(6): 890-904.

Colquhoun, D. (1991). "Ion channels: this year's Nobel prize in physiology or medicine." BMJ **303**(6808): 938-939.

- de Jong, A. P. and D. Fioravante (2014). "Translating neuronal activity at the synapse: presynaptic calcium sensors in short-term plasticity." Front Cell Neurosci **8**: 356.
- Deperrois, N. and M. Graupner (2020). "Short-term depression and long-term plasticity together tune sensitive range of synaptic plasticity." PLoS Comput Biol **16**(9): e1008265.
- Diaz-Alonso, J. and R. A. Nicoll (2021). "AMPA receptor trafficking and LTP: Carboxy-termini, amino-termini and TARPs." Neuropharmacology **197**: 108710.
- Diering, G. H. and R. L. Huganir (2018). "The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity." Neuron **100**(2): 314-329.
- Dietrich, D., et al. (1999). "Two electrophysiologically distinct types of granule cells in epileptic human hippocampus." Neuroscience **90**(4): 1197-1206.
- Doan, J., et al. (2019). "Role of adult-born granule cells in the hippocampal functions: Focus on the GluN2B-containing NMDA receptors." Eur Neuropsychopharmacol **29**(10): 1065-1082.
- Dutta Roy, R., et al. (2014). "Biophysical properties of presynaptic short-term plasticity in hippocampal neurons: insights from electrophysiology, imaging and mechanistic models." Front Cell Neurosci **8**: 141.
- Erlenhardt, N., et al. (2016). "Porcupine Controls Hippocampal AMPAR Levels, Composition, and Synaptic Transmission." Cell Rep **14**(4): 782-794.
- Farrow, P., et al. (2015). "Auxiliary subunits of the CKAMP family differentially modulate AMPA receptor properties." Elife **4**: e09693.
- Fazl, A. and J. Fleisher (2018). "Anatomy, Physiology, and Clinical Syndromes of the Basal Ganglia: A Brief Review." Semin Pediatr Neurol **25**: 2-9.
- Gecz, J. (2010). "Glutamate receptors and learning and memory." Nat Genet **42**(11): 925-926.
- Giap, B. T., et al. (2000). "The hippocampus: anatomy, pathophysiology, and regenerative capacity." J Head Trauma Rehabil **15**(3): 875-894.
- Gothelf, D., et al. (2000). "Evidence for the involvement of the hippocampus in the pathophysiology of schizophrenia." Eur Neuropsychopharmacol **10**(5): 389-395.
- Greger, I. H. and J. A. Esteban (2007). "AMPA receptor biogenesis and trafficking." Curr Opin Neurobiol **17**(3): 289-297.
- Greger, I. H., et al. (2017). "Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins." Neuron **94**(4): 713-730.
- Hayashi, Y. (2022). "Molecular mechanism of hippocampal long-term potentiation - Towards multiscale understanding of learning and memory." Neurosci Res **175**: 3-15.

- Henley, J. M., et al. (2021). "SUMOylation of synaptic and synapse-associated proteins: An update." J Neurochem **156**(2): 145-161.
- Henley, J. M. and K. A. Wilkinson (2016). "Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease." Nat Rev Neurosci **17**(6): 337-350.
- Hermey, G., et al. (2010). Der Experimentator: Neurowissenschaften. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Huang, H. and A. Bordey (2004). "Glial glutamate transporters limit spillover activation of presynaptic NMDA receptors and influence synaptic inhibition of Purkinje neurons." J Neurosci **24**(25): 5659-5669.
- Jaafari, N., et al. (2013). "SUMOylation is required for glycine-induced increases in AMPA receptor surface expression (ChemLTP) in hippocampal neurons." PLoS One **8**(1): e52345.
- Jackman, S. L. and W. G. Regehr (2017). "The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation." Neuron **94**(3): 447-464.
- Jackson, A. C. and R. A. Nicoll (2011). "The expanding social network of ionotropic glutamate receptors: TARPs and other transmembrane auxiliary subunits." Neuron **70**(2): 178-199.
- Jacobi, E. and J. von Engelhardt (2017). "Diversity in AMPA receptor complexes in the brain." Curr Opin Neurobiol **45**: 32-38.
- Jacobi, E. and J. von Engelhardt (2021). "Modulation of information processing by AMPA receptor auxiliary subunits." J Physiol **599**(2): 471-483.
- Jeong, Y., et al. (2021). "Synaptic plasticity-dependent competition rule influences memory formation." Nature Communications **12**(1): 3915.
- Jonas, P. (2000). "The Time Course of Signaling at Central Glutamatergic Synapses." Physiology **15**(2): 83-89.
- Kato, A. S., et al. (2016). "Forebrain-selective AMPA-receptor antagonism guided by TARP gamma-8 as an antiepileptic mechanism." Nat Med **22**(12): 1496-1501.
- Kempermann, G., et al. (2015). "Neurogenesis in the Adult Hippocampus." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(9): a018812.
- Kesner, R. P. (2013). "Role of the hippocampus in mediating interference as measured by pattern separation processes." Behav Processes **93**: 148-154.
- Kesner, R. P. (2018). "An analysis of dentate gyrus function (an update)." Behav Brain Res **354**: 84-91.
- Kesner, R. P. and E. T. Rolls (2015). "A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments." Neurosci Biobehav Rev **48**: 92-147.

- Khan, Z., et al. (2004). "Abnormal motor behavior and vestibular dysfunction in the stargazer mouse mutant." Neuroscience **127**(3): 785-796.
- Khodosevich, K., et al. (2014). "Coexpressed auxiliary subunits exhibit distinct modulatory profiles on AMPA receptor function." Neuron **83**(3): 601-615.
- Kielland, A., et al. (2009). "Activity patterns govern synapse-specific AMPA receptor trafficking between deliverable and synaptic pools." Neuron **62**(1): 84-101.
- Klaassen, R. V., et al. (2016). "Shisa6 traps AMPA receptors at postsynaptic sites and prevents their desensitization during synaptic activity." Nat Commun **7**: 10682.
- Kleppe, I. C. and H. P. Robinson (1999). "Determining the activation time course of synaptic AMPA receptors from openings of colocalized NMDA receptors." Biophys J **77**(3): 1418-1427.
- Kreitzer, A. C. and R. C. Malenka (2008). "Striatal plasticity and basal ganglia circuit function." Neuron **60**(4): 543-554.
- Kumar, J. and M. L. Mayer (2013). "Functional insights from glutamate receptor ion channel structures." Annu Rev Physiol **75**: 313-337.
- Letts, V. A., et al. (1998). "The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit." Nat Genet **19**(4): 340-347.
- Lin, A., et al. (2011). "Nedd4-mediated AMPA receptor ubiquitination regulates receptor turnover and trafficking." J Neurochem **119**(1): 27-39.
- Magee, J. C. and C. Grienberger (2020). "Synaptic Plasticity Forms and Functions." Annu Rev Neurosci **43**: 95-117.
- Maher, M. P., et al. (2017). "Getting a Handle on Neuropharmacology by Targeting Receptor-Associated Proteins." Neuron **96**(5): 989-1001.
- Mansvelder, H. D., et al. (2019). "Synaptic plasticity in human cortical circuits: cellular mechanisms of learning and memory in the human brain?" Curr Opin Neurobiol **54**: 186-193.
- Marcaggi, P., et al. (2003). "The role of glial glutamate transporters in maintaining the independent operation of juvenile mouse cerebellar parallel fibre synapses." J Physiol **552**(Pt 1): 89-107.
- Monday, H. R., et al. (2018). "Long-Term Plasticity of Neurotransmitter Release: Emerging Mechanisms and Contributions to Brain Function and Disease." Annu Rev Neurosci **41**: 299-322.
- Monyer, H. and J. von Engelhardt (2015). "Modulation der Funktion von AMPA-Rezeptoren durch auxiliäre Proteine." Neuroforum 2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 11.
- Olsen, R. K., et al. (2012). "The hippocampus supports multiple cognitive processes through relational binding and comparison." Front Hum Neurosci **6**: 146.

- Opazo, P., et al. (2010). "CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin." Neuron **67**(2): 239-252.
- Palacios-Filardo, J. and J. R. Mellor (2019). "Neuromodulation of hippocampal long-term synaptic plasticity." Curr Opin Neurobiol **54**: 37-43.
- Palmer, C. L., et al. (2005). "The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors." Pharmacol Rev **57**(2): 253-277.
- Park, J. (2018). "Phosphorylation of the AMPAR-TARP Complex in Synaptic Plasticity." Proteomes **6**(4).
- Percie du Sert, N., et al. (2020). "The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research." BMJ Open Sci **4**(1): e100115.
- Prager, E. M. and J. L. Plotkin (2019). "Compartmental function and modulation of the striatum." J Neurosci Res **97**(12): 1503-1514.
- Reiner, A. and J. Levitz (2018). "Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert." Neuron **98**(6): 1080-1098.
- Rouach, N., et al. (2005). "TARP gamma-8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity." Nat Neurosci **8**(11): 1525-1533.
- Rusakov, D. A. and D. M. Kullmann (1998). "Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation." J Neurosci **18**(9): 3158-3170.
- Schmitz, L. J. M., et al. (2017). "The AMPA receptor-associated protein Shisa7 regulates hippocampal synaptic function and contextual memory." Elife **6**.
- Schwenk, J., et al. (2014). "Regional diversity and developmental dynamics of the AMPA-receptor proteome in the mammalian brain." Neuron **84**(1): 41-54.
- Schwenk, J., et al. (2009). "Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors." Science **323**(5919): 1313-1319.
- Scoville, W. B. and B. Milner (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." J Neurol Neurosurg Psychiatry **20**(1): 11-21.
- Shanks, N. F., et al. (2012). "Differences in AMPA and kainate receptor interactomes facilitate identification of AMPA receptor auxiliary subunit GSG1L." Cell Rep **1**(6): 590-598.
- Simeone, T. A., et al. (2004). "Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system." J Child Neurol **19**(5): 343-360; discussion 361.
- Skarnes, W. C., et al. (2011). "A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function." Nature **474**(7351): 337-342.

- Sourdet, V. and D. Debanne (1999). "The role of dendritic filtering in associative long-term synaptic plasticity." Learn Mem **6**(5): 422-447.
- Stepan, J., et al. (2015). "Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP." Front Neurosci **9**: 160.
- Strange, B. A., et al. (2014). "Functional organization of the hippocampal longitudinal axis." Nat Rev Neurosci **15**(10): 655-669.
- Taschenberger, H., et al. (2005). "Release kinetics, quantal parameters and their modulation during short-term depression at a developing synapse in the rat CNS." J Physiol **568**(Pt 2): 513-537.
- Testa, G., et al. (2004). "A reliable lacZ expression reporter cassette for multipurpose, knockout-first alleles." Genesis **38**(3): 151-158.
- Thiagarajan, T. C., et al. (2007). "LTP and adaptation to inactivity: overlapping mechanisms and implications for metaplasticity." Neuropharmacology **52**(1): 156-175.
- Tomita, S., et al. (2003). "Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins." J Cell Biol **161**(4): 805-816.
- Toni, N. and A. F. Schinder (2015). "Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus." Cold Spring Harb Perspect Biol **8**(1): a018903.
- Trepel, M. (2015). Neuroanatomie: Struktur und Funktion. München, Elsevier GmbH.
- von Engelhardt, J. (2019). "AMPA Receptor Auxiliary Proteins of the CKAMP Family." Int J Mol Sci **20**(6).
- von Engelhardt, J., et al. (2010). "CKAMP44: a brain-specific protein attenuating short-term synaptic plasticity in the dentate gyrus." Science **327**(5972): 1518-1522.
- Wenthold, R. J., et al. (1996). "Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons." J Neurosci **16**(6): 1982-1989.
- Widagdo, J., et al. (2015). "Activity-Dependent Ubiquitination of GluA1 and GluA2 Regulates AMPA Receptor Intracellular Sorting and Degradation." Cell Rep **10**(5): 783-795.
- Wu, K., et al. (2021). "Activity- and sleep-dependent regulation of tonic inhibition by Shisa7." Cell Rep **34**(12): 108899.
- Xu, J., et al. (2007). "Role of Ca(2+) channels in short-term synaptic plasticity." Curr Opin Neurobiol **17**(3): 352-359.
- Yan, D. and S. Tomita (2012). "Defined criteria for auxiliary subunits of glutamate receptors." J Physiol **590**(1): 21-31.

Yang, C., et al. (2021). "Epileptic seizures in a heterogeneous excitatory network with short-term plasticity." Cogn Neurodyn **15**(1): 43-51.

Yang, Y. and N. Calakos (2013). "Presynaptic long-term plasticity." Front Synaptic Neurosci **5**: 8.

Zucker, R. S. and W. G. Regehr (2002). "Short-term synaptic plasticity." Annu Rev Physiol **64**: 355-405.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der letzten Jahre bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jakob von Engelhardt, der mir die Chance gegeben hat, meine Promotion im Institut für Pathophysiologie an der Universität Mainz zu absolvieren und mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützt hat.

Als Teil seiner Arbeitsgruppe hatte ich eine sehr lehrreiche Zeit.

Außerdem möchte ich mich auch herzlich bei meinem großartigen Betreuer Dr. Benedikt Grünewald bedanken, der mich während der ganzen Zeit begleitet und sehr geduldig angeleitet hat, mir immer hilfsbereit zur Seite stand und mir eine so große Unterstützung war. Trotz der Anstrengung, die die Experimente manchmal mit sich gebracht haben, war es oft sehr lustig mit dir. Es war mir eine Freude, dich als meinen Betreuer gehabt zu haben.

Ein weiterer besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für die Unterstützung und Anleitung im Labor sowie die netten und motivierenden Gespräche.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. Werner Kilb herzlich für sein Zweitgutachten.

Insbesondere gilt mein Dank auch meiner Kommilitonin und sehr guten Freundin Mariel Braunbeck, mit der ich diese Reise größtenteils zusammen machen durfte. Danke, dass du mir so ein guter Labbuddy warst und immer ein offenes Ohr für mich hattest, wenn ich wieder mal frustriert war. Vielen Dank für alles.

Ich bedanke mich des Weiteren auch bei allen anderen Freunden, die mich immer unterstützt haben während der gesamten Anfertigung dieser Arbeit.

Ganz besonderer und unendlicher Dank gilt dabei Benedikt Langfeld, der mich beim Schreiben der Arbeit durch Korrekturlesen und seelischen Beistand über Monate hinweg unterstützt hat, immer unglaublich geduldig mit mir war und mich immer wieder ermutigt hat. Danke, dass du immer für mich da bist.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Mama Iman Messerle danken, dafür dass sie mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat. Ohne dich wäre das alles nicht möglich gewesen.

9. Tabellarischer Lebenslauf

05.02.1995	geboren in St.Wendel
09.2005 – 06.2013	Albert-Einstein-Gymnasium, Völklingen, Abiturnote: 1,6
07.2013 – 08. 2013	Pflegepraktikum, Caritas Klinikum Rastpfuhl, Saarbrücken
09.2013 – 08. 2014	Freiwilliges Soziales Jahr, Rettungswache Völklingen
09.2014 – 05.2015	Ausbildung zur Rettungsassistentin, Köln
10.2015 – 05.2022	Medizinstudium an der Johannes Gutenberg Universität, Mainz
01.09.2017	1. Staatsexamen, Note: 2,5
10.2017 – 01.2018	Arbeit als Blutentnahme-Hiwi in der I. Medizinischen Klinik, Universitätsmedizin Mainz
03.2018 – 06.2020	Arbeit als Doktorandin im Institut für Pathophysiologie, Universitätsmedizin Mainz
10.2018 – 09.2019	Arbeit als studentische Hilfskraft auf der Rhythmusstation der Kardiologie (401K), Universitätsmedizin Mainz
13.04. – 15.04.2021	2. Staatsexamen, Note: 2
05.2021 – 04.2022	Praktisches Jahr
05.2021 – 09.2021	Wahltertial Radiologie im Klinikum Darmstadt
09.2021 – 10.2021	Chirurgie Tertial im Spital Frutigen, Schweiz

11.2021 – 12.2021	Chirurgie Tertial im Diakonie Krankenhaus Bad Kreuznach
12.2021 – 04.2022	Innere Tertial im Katholischen Klinikum Koblenz-Montabaur
11.05. – 12.05.2022	3. Staatsexamen, Note: 1
seit 01.12.2022	Ärztin in Weiterbildung in der Klinik und Poliklinik für Neuroradiologie an der Universitätsmedizin Mainz

