

**Neuronal Calcium Binding Protein 2 (NECAB2):
Charakterisierung eines striatalen
Ca²⁺-bindenden Proteins**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Teresa Schacht, geb. Boldt
geb. am 19.03.1984 in Bad Pyrmont

Die experimentellen Arbeiten dieser Doktorarbeit entstanden vom 01.06.2011-31.03.2013 im Life Science Center, Klinik und Poliklinik für Neurologie, in Düsseldorf und vom 01.04.2013-31.05.2015 in der Klinik und Poliklinik für Neurologie in Mainz.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „**Neuronal Calcium Binding protein 2 (NECAB2): Charakterisierung eines striatalen Ca²⁺-bindendes Proteins**“ selbständig verfasst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass ich noch keinen Promotionsversuch an einer anderen Universität oder in einem anderen Fachbereich unternommen habe.

Mainz, den 14.8.2015

(Teresa Schacht)

*„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an
interessant zu werden, wo sie aufhört“*

Justus Freiherr von Liebig (1803-1873)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Striatum	1
1.1.1 Aufbau und Funktion des Striatums	1
1.1.2 <i>Medium-sized spiny neurons (MSN)</i> -Projektionsneurone	2
1.2 Synaptische Übertragung	3
1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)	6
1.4 Striatale GPCRs	8
1.4.1 Adenosin A _{2A} -Rezeptor (A _{2A} R)	8
1.4.2 Metabotroper Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5)	9
1.4.3 Dopaminrezeptoren	12
1.5 Neuronal Ca²⁺-Binding protein 2 (NECAB2)	16
1.5.1 Die <i>Neuronal Ca²⁺-Binding protein (NECAB)</i> -Familie	16
1.5.2 Vorkommen von NECAB2 in der Maus	17
1.5.3 Struktur und Aufbau von NECAB2	18
1.5.4 Interaktion von NECAB2 mit dem Adenosine A _{2A} Rezeptor und dem metabotropischen Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5)	20
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
3. MATERIALIEN	24
3.1 Chemikalien	24
3.2 Enzyme	24
3.2.1 Restriktionsenzyme	24
3.2.2 Weitere verwendete Enzyme	24
3.3 Kits	24
3.4 Antikörper	25
3.4.1 Primärantikörper	25
3.4.2 Sekundärantikörper	25
3.5 Puffer	26
3.6 Medien	26
3.6.1 Medium für Bakterien	26
3.6.2 Medium für Zellkultur	27
3.7 Bakterien	27
3.7.1 <i>Escherichia coli (E. coli)</i>	27

3.8 Primärkulturen und immortalisierte Zelllinien	28
3.8.1 Striatale Neuronenkultur	28
3.8.2 CHO	28
3.8.3 HT22	28
3.9 Mäuse	28
3.10 Plasmide	29
3.11 Oligonukleotide	30
3.11.1 Primer für Klonierungen	31
3.12 Geräte	31
3.13 Computerprogramme	33
3.12.1 Snapgene	33
3.13.2 ODYSSEY Sa	33
3.13.3 Graph Pad Prism 6.0	33
3.13.3 ImageJ	33
3.13.4 BD AttoVision Version 1.7/855	33
3.13.5 MS Office Programme	33
3.13.6 Huygens Software	33
4. METHODEN	34
4.1 Molekularbiologische Techniken	34
4.1.1 DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen	34
4.1.2 Polymerase-chain-reaction (PCR)	34
4.1.3 Reverse Transkription	35
4.1.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	36
4.1.5 Herstellung kompetenter Bakterien	36
4.1.6 Transformation von <i>E. coli</i>	37
4.1.7 DNA-Isolierung von PCR Produkten und Plasmiden	37
4.1.8 RNA Isolierung aus Hirnlysaten	38
4.1.9 Agarose-Gelelektrophorese	38
4.1.10 DNA Extraktion aus Agarosegelen	38
4.1.11 DNA-Restriktionsverdau	39
4.1.12 Ligation	39
4.1.13 Klonierung	39
4.1.15 Generierung der induzierbaren Dimerisierungsstrukture	42
4.2 Proteinbiochemische Techniken	42
4.2.1 Herstellung von Proteinlysaten aus adhärenenten Zellkulturen	42
4.2.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Maushirnen	43
4.2.3 Testexpression von NECAB2-His	43
4.2.4 Aufreinigung der Testexpression	43
4.2.5 Proteinexpression in <i>E.coli</i>	44
4.2.6 Zellaufschluss	44
4.2.7 Testsolubilisierung	45
4.2.8 „Inclusion bodies“-Testsolubilisierung	45
4.2.9 „Inclusion bodies“-Aufreinigung	46
4.2.10 Aufreinigung des rekombinanten, denaturierten NECAB2-Proteins mit His-tag (Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie)	47

4.2.11 Renaturierung von NECAB2	48
4.2.12 Ultrafiltration	48
4.2.13 Dialyse	48
4.2.14 Quantitative Proteinbestimmung	49
4.2.15 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
4.2.16 Immunoblot	50
4.2.17 Blaue Nativ Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)	50
4.2.18 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Autoradiogramm	51
4.2.19 Immunpräzipitation (IP)	51
4.2.20 Chemisches <i>Crosslinking</i>	52
4.2.21 Immunzytochemie/Immunhistochemie	52
4.2.22 Synaptosomenpräparation	54
4.2.23 NADPH Assay	55
4.3 Zellkulturtechniken	55
4.3.1 Striatale Neuronenprimärkultur	55
4.3.2 Kultivierung immortalisierter Zelllinien	56
4.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl	56
4.3.4 Transiente Transfektion	57
4.3.5 Generierung von stabilen überexprimierenden Necab2 Zelllinien	57
4.3.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen	57
4.4 Biophysikalische Methoden	58
4.4.1 CD (<i>Circular dichroism</i>)- Spektroskopie	58
4.4.2 CLS (<i>Confocal Laser-scanning</i>)-Mikroskopie	59
4.4.3 STED (Stimulation Emission Depletion)-Mikroskopie	60
5. ERGEBNISSE	61
5.1 NECAB2 wird ausschließlich im Hirn und vorwiegend im Striatum exprimiert	61
5.2 Keine kompensatorische Regulation von Necab1 oder Necab3 in den NECAB2 -/- Mäusen	63
5.3 NECAB2 ist vorwiegend präsynaptisch exprimiert	64
5.4 Expression und Aufreinigung vom rekombinanten, humanen NECAB2	66
5.4.1 Rekombinantes humanes NECAB2 wird in unlöslichen "Inclusion bodies" exprimiert.	66
5.4.2 Aufreinigung von His-NECAB2 mittels Nickelaffinitäts-chromatographie	68
5.5 Renaturiertes NECAB2 zeigt keine NADPH Aktivität	70
5.6 NECAB2 liegt als Homodimer vor	71
5.7 Ca^{2+} induziert die Dimerisierung von NECAB2	75
5.8 NECAB2 interagiert mit dem metabotropischen Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5)	76
5.9 Strukturelle Organisation von NECAB2	77
5.10 Dimerisierung wird von der coiled-coiled 1 Domäne vermittelt	80
5.11 Interaktion von NECAB2 mit mGluR5 wird durch die coiled-coiled 1 Domäne vermittelt	81
5.12 Induzierte, gezwungene Dimerisierung bestätigt CC1 als Dimerisierungsdomäne	82

5.13 Proteinexpressionsanalysen in den NECAB2 KO Mäusen	85
5.13.1 Tendenziell herunterregulierte Expression von mGluR5 und A _{2A} R in den NECAB2 -/- Hirnlysaten	86
5.13.2 Kein signifikanter Expressionsunterschied der prä- und postsynaptischem Marker in den NECAB2 KO Synaptosomen	87
5.14 Kein signifikanter Expressionsunterschied von NECAB2 in phox47 -/- Mäusen	88
5.15 Signifikante Beeinträchtigung der sensorischen Reizverarbeitung und eine signifikant reduzierte Motivation in den NECAB2 KO Mäusen	90
6. DISKUSSION	93
6.1 NECAB2 dimerisiert Ca ²⁺ abhängig und hat mutmaßlich eine protektive Wirkung	93
6.2 Coiled-coiled 1 (CC1) Domäne vermittelt sowohl die Homodimerisierung als auch die Interaktion mit mGluR5	98
6.3 Tendenziell reduzierte Expression von mGluR5 und A _{2A} R in den NECAB2 KO Mäusen	100
6.4 NECAB2 KO Mäuse zeigen eine signifikante Beeinträchtigung der sensorischen Reizverarbeitung sowie eine signifikant reduzierte Motivation	104
6.5 Physiologische Rolle von NECAB2: Ein Modell	108
7. ZUSAMMENFASSUNG	111
8. SUMMARY	113
9. LITERATURVERZEICHNIS	115
ANHANG	132
Tabellenverzeichnis	132
Abbildungsverzeichnis	133
Genotypisierungsprotokoll	
Lebenslauf und Publikationsliste	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
°C	Grad Celcius
µg	mikrogramm
µL	mikroliter
µM	mikromolar
µm	mikrometer
A ₁ R	Adenosin Rezeptor 1
A _{2A} R	Adenosin Rezeptor 2A
A _{2B} R	Adenosin Rezeptor 2B
A ₃ R	Adenosin Rezeptor 3
ABM	Antibiotische Monooxygenase Domäne
AMP	Adenosin-Monophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Adenosinzyklase
BCA	Bicinchoninsäure
BIFC	Bimolekulare Fluoreszenz Komplementationsmikroskopie
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat
cc	<i>coiled-coil</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	(3[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1propansulfonat)
CHO	Chinesische Hamsterovarien
CREB	cAMP-response-element binding
CTB	Celltiterblue-Assay
D1R	Dopamin D1 Rezeptor
D2R	Dopamin D2 Rezeptor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindol
DARPP32	cAMP-reguliertes phosphoprotein
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DDM	n-Dodecyl-maltosid
DHPG	Dihydroxyphenylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethyl diamintetraacetat

EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N,N-tetraessigsäure
ERK	extrazelluläre signal-regulierte Kinase
ERK	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Rinderserum
GABA	γ -Aminobutyric acid
GDP	Guanin-Diphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanin-Triphosphat
h	hour (Stunde)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
IP	Immunopräzipitation
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
LB	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
mg	milligramm
mGluR5	metabotroper Glutamatrezeptor5
ml	milliliter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MSN	<i>Medium-sized spiny neurons</i>
mV	millivolt
NADPH	Nicotinamidadenindinkleotidphosphat
NECAB2	<i>Neuronal Calcium-Binding protein 2</i>
ng	nanogramm
NHR	<i>NECAB homology region</i>
NLS	Kernlokalisierungssequenz
nm	nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	Optische Dichte
OG	Octylglucosid
ORF	<i>Open reading frame</i> (Offener Leserahmen)
OTG	Octylthioglucoosid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI-3	Phosphat-Inositol-3

PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKA	Phosphokinase A
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
qPCR	Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>standard error mean</i>
STED	<i>Stimulated-emission-depletion</i>
TAE	Tris-Acetat-gepufferte Salzlösung
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat
ü.N.	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Striatum

1.1.1 Aufbau und Funktion des Striatums

Das Striatum ist Teil des Großhirns und das Eingangskerngebiet der Basalganglien. Die Basalganglien bilden eine Gruppe verbundener subcortikaler Kerne, die das Zwischenhirn, das Mittelhirn und das Großhirn umfassen (Albin et al., 1989). Zusammengesetzt ist das Striatum aus Putamen (Schalenkern) und Nucleus caudatus (Schweifkern). Entwicklungsgeschichtlich entstammen sie einer gemeinsamen Anlage und werden erst später von den Fasern der Capsula interna unvollständig getrennt. Beide Kerne sind funktionell eng miteinander verwandt. Die Faserzüge der Capsula interna, die auf ihrem Weg zwischen Thalamus und Cortex das Striatum durchziehen, geben dem Striatum seinen Namen. Das Striatum kann mikroskopisch in zwei unterschiedliche Komponenten getrennt werden. Die Matrix nimmt dabei 85% des gesamten Striatums ein. Die Striasomen sind kleine Felder, die in die Matrix eingelagert sind. Matrix und Striasomen sind aufgrund ihrer unterschiedlichen Faserverbindungen auch funktionell unterschiedlich (Goldman and Nauta, 1977; Graybiel, 1984).

Das Striatum ist das Schaltzentrum motorischer Impulse. Die Hauptaufgabe liegt in der inhibitorischen Integration motorischer Impulse. Dabei sind die Projektionsneurone (auch *medium-sized spiny neurons (MSN)* genannt, siehe 1.1.2) Hauptziel intrinsischer und extrinsischer Afferenzen (Parent and Hazrati, 1995). Das Striatum empfängt über cortikostriatale Bahnen exzitatorische (erregende), glutamaterge Impulse vom Cortex. Die MSNs projizieren striatonigral bzw. striatopallidal zum Globus pallidus internus/Substantia nigra-Komplex. Die MSNs sind GABA (γ -Aminobutyric acid)-positiv und besitzen inhibitorische (hemmende) Wirkung. Der Globus pallidus internus/Substantia nigra Komplex ist das Ausgangssystem der Basalganglien. GABA-erge Neurone in der Substantia nigra pars reticulata wirken hemmend und enden im Thalamus. Die thalamo-cortikalen Fasern sind erregend und enden schließlich wieder im Frontalcortex (Gerfen, 1992). Die Verschaltung zum internen Globus pallidus erfolgt dabei auf „direktem Weg“, während die Verschaltung über den externen Globus pallidus und Nucleus subthalamicus über den „indirekten Weg“ erfolgt. Die Aktivität des Thalamus' wird

bei der direkten Verschaltung erregt und bei der indirekten Verschaltung gehemmt. Das Ergebnis bestimmt, ob die Aktivität einer bestimmten Cortexregion über den Thalamus gehemmt oder enthemmt wird (Calabresi et al., 2014).

1.1.2 *Medium-sized spiny neurons (MSN)*-Projektionsneurone

Das Striatum besteht aus Projektionsneuronen, bzw. *medium spiny neurons* und Interneuronen. Dabei sind 90-95% *medium-sized spiny neurons* (Tepper and Bolam, 2004). Diese Neurone sind für die in 1.1.1 beschriebenen GABA-ergen Inhibitionen verantwortlich. Sie besitzen einen durchschnittlich großen Zellkörper von 20-25 µm Durchmesser und bilden umfangreiche dendritische Verzweigungen. Jede dieser Verzweigungen ist mit zahlreichen kleinen Dornen (*spines*) versehen, die die synaptischen Impulse der anderen Hirnregionen empfangen (Kemp and Powell, 1971; Wilson and Groves, 1980; Kawaguchi et al., 1990). MSNs werden anhand der von ihnen exprimierten Neuropeptide in zwei verschiedene Untergruppen unterteilt. Die Hälfte aller MSNs (striatonigrale Neurone) exprimiert Substanz P, Dynorphin und Dopamin D1 Rezeptoren und projiziert zum Globus pallidus internus und der *pars reticulata*, während die andere Hälfte aller MSNs (striatopallidale Neurone) Enkephalin und Dopamin D2 Rezeptoren exprimieren und diese in einem indirekten Signalweg zum Globus pallidus projizieren. 15% der striatopallidalen Neuronen exprimieren keinen der Dopaminrezeptoren, sondern stattdessen Neurokinin B (Gerfen, 1992). Ferner wurden auch MSNs gefunden, die beide Dopaminrezeptoren exprimieren (Meador-Woodruff et al., 1991). Es ist bekannt, dass die zwei Hauptuntergruppen homogen im Striatum verteilt sind und gegensätzliche Verhaltenseffekte haben, da sie an andere, äußere Signalwege mit gegensätzlichen Eigenschaften gekoppelt sind (Alexander et al., 1986).

MSNs besitzen sowohl eine rezeptive als auch eine projizierende Funktion. Die kortikalen und thalamischen extrinsischen Afferenzen (z.B. Glutamat) enden im Wesentlichen distal an den Köpfen der *Spines* (cortikostriatal) oder distal am Dendritenbaum (thalamostriatal) (Bouyer et al., 1984; Hattori et al., 1979; Somogyi et al., 1981; Sadikot et al., 1992). Nigrostriatale intrinsische Afferenzen (dopaminerg) formen symmetrische Synapsen an den *Spines*, wobei die Mehrheit der Afferenzen im Bereich des Halses der dendritischen *Spines* endet (Bouyer et al., 1984; Freund et al., 1984).

1.2 Synaptische Übertragung

Die wichtigste Funktion von Neuronen besteht in der Übertragung und Weiterleitung von Informationen. Die Zellkörper der Neurone sind durch zwei Arten von Fortsätzen, die Dendriten und das Axon, charakterisiert. Dabei nehmen die Dendriten die Erregung anderer Neurone auf und leiten diese zum Zellkörper weiter. Das Axon hingegen leitet die Erregung vom Zellkörper fort und gibt sie an die Dendriten anderer Neurone weiter. Die Verknüpfung von zwei Neuronen wird als Synapse bezeichnet. Synapsen übertragen die Informationen in Form von Aktionspotentialen.

Bei den Synapsen unterscheidet man zwischen elektrischen und chemischen Synapsen. Bei elektrischen Synapsen (auch *gap junctions* genannt) lagern sich jeweils sechs Connexin-Moleküle benachbarter Neurone an der Membran aneinander und bilden so eine Pore zwischen beiden aus. Die Pore erlaubt eine elektrische Kopplung beider Neurone (Kumar and Gilula, 1996; Bruzzone and Ressot, 1997; Roerig and Feller, 2000).

Chemische Synapsen bestehen aus einem prä- und einem postsynaptischen Teil (Abbildung 1.1). Getrennt werden beide durch einen 20-30 nm synaptischen Spalt. Durch die Trennung kann ein Aktionspotential nicht unmittelbar von der präsynaptischen Zelle auf die Membran der postsynaptischen Zelle übertragen werden. In diesem Fall gibt ein chemischer Botenstoff (Transmitter) die elektrische Erregung der präsynaptischen Zelle an die postsynaptische Zelle weiter, wo sie wieder in elektrische Erregung umgewandelt wird (Collingridge and Lester, 1989). Alle chemischen Synapsen besitzen kleine, membran-gebundene synaptische Vesikel innerhalb der präsynaptischen Zelle. In diesen Vesikeln sind ein oder mehrere Neurotransmitter gespeichert, die bei Erregung freigesetzt werden. Die Synthese der Neurotransmitter ist damit zeitlich von der Ausschüttung getrennt.

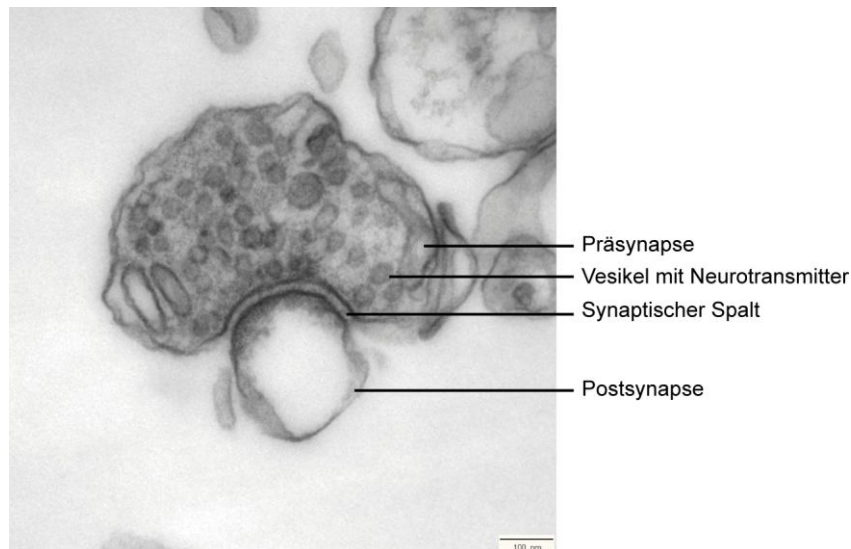


Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer striatalen Synapse einer Wildtyp-Maus (aufgenommen von Andrea Hellwig, Heidelberg).

Erfolgt eine präsynaptische Depolarisation durch spannungsabhängige Calciumkanäle (Augustine et al., 1987; Fillenz, 1995; Schneggenburger and Neher, 2000), kommt es zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration im Zytoplasma. Die erhöhte Calciumkonzentration bewirkt daraufhin die Exozytose der transmittergefüllten Vesikel und anschließend die Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt (Hall and Sanes, 1993). Eine mögliche Konformationsänderung eines Proteinkomplexes zwischen präsynaptischer Membran und Vesikelmembran, bedingt durch die erhöhte Calciumkonzentration, führt zur Verschmelzung beider Membranen und zur Freisetzung des Transmitters in den synaptischen Spalt (Benfenati et al., 1999). Der Proteinkomplex enthält die Proteine RIM, Munc13, RIM-BO, α -liprin und ELKS und dockt an synaptische Vesikel für die Exozytose an. Anschließend werden die Ca^{2+} -Kanäle mithilfe des Komplexes an den Platz der Exozytose rekrutiert und die aktive Zone exakt auf die gegenüberliegende Seite der Postsynapse mithilfe von transsynaptischen Zell-Adhäsionsmolekülen positioniert. Ferner steuert der Komplex die Kurzzeit- und Langzeitplastizität als Folge des Feuerns der Aktionspotentiale (Südhof, 2012a; Südhof and Rizo, 2011; Südhof, 2012b).

An der postsynaptischen Membran verursachen die an die Transmitter gebundenen spezifischen Rezeptoren eine Leitfähigkeitsänderung der Membran. Die Leitfähigkeitsänderung wird entweder als ligandengesteuerter Ionenkanal direkt oder

als G-Protein gekoppelter metabotroper Rezeptor indirekt herbeigeführt (Wisden and Seeburg, 1993; Nakanishi, 1994; Hollmann and Heinemann, 1994). In Abhängigkeit von der De- oder Hyperpolarisation des postsynaptischen Neurons, hat der Transmitter eine hemmende oder erregende Wirkung. Wird im postsynaptischen Neuron aufgrund von räumlicher oder zeitlicher Integration der Eingänge über verschiedene Synapsen ein Aktionspotential ausgelöst, kann das zur Sekretion von Transmittern an den nachgeschalteten präsynaptischen Zellen führen (Mainen and Sejnowski, 1996).

Kommt es zu einer exzessiven Aktivierung bestimmter postsynaptisch lokalisierter Rezeptoren, entsteht als Folge Exzitotoxizität. Exzitotoxizität ist ein pathologischer Prozess, bei dem Nervenzellen aufgrund von exzessiver Stimulation von Neurotransmitterrezeptoren geschädigt werden und/oder sterben können. N-Methyl-D-Asparat (NMDA) Rezeptoren sind ein bekanntes Beispiel für Exzitotoxizität. Die Überaktivierung von NMDA Rezeptoren spielt eine zentrale Rolle bei akuten, neurologischen Erkrankungen, wie Schlaganfall oder chronischen, neurologischen Erkrankungen wie Alzheimer (Choi, 1988; Lipton, 2004; Meldrum, 1993; Rothstein, 2009). Der Mechanismus der Exzitotoxizität ist weitestgehend aufgeklärt. Damit es zum Absterben von Nervenzellen kommt, wird die Calcium-abhängige Produktion von Stickstoffmonoxid und Superoxid benötigt (Brennan et al., 2009; Lafon-Cazal et al., 1993; Patel et al., 1996; Sattler et al., 1999; Pacher et al., 2007). In Folge des Calciumeinstroms durch die NMDA-Rezeptoren wird Stickstoffmonoxid von der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase produziert (Sattler et al., 1999). Die Produktion von Superoxid wurde lange Zeit als Konsequenz mitochondrialer Calciumaufnahme betrachtet (Keelan et al., 1999; Stout et al., 1998). Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass die NADPH Oxidase die Hauptquelle des NMDA-induzierten Superoxids ist (Girouard et al., 2009; Alekseenko et al., 2012; Reyes et al., 2012). Die neuronale NADPH Oxidase wurde in früheren Arbeiten bereits als Quelle für oxidativen Stress bei Schlaganfall und anderen Erkrankungen identifiziert (Chen et al., 2010; Behrens et al., 2007; Sorce and Krause, 2009). NOX2 ist eine Isoform der NADPH Oxidase und wird von Neuronen exprimiert. NOX2 ist aus zwei membrangebundenen Untereinheiten ($p22^{\text{phox}}$ und $gp91^{\text{phox}}$) und drei zytosolischen Untereinheiten aufgebaut: $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ und $p40^{\text{phox}}$. Phosphorylierung von $p47^{\text{phox}}$ induziert ihre Translokation zu Zellmembranen, wo es mit anderen Untereinheiten, mit Membranphospholipiden und Rac GTPasen interagiert, um einen aktiven

Enzymkomplex zu formen (Bedard and Krause, 2007; Dang et al., 2001). Brennan et al. konnten zeigen, dass NMDA die Superoxid Produktion durch einen Signalweg induziert, bei dem PI3K (Phosphoinosid-3-Kinase) involviert ist (Brennan-Minnella et al., 2013a). Der durch die NMDA-Untereinheit (NR2B) vermittelte Calciumeinstrom induziert PI3K, um PI(3,4,5)P3 zu bilden. PI(3,4,5)P3 aktiviert PKC ζ , welches die p47^{phox} Untereinheit von NOX2 phosphoryliert. Die Phosphorylierung von p47^{phox} induziert daraufhin den Zusammenschluss des aktiven NOX2 Komplexes an der Zelloberfläche und die Produktion von Superoxid. Diese Ergebnisse zeigen, dass Calciumeinstrom, speziell durch NMDA Rezeptoren, zu exzitotoxischem Zelltod durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) führen kann (Brennan-Minnella et al., 2013a). Frühere Studien konnten ebenfalls zeigen, dass Rezeptoren mit einer NR2B Untereinheit selektiv verantwortlich für exzitotoxischen neuronalen Zelltod sind (Martel et al., 2012). Des Weiteren konnten Brennan et al. (2013) allerdings auch zeigen, dass ebenfalls durch Ionomycin induzierte hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen zur Superoxidproduktion führen können. Damit könnte der neuronale Zelltod unabhängig von NOX2 sein und mutmaßlich auch über einen anderen Calcium-induzierten Signalweg entstehen (Brennan-Minnella et al., 2013a).

1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind Sensoren, die Botenstoffe und äußere Reize wahrnehmen. Ihre Aktivität steuert viele physiologische Prozesse, wie Entzündung, Zellbewegung, Transport von Stoffen, sowie die Wirkung von Hormonen und Neurotransmittern. GPCRs bilden mit 800 Mitgliedern die größte Familie der Zelloberflächentransmembranproteine im menschlichen Genom. Strukturell weisen sie typischerweise sieben Transmembrandomänen auf. Das heißt, sie sind heptohelikal. Basierend auf ihrer Sequenzhomologie innerhalb der sieben Transmembrandomänen werden die GPCRs in fünf Familien unterteilt: die Rhodopsinfamilie (701 Mitglieder), die Adhäsionsfamilie (24 Mitglieder), die frizzle/tastefamilie (24 Mitglieder), die Glutamatfamilie (15 Mitglieder) und die Secretinfamilie (15 Mitglieder). Neben den sieben Transmembrandomänen besitzen alle GPCRs einen extrazellulären Aminoterminus und einen intrazellulären Carboxylterminus. Dabei weist der Aminoterminus hingegen die größte Diversität auf. Dessen Sequenzlänge kann zwischen 10-50 Aminosäuren bei Monoamin- und

Peptidrezeptoren sowie 350-600 Aminosäuren bei Glycoproteinrezeptoren und Glutamatrezeptoren variieren.

GPCRs werden durch eine große Vielfalt natürlicher Liganden aktiviert und bilden wichtige Angriffspunkte für Arzneistoff-basierte Therapien. 50% aller pharmazeutisch genutzten Wirkstoffe sind Liganden von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Flower, 1999). Zu den natürlichen Liganden der GPCRs gehören subatomare Partikel (Photonen), Ionen (H^+ , Ca^{2+}), *small molecules*, Peptide sowie Proteine. Während die kleinen, organischen Agonisten innerhalb der Transmembrandomänen binden, binden Peptidhormone und Proteine häufig an den Aminoterminus und den extrazellulären Sequenzen, die mit den Transmembrandomänen verbunden sind. Unabhängig von der Größe binden allerdings Glycoproteinrezeptoren, Glutamat und Ca^{2+} an der großen Aminoterminalen Domäne (Ji et al., 1998; Pin et al., 2003; Kobilka, 2007).

Verschiedene Publikationen verweisen darauf, dass GPCRs als Dimere existieren und dass diese Dimere vermutlich für die G-Protein Aktivierung einiger GPCR Familien wichtig sind (Gurevich and Gurevich, 2008; Devi, 2001; Damian et al., 2006; Terrillon and Bouvier, 2004). Offensichtlich ist die Dimerisierung ein wichtiger Mechanismus der Aktivierung der Glutamatfamilie (Pin et al., 2003; Pin et al., 2004).

Kommt es zur Rezeptoraktivierung durch einen Liganden (bspw. Adrenalin), wird durch Konformationsumwandlung des Rezeptors die Bindungsstelle für heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) freigelegt. G-Proteine sind aus drei Untereinheiten (α -Untereinheit und dem Komplex der β/γ Untereinheit) aufgebaut (Hamm and Gilchrist, 1996). Der Ligand-Rezeptorkomplex assoziiert mit dem G-Protein. Das G-Protein wird daraufhin zum Austausch von GDP zu GTP aktiviert. Der Austausch führt dabei zur Dissoziation der α -GTP-Untereinheit vom restlichen G-Protein. Die α -Untereinheit diffundiert entlang der Membran, bis es auf ein membrangebundenes Enzym (hier: Adenylatzyklase) stößt, welches durch die Untereinheit angeschaltet wird. Dieses Enzym katalysiert dann in diesem Fall die Bildung von cAMP aus ATP. cAMP kann daraufhin die Proteinkinase A aktivieren, welche dann Empfängerproteine phosphoryliert (Abbildung 1.2).

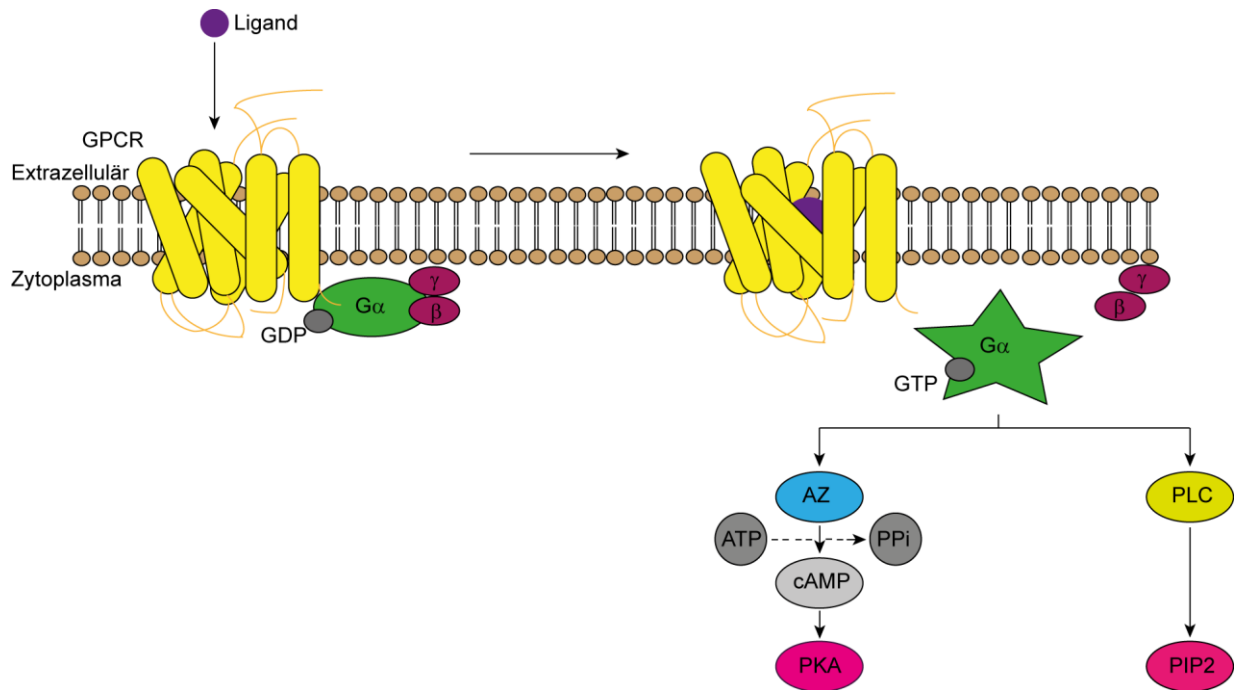


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des $G\alpha$ -vermittelten GPCR Signalweges.

Bei der Aktivierung des zunächst inaktiven GDP-gebundenen Rezeptorkomplexes durch einen Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zum Austausch von GDP in GTP. Der GTP gebundene Komplex ist instabil und dissoziiert in die drei Untereinheiten (α , β , γ). Die aktivierten G-Proteine können nun die durch den Liganden übertragenden Signale ins Zellinnere leiten. Die α -Untereinheiten der G_s /olf können zum Beispiel die Adenylatzyklase (AZ) modulieren, während die α -Untereinheiten der $G_q/11$ die Phospholipase C (PLC) aktivieren können. Während die Aktivierung der PLC zur Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) führt, resultiert die Aktivierung der AZ in der Synthese von cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) aus ATP und in der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA).

1.4 Striatale GPCRs

1.4.1 Adenosin A_{2A} -Rezeptor ($A_{2A}R$)

Adenosin spielt im zentralen Nervensystem eine regulatorische Rolle, entweder als präsynaptischer, postsynaptischer und/oder nicht-synaptischer Neuromodulator und aktiviert Adenosinrezeptoren (Sebastião and Ribeiro, 2000). Diese gehören zu den GPCRs und bestehen aus mehreren Subtypen: A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 . (Fredholm et al., 2011; Fredholm et al., 2001). Abhängig vom Rezeptorsubtyp wird die Adenylatzyklase (AZ) inhibiert oder stimuliert. Die A_{2A} Rezeptoren sind an G_s Proteine gekoppelt (Marala and Mustafa, 1993) und stimulieren dadurch die Adenylatzyklase. Daraus resultiert die Bildung des Signalmoleküls cAMP aus ATP.

Im Striatum ist cAMP die Hauptquelle des extrazellulären Adenosins (Fredholm, 1995). cAMP wird zunächst von Phosphodiesterasen zu AMP und dann von der

Ectoenzym 5'-Nukleotidase zu Adenosin metabolisiert. cAMP wird, wie bereits oben erwähnt, nur von der Adenylatzyklase generiert. Striatales extrazelluläres Adenosin erhöht wiederum die Aktivierung der Rezeptoren und damit die Synthese der Adenylatzyklase. Striatales Adenosin wird demnach in einem positiven Feedback-Mechanismus synthetisiert (Ciruela et al., 2010).

Der A_{2A} -Rezeptor wird in einigen Regionen des Gehirns hoch exprimiert: Striatum, Tuberculum olfactorium und Nucleus accumbens (Schiffmann et al., 1991; Fredholm, 1995, Ferre et al., 1991; Rosin et al., 1998). Hauptsächlich sind A_{2A} Rezeptoren in Synapsen lokalisiert und spielen eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der synaptischen Plastizität (Cunha et al., 2008). Präsynaptische A_{2A} Rezeptoren konnten in Dendriten und dendritischen *Spines* von striatalen GABA-ergen Rattenneuronen gefunden werden (Hettinger et al., 2001; Ciruela et al., 2006a) und spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Glutamatfreisetzung. Des Weiteren sind sie an der Abschaltung der A_{1R} -gesteuerten Inhibierung der synaptischen Übertragung (Lopes et al., 1999; Ciruela et al., 2006a) beteiligt, welches andererseits die Möglichkeit der Erhöhung der synaptischen Effizienz nach neuronaler Aktivität ausschließen würde. Postsynaptische A_{2A} Rezeptoren hingegen können N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren kontrollieren. Diese Ergebnisse liefern die mechanistische Grundlage, um zu verstehen, warum die pharmakologische bzw. genetische Blockierung von A_{2A} Rezeptoren die Langzeit-Potenzierung an verschiedenen exzitatorischen Synapsen schwächen kann (Wirkner et al., 2004 ; Rebola et al., 2008 ; Higley and Sabatini, 2010; d'Alcantara et al., 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass A_{2A} Rs eine Schlüsselrolle in der Feinabstimmung der glutamatergen Neurotransmission in striatalen GABA-ergen Neuronen auf der postsynaptischen, als auch auf der präsynaptischen Ebene spielen (Ferré et al., 2007a; Ciruela et al., 2006a; Ciruela et al., 2006b; Ferré et al., 2007b).

1.4.2 Metabotroper Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5)

Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs) werden durch die Aminosäure Glutamat aktiviert. Im Gegensatz zu den ionotropen Glutamatrezeptoren, die ebenfalls durch Glutamat aktiviert werden, sind metabotrope Glutamatrezeptoren keine Ionenkanäle sondern G-Protein gekoppelte Rezeptoren.

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Zentralen Nervensystem von Säugetieren (Mayer and Westbrook, 1987) und ist an vielen physiologischen Funktionen wie Lernen, Erinnerung und Entwicklung beteiligt. Die mGluR Familie zeigt keine Sequenzhomologie zu anderen GPCRs. Alle Mitglieder besitzen eine große extrazelluläre Domäne, sieben mutmaßliche Transmembrandomänen, getrennt von kleinen intra- und extrazellulären Loops, sowie eine zytoplasmatische Carboxylterminale Domäne, die variabel in ihrer Länge ist. Des Weiteren sind 19 Cysteinreste in der extrazellulären Domäne und in den extrazellulären Loops in allen Mitgliedern der Rezeptorfamilie konserviert (Conn and Pin, 1997).

Die mGluR Familie besteht aus acht Mitgliedern und wird anhand ihrer Sequenzhomologie, Agonistenspezifität und Signaltransduktionswege in drei Subgruppen unterteilt (Nakanishi, 1992). mGluR5 gehört, wie mGluR1, zu den Gruppe I Rezeptoren. Diese sind an den Phospholipase C (PLC) Signalweg, der zur Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem ER führt (Hermans and Challiss, 2001), den extrazellulären signal-regulierten Kinase (ERK) Signalweg (Peavy and Conn, 1998), sowie den p38 Signalweg gekoppelt (Mukherjee et al., 1999).

mGluR5 ist stark in der CA1 und der CA3 Region des Hippocampus, sowie im Gyrus dentatus, im lateralen Septus Kern, im Striatum und im Cortex exprimiert (Abe et al., 1992; Joly et al., 1995). Im Striatum werden die mGluR5 Rezeptoren von *medium spiny* GABA Neuronen sowie von allen Interneuronen exprimiert. Hauptsächlich sind mGluR5 Rezeptoren postsynaptisch lokalisiert. Es wurde jedoch auch eine präsynaptische Lokalisierung beschrieben (Rodrigues et al., 2005). mGluR5 wird in zwei Splicevarianten exprimiert: mGluR5a und mGluR5b. mGluR5b enthält 33 Aminosäuren mehr im Innern der intrazellulären C-terminalen Domäne (Minakami et al., 1994). Möglicherweise spielen die zwei Splicevarianten unterschiedliche mGluR5-gesteuerte Funktionen während des Entwicklungszeitraums und in unterschiedlichen Hirnregionen (Romano et al., 2002).

Wie bereits in 1.3 beschrieben, können G-Protein gekoppelte Rezeptoren Signalwege anschalten. mGluR5 Rezeptoren werden von diversen Agonisten wie Glutamat, Dihydroxyphenylglycin (DHPG), Quisqualisäure und 1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylate (ACPD), aktiviert, wobei Quisqualisäure der potenteste Agonist ist (Pin and Duvoisin, 1995). Nach der Aktivierung bindet mGluR5

an das G_q Protein und aktiviert dadurch die Phospholipase C (PLC). PLC spaltet anschließend ein Phospholipid. Das dadurch entstehende Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) wird dann in Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃) gespalten. Da IP₃ hydrophil ist diffundiert es zum endoplasmatischen Retikulum, wo es an den IP₃ Rezeptor bindet, der ein Calciumkanal ist und so die zytosolische Calciumkonzentration erhöht. Das lipophile Diacylglycerol bleibt in der Membran und agiert als Cofaktor für die Aktivierung der Proteinkinase C.

Wie bereits beschrieben sind mGluRs durchgehend stark in den Basalganglien exprimiert. Dort sind sie für verschiedene wichtige Funktionen, z.B. in der Regulierung neuronaler Erregbarkeit und synaptischer Übertragung, verantwortlich (Marino et al., 2012; Marino and Conn, 2002). Des Weiteren nehmen mGluR1/5 Rezeptoren eine regulierende Rolle bei der Exzitotoxizität ein. In den MSNs verstärkt die Aktivierung der mGluR5 Rezeptoren die NMDA-Rezeptoraktivität (Domenici et al., 2004; Pisani et al., 2001). Dadurch kommt es zu einer erhöhten Glutamatausschüttung in den synaptischen Spalt, sodass das Magnesiumion, welches den NMDA Rezeptor im Normalzustand blockiert, verdrängt wird und die Zelle geöffnet werden kann. Anschließend fließen vermehrt Calciumionen in die postsynaptische Nervenzelle und können so eine Calcium-induzierte Apoptose auslösen. Eine zusätzliche Verstärkung der NMDAR-Aktivität kann durch Acetylcholin erreicht werden. Acetylcholin wird in Folge der mGluR5 Aktivierung in striatalen Neuronen ausgeschüttet (Marti et al., 2003; Valenti et al., 2002; Poisik et al., 2003). Die enge Interaktion zwischen mGluR5 und NMDA Rezeptoren wird aufgrund einer Kette verankerter Proteine ermöglicht. Dabei bilden PSD95 (postsynaptic density-95), Shank und Homer mit dem NMDA Rezeptor und dem mGluR5 ein *Cluster* in der gleichen synaptischen Region (Tu et al., 1999). Die kombinierte Aktivierung von mGluR5 und NMDA-Rezeptoren in den MSNs aktiviert durch schnelle Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren ELK1 und *cyclic AMP responsive element-binding protein* (CREB) die Genexpression. Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB wird zum einen von *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2), einem Mitglied des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweges und zum anderen durch die Inhibierung der Proteinphosphatasen 1 und 2A vermittelt (Mao and Wang, 2003; Mao and Wang, 2001; Choe et al., 2004).

1.4.3 Dopaminrezeptoren

Eine weitere Familie der striatalen GPCRs stellen die fünf Untergruppen der Dopaminrezeptoren dar, die in zwei Hauptgruppen unterteilt werden können, den Dopamin D1-Klasse- und den Dopamin D2-Klasse Rezeptoren (Andersen et al., 1990; Niznik and Van Tol, 1992; Sibley and Monsma, 1992). Die einzelnen Mitglieder der Unterfamilien der D1-Klasse und D2-Klasse Rezeptoren weisen homologe Transmembrandomänen auf und besitzen individuelle pharmakologische Eigenschaften.

Es wird allgemein angenommen, dass die D1-Klasse Dopaminrezeptoren, zu denen die Rezeptoren D1 und D5 gehören, die $G_{s/olf}$ Familie der G Proteine aktivieren um die cAMP Produktion der Adenylatzyklase und die Aktivität der Protein Kinase A (PKA) zu stimulieren. Diese Rezeptoren sind ausschließlich postsynaptisch in dopaminempfangenen Zellen, wie den GABA-ergen MSNs im Striatum zu finden. Die D2-Klasse Dopaminrezeptoren (D2, D3 und D4) koppeln an die $G_{i/o}$ Familie der G Proteine und induzieren dabei die Inhibierung der Adenylatzyklase und reduzieren damit die PKA Aktivität (Missale et al., 1998; Keibadian and Greengard, 1971; Enjalbert and Bockaert, 1983). Im Vergleich zu den D1-Klasse Rezeptoren werden die D2 und D3 Dopaminrezeptoren postsynaptisch in Dopamin Zielzellen und auch präsynaptisch in dopaminergen Neuronen exprimiert (Sokoloff et al., 2006; Rankin et al., 2006; Rondou et al., 2010).

Dopaminrezeptoren besitzen ein breites Expressionsspektrum im Hirn und in der Peripherie. D1 Rezeptoren werden dabei stark in den nigrostriatalen, mesolimbischen und mesocortikalen Bereichen wie dem Striatum, dem Nucleus accumbens, der Substantia nigra, dem Olfactorus bulbus, der Amygdala und dem Frontalcortex exprimiert. Eine schwache Expression wurde im Hippocampus, im Cerebellum, in den thalamischen und in den hypothalamischen Bereichen gefunden (Missale et al., 1998; Gerfen, 2000; Sokoloff et al., 2006; Rankin et al., 2006). Die Dopamin D2 Rezeptoren weisen die höchste Expression im Striatum, im Nucleus accumbens und im Olfactorus bulbus auf. Weiterhin werden die D2 Rezeptoren in der Substantia nigra, im ventralen Tegmentum, im Hypothalamus, in den cortikalen Bereichen, im Septum, in der Amygdala sowie im Hippocampus exprimiert (Missale et al., 1998; Gerfen, 2000; Vallone et al., 2000; Seeman, 2006).

Wie bereits in 1.1.2 erwähnt, können MSNs klar in zwei prinzipielle Untergruppen eingeteilt werden. Sie unterscheiden sich anhand ihrer Projektionslage und ihrer Proteine, welche sie exprimieren. MSNs, die zum medialen Globus pallidus und der Substantia nigra reticulata projizieren, tragen zu dem direkten striatonigralen Signalweg bei und exprimieren vorwiegend Dopamin D1 Rezeptoren. Eine andere Gruppe an MSNs, die zum lateralen Globus pallidus projiziert und gezielt die Dopamin D2 Rezeptoren exprimiert, bildet den indirekten striatopallidalen Signalweg. Dieser Signalweg erreicht durch synaptische Verschaltung im lateralen Globus pallidus und den subthalamischen Kernen indirekt die Substantia nigra pars reticulata. Wie ebenso bereits erwähnt, gibt es eine weitere Population an MSNs, die beide Dopaminrezeptoren (D1 und D2) exprimiert. Diese Population stellt etwa 5-15 % im dorsalen Striatum dar (Valjent et al., 2009).

Der Ligand der Dopaminrezeptoren ist der Neurotransmitter Dopamin. Dopamin ist ein Metabolit der Aminosäure Tyrosin und spielt im zentralen Nervensystem z.B. bei Belohnung, im Schlaf, bei der Aufmerksamkeit und beim Lernen eine wichtige Rolle (Carlsson et al., 1957; Snyder et al., 1970; Missale et al., 1998; Sibley, 1999; Carlsson, 2001). Den stärksten Effekt hat Dopamin auf die lokomotorische Aktivität. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die lokomotorische Aktivität durch D1, D2 und D3 Dopaminrezeptoren kontrolliert wird. Der Einfluss der Dopamin D2 Rezeptoren (D2R) ist dabei sehr viel komplexer aufgrund seiner prä- und postsynaptischen Expression (Missale et al., 1998; Sibley, 1999). Aktivierung von präsynaptischen D2-Rezeptoren verursacht im Allgemeinen eine Abnahme der Dopaminausschüttung, was wiederum eine verminderte lokomotorische Aktivität zur Folge hat, während die Aktivierung der postsynaptischen Rezeptoren die lokomotorischen Fähigkeiten stimuliert. Dopamin D2 Rezeptoren scheinen in der präsynaptischen Regulierung der Feuerrate, der Dopaminsynthese und der Dopaminausschüttung involviert zu sein. Es ist jedoch zu erwähnen, dass die beiden Splicevarianten der Dopamin D2 Rezeptoren, D2L und D2S, vermutlich eine unterschiedliche neuronale Verteilung haben. Während D2S vorwiegend präsynaptisch exprimiert wird, wird D2L eher postsynaptisch exprimiert (Usiello et al., 2000; De Mei et al., 2009). Des Weiteren scheinen Dopamin D2 Rezeptoren eine entscheidende Rolle in den psychotischen Reaktionen bei Schizophrenie oder bei bipolaren Störungen zu spielen, da alle klinisch wirksamen antipsychotischen Medikamente die Fähigkeit besitzen, den Dopamin D2 Rezeptor zu blockieren

(Snyder et al., 1970; Roth et al., 2004). Ferner spielt Dopamin eine entscheidene Rolle in der Motivation bzw. im Belohnungssystem. Fehlende Motivation bzw. Antriebslosigkeit wird mit einem Dopaminmangel in Verbindung gebracht (Phillips and Fibiger, 1973; Wise, 1985). Der wichtigste neurochemische Signalweg des Belohnungssystems ist der mesocorticolimbische Signalweg, der sowohl den mesolimbischen als auch den mesocorticalen Signalweg beinhaltet. Das ventrale Tegmentum (VTA) ist dabei ein Ausgangspunkt vieler Dopaminsignalwege im Hirn. Zum einen empfängt die laterale Habenula dopaminerge Informationen von der Substantia nigra und dem ventralen Tegmentum (Méndez et al., 2001), zum anderen projiziert die laterale Habenula auf die Mittelhirnkerne des ventralen Tegmentum und der Substantia nigra (Araki et al., 1988).

Die drei hier beschriebenen GPCRs wirken im Striatum zusammen (Abbildung 1.2). So konnte gezeigt werden, dass Dopamin D2 Rezeptoren Komplexe mit mGluR5 allein, mit A_{2A}R allein oder zusammen mit mGluR5 und A_{2A}R eingehen (Fuxe et al., 2015; Díaz-Cabiale et al., 2002). Dabei zeigten beispielsweise Ligandenbindeassays in Membranpräparationen des Rattenstriatums eine Interaktion von A_{2A}R, mGluR5 und D2R an der Membran in den GABA-ergen striatopallidalen Neuronen (Ferré et al., 1999; Popoli et al., 2001; Rimondini et al., 1999). Während Adenosin A1 Rezeptoren mit Dopamin D1 Rezeptoren heteromere Komplexe eingehen können (Ginés et al., 2000), bilden Adenosin A2 Rezeptoren einen Komplex mit Dopamin D2 Rezeptoren (Hillion et al., 2002). A_{2A}R und D2R werden striatopallidal prä- und postsynaptisch exprimiert und spielen eine Schlüsselrolle in der Regulierung neuronaler Aktivität (Zhu et al., 2003). Es wird angenommen, dass Adenosin und Dopamin eine antagonistische Interaktion im Striatum zeigen. Während A_{2A}R Aktivierung mit der Stimulation von cAMP assoziiert wird, resultiert die Aktivierung des D2R in einer Inhibierung von cAMP (vgl. Abbildung 1.2). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Stimulierung der A_{2A} Rezeptoren durch einen Agonisten wie CGS21680 einen ähnlichen Effekt bewirkt wie bei einer Blockierung des Dopamin D2 Rezeptors durch einen Antagonisten (Ferre et al., 1991b; Ferre et al., 1993).

Neben dem Einfluss des A_{2A} Rezeptors auf den D2R kann auch die Aktivierung von mGluR5 die synaptische Antwort auf Dopamin beeinflussen, indem die Aktivität von Dopamin- und cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP32) reguliert wird.

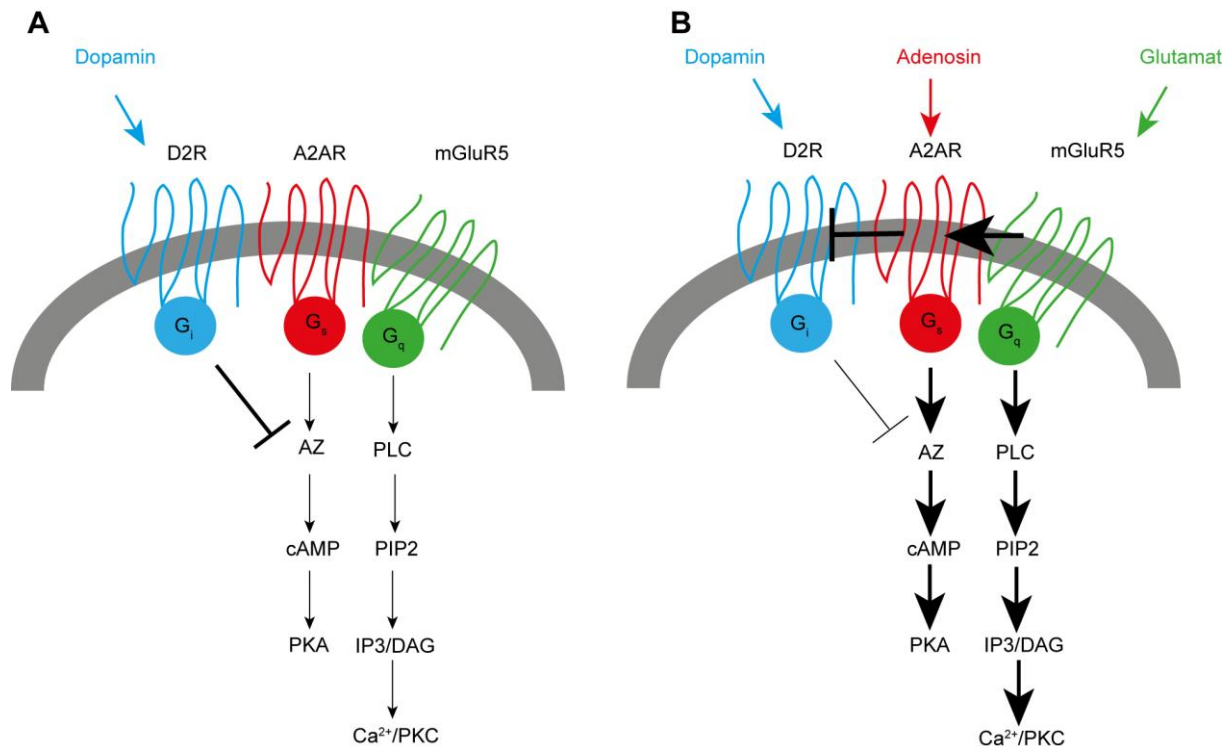


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Zusammenspiels vom D2R, A_{2A}R und mGluR5 in der Postsynapse. (A) Unter unaktivierten Bedingungen mit geringer Adenosin- und Glutamatkonzentration wird der D2R Signalweg begünstigt und die Adenylatzyklase (AZ) Aktivität gehemmt. (B) Unter aktivierten Bedingungen mit hohen Konzentrationen an Glutamat und Adenosin interagieren A2AR-mGluR5 synergistisch und wirken dem D2R Signalweg entgegen. Dabei wird sowohl die AZ als auch die Phospholipase C (PLC) aktiviert und der jeweilige Signalweg angeschaltet. cAMP=cyclic Adenosine Monophosphate, PKA=Phosphokinase A, PIP2= Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, IP3=Inositol 1,4,5-trisphosphat, DAG=Diacylglycerol, PKC=Phosphokinase C.

Wird DARPP-32 mit Hilfe der Protein Kinase A (PKA) an der Aminosäureposition 34 des Threonins phosphoryliert, wird DARPP32 zu einem Inhibitor der Protein Phosphatase umgewandelt und verstärkt dabei das Dopamin D1 Signalling. Dieses Signalling wird allerdings durch die Aktivierung der mGluR5 Rezeptoren inhibiert, indem die Aktivität der Casein 1 (CK1) und *Cyclin-dependent kinase 5* (CDK5) stimuliert wird. Diese Kinasen phosphorylieren wiederum Thr75 und Ser137 an DARPP32 und wandeln es zu einem Inhibitor der PKA um. mGluR5 agiert wiederum auch mit A_{2A}R synergetisch zusammen, um *downstream* Ereignisse sowie die Aktivierung der MAPK voranzutreiben (Nishi et al., 2003). Ebenfalls eine Aktivierung der MAPK und damit ein erhöhtes ERK Signalling wird bei einer Blockierung des Dopamin D2 Rezeptors durch einen Antagonisten wie Haloperidol erreicht (Pozzi et al., 2003). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Zusammenspiel von

mGluR5 und A_{2A} Rezeptoren der dopaminergen Übertragung in striatalen MSNs im indirekten Signalweg entgegenwirkt (Liu et al., 2002; Liu et al., 2001).

1.5 Neuronal Ca²⁺-Binding protein 2 (NECAB2)

1.5.1 Die Neuronal Ca²⁺-Binding protein (NECAB)-Familie

NECAB1-3 sind Mitglieder der Neuronal Ca²⁺-Binding protein Familie. Sugita et al. (2002) haben diese Proteinfamilie molekular charakterisiert und ihr den Namen NECABs gegeben (Sugita et al., 2002). Alle NECAB Proteine besitzen drei homologe Domänen: zwei N-terminale EF-Hand Domänen, die für die Calciumbindung verantwortlich sind. Eine zentrale, einzigartige und hoch konservierte Domäne, welche als *NECAB homology region* (NHR) bezeichnet wird und eine C-terminale DUF167 Domäne bzw. eine antibiotische Monooxygenase Domäne (ABM), deren Funktion zumindest im Eukaryonten bisher nicht geklärt ist (Sugita et al., 2002).

NECABs werden vorwiegend im Hirn (NECAB1 und 2) bzw. im Hirn, Herz und Muskelgewebe (NECAB3) in Vertebraten exprimiert (Sugita et al., 2002). In Invertebraten hingegen konnte keine Expression nachgewiesen werden (Sugita et al., 2002). Die biologische Funktion der NECAB Proteine ist weitestgehend unbekannt.

Initial wurde das NECAB1 Protein mittels Ca²⁺-Affinitätschromatographie isoliert. Dabei diente die C2A Domäne von Synaptotagmin 1 (Syt1) als Matrix. Synaptotagmine sind eine Gruppe von 15 an Zellmembranen lokalisierten Proteinen, die neben einer Transmembrandomäne zwei C-terminale C2 Domänen besitzt (C2A und C2B). Synaptotagmine binden Calcium und dienen vermutlich als Calciumsensoren, die bei der Freisetzung von Hormonen und Neurotransmittern beteiligt sind (Pang et al., 2006)

NECAB1 ist vorwiegend in kortikalen, pyramidalen Neuronen der CA4 Region im Hippocampus, in inhibitorischen Interneuronen und pyramidalen Zellen der CA2 Region des Hippocampus im Maushirn lokalisiert (Sugita et al., 2002; Sugita and Südhof, 2000).

NECAB2 wurde initial *Necab* genannt und besteht aus 389 Aminosäuren. Es wurde als *Downstream Target* von Pax 6 in der Maus Retina identifiziert. Pax6 ist in der retinalen Entwicklung involviert (Wolf et al., 2009). Weiter wurde NECAB2 als Interaktionspartner des zytoplasmatischen Teils von Neuroligin identifiziert. Neuroligine sind Transmembranmoleküle auf der postsynaptischen Seite, die mit

dem *scaffold* Protein PDZ95 interagieren (Zang, 2008). Des Weiteren ist NECAB2 ein Bindungspartner des A_{2A} Rezeptors (Canela et al., 2007), interagiert mit dem metabotropischen Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5) und beeinflusst den MAPK Signalweg (Canela et al., 2009). Auf das Vorkommen, den Aufbau und die Interaktion von NECAB2 mit A_{2A}R und mGluR5 wird in den Kapiteln 1.5.2, 1.5.3 und 1.5.4 eingegangen.

NECAB3, auch bekannt als XB51, wurde als Interaktionspartner des neuron-specific *X-11-like* protein (X11L) isoliert (Lee et al., 2000) und soll eine wichtige Rolle im regulatorischen System des *Amyloid precursor protein* Metabolismus (Lee et al., 2000) und der β -Amyloid Generierung spielen (Lee et al., 2000; Uchigashima et al., 2007). Die Rolle bei der β -Amyloid Generierung konnte jedoch nicht bestätigt werden (Zimmermann et al., 2013). Ferner wurde gezeigt, dass NECAB3 ein potentielles Substrat für Nek2 ist. Nek2 ist eine Säugetier-Proteinkinase, die strukturell homolog zu *Aspergillus nidulans* nimA und spezifisch für den Zentrosomenzusammenbau und deren Aufrechterhaltung ist (Yoo et al., 2004). Des Weiteren wird angenommen, dass NECAB3 eine Rolle bei M. Alzheimer spielen könnte (Sumioka et al., 2003).

1.5.2 Vorkommen von NECAB2 in der Maus

NECAB2 wird ausschließlich im Hirn und hauptsächlich im Striatum und in pyramidalen Zellen der CA2 Region des Hippocampus exprimiert (Canela et al., 2007; Zimmermann et al., 2013). Die Expression von NECAB2 in der CA1 Region des Hippocampus (Canela et al., 2009) konnte von Zimmermann et al. (2013) nicht bestätigt werden. Ferner wird NECAB2 in einigen seltenen Interneuronen im Rest des Hippocampus (Zimmermann et al., 2013) sowie in einer hohen Anzahl in lumbalen dorsalen Spinalganglionneuronen exprimiert (Zhang et al., 2014). NECAB2 coexistiert dabei nur in geringem Ausmaß mit anderen Calciumbindenden Proteinen wie Parvalbumin, Calbindin, Calretinin und Secretagogen in dorsalen Spinalganglionneuronen (Zhang et al., 2014).

Die Arbeitsgruppe um Canela zeigte 2007 erstmals in Immunfärbungen des Caudate putamen eine NECAB2 Expression im Neuropil und in Zellkörpern von Neuronen. Die NECAB2-immunpositiven Zellen wiesen eine starke NECAB2 Immunreaktivität im Cytoplasma auf, jedoch nicht im Zellkern. Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten eine gleichmäßig verteilte Immunreaktivität von NECAB2 im Zytoplasma von striatalen Neuronen (Canela et al., 2007). Außerdem konnte sowohl in der

postsynaptischen als auch in der präsynaptischen Region Immunreaktivität für NECAB2 gefunden werden. NECAB2 markierte Immunopartikel wurden mit Hilfe der Immunogold-Technik im Zytoplasma und in dendritischen *spines* von striatalen Neuronen beobachtet. Entweder sind diese mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert und/oder intrazelluläre Vesikel. Diese zeigen jedoch ein zytosolisches Expressionsmuster mit keiner offensichtlichen Assoziation mit diesen Organellen. Darüberhinaus wurden Immunopartikel gefunden, die sowohl mit der extrasynaptischen Plasmamembran von postsynaptischen dendritischen *spines* als auch mit der präsynaptischen Endigung des Axons assoziiert sind. NECAB2 ist demnach sowohl in prä-, als auch in postynaptischen Strukturen von asymmetrischen, vermutlichen glutamatergen Synapsen als auch im Zytosol des Somas zu finden (Canela et al., 2007).

1.5.3 Struktur und Aufbau von NECAB2

Das humane *Necab2* Gen liegt auf dem Chromosomen 16q23.3 und codiert für ein Protein von 389 Aminosäuren und ca. 43 kDa. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass NECAB2 eine weitere Isoform (NECAB2_s) mit einem Molekulargewicht von 39 kDa besitzt. Eine Sequenzanalyse von NECAB2 deutet auf ein Vorhandensein von zwei mutmaßlichen Translationsinitiationscodons im offenen Leserahmen hin. Die beiden Isoformen unterscheiden sich in 37 Aminosäuren im N-terminalen Bereich des Proteins (Canela et al., 2007; Canela et al., 2009).

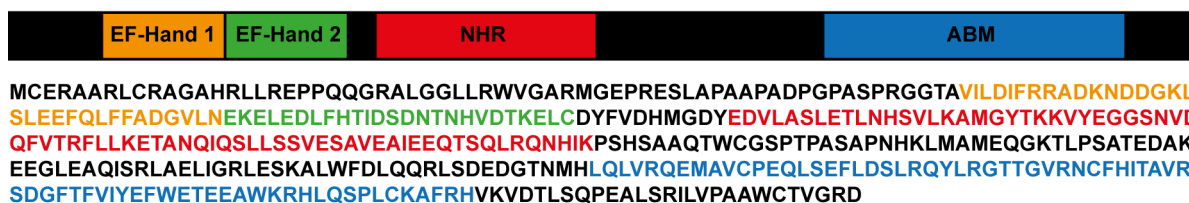


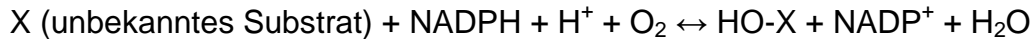
Abbildung 1.3: Domänenstruktur von NECAB2.

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von NECAB2. NECAB2 besitzt 389 Aminosäuren und ist aus zwei EF-Hand Domänen (orange und grün), einer NECAB homology region (NHR)- Domäne (rot) und einer antibiotischen Monooxygenase (ABM)- Domäne (blau) aufgebaut.

NECAB2 besitzt, wie in 1.5.1 erwähnt, zwei EF-Hand Domänen, eine homologe *NECAB homology region* (NHR) und eine antibiotische Monooxygenase (ABM) Domäne. Beide EF-Hand Domänen sind kanonisch, während jeweils die zweite EF-Hand bei NECAB1 und NECAB3 nicht kanonisch ist. Eine EF-Hand besitzt ein Helix-Loop-Helix Motiv, welches aus geladenen Aminosäuren besteht und Ca²⁺ Ionen

binden kann. Durch die Ca^{2+} -Bindung ändert sich die Konformation des Proteins und das Protein selbst kann seine Funktion ändern. Der Name der EF-Hand geht auf das Ca^{2+} -bindende Protein Parvalbumin zurück. Parvalbumin besitzt sechs Helices, benannt mit den Buchstaben A-F. Die Struktur der C-terminalen Domäne mit den Helices E und F wurde aufgeklärt und diente als Namensgeber der EF-Hand (Kretsinger and Nockolds, 1973). Genau wie bei Parvalbumin sind die EF-Hände von NECAB2 für die Ca^{2+} -Bindung zuständig. Dabei kommt es vermutlich auch zu einer Konformationsänderung des Proteins und damit zu einer Aktivitätsänderung.

Die Funktion der C-terminalen antibiotischen Monooxygenase (ABM) Domäne bei NECAB2 ist bisher nicht bekannt. Es wurden jedoch bakterielle Homologe von NECAB2 aus *E. coli* gefunden, die ebenfalls eine ABM Domäne enthalten und in der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies involviert sind (Lemieux et al., 2006; Adams and Jia, 2005). Möglicherweise hat die ABM Domäne in Eukaryoten eine ähnliche Funktion. Monooxygenasen sind NADP^+ -abhängige Oxidoreduktasen, die ein Sauerstoffatom aus O_2 in das Substrat als Hydroxylgruppe einbauen, während das andere Sauerstoffatom zu H_2O reduziert wird (siehe Gleichung).



Des Weiteren deuten strukturelle Analysen des *Streptomyces* ABM Proteins an, dass das aktive Enzym vermutlich als Homodimer vorliegt (Sciara et al., 2003).

Die *NECAB homology region* (NHR) Domäne besteht aus 74 Aminosäuren und enthält eine *coiled-coil* Sekundärstruktur (Sugita et al., 2002). In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass *coiled-coil* Domänen in Protein-Protein Interaktionen involviert sind (M.Soloviev et al., 2000). Canela et al. (2007) konnten zeigen, dass NECAB2 mit dem Adenosine A_{2A} Rezeptor und dem metabotropischen Glutamat Rezeptor 5 interagiert. Dabei ist die Interaktion mit den Rezeptoren abhängig von der Anwesenheit der *coiled-coil* Domäne (Aminosäuren: 133-206) (Canela et al., 2007; Canela et al., 2009). Als weiterer Interaktionspartner von NECAB2 wurde, mithilfe von Pulldown-assays und dem Hefe-2-Hybrid System, Neurologin identifiziert (Zang, 2008). Dabei wurde jedoch nicht die Interaktionsdomäne ermittelt. Möglicherweise ist aber auch die *coiled-coil* Domäne für diese Interaktion verantwortlich.

In unserer Arbeitsgruppe wurde NECAB2 ebenfalls als Interaktionspartner eines G-Protein gekoppelten Rezeptors gefunden (nicht publizierte Daten, Kovacs et al.,

2014). In einem Hefe-2-Hybrid *Screening* wurde dabei NECAB2 als einer von drei Interaktionspartnern von GPR39 identifiziert. GPR39 ist in einem von unserer Arbeitsgruppe entwickelten *Screening*-Verfahren als ein protektiver G-Protein gekoppelter Rezeptor identifiziert worden (Sahin et al., 2006; Dittmer et al., 2008). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) in diversen Modellsystemen vor Neurodegeneration schützt (Jolkkonen et al., 1999; Takei et al., 1998; Yasui and Kawasaki, 1995; O'Neill et al., 1998; Pizzi et al., 1999). Die gefundenen Interaktionen von NECAB2 mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren deuten auf ein wichtiges Zusammenspiel der beiden hin, auf das im nächsten Kapitel detaillierter eingegangen wird.

1.5.4 Interaktion von NECAB2 mit dem Adenosine A_{2A} Rezeptor und dem metabotropischen Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5)

Die gefundene Interaktion von NECAB2 mit den beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren A_{2A}R und mGluR5 geht auf die Arbeitsgruppe um Canela et al. zurück. Zunächst identifizierten sie 2007 in einem Hefe-2-Hybrid *Screening* A_{2A}R als Interaktionspartner von NECAB2. Da frühere Arbeiten darüberhinaus zeigten, dass A_{2A}R auch mit mGluR5 interagieren kann (Ferré et al., 2002), lag es nahe, auch die Interaktion von NECAB2 und mGluR5 zu untersuchen (Canela et al., 2009). Pull-down Experimente mit rekombinanten GST-markierten NECAB2 Proteinen, von unterschiedlicher Sequenzlänge bestätigten jeweils A_{2A}R und mGluR5 als Bindungspartner. Dabei zeigte sich, dass die Protein-Protein Interaktion spezifisch an der *NECAB homology region* (Aminosäure 133-206) stattfindet (Canela et al., 2007). Pull-down Experimente mit der Abwesenheit oder Anwesenheit steigender physiologisch relevanter Ca²⁺-Konzentrationen (100 nM bis 100 µM) deuteten auf eine verminderte Bindung von GST-NECAB2, bei der Erhöhung des Calciums, an A_{2A}R und mGluR5 hin. Dabei konnte eine signifikante Inhibition von 50% mit 5 µM Ca²⁺ bei der Interaktion von NECAB2 und A_{2A}R, sowie eine 85%ige Hemmung bei der Interaktion von NECAB2 und mGluR5 erreicht werden (Canela et al., 2007; Canela et al., 2009).

Kolokalisationsstudien in transfizierten HEK-293 Zellen zeigten eine Überlappung von A_{2A}R bzw. mGluR5 mit NECAB2 in intrazellulären Aggregaten, sowie an der Plasmamembran. Bei einer Transfektion von NECAB2 ohne A_{2A}R bzw. mGluR5, wies NECAB2 hingegen eine zytosolische subzelluläre Verteilung auf. Eine weitere

Bestätigung der Interaktion beider Proteine stellten KO-Immunopräzipitationsanalysen in HEK-293 Zellen und im Striatum ($A_{2A}R$) bzw. im Hippocampus (mGluR5) von Ratten dar. Dabei konnte abermals in den HEK-293 Zellen bestätigt werden, dass die NHR Domäne der NECABs für die Interaktion verantwortlich ist.

In konfokalen Mikroskopiestudien von $A_{2A}R$ und NECAB2 gefärbten striatalen Neuronen wurde eine Punctae-artige Verteilung beider Proteine gefunden. Dabei waren NECAB2 und $A_{2A}R$ sowohl im Zellkörper als auch in Dendriten an spezifischen Aggregaten partiell kolokalisiert. Die Interaktion von $A_{2A}R$ und NECAB2 im Striatum der Ratten sowie in kultivierten striatalen Neuronen unterstreicht die physiologische Relevanz. Interessanterweise sind NECAB2 und $A_{2A}R$ in prä- und postsynaptischen Strukturen von asymmetrischen, mutmaßlichen glutamatergen Synapsen koverteilt zu finden (Canela et al., 2007). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Interaktion von NECAB2 mit mGluR5 zeigten hingegen eine gleichsinnige Verteilung beider Proteine in postsynaptischen Strukturen hippocampaler Pyramidalzellen.

Die Untersuchungen zur *in vivo* Interaktion zwischen NECAB2 und mGluR5 erfolgten im Gewebe des Hippocampus. Dabei wurde eine Ko-Verteilung beider Proteine in der CA1 Region des Hippocampus gefunden.

Übereinstimmend mit früheren Studien (Burgueño et al., 2003) konnten Canela et al. (2007) eine agonistenstimulierende sowie erhöhte $A_{2A}R$ Internalisierung finden. Aufgrund dessen untersuchte die Arbeitsgruppe mit Hilfe des Agonisten CGS21680 die Aktivierung des MAPK Signalwegs. Doppeltransfektion von NECAB2 und $A_{2A}R$ wies dabei eine signifikante erhöhte ERK1/2 Phosphorylierung auf. NECAB2 dient also mutmaßlich als Regulator für die Kupplungseffizienz von $A_{2A}R$ in der Signaltransduktion (Canela et al., 2007). Ähnliche Resultate konnten bei der Interaktion von NECAB2 und mGluR5 gezeigt werden. Die Anwesenheit von NECAB2 erzeugt keine erhöhte Expression des mGluR5. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Stimulierung mit dem Agonisten Quisqualisäure eine signifikante erhöhte ERK1/2 Phosphorylierung zur Folge hatte. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass eine Koverteilung von NECAB2 mit beiden Rezeptoren auf eine physiologische Relevanz hindeutet. NECAB2 erhöht die Kupplungseffizienz von $A_{2A}R$ und mGluR5 zur Signaltransduktionsmaschinerie ohne dabei die

Zelloberflächenexpression der Rezeptoren zu verändern. Dabei ist die Interaktion von NECAB2 mit den Rezeptoren Ca^{2+} -abhängig (Canela et al., 2009).

2. Zielsetzung der Arbeit

NECAB2 (**N**eural **Ca**²⁺-**B**inding protein-2) gehört zur NECAB Familie und ist aus zwei EF-Hand Domänen, einer NHR (*NECAB homology region*) Domäne und einer ABM (*antibiotic monooxygenase domain*) Domäne aufgebaut. NECAB2 wird vorwiegend im Striatum und im Hippocampus exprimiert. Strukturelle und funktionelle Analysen eines bakteriellen ABM Homologs aus *Streptomyces* deuten an, dass das Protein als Dimer vorliegt und möglicherweise an der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt ist. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass das humane NECAB2 mit dem metabotropen Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5) und dem Adenosin 2A Rezeptor (A_{2A}R) Ca²⁺-abhängig interagiert.

Ziel dieser Arbeit war es NECAB2 näher zu charakterisieren. Dabei sollte zunächst die genaue Expression von NECAB2 untersucht werden. Hierbei sollte insbesondere aufgeklärt werden, ob NECAB2 prä- oder postsynaptisch exprimiert wird. Des Weiteren sollte das humane NECAB2 Protein rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden. Anschließend sollten mit dem aufgereinigten, rekombinanten Protein Untersuchungen hinsichtlich der Dimerbildung, der Funktion und der Struktur durchgeführt werden. Hinsichtlich der Dimerbildung sollte ferner herausgefunden werden welche Domäne die Homodimerisierung vermittelt. Weiter sollte geklärt werden welche Domäne für die Interaktion mit mGluR5 verantwortlich ist. Letztendlich sollten Proteinexpressionsexperimente und Verhaltenstests mit dem NECAB2 *Knockout* (KO) Mausmodell Aufschluss über die mögliche Funktion von NECAB2 geben.

3. Materialien

3.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Life Technologies (Karlsruhe), Roche (Mannheim), BioRad (München), Merck (Darmstadt), Fermentas (St. Leon-Roth), Millipore (Billerica, Massachusetts), New England Biolabs (Schwalbach), Fluka Chemie GmbH (Buchs), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts), Qiagen (Hilden). Falls nicht anders erwähnt, wurden die Substanzen in deionisiertem Wasser laut Herstellerangaben gelöst.

3.2 Enzyme

3.2.1 Restriktionsenzyme

Alle Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) und Thermo Scientific bezogen und nach Herstellerangaben mit dem dazugehörigen Puffer von NEB bzw. Thermo Scientific verwendet.

3.2.2 Weitere verwendete Enzyme

Tabelle 3.1 Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt
LR clonase II	Life Technologies, Karlsruhe
DNase	Peqlab
Shrimp alkaline phosphatase	Fermentas
Proteinase K	Qiagen

3.3 Kits

Tabelle 3.2 Verwendete Kits

Kits	Hersteller
Nucleobond Kit PC500	Macherey-Nagel, Düren
Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, Freiburg
Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Freiburg
BCA Protein Assay Kit	Interchim, Montlucon
Profound c-myc-Tag IP/COIP Kit	Pierce, Bonn
Profound HA Tag IP/COIP Kit	Pierce, Bonn
ProteoPrep Detergent Sample Kit	Sigma

3.4 Antikörper

3.4.1 Primärantikörper

Tabelle 3.3 Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Spezie	Klon	Hersteller
Anti-Aktin (WB 1:4000)	Maus, monoklonal	C4	Millipore
Anti-GAPDH (WB 1:4000)	Kaninchen, monoklonal	14C10	New England biolabs
Anti-MAP2 (IC 1:750)	Maus, monoklonal		Sigma Aldrich
Anti-PSD95 (WB/IC 1:1000)	Maus, polyklonal		Synaptic systems
Anti-Myc (WB:1:3000, IC:1:500)	Maus, monoklonal	4A6	Millipore
Anti-NECAB2 (WB: 1:1000, IC: 1:400)	Kaninchen, polyklonal		Sigma Aldrich
Anti-mGluR5 (WB: 1:000, IC:1:500)	Kaninchen, polyklonal		Millipore
Anti-Darpp32 (IC: 1:500)	Maus, monoklonal		BD Bioscience
Anti-Darpp32 (IC 1:500)	Kaninchen, polyklonal		Cell signalling
Anti-His (WB: 1:1000)	Maus, monoklonal		Cell signalling
Anti-A2AR (WB:1: 1000)	Kaninchen, polyklonal		Cell signalling
Anti-Synaptobrevin2 (WB:1000, IC: 1:1000)	Maus, monoklonal		Synaptic systems
Anti-TubIII (WB:1000)	Maus, monoklonal		R&D Systems
Anti-total CREB (WB: 1:1000)	Kaninchen, monoklonal		Cell signalling
Anti-Polyglutamine (WB:1:1000)	Maus, monoklonal	5TF1-1C2	Millipore
Anti-Synaptophysin (WB:1:1000)	Meerschweinchen		Synaptic systems
Anti-HA (WB:1:3000)	Kaninchen, monoklonal	6,00E+02	abcam

3.4.2 Sekundärantikörper

Immunoblot-Sekundärantikörper

Für fluoreszente Detektion der Immunoblots wurden IRdye-konjugierte Sekundärantikörper verwendet. Die aus der Ziege hergestellten Anti-Maus (IRdye 680 bzw. IRdye 800) oder Anti-Kaninchen (IRdye 680 bzw. IRdye 800) IgG Antikörper wurden von der Firma Licor (Königsstein) bzw. Cell Signalling (Frankfurt) bezogen. Dabei wurden die Antikörper der Firma Licor 1:30000 und die der Firma Cell Signalling 1:15000 eingesetzt.

Immunhistochemische/Immunzytochemische Sekundärantikörper:**Tabelle 3.4** Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege-Anti-Maus Chromeo505	1:500	Active Motive
Ziege-Anti-Kaninchen Abberior Star 440SX	1:500	Abberior
Ziege-Anti-Maus Alexa488	1:1000	Millipore
Ziege-Anti-Kaninchen-Alexa488	1:1000	Millipore
Ziege-Anti-Maus Alexa568	1:1000	Millipore
Ziege-Anti-Kaninchen Alexa568	1:1000	Millipore
Ziege-Anti-Maus Alexa647	1:500	Cell Signalling

3.5 Puffer**Tabelle 3.5** Verwendete Puffer

Puffer	Hersteller
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
RIPA-Puffer	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
TBE 10x	Invitrogen, Karlsruhe
MOPS SDS Puffer 20x	Life Technologies
Tris-Glycine SDS Puffer 10 x	BioRad
TAE 50x	2 M Tris-Base, 1 M Essigsäure, 0,05 M EDTA (ph 8)

3.6 Medien**3.6.1 Medium für Bakterien****S.O.C. Medium**

Das S.O.C. Medium wurde fertig von der Firma Invitrogen bezogen.

LB-Medium

Für die Kultivierung der verschiedenen Bakterienstämme wurde LB-Medium verwendet. Dafür wurden 20 g LB-Medium (Life Technologies, Karlsruhe) in 1 L destilliertem Wasser gegeben und vor Gebrauch autoklaviert.

LB-Agarplatten

In 1 L destilliertem Wasser wurden 32 g LB-Agar (Life Technologies, Karlsruhe) abgewogen, autoklaviert und entweder mit Kanamycin (100 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml) versetzt. Das Antibiotika-haltige LB-Agarmedium wurde auf 10 cm Schalen verteilt. Die Schalen wurden bis zu ihrem Gebrauch bei 4°C gelagert.

3.6.2 Medium für Zellkultur

Medium für HT22 Zellen

Die HT22 Zelllinie sowie die stabilen überexprimierenden Necab2-Zelllinien wurden mit DMEM (Dulbeccos modified eagles medium) High Glucose (PAA, Paschin, Österreich) mit 5% FCS (Fetales Calf Serum) (Hyclone, Vienna, Österreich), 1 % P/S (Penicillin/Streptomycin) (100 U/ml /100 µg/ml) (Gibco, Karlsruhe) kultiviert.

Medium für CHO Zellen

CHO (Chinesische Hamster Ovarien) Zellen wurden mit DMEM/F12-Medium (Gibco, Karlsruhe) mit 10 % FCS, 1 % P/S und 2 mM L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe) kultiviert.

Präparationsmedium für striatale Neuronenkultur

Als Präparationsmedium für die striatale Neuronenkultur diente MEM/Glutamax (Gibco, Karlsruhe) mit 10 % Pferdeserum (Gibco, Karlsruhe), 0,6% Glucose (Sigma) und 0,2 % P/S.

Kultivierungsmedium für striatale Neuronenkultur

Die striatalen Neurone wurden mit Neurobasal (Gibco, Karlsruhe) Medium und 0,2 % P/S, 0,05 % L-Glutamin und 2% B27 supplement (Life Technologies) kultiviert.

3.7 Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien wurden für die Herstellung von Plasmid-DNA und der Produktion von rekombinanten Proteinen genutzt.

3.7.1 Escherichia coli (*E. coli*)

DH5 α

Dieser Bakterienstamm wurde für Transformationen und Klonierungen verwendet.

Genotyp: F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+)

PhoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1

BL21(DE3)

Dieser Bakterienstamm diente zur Proteinexpression.

Genotyp: F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3)

One Shot® ccdB Survival™

Dieser Bakterienstamm ist resistent gegenüber dem ccdB Gen, welches bei den Gateway-Vektoren vorhanden ist (Bernard and Couturier, 1992).

Genotyp: $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 ara\Delta 139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG fhuA::IS2$

3.8 Primärkulturen und immortalisierte Zelllinien

3.8.1 Striatale Neuronenkultur

Die Neurone wurden aus dem Striatum von embryonalen Mäusen aus dem Entwicklungsstadium E16-E18 isoliert und kultiviert.

3.8.2 CHO

Die CHO-Zelllinie stammt aus den Ovarien von chinesischen Hamstern. In dieser Arbeit wurden die CHO-Zellen hauptsächlich für Proteinexpression verwendet.

3.8.3 HT22

Die HT22 Zellen sind Subklone der murinen hippocampalen Zelllinie HT4, die mit dem temperaturabhängigen Onkogen SV40 T Antigen immortalisiert worden sind. Diese Zelllinie dient als Modell für endogenen oxidativen Stress. Extrazelluläres Glutamat entleert die zellulären Glutathionspiegel, indem es das Glutamat/Cystine Antiporter System xc blockiert. Die Glutathion-Entleerung induziert daraufhin die Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies. Die Generierung der NECAB2 WT und NECAB2 Mutanten Zelllinien erfolgte auch in HT22 Zellen.

3.9 Mäuse

Die NECAB2^{+/-} Mäuse (Necab2^{tm1a(KOMP)Wtsi}) wurden von der Firma KOMP (UCDavis Mouse Biology Program) bezogen. Die Tiere besitzen einen C57BL/6NCrl Hintergrund. Die Zucht wurde mit drei heterozygoten Männchen in der ZVTE Mainz begonnen. Die Experimente wurden mit homozygoten KO Tieren (NECAB^{-/-}) und WT Tieren (NECAB2^{+/+}) durchgeführt. In Tabelle 3.6 sind die Genotypisierungsprimer dargestellt. Das Genotypisierungsprotokoll ist im Anhang zu finden.

Tabelle 3.6 Verwendete Genotypisierungsprimer

Bezeichnung		Sequenz	bp
Necab2 KO	fw	GGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCG	586
Necab2 KO	rv	AAACAATAACCCTTCCCCTCCTGGG	
Necab2 WT	fw	GTGAGTTGCAGGACACAGAGAAACC	576
Necab2 WT	rv	AAACAATAACCCTTCCCCTCCTGGG	

Des Weiteren wurden C57BL/6NCrl von der Firma Janvier (Belgien) bezogen.

Alle Tierversuchsarbeiten wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Mauslinien wurden in der Tierhaltung der ZVTE (Zentralen Versuchstieranlage) gehalten. Die Mauslinien wurden mit jeweils 3-5 Tieren bei Temperaturen um 22°C in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Verpaarung erfolgte 1:1 oder 1:2 (NECAB2^{-/-} x NECAB2^{-/-} bzw. NECAB2^{+/+} x NECAB2^{+/+}) (Bradley et al., 2012; Skarnes et al., 2011).

3.10 Plasmide

Tabelle 3.7 Verwendete Plasmide

Vektor	Rückgrat	Konstrukt	Hersteller
Necab2_His_pET28a	pET28a	Necab2_WT	Laborkollektion
Necab2_WT_pcDNA3myc-dest	pcDNA3Myc-dest	Necab2_WT	Armagan Özgür
Necab2_ΔABM_pcDNA3Myc-dest	pcDNA3Myc-dest	Necab2_ΔABM	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC1_pcDNA3Myc-dest	pcDNA3Myc-dest	Necab2_ΔCC1	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC2_pcDNA3Myc-dest	pcDNA3Myc-dest	Necab2_ΔCC2	selbsthergestellt
Necab2_WT_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_WT	Nadine Nickel
Necab2_ΔABM_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_ΔABM	Nadine Nickel
Necab2_ΔCC1_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_ΔCC1	Nadine Nickel
Necab2_ΔCC2_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_ΔCC2	Nadine Nickel
Necab2_Ala_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_E84A-E118A	Armagan Özgür
Leervektor	pENTR3C		Laborkollektion
Necab2_WT_pB CAG HA IRES VENUS DEST	pB CAG HA IRES VENUS DEST	Necab2_WT	selbsthergestellt
Necab2_ΔABM_pB CAG HA IRES VENUS DEST	pB CAG HA IRES VENUS DEST	Necab2_ΔABM	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC1_pB CAG HA IRES VENUS DEST	pB CAG HA IRES VENUS DEST	Necab2_ΔCC1	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC2_pB CAG HA IRES VENUS DEST	pB CAG HA IRES VENUS DEST	Necab2_ΔCC2	selbsthergestellt
Necab2_E84A-E118A_pB CAG HA IRES VENUS DEST	pB CAG HA IRES VENUS DEST	Necab2_E84A-E118A	selbsthergestellt
Leervektor	pB CAG HA IRES VENUS DEST		Laborkollektion
Necab2_WT_pmt2smHA	pmt2smHA	Necab2_WT	Armagan Özgür
Necab2_ΔABM_pmt2smHA	pmt2smHA	Necab2_ΔABM	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC1_pmt2smHA	pmt2smHA	Necab2_ΔCC1	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC2_pmt2smHA	pmt2smHA	Necab2_ΔCC2	selbsthergestellt
Necab2_E84A-E118A_pmt2smHA	pmt2smHA	Necab2_E84A-E118A	Armagan Özgür
Leervektor	pmt2smHA		Laborkollektion

Necab2_WT_VenusC_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_WT	selbsthergestellt
Necab2_ΔABM_VenusC_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_ΔABM	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC1_VenusC_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_ΔCC1	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC2_VenusC_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_ΔCC2	selbsthergestellt
Necab2_E84A-E118A_VenusC_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_E84A-E118A	selbsthergestellt
Necab2_WT_VenusN_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_WT	selbsthergestellt
Necab2_ΔABM_VenusN_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_ΔABM	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC1_VenusN_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_ΔCC1	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC2_VenusN_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_ΔCC2	selbsthergestellt
Necab2_E84A-E118A_VenusN_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_E84A-E118A	selbsthergestellt
Necab2_WT_VenusC_pENTR3C_pcDNA3myc-dest	pcDNA3myc-dest	Necab2_WT	selbsthergestellt
Necab2_ΔABM_VenusC_pENTR3C_pcDNA3myc-dest	pcDNA3myc-dest	Necab2_ΔABM	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC1_VenusC_pENTR3C_pcDNA3myc-dest	pcDNA3myc-dest	Necab2_ΔCC1	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC2_VenusC_pENTR3C_pcDNA3myc-dest	pcDNA3myc-dest	Necab2_ΔCC2	selbsthergestellt
Necab2_E84A-E118A_VenusC_pENTR3C_pcDNA3myc-dest	pcDNA3myc-dest	Necab2_E84A-E118A	selbsthergestellt
Necab2_WT_VenusN_pENTR3C_pcDNA3myc-dest	pcDNA3myc-dest	Necab2_WT	selbsthergestellt
Necab2_ΔABM_VenusN_pENTR3C_pcDNA3myc-dest	pcDNA3myc-dest	Necab2_ΔABM	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC1_VenusN_pENTR3C_pcDNA3myc-dest	pcDNA3myc-dest	Necab2_ΔCC1	selbsthergestellt
Necab2_ΔCC2_VenusN_pENTR3C_pcDNA3myc-dest	pcDNA3myc-dest	Necab2_ΔCC2	selbsthergestellt
Necab2_E84A-E118A_VenusN_pENTR3C_pcDNA3myc-dest	pcDNA3myc-dest	Necab2_E84A-E118A	selbsthergestellt
mGluR5_YFP_N1	eYFP_N1	metabotropic Glutamate receptor 5	Laborkollektion
mGluR5_mcherry	eGFP_N1	metabotropic Glutamate receptor 5	selbsthergestellt
mGluR5	eGFP_N1	metabotropic Glutamate receptor 5	selbsthergestellt
Necab2_WT_VenusN_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_WT	selbsthergestellt
Necab2_E84A-E118A_VenusN_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_E84A-E118A	selbsthergestellt
Necab2_WT_VenusC_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_WT	selbsthergestellt
Necab2_E84A-E118A_VenusC_pENTR3C	pENTR3C	Necab2_E84A-E118A	selbsthergestellt
Necab2_WT_VenusN_pB CAG HA IRES_mcherry_DEST	pB CAG HA IRES_mcherry_DEST	Necab2_WT	selbsthergestellt
Necab2_E84A-E118A_VenusN_pB CAG HA IRES_mcherry_DEST	pB CAG HA IRES_mcherry_DEST	Necab2_E84A-E118A	selbsthergestellt
Necab2_WT_VenusC_pB CAG HA IRES_mcherry_DEST	pB CAG HA IRES_mcherry_DEST	Necab2_WT	selbsthergestellt
Necab2_E84A-E118A_VenusC_pB CAG HA IRES_mcherry_DEST	pB CAG HA IRES_mcherry_DEST	Necab2_E84A-E118A	selbsthergestellt

3.11 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Martinsried) bzw. Metabion (Planegg/Steinkirchen) bezogen.

3.11.1 Primer für Klonierungen

Tabelle 3.8 Verwendete Klonierungsprimer

Primer	Sequenz	Schnittstellen
Necab2_CC2_ABM_f	5'-ACTAGTCCCAGCCACAGCGCG-3'	SpeI
Necab2_CC2_ABM_r	5'-CTCGAGTCAGTCCCGTCCCACCG-3'	XhoI
FKBP_f	5'-GGATCCGCTTCTAGAGGAGTGCAGGTGG-3'	BamHI
FKBP_r	5'-GGTACCACTAGTTTCCAGTTTTAGAAGCTC-3'	KpnI
Gibson_Necab2_CC2_ABM_f	5'-GGAGCTTCTAAAAGTGGAAAGCGAGCGGGCGG-3'	
Gibson_Necab2_CC2_ABM_r	5'-GCGCTGTGGCTGGGAAGGACATCCTCATAGTCACCCA-3'	

3.12 Geräte

Tabelle 3.9 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Äkta prime plus	GE Healthcare
BD Pathway 855 (Hochdurchsatz-Mikroskop)	BD Biosciences, Heidelberg
Biofuge Strato	Heraeus, Osterode
Captair Bio PCR Hood	Erlab, Köln
CFX Connect Real time system	Bio-Rad
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo
DAKO Auto Stainer S38-0356-01	DAKO
Feinwaage CPA 10035	Sartorius
FluoroGenios Pro	Tecan, Männedorf
Fresco 21 Zentrifuge Heraeus	Thermo Scientific
GDS-Gel Imaging System	Intas, Göttingen
Gradient Thermozykler	Biometra, Göttingen
Grobwaage	Kern EW
Grobwaage ALC-810.2	Acculab – Sartorius Group
Heracell 150 Inkubator	Kendro, Schwerte
Herasafe Sterilbank	Kendro, Schwerte
Heratherm Inkubator	Thermo Scientific
Hochgeschwindigkeitssorter MoFlo XDP	Beckman-Coulter, Krefeld
iBlot Dry Blotting Device	Invitrogen, Karlsruhe
IX81-Fluoreszenz Mikroskop	Olympus, Hamburg
J815 CD Spektrometer	Jasco
Leica TCS SP5 II	Leica Microsystems
Leica TCS STED CE	Leica Microsystems
Luna Automated Cell Counter	Logos Biosystems
Magnetrührer-Heizplatte MR Hei-Standard	Heidolph
Mikroskop Motic AE20 Series	Motic
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
Milli-Q Plus-Anlage	Millipore

Mini PROTEAN Tetra System	Bio-Rad
MSC-Advantage Sterilbank	Thermo Scientific
Multifuge 3 L-R Zentrifuge Heraeus	Thermo Scientific
Multifuge X1 Zentrifuge Heraeus	Thermo Scientific
Multifuge X1R Zentrifuge Heraeus	Thermo Scientific
Multitron Standard	Infors HT
Nanodrop 2000c	Peqlab
Odyssey Infrarotscanner	Licor, Bad Homburg
One shot cell disrupter	Constant Systems Ltd.
Optima L80XT Ultracentrifuge	Beckman-Coulter, Krefeld
P25 Powerpack	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
pH-meter CG 810	Schott Geräte
Pipetten	Eppendorf
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad
Rotor Ti 55.2	Beckman-Coulter, Krefeld
S2100DiodeArray Spektrophotometer	WPA Biowave, Cambridge
Subcell GT Powerpack	Biorad, München
Taumelschüttler 3011	GFL
TC10 System Zählkammer	Bio-Rad, München
Tecan Reader, Infinite M200 Pro	Tecan
The Odyssey® Sa Infrared Imaging System	Li-Cor
Thermomixer F 1,5	Eppendorf
Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
to Storage Phosphor screens	GE Healthcare
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad
Typhon Trio+ scanner	GE Healthcare
Ultratiefkühlgerät, -80 °C	Sanyo
Vacusaft Absaugsystem	Integra Biosciences
Vibratom Microm 650V	Thermo Scientific
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasserbad Aqualine AL 12	LAUDA
Xcell Sure Lock System	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifuge 5430	Eppendorf

3.13 Computerprogramme

3.12.1 Snapgene

Sowohl für Klonierungsstrategien als auch für das Designen der Primer und für die Kontrollverdaue wurde die Software Snapgene verwendet.

3.13.2 ODYSSEY Sa

Die fluoreszente Immunoblotdetektion erfolgte mit Hilfe der Software Odyssey Sa von Licor.

3.13.3 Graph Pad Prism 6.0

Für Diagrammdarstellungen und für statistische Auswertungen wurde das Programm Graph Pad Prism verwendet. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels t-test oder Two-way-Anova. Dabei wurde ein Signifikanzwert für $p < 0.5$ ermittelt.

3.13.4 ImageJ

Das Programm ImageJ (Fiji) wurde zur Quantifizierung von Immunoblots sowie zur digitalen Bearbeitung von konfokalen Bildern verwendet. Für Kollokalisationsstudien wurde das Plugin JACoP (Just Another Colocalization Plugin) verwendet.

3.13.5 BD AttoVision Version 1.7/855

Die Auswertung der Daten des Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskops erfolgte mit der BD AttoVision 1.7/855 Software.

3.13.6 MS Office Programme

Die Protokollierung der Daten wurde mit den gängigen Microsoft Office Programmen wie MS Power Point, MS Excel und MS Word durchgeführt.

3.13.7 Huygens Software

Zum Dekonvolvieren der Bilder der STED-Mikroskopie wurde das Programm Huygens verwendet.

4. Methoden

4.1 Molekularbiologische Techniken

4.1.1 DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen

Die hier beschriebene Methode diente zur Isolierung von DNA aus Mausschwanzspitzen für die Genotypisierung. Die Mäuseschwänze wurden nach der Entnahme bei -20°C gelagert bis sie verwendet wurden. Für die Isolierung wurden die Mäuseschwänze in folgendem Lysepuffer ü.N. bei 56°C eingelegt:

Tabelle 4.1 Lysepuffer (DNA-Isolierung)

18 μl	1 M Tris-HCl (pH8.8)
18 μl	0,5 M EDTA (pH 8)
18 μl	2% SDS
18 μl	2 M NaCl
20 μl	Proteinase K
108 μl	Wasser

Dabei stabilisieren Tris und Natriumchlorid den pH-Wert bzw. den Salzgehalt der Lösung. SDS bewirkt die Zellyse, EDTA als Chelator zweiwertiger Metallionen schützt die DNA vor dem nukleolytischen Abbau. Proteinase K hingegen baut zelluläre Proteine ab. Die Lysate wurden am folgenden Tag bei $14000\times g$ für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend zu 150 μl Isopropanol pipettiert. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei $14000\times g$ für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und zu dem entstandenen DNA Pellet wurde 70%iger Ethanol gegeben und bei $14000\times g$ für 7 Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Reaktionsgefäße bei 37°C getrocknet bis der gesamte Restethanol verdampft war. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 μl ddH₂O bei 55°C für 20 Minuten. Die DNA wurde entweder direkt für die Genotypisierungs-PCR verwendet oder bei -20°C gelagert.

4.1.2 Polymerase-chain-reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der *in vitro* Amplifikation von DNA-Abschnitten und wird mit Hilfe von zwei Nukleotidprimern, die komplementär zueinander sind, durchgeführt (Mullis et al., 1986). Die PCR wurde in dieser Arbeit für die Genotypisierung von Mäusen sowie für Klonierungsexperimente verwendet. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Um spezifische Schnittstellen

einzufragen, wurden Primer mit den jeweiligen Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme verwendet.

Die Schritte der PCR setzen sich aus einem Denaturierungsschritt (98°C), einem Primerhybridisierungsschritt (ca. 50-60°C) und einem Extensionsschritt (72°C) zusammen. Bei dem Prozess der Primerhybridisierung kommt es durch Herabsetzung der Temperatur zum Anlagern der Primer an die flankierenden Bereiche der *Template*-DNA. Beim nachfolgenden Extensionsschritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht, da die Polymerase bei dieser Temperatur ihre optimale Aktivität besitzt. Diese beginnt dann mit dem Anfügen der Desoxyribonukleotidtriphosphate an das 3'-Hydroxy Ende der Primer. Die Länge dieses Schrittes ist abhängig von der amplifizierenden Länge der Zielsequenz. Nach dem abschließenden Schritt der verlängerten Extension von 7 min bei 72°C und dem Herunterkühlen der Proben auf 4°C wurden alle Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Typischerweise wurden für eine PCR Reaktion 10 pmol des *forward* und des *reverse* Primers, 0,5 mM dNTPs, 30 ng DNA, 10 x PCR-Reaction Puffer (enthält Magnesiumsalze) und 1 µl Polymerase verwendet.

4.1.3 Reverse Transkription

Für eine anstehende qPCR musste die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Für den Ansatz der cDNA Synthese wurden 2 µg RNA eingesetzt (10 µl). In Tabelle 4.2 ist der komplette Ansatz für die cDNA Synthese dargestellt.

Tabelle 4.2 Reaktionsansatz für cDNA-Synthese

10x RT Buffer	2,0 µl
25x dNTP Mix	0,8 µl
10x RT Random Primers	2,0 µl
Reverse Transkriptase	1,0 µl
Nuclease-freies Wasser	4,2 µl
	Total: 10 µl

Für die cDNA Synthese wurde folgendes PCR Programm verwendet (siehe Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3 PCR-Programm für cDNA-Synthese

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
T [°C]	25	37	85	4
t [min]	10	120	5	Lagerung

4.1.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Um herauszufinden, ob bei einem NECAB2 KO die anderen Mitglieder der NECAB Familie reguliert sind, wurde eine qPCR in den NECAB2 KO Tieren und WT Tieren durchgeführt. Mit Hilfe der qPCR ist es möglich gewonnene DNA zu quantifizieren. Das Prinzip beruht zunächst auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen, die während eines PCR-Zyklus aufgenommen werden. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Abschließend ist es möglich anhand der Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR durchzuführen. In dieser Arbeit wurde die qPCR mit dem iQ SYBR Green Supermix von der Firma Bio-Rad durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde zunächst 1:10 verdünnt. Anschließend wurden jeweils Triplikate mit jeweils 16 µl des PCR-Mix (Tabelle 4.2) und 4 µl cDNA angesetzt. Als Negativkontrolle diente Wasser. Für Necab1 betrug bei einem 400 nM Ansatz die Annealing Temperatur 54°C und für Necab3 55°C. Der Ansatz des Housekeeping Gens GAPDH betrug 100 nM. Tabelle 4.4 zeigt die jeweiligen Ansätze.

Tabelle 4.4 Reaktionsansatz für qPCR

100 nM		400 nM	
SYBR Green	10 µl	SYBR Green	10 µl
Primer forward	0,2 µl	Primer forward	0,8 µl
Primer reverse	0,2 µl	Primer reverse	0,8 µl
H ₂ O	5,6 µl	H ₂ O	4,4 µl

4.1.5 Herstellung kompetenter Bakterien

DH5α Bakterien wurden ü.N. in 3 ml LB-Medium bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde 1 ml dieser Kultur in 300 ml LB-Medium überführt und weiter bei 37°C geschüttelt bis eine optische Dichte (OD600) von 0.5 erreicht war. Anschließend wurde die Bakterienkultur in 50 ml Aliquots bei 4000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml eiskalter

MgCl₂-Lösung resuspendiert und dann für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm für 5 min bei 4°C. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet in 20 ml CaCl₂ (enthält 15 % Glycerol) Lösung resuspendiert und wieder für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann aliquotiert zu je 100 µl und bei -80°C gelagert.

4.1.6 Transformation von *E. coli*

Die Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut, bevor 1 µl DNA (1-100 ng) bzw. 5 µl DNA auf 100 µl DH5α Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert wurde. Anschließend erfolgte ein „Hitzeschock“ bei 42°C für 1 min. Dabei werden die Zellmembranen permeabel, was die DNA Aufnahme in die Zellen erleichtert. Danach wurden die Bakterien kurz auf Eis inkubiert, mit 250 µl SOC Medium für 1h bei 37°C geschüttelt und dann auf LB-Agarplatten, die das gewünschte Antibiotikum aufwiesen (0.1 µg/ml Kanamycin/Ampicillin) ausgestrichen und anschließend ü. N. bei 37°C inkubiert. Um kleine DNA-Mengen zu erhalten, wurde am nächsten Tag eine Kolonie gepickt und in 3 ml LB-Medium mit dem gewünschten Antibiotikum ü.N. geschüttelt. Für große DNA-Mengen wurden dann 1 ml der Bakterienkultur auf 300 ml LB-Medium mit dem gewünschten Antibiotikum gegeben.

4.1.7 DNA-Isolierung von PCR Produkten und Plasmiden

Für kleine DNA-Mengen wurde das Minipräparationskit der Firma Zymo Research verwendet. Es basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Präparation wurde weitestgehend nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden jedoch statt 600 µl Bakterienkultur aus der ü.N. Kultur 1200 µl verwendet, um eine höhere Ausbeute an DNA zu erhalten. Nach der alkalischen Lyse wurde die Suspension zunächst neutralisiert, dann zentrifugiert und anschließend auf eine Silikasäule pipettiert. Die DNA bindet an die Silikamembran, während Salze durch weiter folgende Waschschrte entfernt werden. Im letzten Schritt erfolgte die Elution mit ddH₂O.

Für größere DNA Mengen wurde das *Nucleobond®XTRA Plasmid Purification System-Kit* der Firma Macherey-Nagel verwendet. Es basiert auf dem gleichen Prinzip wie das Minipräparationskit der Firma Zymo Research. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. DNA Konzentrationen wurden mit dem Nanodrop (peqlab) gemessen.

4.1.8 RNA Isolierung aus Hirnlysaten

Für die RNA-Isolierung wurde das RNA Minipräparationskit der Firma Zymo Research verwendet. Die Hirne wurden aus der Maus herauspräpariert und in 400 ml RNA Lysepuffer überführt. Die weiteren Schritte wurden weitestgehend nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde mit 50 µl DNase/RNase freiem Wasser eluiert. Die Konzentration wurde mit dem Nanodrop gemessen.

4.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird verwendet, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Die DNA ist bei neutralem pH aufgrund ihrer Phosphatgruppen am Rückgrat des DNA-Stranges negativ geladen und wandert damit beim Anlegen einer Spannung zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Größe der DNA-Fragmente, näherungsweise umgekehrt proportional zum Logarithmus der Masse ihrer Basenpaare. Je nach Größe des gewünschten DNA Fragments wurden unterschiedliche Konzentrationen von Agarose gewählt. Zum Gießen eines 1%igen Agarosegels beispielsweise wurden ca. 3 g Agarose mit 300 ml 1x-TAE Puffer aufgefüllt, in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend auf 60°C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 µl Sybr Green und die flüssige Agaroselösung wurde in eine Gelplatte mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach Aushärten der Agarose wurde diese in eine Gelkammer gelegt und mit TAE-Puffer aufgefüllt. Die Proben wurden mit 10x Ladepuffer (Blue Juice, Invitrogen) versetzt und mit einem DNA Standardmarker (1 kb Plus Ladder, Invitrogen) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 120 V durchgeführt. Durch den DNA-interkalierenden Farbstoff Sybr green wurden die DNA-Banden unter UV Licht bei 254 nm sichtbar gemacht und mittels des Bildbearbeitungsprogramms *Fusion* visualisiert.

4.1.10 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA-Fragmente erfolgte mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit der Firma Zymo research. Dafür wurde mit einem Skalpell das entsprechende DNA Fragment unter UV Licht ausgeschnitten, abgewogen, mit dem dreifachen Volumen an ADB Puffers versetzt und anschließend für 5-10 Minuten bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Nach Auflösen der Agarose wurde die Lösung auf die Zymo-Spin Säule überführt, kurz abzentrifugiert und mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde erneut mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert. Mit 30 µl ddH₂O wurde anschließend die DNA eluiert.

4.1.11 DNA-Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme können zum einen für die Analyse von Plasmiden verwendet werden, da bestimmte DNA-Stücke definierter Länge entstehen. Zum anderen werden sie zu Klonierungszwecken verwendet, um bestimmte Zielgene in Vektoren einzubringen. Jedes Restriktionsenzym hat eine bestimmte Erkennungssequenz. Bei der Spaltung der DNA können dann stumpfe (*blunt*) bzw. klebrige (*sticky*) Enden entstehen. Für einen präparativen Restriktionsverdau wurden beispielsweise 3 µg Vektor, 3 µl Restriktionsverdaupuffer (10x), 5 Units/µl Enzym sowie falls nötig 0,3 µl BSA auf 30 µl mit ddH₂O aufgefüllt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

4.1.12 Ligation

Bei der Ligation werden DNA Fragmente mit dem gewünschten Vektor verbunden. Um eine kovalente Phosphodiesterbindung zwischen einer 3`-Hydroxylgruppe eines Nukleotids und einer 5`-Phosphatgruppe eines anderen Nukleotids herzustellen, benötigt die T4 Ligase ATP. Typischerweise wurden 100 ng Vektor mit der vierfachen Menge des PCR-DNA-Fragments, 2 µl des Ligasepuffers (10x, enthält ATP) und 1 µl T4-Ligase (3 U/µl) für 1 Stunde bei RT inkubiert.

4.1.13 Klonierung

Gateway Klonierung

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die *Gateway*-Methode der Firma Invitrogen als Klonierungsmethode verwendet. Diese Methode beruht auf einem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Phagen λ . Mit Hilfe bestimmter Enzyme kann seine DNA in das Genom des Bakteriums *Escherichia coli* integriert werden. Durch spezifische Sequenzabschnitte (*attachment sites/recombination sites*), die sowohl in der Ziel-DNA, als auch in den zu transferierenden DNA Abschnitten vorhanden sind, können die zu übertragenden genetischen Informationen eingefügt werden.

Das gewünschte PCR-Produkt wird mittels Restriktionsverdau in einen ENTRY-Klon kloniert. Dieser ENTRY-Klon enthält die attL-Sequenzen. Der erfolgreiche mit dem Zielkonstrukt klonierte ENTRY-Klon kann nun in sämtliche gewünschte Zielvektoren (DEST-Vektoren) ligiert werden. In diesem Fall kann der Ziel-Vektor 5`- oder 3`- der attR-Seiten die entsprechende Sequenz tragen. Das ist abhängig davon, ob im Genprodukt eine N-terminale oder eine C-terminale Fusion herbeigeführt werden soll.

Des Weiteren enthält der Ziel-Vektor das von den *attR*-Stellen flankierte *ccdB*-Gen. In der LR-Reaktion zwischen *attL1* und *attR1* und zwischen *attL2* und *attR2* werden im Zielvektor erneut die *attB*-Seiten generiert. Der Zielvektor trägt außerdem eine andere Antibiotika-Resistenz als der des ENTRY-Klons. Des Weiteren entsteht bei der LR-Reaktion außer dem Ziel-Vektor das Selbstmordgen *ccdB* tragende Plasmid. Diese Konstrukte werden allerdings bei einer Transformation selbst getötet, sodass nur die gewünschten Klone wachsen können.

Eine typische LR-Reaktion wurde weitestgehend nach Herstellerangaben durchgeführt:

Tabelle 4.5 Reaktionsansatz für LR-Reaktion

150 ng	ENTRY-Klon
150 ng/μl	DEST-Vektor
2 μl	TE-Puffer
2 μl	LR-clonase II

Alle Komponenten wurden für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 1 μl Proteinase K bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Transformation in DH5α Bakterien mit 5 μl des Ansatzes.

Gibson cloning

Bei der *Gibson Assembly cloning* Methode handelt es sich um eine Restriktionsenzymfreie Klonierung, die von Gibson et al. entwickelt wurde (Gibson et al., 2009). Dabei werden multiple DNA Fragmente beliebiger Länge in einer isothermalen Reaktion assembliert. Die überlappenden DNA Fragmente werden mit Exonuklease, DNA Polymerase und DNA Ligase und anderen Pufferkomponenten gemischt. Dabei verdaut die Exonuklease die DNA vom 5'-Ende, wodurch die überhängenden Einzelstränge an die DNA-Fragmente binden können. Die DNA Polymerase füllt fehlende Lücken mit Nukleotiden auf, während die DNA Ligase kovalent die DNA von angrenzenden Segmenten bindet und Brüche in der DNA entfernt werden. In dieser Arbeit wurde das *Gibson Assembly Kit* der Firma *New England Biolabs* benutzt. Dafür wurde nach Herstellerangaben die DNA mit dem 2x Gibson Assembly Kit für 1 h bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA in DH5α Bakterien transformiert. Die Reaktion wurde mittels Kontrollverdau überprüft.

PJET Klonierung

In dieser Arbeit wurde das pJET Klonierungssystem verwendet, um PCR Produkte erfolgreich zu klonieren. Der pJET1.2/blunt Vektor enthält ein lethales Restriktionsenzymgen, welches bei der Ligation mit einer Ziel-DNA zerstört wird. Bei einer anschließenden Transformation des Vektors können nur Bakterien mit dem rekombinanten Plasmid Kolonien bilden. Der rezirkulierte Vektor, welcher kein Zielgen beinhaltet, exprimiert ein lethales Restriktionsezym, welches die *E.coli* Zellen tötet. Mit dieser Methode ist daher kein *blue/white* screening mehr nötig. Die PCR Produkte können entweder mit Hilfe einer *proofreading* Polymerase oder einer *taq*-Polymerase hergestellt werden. Für die pJET-Klonierung müssen die PCR Produkte nach der PCR mit der *taq*-Polymerase „*blunt*“ gemacht werden, sodass die Aufnahme in den pJET Vektor gewährleistet werden kann.

4.1.14 Generierung der Split-Venus Necab2 Konstrukte

Für Dimerisierungsexperimente wurde das Split-Venus System verwendet. Dafür wurde der N-terminale Teil von Venus an Necab2-WT kloniert und der C-terminale Teil jeweils an Necab2-WT, sowie den unterschiedlichen Mutanten von Necab2. Bei den unterschiedlichen Mutanten von Necab2 fehlt entweder die CC1, die CC2 oder die ABM Domäne. Des Weiteren wurde eine Mutante generiert, bei der in der EF Hand Domäne die Aminosäure Glutamat an den Positionen 88 und 118 gegen Alanin ausgetauscht wurden. Die gekauften synthetischen Genfragmente der verschiedenen Mutanten wurden in den pENTR3C kloniert. Der Carboxyterminus von Venus sowie der N-terminus wurden jeweils mit Sall/BamHI aus dem VenusC-teasy bzw. VenusN-t-easy in den Necab2-pENTR3C kloniert. Diese beschriebenen Klonierungsarbeiten wurden von vorherigen Arbeitsgruppenmitgliedern durchgeführt. Anschließend wurden alle Konstrukte mit Hilfe des *Gateway cloning* in den pcDNA3myc-dest kloniert. Mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie und High content Imaging wurden die Experimente analysiert. Die Zellen leuchten nur dann grün (Venus), wenn NECAB2 dimerisiert bzw. die Proteine in räumliche Nähe kommen, sodass der N-terminale und der C-terminale Teil von Venus zusammen kommen. Als Transfektionskontrolle diente hier eine immunzytochemische Färbung auf den myc-tag.

4.1.15 Generierung der induzierbaren Dimerisierungskonstrukte

Für gezwungene, induzierbare Dimerisierungsversuche wurde das FKBP System verwendet. Dafür wurde das FKBP Konstrukt (Originalplasmid: Zur Verfügung gestellt von der AG Prof. Dr. Kins, TU Kaiserslautern) per PCR amplifiziert (siehe 3.11.1) und in den pJET Vektor ligiert. Anschließend wurde das amplifizierte Konstrukt mit KpnI/BamHI in den VenusC/N_Necab2_WT _pENTR3C kloniert. Die ENTR3C Vektoren wurden anschließend mit SpeI linearisiert. Mit Hilfe von *Gibson* Primern (siehe 3.11.1) wurde der N-terminale Teil von Necab2_WT und Necab2_E84A-E118A, inklusive der EF-Hand, amplifiziert und anschließend jeweils mittels Gibson Assembly in VenusC_FKBP_Necab2-CC2-ABM_pENTR3C und VenusN_FKBP_Necab2-CC2-ABM_pENTR3C ligiert. Die so erhaltenen Plasmide VenusC_FKBP_Necab2_EF-Hand-CC2-ABM_pENTR3C, VenusN_FKBP_Necab2_EF-Hand-CC2-ABM und VenusC_FKBP_Necab2_Ala(E84A-E118A)_EF-Hand-CC2-ABM_pENTR3C, VenusN_FKBP_Necab2_Ala(E84A-E118A)_EF-Hand-CC2-ABM wurden in den pCScherryDest mit Hilfe der LR-Reaktion der Firma Invitrogen kloniert.

Die Plasmide wurden entweder einzeln oder zusammen transfiziert und mittels 100 nM des Liganden AP20187 (Clontech) in 100% Ethanol für 1 Stunde dimerisiert. Als Kontrolle diente 100% Ethanol. Der Ligand bindet an beide FKBP Proteine und bringt so beide in räumliche Nähe. Dadurch interagieren gezwungenermaßen auch die Venus Proteine miteinander und die Zellen leuchten grün. Die erfolgreiche Dimerisierung wurde mittels Immunzytochemie nachgewiesen (siehe 4.2.20). Als Transfektionskontrolle diente mcherry im Expressionsplasmid.

4.2 Proteinbiochemische Techniken

4.2.1 Herstellung von Proteinlysaten aus adhärenen Zellkulturen

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden Zellen verwendet, die ca. 90% konfluent gewachsen waren. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen, bevor diese mit dem Zellysepuffer RIPA (Life Technologies) 5 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Der RIPA Puffer bricht die Zellwände auf und hält das Gesamtprotein unter physiologischen Bedingungen stabil. Um Proteindegradation zu vermeiden, wurden Proteaseinhibitoren (CompleteMini, Roche) dazugegeben. Die lysierten Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand entweder direkt für die Proteinbestimmung weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

4.2.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Maushirnen

Adulte WT und NECAB2 KO Mäuse wurden mit zervikaler Dislokation fachgerecht getötet. Anschließend wurde der Kopf mit einer Schere abgetrennt und das Hirn herauspräpariert und direkt in 1 ml Zellysepuffer RIPA (Life Technologies) mit Proteaseinhibitor (CompleteMini, Roche) auf Eis überführt. Das Hirn wurde mittels einer Pipettenspitze zerkleinert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Hirnlysate 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie in 4.2.1 beschrieben.

4.2.3 Testexpression von NECAB2-His

Um optimale Expressionsbedingungen für das Fusionsprotein His-NECAB2 (siehe Kapitel 3.10) zu finden, wurde ein Expressionstest in *E.coli* durchgeführt. Für die Testexpression wurde nach der Transformation des Plasmides in die BL21 Zellen eine Kolonie mit 6 ml LB Medium mit Kanamycin (Kan) ($50\ \mu\text{g/ml}$) über Nacht bei 37°C angezogen.

Am darauffolgenden Tag wurden zwei 1 Liter Kolben mit jeweils 300 ml LB Medium, versetzt mit Kan, in einem Verhältnis von 1:100 angeimpft. Beide Kulturen wuchsen bis zu einer OD_{600} von 0,7-0,9 und wurden dann auf insgesamt 3 Kolben aufgeteilt. Die 3 Kolben wurden jeweils mit 1 mM IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid) induziert und auf folgende Temperaturen aufgeteilt (37°C , 30°C und 25°C). Nach jeweils 1, 2 und 3 Stunden sowie über Nacht wurden 15 ml der Kulturen in Zentrifugenröhrchen bei 3900 g für 15 min bei 4°C in der Zentrifuge abzentrifugiert und das Zellpellet bei -20°C eingefroren.

4.2.4 Aufreinigung der Testexpression

Nach dem Auftauen der Zellpellets auf Eis wurden 1,5 ml des Zellysepuffers auf die verschiedenen Pellets gegeben. Nach anschließendem Resuspendieren der Pellets durch Vortexen erfolgte die Sonifizierung der Pellets zweimal mit jeweils 15 Pulsen. Dabei wurde der Output auf 3,5 und der *Duty cycle* auf 10% eingestellt, die Zellysate anschließend in 2 ml Eppendorffgefäße überführt und bei $16.000\times g$ für 10 min bei

4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue 2 ml Eppendorff-Gefäße überführt und direkt zur Analyse weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

Tabelle 4.6 Lysepuffer für Testexpression

Lysepuffer	
50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
5 mM	DTT
1 mg/ml	Lysozym
0,5 mg/ml	DNase

4.2.5 Proteinexpression in *E.coli*

Nachdem im Expressionstest die optimale Expressionsbedingung gefunden wurde, konnte die Expression mit der entsprechend besten Bedingung für NECAB2-His (30°C, 3h) durchgeführt werden. Zunächst wurde eine Kolonie in jeweils 2x6 ml LB-Medium und jeweils 50 µg/ml Kanamycin bei 37°C ü.N. im Schüttler angezogen. Am nächsten Tag wurden 2 Kolben mit 300 ml LB-Medium mit Kanamycin versetzt und 1:50 mit der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD von 0,7-0,9 bei 37°C und 160 rpm geschüttelt. Nach Erreichen der OD, die photometrisch gemessen wurde, erfolgte eine Induktion mit 1 mM IPTG. Die Kulturen wurden dann weitere 3 h bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden dann bei 4000xg bei 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert, anschließend mit eiskaltem Lysepuffer (3 ml pro g Nassgewicht) resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

Tabelle 4.7 Lysepuffer

Lysepuffer	
30 mM	Tris-HCl
100 mM	NaCl
3 mM	DTT
	Proteaseinhibitor (Roche)

4.2.6 Zellaufschluss

Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis wurden diese nach Zugabe von DNase mittels des *One shot Cell disrupter* (Constant systems Ltd) am Institut für physikalische Biologie (AG Prof. Dr. Willbold) aufgeschlossen. Dafür wurde zunächst das Gerät dreimal mit Lysepuffer gespült (500 bar). Nach dem zweimaligen Aufschließen der Zellen mit 2500 bar wurden die Zellen in Beckmann-Zentrifugen-Röhrchen überführt und bei 40.000xg für 1 Stunde bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände und die Pellets

wurden für nachfolgende Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

4.2.7 Testsolubilisierung

Da NECAB2 nach der Ultrazentrifugation nicht im Überstand detektiert werden konnte, wurden verschiedene Detergenzbedingungen (Triton X-100, OG, DDM, CHAPS, OTG) getestet, um NECAB2 aus dem Pellet zu lösen. Es wurden jeweils 250 µl Pellets mit 500 µl Solubilisierungspuffer (Tabelle 4.8) für 1 h bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile in einer Tischzentrifuge bei 16000xg bei 4°C für 30 min abzentrifugiert und die Überstände sowie die Pellets für die Analysen vorbereitet.

Tabelle 4.8 Puffer für Testsolubilisierung

Solubilisierungspuffer		Solubilisierungspuffer	
2%	OTB	1,5 %	Triton X-100
300 mM	NaCL	300 mM	NaCL
50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
Solubilisierungspuffer		Solubilisierungspuffer	
1,5%	DDM	4%	CHAPS
300 mM	NaCL	300 mM	NaCL
50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
Solubilisierungspuffer			
4%	OG		
300 mM	NaCL		
50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)		

4.2.8 „Inclusion bodies“-Testsolubilisierung

Da die Testsolubilisierung mit verschiedenen Detergenzien nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurde untersucht, ob NECAB2 möglicherweise in „Inclusion bodies“ exprimiert wurde. „Inclusion bodies“ sind Einschlusskörperchen, die entstehen können, wenn rekombinante Proteine in *E.coli* exprimiert werden. Die Proteine können dabei partiell oder auch vollständig nativ gefaltet sein. Um die Proteine aus den „Inclusion bodies“ isolieren zu können, müssen zunächst die Inclusion bodies isoliert und aufgereinigt werden. Anschließend werden dann die Proteine mit Hilfe von Denaturierungsreagenzien aus den „Inclusion bodies“ isoliert.

Für eine Testsolubilisierung wurden Tests mit zwei Denaturierungsreagenzien (Guanidiniumchlorid, UREA) gemacht. Die Pellets wurden nach der Ultrazentrifugation für 2 Stunden mit dem jeweiligen Puffer (siehe Tabelle 4.9) bei RT vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden die solubilisierten „Inclusion bodies“ bei 16.000xg für 30 min abzentrifugiert. Die Überstände und Pellets wurden für nachfolgende Analysen vorbereitet.

Tabelle 4.9 Puffer für den Test der Aufreinigung der „Inclusion bodies“

Solubilisierungspuffer		Solubilisierungspuffer	
8 M	UREA	6 M	Guanidiniumchlorid
300 mM	NaCl	300 mM	NaCl
50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)

4.2.9 „Inclusion bodies“-Aufreinigung

Nachdem die beste Bedingung für die Solubilisierung der „Inclusion bodies“ gefunden wurde (vgl. 4.3.1), wurden diese im weiteren Verlauf der Arbeit wie folgt aufgereinigt. Nach der Ultrazentrifugation bei 40.000xg befindet sich NECAB2 im Pellet. Das Pellet wurde zunächst gewaschen, resuspendiert (Tabelle 4.10: Waschpuffer A) und 3x 10 Sekunden sonifiziert. Anschließend wurde erneut 1 h bei 4°C in der Ultrazentrifuge gefügt. Danach wurde das Pellet erneut gewaschen (Tabelle 4.10: Waschpuffer B). Es folgte eine erneute Zentrifugation. Im letzten Schritt wurde das Pellet im Waschpuffer C resuspendiert und sonifiziert (Tabelle 4.10) und anschließend zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde das Pellet im Solubilisierungspuffer (Tabelle 4.11) ü. N. bei RT resuspendiert. Am nächsten Tag wurde bei 40.000xg für 1h bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend gegen den Aufreinigungspuffer (Tabelle 4.11) dialysiert.

Tabelle 4.10 Waschpuffer für die Aufreinigung der „Inclusion bodies“

Waschpuffer A		Waschpuffer B		Waschpuffer C	
30 mM	Tris-HCl (pH 7,4)	30 mM	Tris-HCl (pH 7,4)	30 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
100 mM	NaCl	3 mM	DTT	100 mM	NaCl
3 mM	DTT	1 M	NaCl	3 mM	DTT
2%	Triton-X-100				
1 mM	EDTA				

Tabelle 4.11 Puffer für die Solubilisierung und Aufreinigung von His-NECAB2

Solubilisierungspuffer		Aufreinigungspuffer	
30 mM	Tris-HCl (pH 7,4)	30 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
100 mM	NaCl	100 mM	NaCl
3 mM	DTT	8 M	UREA
8 M	UREA		

4.2.10 Aufreinigung des rekombinanten, denaturierten NECAB2-Proteins mit His-tag (Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie)

Bei dieser Methode können nur Proteine mit einem Affinitätstag (hier Histidin) über nicht-kovalente Wechselwirkungen an die Matrix binden.

Proteine, die mit einem Histidinrest markiert sind, können so mittels einer Nickel-Affinitätschromatographiesäule aufgereinigt werden. Hierbei wurde eine Nickel-Agarosematrix verwendet auf der Ni^{2+} -Ionen mittels Chelatisierung an vierzählige Nitrilotriacetatgruppen gebunden sind. Das Prinzip beruht darauf, dass die Nitrilotriessigsäure mit 4 von 6 Koordinationsstellen des Nickels komplexiert wird. Im Verlauf der Aufreinigung binden dann zwei deprotonierte Histidinreste an die freien Stellen des Nickels, sodass sich ein oktaedrischer Chelatkomplex ausbilden kann. Proteine ohne His-tag binden nur schwach oder gar nicht an die Säule und werden mit ansteigender Imidazolkonzentration von der Säule gelöst.

Die Aufreinigung erfolgte mit der *Äkta prime plus* am Institut für physikalische Biologie (AG Prof. Dr. Willbold). Es wurden jeweils vor dem Beladen der Säule vom Proteinlysate und vom Durchfluss Proben genommen, um diese mittels SDS-PAGE zu analysieren. Mit Hilfe eines 5 ml-Loops wurde die vorher dialysierte, in UREA denaturierte Proteinlösung (ohne DTT), auf die mit Wasser und Bindungspuffer gewaschene Nickelsäule injiziert. Anschließend wurde die Säule mit einem Gradienten vom Bindungspuffer hin zum Elutionspuffer (0-100%) gewaschen. Die eluierten Fraktionen wurden ab einer Imidazolkonzentration von ca. 150 mM in Reagenzglasern aufgefangen.

Exemplarisch sind in Tabelle 4.12, die Puffer für die etablierte Aufreinigung mit UREA dargestellt.

Tabelle 4.12 Bindungs- und Elutionspuffer

Bindungspuffer		Elutionspuffer	
30 mM	Tris-HCl (pH 7,4)	30 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
150 mM	NaCl	150 mM	NaCl
10 mM	Imidazol (pH 8)	150 mM	Imidazol (pH 8)
8 M	UREA	8 M	UREA

4.2.11 Renaturierung von NECAB2

Um nach der Aufreinigung mit der Affinitätschromatographie das mit UREA denaturierte NECAB2 wieder zu renaturieren, wurde die Proteinlösung mit einer 27g Nadel und Spritze langsam zu 200 ml Renaturierungspuffer pipettiert. Es wurde 1 ml dreimal dazupipettiert und jeweils 8 h lang bei 4°C gerührt. Anschließend erfolgte eine Ankonzentrierung von NECAB2 mit Hilfe der Ultrafiltration.

Tabelle 4.13 Renaturierungspuffer

Renaturierungspuffer	
100 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
400 mM	L-Arginin
2 mM	EDTA
0,5 mM	ox. Glutathion
5 mM	red. Glutathion
	Proteaseinhibitor

4.2.12 Ultrafiltration

Nach der Aufreinigung wurde das Protein in Ultrafiltrationsröhrchen (Amicon, Millipore) ankonzentriert. Die Röhrchen wurden vor dem Gebrauch mit Wasser gespült und anschließend mit dem Proteingemisch bei 4000xg 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die Ultrafiltrationsröhrchen sind mit Membranen ausgestattet, die eine bestimmte Porengröße besitzen (*cut off*: 30 kDa). Dabei gehen kleinere Moleküle verloren, während das Protein im Filter verbleibt und dadurch ankonzentriert wird. Das Volumen kann somit wie gewünscht verringert werden.

4.2.13 Dialyse

Als die wichtigste Methode für die Entsalzung der Proteine dient die Dialyse. Dafür wird die Proteinlösung mit Hilfe einer Spritze und einer Nadel (25g) in eine Dialysekammer (Thermo Scientific) gefüllt. Die Dialysekammern unterscheiden sich in der Porengröße, sodass die Proteine innerhalb der Kammer gehalten werden, während Salze herausdiffundieren können. Die Dialysekammer mit der Proteinlösung

wurde über Nacht bzw. mehrere Tage im Kühlraum gegen den gewünschten Puffer dialysiert.

4.2.14 Quantitative Proteinbestimmung

In dieser Arbeit wurde für die Proteinbestimmung das BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Kit der Firma Pierce verwendet. Das BCA Kit beruht auf dem Prinzip der Biuretreaktion, in der Cu^{2+} in einer alkalischen Lösung zu Cu^+ reduziert wird. BCA reagiert mit Cu^+ zu einem violett gefärbten Komplex. Das Absorptionsmaximum des Komplexes liegt bei 562 nm. Die gemessenen Absorptionswerte bei 562 nm korrelieren mit der Menge an Protein pro Probe. Anhand einer BSA-Standardreihe, in der aufsteigende BSA-Konzentrationen (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) verwendet werden, lässt sich anschließend die Proteinkonzentration bestimmen. Für die Bestimmung wurde in eine 96-Lochnapfschale die BSA Standardreihe in Triplikaten zu je 15 μl pipettiert. Die gewünschten Proteinlysate wurden zunächst 1:10 verdünnt und auch in Triplikaten zu je 15 μl in die Lochnapfschale pipettiert. Anschließend wurde nach Herstellerangaben die BCA Lösung zu den Proteinproben pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesegerätes (Tecan) gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte entweder durch die Magellan Software oder manuell mit Microsoft Excel.

4.2.15 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteinexpression nachzuweisen, wurde unter anderem die SDS-PAGE verwendet. Bei dieser Methode wandern die Proteine durch eine Polyacrylamidmatrix. SDS überdeckt dabei die Eigenladung der Proteine, sodass diese nur aufgrund ihrer Größe im Gel aufgetrennt werden. β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) dienen als Reduktionsmittel, um Disulfidbrücken aufzubrechen. Die Proteinlysate wurden mit 10x Reduzierungsagens und 4x LDS Ladepuffer (Life Technologies) versetzt und für 5 Minuten bei 99°C denaturiert. Anschließend wurden gleiche Mengen Protein und ein Proteinstandard (MagicMark XP Western Protein Standard, Life Technologies oder His-Markerproteinstandard, Life Technologies) in die einzelnen Taschen des denaturierenden 8-16% Bis-Tris Gradientengels (Thermo Scientific) bzw. 4-15% Bis-Tris Gradientengels (BioRad) geladen. Die Gelapparatur wurde mit 1x MOPS Puffer (Life Technologies) bzw. 1x Laufpuffer (BioRad) gefüllt und betrug bei 120 V 45 Minuten (Thermo Scientific) bzw. bei 300 V 15 Minuten (BioRad).

4.2.16 Immunoblot

Diese Methode dient als spezifischer Nachweis für ein gewünschtes Protein. Dabei werden Proteine nach Auftrennung im SDS-Gel auf eine Membran transferiert und mittels eines spezifischen Antikörpers sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurden die Proteine mit Hilfe des iBlot Gerätes (Life Technologies) bzw. des Turbo Blotters (BioRad) auf eine Nitrocellulose bzw. PVDF Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S Lösung benetzt. Ponceau S dient zum einen zur Fixierung der Proteine auf der Membran und zum anderen zum direkten Nachweis des Proteintransfers. Anschließend wurde mehrfach mit PBS-T (PBS mit 0,05% Tween) gewaschen, um die Reste der Ponceau S Lösung zu entfernen. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran für eine Stunde mit 3%igem Magermilchpulver in PBS-T inkubiert. Anschließend wurde über Nacht mit dem primären Antikörper (3% Milch in PBS-T) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal für 10 Minuten mit PBS-T gewaschen und anschließend für eine Stunde bei RT mit dem sekundären Antikörper (1:30.000 IRDye 680 oder IRDye 800, Licor bzw. 1:15000 IRDye680 oder IRDye800, New England Biolabs in 3% Milch in PBS-T) inkubiert, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist. Es erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen für 10 Minuten in PBS-T. Mit Hilfe des Odyssey Lesegerätes wurden die Banden im Nah-Infrarotbereich sichtbar gemacht.

4.2.17 Blaue Nativ Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Bei der BN-PAGE werden Proteine in ihrer nativen, gefalteten Form nach Größe aufgetrennt (Schägger and von Jagow, 1991). Im Unterschied zur SDS-Gelelektrophorese bindet bei der BN-Page kein denaturierendes Detergenz. Die elektrophoretische Mobilität der Proteine wird durch Bindung des amphiphilen, negativ geladenen Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G-250 erreicht. In dieser Arbeit wurden fertige native Gele der Firma Invitrogen verwendet. Die Hirne der WT und KO Tiere wurden mit PBS und Proteaseinhibitor (pro 3 g Hirn 9 ml PBS) und einem Homogenisierer resuspendiert. Die Proben wurden mit Wasser, 4x Probenpuffer und Coomassielösung versetzt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenvergleich wurde ein Größenstandard aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 150 V für eine Stunde und anschließend bei 250 V im Kühlraum durchgeführt. Das Gel wurde geblottet und anschließend die Membran mit einem Entfärbungspuffer (40% Methanol, 10% Essigsäure) entfärbt und mit spezifischen

primären Antikörper und dem HRP gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert und per UV Transilluminator detektiert.

4.2.18 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Autoradiogramm

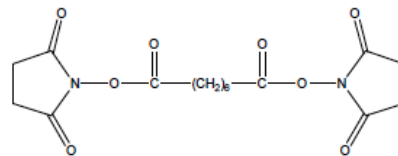
Um die Funktion des aufgereinigten, rekombinanten NECAB2 zu testen wurde ein radioaktiver Calciumblot verwendet. Dafür wurden 12 μg des gereinigten NECAB2 sowie eine Positivkontrolle (Calmodulin) auf ein denaturierendes SDS Gel geladen. Nach der SDS-PAGE erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit Hilfe des Bio-Rad Turboblotter (siehe 4.3.9). Nach dem Transfer wurde die Membran mit PBS-T gewaschen, für 10 Minuten mit 0.1 mCi $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in 60 mM KCl, 10 mM HCl (pH 6.8), 5 mM MgCl_2 inkubiert. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran für 5 Minuten mit Wasser gewaschen, dann mit Saran getrocknet und für 11 Tage mit dem Storage Phosphor Screen (Ge Healthcare) exponiert. Gescannt wurde die Autoradiographie mit dem Typhon Trio+ Scanner (Ge Healthcare). Die Exposition mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Jacek Kuźnicki am Internationalen Institut für Molekularbiologie in Warschau durchgeführt (Maruyama et al., 1984).

4.2.19 Immunpräzipitation (IP)

Um Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren, wurden in dieser Arbeit Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei wurde das Co-Immunopräzipitationskit der Firma Pierce verwendet. Zwei potentielle Interaktionspartner wurden in CHO-Zellen zunächst ko-transfiziert, wobei ein Protein ein Myc-tag trug. Nach der Zelllyse mit RIPA-Puffer wurden die Proteinlysate zunächst auf die erfolgreiche Transfektion anhand eines Immunoblots überprüft. 500 μg Protein wurden ü.N. mit den Agarosekügelchen inkubiert. Diese Kügelchen besitzen an ihrer Oberfläche immobilisierte Myc-Antikörper. Am nächsten Tag wurde das Proteinlysate auf die Handee Spin Säule der Firma Pierce gegeben. Die Säulen wurden zentrifugiert und anschließend dreimal mit eiskaltem TBS gewaschen. Zum Eluieren der an die immobilisierten Myc-Antikörper gebundenen Protein-Interaktionspartner wurden 25 μl des 2x nicht-reduzierenden Probenpuffers (Pierce) hinzugegeben. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 99°C aufgeköcht und anschließend abzentrifugiert. Als Reduzierungsmittel diente anschließend das 10x reduzierende Agens der Firma Life Technologies, bevor die Proben ein weiteres Mal für 5 Minuten bei 99°C erhitzt wurden. Anschließend erfolgte die Analyse der Interaktionspartner mit Hilfe des Immunoblots.

4.2.20 Chemisches *Crosslinking*

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Dimerbildung von NECAB2 mittels eines chemischen *Crosslinkers* gemacht. Dabei bieten chemische *Crosslinker* (Vernetzungsreagenzien) eine unmittelbare Methode, um Interaktionen von Untereinheiten bzw. Proteinen zu untersuchen. Durch Gebrauch von bifunktionellen Reagenzien, die reaktive Gruppen besitzen, können kovalente Bindungen mit SH-Gruppen bzw. primären Aminen der Proteine entstehen. In dieser Arbeit wurde der *Crosslinker* Disuccinimidylsuberat (DSS) verwendet.



Disuccinimidylsuberat (DSS).

Für die *Crosslinking*-Experimente mit DSS wurden 2 mg DSS in 54 μ l DMSO gelöst (100 mM Stammlösung). Davon wurden für die Experimente mit dem rekombinanten NECAB2 ansteigende DSS Konzentrationen verwendet (0, 70, 200, 700 μ M). Vor dem Experiment wurde das Protein in einen HEPES Puffer (30 mM HEPES) umgepuffert, um störende Amingruppen des Tris für das *Crosslinking* zu entfernen. Für das *Crosslinking* der Zellen wurden diese vorher entweder mit 2 mM EGTA oder mit PBS für 30 min inkubiert, bevor sie mit 2,5 mM DSS für 30 Minuten inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das rekombinante Protein direkt auf ein SDS-Gel übertragen.

4.2.21 Immunzytochemie/Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunzyto- bzw. Immunhistochemie lassen sich bestimmte molekulare Strukturen in einem Gewebe oder in Zellen anfärben. Man bedient sich dabei fluoreszierender Antikörper, die spezifisch in Geweben oder Zellen bestimmte Kompartimente anfärben können.

Immunzytochemie

Die Zellen wurden zu einer bestimmten Zellzahl in 24- oder 12-Lochnapfplatten ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit der Fixierlösung fixiert. Anschließend wurde zweimal erneut mit PBS gewaschen und für 10 min permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellen für 1 Stunde mit der

Blockierlösung geblockt und anschließend mit dem primären Antikörper in Färbelösung ü.N. bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper in Färbelösung für 1 Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 3 Minuten mit 100 nM DAPI inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Coverslips mit Hilfe einer Pinzette aus der 24 Lochnapfschale herausgeholt, kurz in MilliQ Wasser getaucht und dann mit DakoAmount (Sigma) eingedeckelt.

Tabelle 4.14 Verwendete Puffer für die Immunzytochemie

Fixierlösung	Blockierlösung	Färbelösung
4% PFA (Roti-Histofix, Carl Roth)	1x Roti-Immunoblock in PBS (Carl Roth)	1x Blockierlösung in PBS, 0,1% TritonX-100

Immunhistochemie mit fluoreszenter Sekundärantikörperfärbung

In dieser Arbeit wurden adulte Mäuse zunächst mit Isofluran narkotisiert und anschließend mit 4% PFA perfundiert. Nach der Perfusion wurden die Hirne entnommen und für 24 Stunden in PFA eingelegt, dann in PB überführt und für das Schneiden mit dem Vibratom vorbereitet. Dafür wurden die Hirne in *Low melting* Agarose eingebettet und dann mit Hilfe des Vibratoms in 50 µm dicke Scheiben geschnitten und in 24-Lochnapfschalen in PB ü.N. gelagert. Das Färben erfolgte mit der Methode des *free floatings*. Nach mehrmaligem Waschen mit PB erfolgte das Blocken mit der Blockierlösung für eine Stunde. Bei der Immunhistochemie wurden die einzelnen primären, wie auch die einzelnen sekundären Antikörper nacheinander gefärbt. Die Schnitte wurden zunächst mit dem ersten primären Antikörper für 3 Stunden gefärbt, anschließend erfolgte ein fünfmaliges Waschen zu je 7 Minuten mit PB und danach wurde der zweite primäre Antikörper für 3 Stunden gefärbt. Es erfolgte ein weiteres fünfmaliges Waschen zu je 7 Minuten. Mit den Sekundärantikörpern wurde genauso verfahren. Nach dem letzten Waschen wurde für 10-15 Minuten mit 100 nM DAPI gefärbt und anschließend nochmal zweimal für je 7 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen und mit ProLong Gold der Firma Invitrogen eingedeckelt.

Tabelle 4.15 Verwendete Puffer für die Immunhistochemie

Fixierlösung	Blockierlösung	Färbelösung
4% PFA (Roti-Histofix, Carl Roth)	5% Normal Goat Serum, 0,5% Triton X-100 (Life Technologies) in PB	PB

Immunhistochemie mit DAB Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen mit DAB für Maus und Mensch wurden in Kooperation von Dr. Katrin Frauenknecht durchgeführt. Dafür wurden Hirne der WT Maus und des Menschen automatisiert gefärbt. Die automatisierte Färbung erfolgte im DAKO Autostainer. Die Schnitte wurden mit 100 µl H₂O₂ für 5 Minuten blockiert und mit 100 µl Tris-EDTA vorbehandelt. Die Primärantikörperinkubation erfolgte mit Anti-NECAB2 (1:2400) für 30 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte zunächst mit 100 µl des Sekundärreagenzes für 15 Minuten und mit 100 µl des Tertiärreagenzes für 20 Minuten behandelt. Die erste Inkubation mit DAB erfolgte mit 100 µl DAB und anschließend erneut mit 100 µl DAB. Die Gegenfärbung erfolgte mit 100 µl Hämalaun für 5 Minuten.

4.2.22 Synaptosomenpräparation

Für die synaptische Charakterisierung von NECAB2 wurden Synaptosomen von 8-12 Wochen alten WT und NECAB2 KO Tieren präpariert.

Die Synaptosomenpräparation erfolgte mit einer Kooperation der AG Prof. Dr. Trotter der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Hatice Yigit führte die Synaptosomenpräparation durch.

Nach der Hirnentnahme wurde das Hirn zunächst gewogen und anschließend mit Puffer A (10 ml/g) 10x mit einem Glass Potter homogenisiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 1000xg und 4°C wurde der Überstand verwahrt und das Pellet in 5 ml Puffer A resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Homogenisierung mit dem Glass Potter und eine anschließende Zentrifugation. Der Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereint und die Pellets verworfen. Der vereinte Überstand wurde bei 12000xg für 15 Minuten und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml Puffer A resuspendiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 12000xg für 20 Minuten und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Puffer B (1.5 ml/g) resuspendiert. Diese Probe wurde auf einen Sucrose Step Gradienten geladen (SW40Ti: 10 ml Röhren, 3ml pro Gradient). Anschließend wurde 2 h bei 85.000xg und 4°C zentrifugiert (SW40Ti: 26000 rpm). Die unterschiedlichen Fraktionen, wie Myelin, Membranfraktion, Synaptosomen und Mitochondrien wurden gesammelt und anschließend per Immunoblotting analysiert.

Tabelle 4.16 Puffer für die Synaptosomenpräparation

Puffer A		Puffer B	
0.32 M	Sucrose	0.32 M	Sucrose
5 mM	HEPES (pH 7.4)	5 mM	TRIS (pH 8.1)
	Proteaseinhibitor		Proteaseinhibitor

Tabelle 4.17 Gradientenpuffer

Gradient 1		Gradient 2		Gradient 3	
0.85 M	Sucrose	1 M	Sucrose	1.2 M	Sucrose
5 mM	TRIS (pH 8.1)	5 mM	TRIS (pH 8.1)	5 mM	TRIS (pH 8.1)
	Proteaseinhibitor		Proteaseinhibitor		Proteaseinhibitor

4.2.23 NADPH Assay

Zur Überprüfung der funktionellen Aktivität des rekombinanten NECAB2 Proteins wurde ein NADPH Assay durchgeführt. Je nachdem, ob eher NADP⁺ oder eher NADPH vorliegt, gibt es ein Absorptionsmaximum für die oxidierte Form bei 260 nm (NADP⁺) oder für die reduzierte Form bei 340 nm (NADPH). Dafür wurde das rekombinante, renaturierte His-NECAB2 in eine 96-Lochnapfschale pipettiert und mit 100 µM NADPH inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation mit Wasser. Als Negativkontrolle diente BSA und das denaturierte NECAB2 Protein. Sofort nach Zugabe von NADPH wurde innerhalb einer Stunde im Zeitabstand von 10 Minuten ein Absorptionsspektrum von 230-370 nm im Plattenauslesegerät aufgenommen.

4.3 Zellkulturtechniken

4.3.1 Striatale Neuronenprimärkultur

Für diese Arbeit wurden tragende Mäuse im Embryonalstadium E16-E18 verwendet. Das Muttertier wurde fachgerecht mittels Genickbruch getötet. Anschließend wurde das Fell des Tieres mit Ethanol desinfiziert und der Bauchraum mittels einer Schere geöffnet. Der Uterus wurde entnommen und die Embryonen in eine Zellkulturplatte auf Eis überführt. Nach der Dekapitation der Embryonen wurde unter einer Sterilbank mit Hilfe eines bimolekularen Mikroskops das dorsale und ventrale Striatum aus den embryonalen Mäusen herauspräpariert. Die Striata wurden in einem Zentrifugenröhrchen mit HBSS +/- auf Eis gesammelt. Für 3-5 Tiere wurden 9 ml HBSS verwendet. Anschließend wurde unter der Sterilbank das HBSS abgesaugt und mit frischem 5 ml HBSS ersetzt. Anschließend wurden erneut 5 ml auf die Striata

pipettiert und mit 120 µl Trypsin und 10 µl DNase für 12-14 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen und das Gewebe mit 3 ml Präparationsmedium (siehe 3.6.2) versehen. Mit einer steril abgeflamnten Pasteurpipette wurde das Gewebe im Präparationsmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min stehen gelassen. Der Überstand wurde dann in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellzahl mittels des BioRad Zellzählgerätes bestimmt. Es wurden jeweils 300.000 Zellen in eine mit 0,2 % Poly-L-lysin beschichtete 12-Lochnapfschale bzw. 150.000 Zellen in eine 24-Lochnapfschale pipettiert. Für mikroskopische Untersuchungen wurden vorher sterile Deckgläschen in die Lochnapfschalen gegeben. Die Kultivierung der striatalen Neuronenprimärkulturen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Das Medium wurde vorher auf 37°C angewärmt. Vier Stunden nach dem Ausplattieren wurde das Präparationsmedium abgesaugt und durch Kultivierungsmedium (siehe 3.6.2) ersetzt. An Tag 3 wurde das Medium abgesaugt und gegen frisches Kultivierungsmedium ausgetauscht. Die striatale Neuronenkultur wuchs bis zu Tag 14 heran und wurde anschließend für die Experimente verwendet.

4.3.2 Kultivierung immortalisierter Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ entweder in 10 cm Platten oder Zellkulturflaschen in den jeweiligen Medien (siehe 3.6.2) kultiviert. In einem Abstand von jeweils 3-4 Tagen wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Platten oder Flaschen mit PBS gewaschen und anschließend für 2-3 Minuten mit Trypsin inkubiert. Die Zellen wurden mit einer 1 ml Pipette im Trypsin trituiert. Durch das 10-fache Volumen an Kulturmedium wurde Trypsin inaktiviert, da das im Kulturmedium enthaltene FCS an die Peptidbindungen im Trypsin bindet und so die Reaktion stoppt. Eine bestimmte Zellmenge wurde dann mit frischem Medium auf neue Zellkulturplatten verteilt.

4.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die duale Zählkammer (TC10 System Counting Slides Dual Chamber) der Firma Bio-Rad bzw. die Zählkammer Luna der Firma Biozym verwendet. Trypanblau diente zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen. Dabei dringt der Farbstoff nur in die toten Zellen ein und wird von dem Zählgerät als tote Zelle erfasst. Dafür wurden die Zellen 1:1 mit Trypanblau gemischt

Das Zellzählgerät ermittelt die Zellzahl mit folgender Formel:

Zellzahl= Anzahl gezählter Zellen x Verdünnungsfaktor x 10^4 Zellen/ml

4.3.4 Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion wurde das Reagenz Attractene nach Angaben des Herstellers Qiagen verwendet. Die Methode beruht darauf, dass nicht-liposomales Lipid mit der negativ geladenen DNA einen Komplex bildet, der dann in die Zellen eintreten kann. Typischerweise wurden die Zellen in einer 6-Loch-Napfschale transfiziert. Dafür wurden 200.000 Zellen/Loch am Tag vor der Transfektion ausplattiert, sodass die Zellen am nächsten Tag zu 60-80% konfluent waren. Es wurden 1,5 µg DNA mit 100 µl Optimem und 4,8 µl Attractene zunächst gevortext, zentrifugiert und dann für 15 Minuten bei RT inkubiert. In den 15 Minuten der Komplexbildung wurde das Medium in der 6-Lochnapfschale erneuert. Anschließend wurde die Lösung tropfenweise zu den Zellen pipettiert, die Platte vorsichtig geschüttelt und anschließend bei normalen Wachstumsbedingungen kultiviert. Nach 24 bzw. 48 h wurde die Transfektionseffizienz mittels Mikroskopie oder Western Blot nachgewiesen.

4.3.5 Generierung von stabilen überexprimierenden Necab2 Zelllinien

Für die Generierung stabiler Zelllinien wurde das Piggy Bac Transposon System verwendet. Diese Methode beruht darauf, dass die Transposase das Zielgen aus der flankierenden Erkennungssequenz herausschneidet. Das Zielgen wird nach dem Prinzip des „Cut & Paste“ mit Hilfe von TTAA Sequenzen, die zufällig im Genom vorkommen, integriert (Fraser et al. 1996, Kettlun et al. 2011). Die unterschiedlichen Necab2 Konstrukte (WT, Ala (E84A-E118A), Δ CC1, Δ CC2, Δ ABM), die sich in dem pBac-CAG-HA-Venus-DEST Vektor befanden, wurden mit Hilfe des hy-pBase-Vektors dauerhaft in das Genom der HT22 Zellen integriert. Dabei wurden 3-4 Sortierungsrunden mit Hilfe des Hochgeschwindigkeitssorters (MoFlo XDP; Beckman-Coulter) durchgeführt, um die Venus-leuchtenden Zellen zu sortieren. Ab einer Prozentzahl von über 80% transfizierten Zellen wurden die Zellen expandiert, für Experimente verwendet oder langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.3.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen können langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Um intrazelluläre Eisbildung zu vermeiden, müssen die Zellen in einem speziellen Medium eingefroren

werden. Damit dient DMSO als Inhibitor für die Eisbildung. Zum Einfrieren wurden ca. 2×10^6 Zellen/ml trypsinisiert, mit Medium versetzt und anschließend bei 1200 rpm für 3 min bei RT zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend im Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert. Da DMSO einen toxischen Einfluss auf die Zellen hat, wurde die Zeit bei RT kurz gehalten. Die Zellen wurden zunächst für 24 h in eine „freezing box“ überführt. Diese bewirkt eine langsame Abkühlung, bei der pro Stunde eine Temperaturerniedrigung um 1°C erreicht wird. Anschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Für das Auftauen wurden die Zellen rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in 10 ml Medium überführt und bei 1200 rpm bei RT für 3 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturplatte überführt und sofort bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um die toten Zellen zu entfernen. Beim Erreichen einer Konfluenz von ca. 90 % wurden die Zellen passagiert und anschließend wie in 4.3.2 kultiviert.

4.4 Biophysikalische Methoden

4.4.1 CD (Circular dichroism)- Spektroskopie

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann die Stereochemie optisch aktiver chiraler Moleküle bestimmt werden. Die beiden Enantiomere eines Moleküls absorbieren dabei unterschiedlich stark zirkulär polarisiertes Licht. Gemessen wird die Elliptizität

$$q(l) = \text{const.} (e_L - e_R) \times c \times d$$

wobei e_L bzw. e_R die Absorptionskoeffizienten, c die Konzentration und d die Schichtdicke der Küvette darstellen. Die Abhängigkeit der Elliptizität q von der Wellenlänge λ wird im CD-Spektrum aufgezeichnet.

Bei der Aufnahme eines CD Spektrums wird durch einen Monochromator Licht einer Wellenlänge λ erzeugt, die dann linear polarisiert wird. Ein Modulator erzeugt dann unter Einfluss eines hochfrequenten elektrischen Wechselfeldes eine links- und eine rechtszirkular polarisierte Welle. Ein synchron dazu geschalteter Detektor detektiert dann alternativ e_L oder e_R . Daraus wird mit der Variation der Wellenlänge ein CD Spektrum aufgenommen. Mit Hilfe der CD Spektroskopie ist es möglich, Sekundärstrukturen von Proteinen zu analysieren. Bei einem Protein mit unbekannter

Struktur wird zunächst ein CD Spektrum aufgenommen, welches dann mathematisch an einer Linearkombination von Beiträgen einer reinen α -helikalen Struktur, einer reinen β -Faltblattstruktur und einer reinen Knäuelstruktur angepasst wird. Durch die Anpassung der einzelnen Sekundärstrukturkomponenten des Proteins erhält man die Anteile für das unbekannte Protein.

Für die experimentelle Durchführung wurde das aufgereinigte, rekombinante und renaturierte NECAB2 Protein genommen. Die CD-Spektroskopie wurde in einem J815 CD Spektrometer mit Temperiereinheit am Institut für physikalische Biologie an der Uni Düsseldorf in Kooperation mit Dr. Lothar Gremer durchgeführt. Das Protein wurde zunächst in einen Natriumphosphat-Puffer (30 mM NaPi, 150 mM NaCl) mittels Dialyse umgepuffert. Anschließend wurde zunächst der Puffer mittels einer Spritze in eine Küvette injiziert (200 μ l) und als Hintergrund aufgenommen. Danach wurde die Proteinlösung (200 μ l) in die Küvette injiziert und gemessen.

4.4.2 CLS (*Confocal Laser-scanning*)-Mikroskopie

In dieser Arbeit wurde zum Analysieren von immunhistochemischen und immunzytochemischen Färbungen die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie angewendet. Bei der konfokalen Mikroskopie wird im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie nicht das gesamte Objekt zum selben Zeitpunkt belichtet, sondern zu jedem Zeitabschnitt ein Bildpunkt. Dabei rastert ein fokussierter Laserstrahl das Präparat ab. Ein dichroitischer Spiegel reflektiert einen großen Teil der Intensität des Laserstrahls. Dieser trifft auf zwei bewegliche Spiegel, die ihn durch das Objektiv auf das Objekt abbilden. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gesammelt und mit Hilfe des Scanspiegels zurück auf den dichroitischen Spiegel und der dahinter liegenden Detektionslochblende abgebildet. Das vom Objekt emittierte Licht wird anschließend vom Lichtdetektor farbselektiv gemessen. Dies wird durch einen Photomultiplier realisiert. Das durch Fluoreszenz abgegebene Licht wird an allen Orten des Objektes gemessen und anschließend als Bild konstruiert. Eine Lochblende im Strahlengang des detektierten Lichts verhindert, dass Licht aus anderen Ebenen blockiert wird und nur das Licht aus dem scharf abgebildeten Bereich durchgelassen wird. Dadurch wird ermöglicht, dass nur das Licht aus einem kleinen Volumen um den Fokuspunkt zum Detektor gelangt und so Bilder mit hohem Kontrast ermöglicht werden können.

4.4.3 STED (*Stimulation Emission Depletion*)-Mikroskopie

Zusätzlich zur konfokalen Laser Scanning Mikroskopie wurde in dieser Arbeit die STED-Mikroskopie angewandt um die Synapsenformation in den striatalen Neuronenkulturen genauer zu untersuchen. Die STED-Mikroskopie ist zunächst nach dem Prinzip von Fluoreszenz-Laser-Scanning Mikroskopen aufgebaut. Das STED-Mikroskop hat allerdings den Vorteil, das Abbe-Limit zu umgehen. Bei normalen Fluoreszenz-Laser-Scanning Mikroskopen gibt es eine Grenze, nach der es nicht mehr möglich ist, kleinere Details aufzulösen, die kleiner als die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts sind. Es wird durch gezieltes Ausschalten von Fluoreszenzfarbstoffen der übrigbleibende, noch fluoreszierende Bereich stark verkleinert, sodass damit die Auflösung unter der Beugungsgrenze ermöglicht wird. Das Objekt wird neben dem Anregungsstrahl zusätzlich gleichzeitig mit einem zweiten Laserstrahl, dem Ausschaltestrahl („depletion“), beleuchtet. Dabei werden die Fluoreszenzfarbstoffe im Außenbereich des Fokus durch stimulierte Emission ausgeschaltet. Stimulierte Emission tritt auf, wenn ein Fluorophor in einem angeregten Zustand auf ein Photon trifft, welches die Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand enthält. Nach der Wechselwirkung des Photons mit dem Fluorophor im angeregten Zustand kehrt das Molekül in den Grundzustand durch stimulierte Emission zurück, bevor die Fluoreszenzemission auftreten kann. Beim Scannen dieses Objektes ist es mit dieser Methode möglich, viel feinere Details aufzulösen als mit einem normalen Laser-Raster-Mikroskop. Für die Probenvorbereitung wurden Sekundärantikörper gewählt, die speziell für die STED-Mikroskopie entwickelt wurden. In dieser Arbeit wurden die Antikörper Anti-Chromeo 505 und Anti-Abberior 440 verwendet (siehe Material 3.4.2).

5. Ergebnisse

5.1 NECAB2 wird ausschließlich im Hirn und vorwiegend im Striatum exprimiert

Frühere Publikationen konnten zeigen, dass NECAB2 ausschließlich im Hirn und speziell im Striatum und in der CA1 und CA2 Region des Hippocampus exprimiert wird (Canela et al., 2007; Canela et al., 2009; Zimmermann et al., 2013). Um NECAB2 näher charakterisieren zu können, war es sinnvoll, diese Daten zu verifizieren. Dafür wurden verschiedene Gewebe und Hirnareale aus der Maus entnommen und entweder im Immunoblot (siehe Kapitel 4.2.16) oder in immunhistochemischen Färbungen (siehe Kapitel 4.2.21) analysiert. Wie in Abbildung 5.1A zu sehen, wird NECAB2 ausschließlich im Hirn exprimiert. Der NECAB2 Antikörper detektierte beide Spliceisoformen bei 43 kDa und 39 kDa, die auch schon in früheren Arbeiten detektiert wurden (Canela et al., 2007; Canela et al., 2009). Als Kontrolle diente das Hirn der homozygoten NECAB2 $-/-$ (KO) Maus (Spalte 1 in Abbildung 5.1A). Die heterozygote NECAB2 KO Maus (NECAB2 $+/-$) wurde von der Firma KOMP bezogen. Eine detaillierte Beschreibung der Maus und der Zucht ist in Kapitel 3.9 dieser Arbeit zu finden. Um den genauen Expressionsort im Hirn lokalisieren zu können wurden verschiedene Areale des Hirns entnommen, lysiert und per Immunoblot analysiert (Abbildung 5.1B). Die Quantifizierung von drei unabhängigen Immunoblots zeigte die signifikante Expression von NECAB2 im Striatum. Diese Daten wurden bereits von einem früheren Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe generiert (Diplomarbeit Armagan Özgür). Wie in Abbildung 5.1C zu sehen ist, konnte die Expression im Striatum mit immunhistochemischer Färbung bestätigt werden. Als striataler Marker diente DARPP32. Die konfokalmikroskopische Aufnahme zeigt das Striatum mit NECAB2 (grün) und DARPP32 (rot) Färbung. Zusätzlich zur Expression im Striatum konnten in einer immunhistochemischen Färbung mit Anti-NECAB2 und anschließender DAB Färbung die CA2 Region des Hippocampus und erstmals die Habenulae als Expressionsorte von NECAB2 gefunden werden (Abbildung 5.1D). Die Expression von NECAB2 in der CA1 Region des Hippocampus (Canela et al., 2007) konnte hier nicht bestätigt werden. Um auszuschließen, dass der Antikörper unspezifisch färbt, wurden Hirnschnitte der NECAB2 KO und der WT Maus mit Anti-NECAB2 gefärbt.

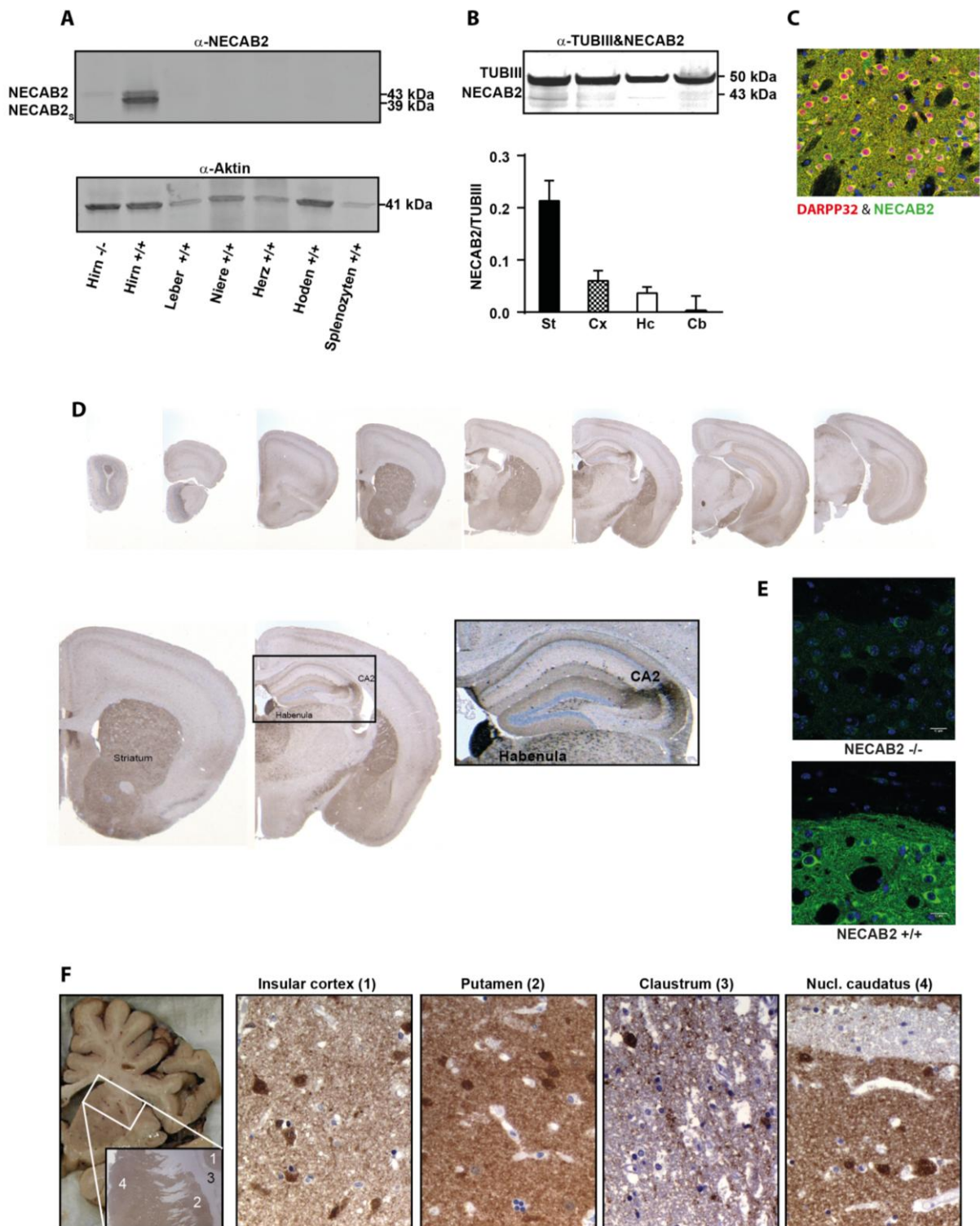


Abbildung 5.1: NECAB2 wird ausschließlich im Hirn und vorwiegend im Striatum exprimiert.

(A) Immunoblot zum Nachweis der NECAB2 Expression im Hirn in der adulten Maus. Die genannten Organe wurden präpariert und anschließend mit Anti-NECAB2 Antikörper im Immunoblot analysiert. NECAB2 (39 kDa und 43 kDa) wird ausschließlich im Hirn exprimiert. Als Ladekontrolle diente Aktin. (B) Immunologischer Nachweis der NECAB2 Expression im Striatum. Die Hirnregionen Striatum (St), Cortex (Cx), Hippocampus (Hc) und Cerebellum (Cb) wurden herauspräpariert und mittels Immunoblot analysiert. Der Nachweis der NECAB2 Expression erfolgte mit Anti-NECAB2. Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Quantifizierung von NECAB2 von jeweils drei

unabhängigen Immunoblots an. TUBIII diene als Ladekontrolle zur Normalisierung der NECAB2-Expression (43 kDa). (C) Immunhistochemischer Nachweis zur NECAB2-Expression im Striatum. Das Bild zeigt das Striatum gefärbt mit Anti-NECAB2 (grün) und dem striatalen Marker Anti-DARPP32 (rot). Größenmaßstab: 50 μm . (C) Automatisierte Färbung von Hirnschnitten aus der Maus mit Anti-NECAB2 und anschließender DAB. Als Gegenfärbung diene Hämalaun. NECAB2 ist stark exprimiert im Bulbus olfactorius, im Striatum, in der CA2 Region des Hippocampus, sowie in den Habenulae. (D) Immunhistochemischer Nachweis zur Herunterregulation von NECAB2 in den NECAB2 $-/-$ Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Hirnschnitte des Striatums von NECAB2 $-/-$ und NECAB2 $+/+$ Tieren wurden mit Anti-NECAB2 angefärbt. Zu sehen ist die fehlende Färbung des Striatums in den NECAB2 $-/-$ Tieren im Vergleich zu den WT Tieren. Größenmaßstab beträgt 17 μm . (E) Humane Hirnschnitte wurden automatisiert mit Anti-NECAB2 und anschließender DAB angefärbt. Als Gegenfärbung diene Hämalaun. Auch im menschlichen Hirn ist eine starke Expression von NECAB2 im Striatum (Putamen und Nucl. Caudatus) zu erkennen.

Abbildung 5.1E zeigt zwei konfokalmikroskopische Aufnahmen der spezifischen Färbung des Striatums von NECAB2 in der WT Maus und nur eine sehr schwache Färbung in der NECAB2 KO Maus. Die striatale Expression von NECAB2 konnte zudem auch im menschlichen Hirn bestätigt werden (Abbildung 5.1F). Die DAB Färbung zeigte eine starke Expression im Putamen und im Nucleus caudatus. Die DAB Färbungen der Hirnschnitte der Maus, sowie des Menschen wurden von Dr. Katrin Frauenknecht vom Institut für Neuropathologie durchgeführt.

5.2 Keine kompensatorische Regulation von *Necab1* oder *Necab3* in den NECAB2 $-/-$ Mäusen

Um auszuschließen, dass der NECAB2 KO in den NECAB2 KO Mäusen zu einer kompensatorischen Hochregulation der anderen Mitglieder der NECAB Familie führt,

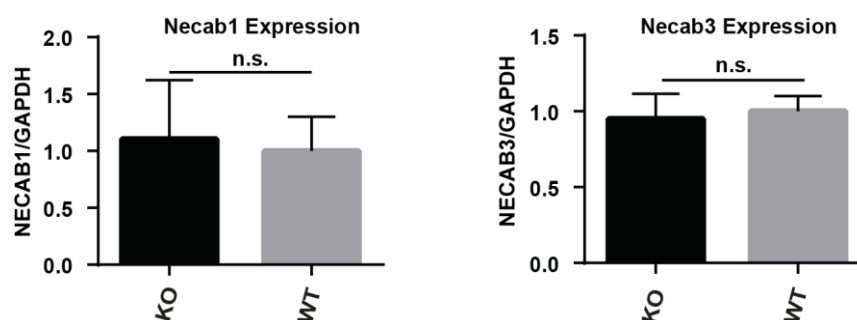


Abbildung 5.2: Keine kompensatorische Regulation von NECAB2 in den NECAB2 $-/-$ Mäusen durch NECAB1 oder NECAB3.

Quantitative Analyse von *Necab1* und *Necab3* mRNA mittels Echtzeit-RT-PCR. *Necab1* und *Necab3* zeigen keine veränderte Expression in den NECAB2 KO Tieren im Vergleich zur Expression in den WT Tieren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei verschiedenen Experimenten in Triplikaten. Der Vergleich der Säule zeigt keine Signifikanz von $P < 0,05$ bei einem student's t-test an.

wurde eine quantitative Echt-Zeit PCR auf *Necab1* und *Necab3* durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.4).

Wie in Abbildung 5.2 zu sehen, zeigten *Necab1* und *Necab3* keine veränderte Expression in den NECAB2 KO Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen. Daraus lässt sich schließen, dass der NECAB2 KO auf mRNA Ebene nicht durch eine vermehrte Expression der anderen Mitglieder der NECAB Familie kompensatorisch ausgeglichen wird.

5.3 NECAB2 ist vorwiegend präsynaptisch exprimiert

In früheren Arbeiten wurde bereits betont, dass NECAB2 sowohl in prä- als auch in postsynaptischen Strukturen exprimiert wird (Canela et al., 2007). Um die genaue Lokalisation von NECAB2 in synaptischen Strukturen zu finden, wurden zunächst, wie in Kapitel 4.1.22 beschrieben, die Synaptosomen von WT Mäusen mittels eines Sucrosegradienten isoliert. Bei der Isolation der Synaptosomen wurden außerdem noch die Mitochondrien-, die light membrane- und die Myelinfraktion aufgefangen. Wie im Immunoblot in Abbildung 5.3A zu sehen, wird NECAB2 fast ausschließlich in den Synaptosomen exprimiert. PSD95 ist ein postsynaptischer Marker und wurde als Nachweis der Synaptosomenfraktion verwendet. Um herauszufinden, ob NECAB2 eher in der Präsynapse oder in der Postsynapse exprimiert wird, wurde nach der allgemeinen Synaptosomenpräparation die präsynaptische von der postsynaptischen Fraktion getrennt. Abbildung 5.3B zeigt, dass NECAB2 in prä- und in postsynaptischen Fraktionen exprimiert wird. Als präsynaptischer Marker diente Synaptophysin. Die Synaptosomenpräparation wurde in Kooperation mit Hatice Yigit von der AG Prof. Dr. Trotter durchgeführt. Eine Verifikation der Ergebnisse wurde mittels STED-Mikroskopie vorgenommen. Mit Hilfe der STED-Mikroskopie lassen sich kleinste, feine Strukturen scharf auflösen (Hell and Wichmann, 1994). Dafür wurde eine striatale Primärneuronenkultur aus WT Embryonen des Entwicklungsstadiums E16-E18 angelegt. An Tag 14 wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern für die STED-Mikroskopie gefärbt. Eine detaillierte Beschreibung der striatalen Primärneuronenkultur, sowie der STED-Mikroskopie ist in den Kapiteln 4.3.1 und 4.4.2 zu finden. Abbildung 5.3B zeigt die Einzelfärbungen von NECAB2, Synaptobrevin2 und PSD95, sowie die überlagerten Bilder von NECAB2 mit Synaptobrevin2 und NECAB2 mit PSD95. Die STED-Aufnahme des überlagerten Bildes von Synaptobrevin2 und NECAB2 zeigte eine partielle

Kolokalisation (gelbe Punkte). Eine Kolokalisation von PSD95 und NECAB2 war hingegen nicht zu erkennen.

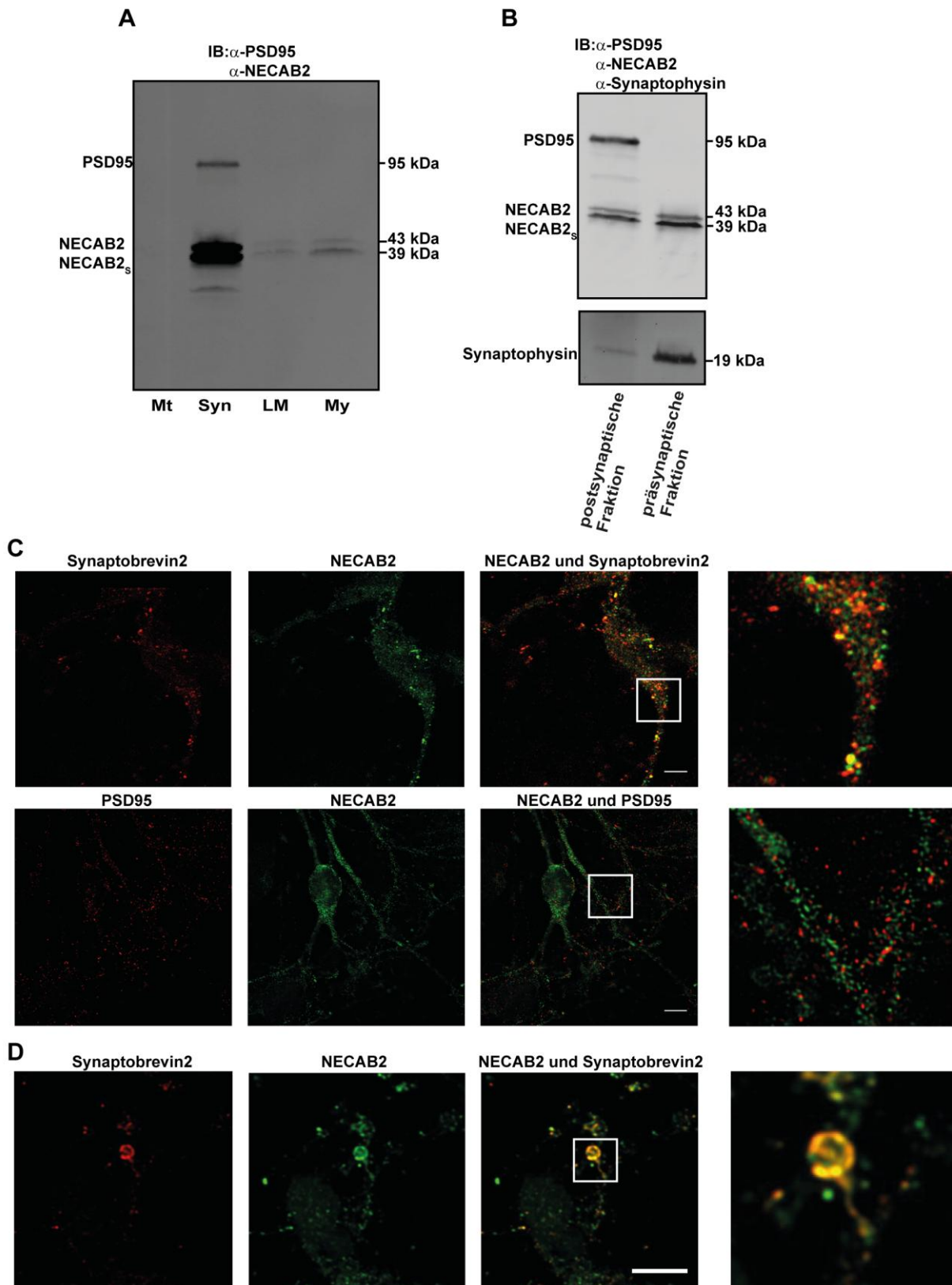


Abbildung 5.3: NECAB2 ist vorwiegend präsynaptisch in striatalen Neuronen exprimiert.

(A-B) Von jeweils drei Mäusen wurde das Hirn entnommen und die Synaptosomenfraktion mit Hilfe eines Sucrosegradienten präpariert. Dargestellt ist exemplarisch jeweils ein Immunoblot von einer Maus. (A) Immunoblot mit Fraktionen der Synaptosomenpräparation. Antikörperfärbung mit Anti-NECAB2 und Anti-PSD95. NECAB2 ist vorwiegend in der Synaptosomenfraktion exprimiert. Mt=Mitochondrien, Syn= Synaptosomen, LM=Light membrane, My=Myelin. (B) Immunoblot mit Fraktionen der prä- und postsynaptischen Präparation. Als Kontrolle der Fraktionen diente Anti-PSD95 und Anti-Synaptophysin. NECAB2 ist vorwiegend in der präsynaptischen Fraktion exprimiert (C-D) Striatale Neurone aus Embryonen wurden auf PLL-beschichteten Glasplättchen ausplattiert und für 14 Tage inkubiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Primärantikörpern gegen NECAB2, gegen den präsynaptischen Marker Synaptobrevin2 und den postsynaptischen Marker PSD95. NECAB2 kolokalisiert partiell mit Synaptobrevin2. (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Neurons mit dem STED-Mikroskop. Die Maßstabsleiste repräsentiert 50 µm. (D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines *Spines* mit dem Konfokalmikroskop. Maßstabsleiste entspricht 25 µm.

Die Kolokalisation von NECAB2 und Synaptobrevin2 wird auch in Abbildung 5.3D deutlich. Hier ist eine konfokalmikroskopische Aufnahme des z-Stapels eines *Spines* (Dorn) zu sehen. Das überlagerte Bild von NECAB2 (grün) und Synaptobrevin2 (rot) zeigt deutlich die Kolokalisation (gelb) an. Da NECAB2 nur mit dem präsynaptischen Marker Synaptobrevin2 kolokalisierte, deutet dies auf eine eher präsynaptische Expression von NECAB2 hin.

5.4 Expression und Aufreinigung vom rekombinanten, humanen NECAB2

Zur funktionellen und strukturellen Charakterisierung von NECAB2 wurde das humane NECAB2 als rekombinantes Protein in *E.coli* exprimiert und anschließend mittels Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt.

5.4.1 Rekombinantes humanes NECAB2 wird in unlöslichen "Inclusion bodies" exprimiert.

Nach der erfolgreichen Klonierung von NECAB2 in den Expressionsvektor pET28a mit N-terminalem His-tag sollte in einer Testexpression die beste Expressionsbedingung gefunden werden. Eine detaillierte Beschreibung der Textexpression ist in Kapitel 4.2.3 zu finden. Insgesamt wurden 3 verschiedene Temperaturen (25°C, 30°C und 37°C) mit unterschiedlichen Expressionszeiten (1 Stunde, 2 Stunden, 3 Stunden und ü.N.) getestet. In Abbildung 5.4A ist exemplarisch ein Immunoblot mit den besten Bedingungen dargestellt. Die Färbung des Immunoblots mit Anti-His und Anti-NECAB2 zeigte NECAB2 auf der erwarteten Höhe von ca. 43 kDa. His-NECAB2 wurde am stärksten bei 30°C und 3 Stunden

Expressionszeit exprimiert. Der His-Marker diente als Kontrolle des His-Antikörpers. Da die Aufreinigung der Testexpression in einer Tischzentrifuge erfolgte, stellte sich erst später heraus, dass His-NECAB2 in einem größeren Expressionsansatz nach der Ultrazentrifugation bei 40.000xg nicht im Überstand zu finden ist (Daten nicht gezeigt).

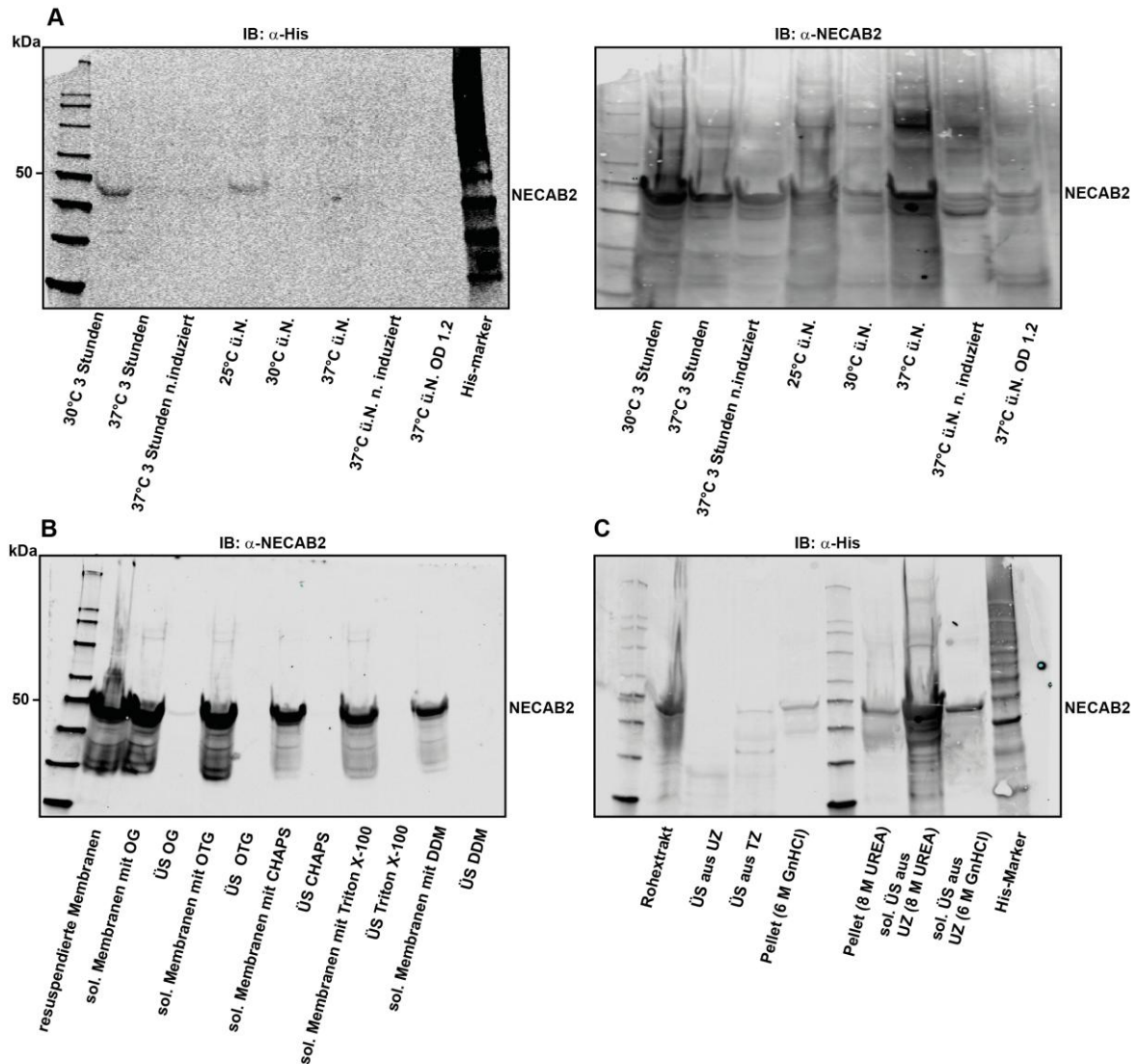


Abbildung 5.4: Rekombinantes humanes NECAB2 wird in unlöslichen „Inclusion bodies“ exprimiert.

(A) Immunoblot der Testexpression vom rekombinanten, humanen NECAB2. Humanes His-NECAB2 wurde in einer Testexpression (jeweils 300 ml) nach der Induktion mit IPTG bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten exprimiert. His-NECAB2 zeigt die höchste Expressionsrate bei 3 Stunden und 30°C. Nachweis der Expression von NECAB2 mit Anti-His und Anti-NECAB2 bei ca. 46 kDa. (B) Immunoblot der Testsolubilisierung mit verschiedenen Detergenzien. Die unlöslichen Membranfraktionen wurden mit Octylglucosid (OG), Octylthioglucosid (OTG), 3-[(Cholaminopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat (CHAPS), TritonX-100 oder n-Dodecyl β -D-maltosid (DDM) für 2 Stunden solubilisiert. NECAB2 kann auch mit den verschiedenen Detergenzien nicht in den Überstand solubilisiert werden. Der Expressionsnachweis erfolgte mit Anti-NECAB2. (C) Immunoblot der Testsolubilisierung der „Inclusion bodies“. Die unlöslichen „Inclusion bodies“ wurden

mit 6 M Guanidiniumchlorid bzw. 8 M UREA für 2 Stunden solubilisiert. Nach der Solubilisierung kann NECAB2 erfolgreich im Überstand nachgewiesen werden. Nachweis der Expression mit Anti-NECAB2.

Um herauszufinden, ob NECAB2 möglicherweise membranständig bzw. membrangebunden vorliegt, wurden die Membranen pelletiert und anschließend mit diversen Detergenzien solubilisiert. Abbildung 5.4B zeigt den mit Anti-NECAB2 gefärbten Immunoblot. Daraus wird deutlich, dass NECAB2 weiterhin nur im Membranpellet und nicht im Überstand detektiert werden kann. Da NECAB2 nicht mit Detergenzien in den Überstand solubilisiert werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass NECAB2 in unlöslichen „Inclusion bodies“ vorliegt. „Inclusion bodies“ bestehen aus einer Ansammlung von fehlerhaften bzw. unvollständig gefalteten Proteinen, die bei einer hohen Syntheserate im Zytoplasma ausfallen. In „Inclusion bodies“ exprimierte Proteine können mit Hilfe der starken Denaturierungsmittel UREA und Guanidiniumchlorid löslich gemacht werden (Tsumoto et al., 2003). Die unlöslichen Membranen wurden nach der Ultrazentrifugation zum einen mit 8 M UREA und zum anderen mit 6 M Guanidiniumchlorid (GnHCl) zwei Stunden bei RT inkubiert. Abbildung 5.4C zeigt den mit Anti-NECAB2 gefärbten Immunoblot vor und nach der Solubilisierung mit UREA und GnHCl. Es ist deutlich zu erkennen, dass NECAB2 nach der Behandlung mit UREA oder GnHCl in den Überstand solubilisiert werden konnte. Der Überstand nach der Inkubation mit 8 M UREA zeigte im Vergleich zur Inkubation mit 6 M GnHCl eine stärkere NECAB2-Bande. Daher wurden für weitere Aufreinigungen die „Inclusion bodies“ mit 8 M UREA behandelt. Eine detaillierte Beschreibung der Aufreinigung und der Solubilisierung der „Inclusion bodies“ ist in Kapitel 4.2.8 und 4.2.9 zu finden.

5.4.2 Aufreinigung von His-NECAB2 mittels Nickelaffinitätschromatographie

In Abbildung 5.5A sind der Immunoblot (Anti-His) sowie das Coomassiegel einer kompletten Aufreinigung von His-NECAB2 zu sehen. Aufgetragen sind die Fraktionen vor und nach der Solubilisierung der Inclusion bodies, sowie die Fraktionen des Durchflusses, der Waschschriffe und der Elution der Nickelsäule. Es wird deutlich, dass NECAB2, wie bereits in 5.4.1 beschrieben, nicht im Überstand nach der Ultrazentrifugation zu sehen ist (Spalte 2). Nach der Solubilisierung mit 8 M UREA konnte jedoch eine NECAB2-Bande bei ca. 43 kDa im Überstand nach der Ultrazentrifugation detektiert werden (Spalte 5). Alle Puffer der Aufreinigung

enthielten 8 M UREA um His-NECAB2 in Lösung zu halten. Nachdem der Überstand der „Inclusion bodies“ gegen den Äquilierungspuffer dialysiert wurde, konnte die Proteinlösung auf die Nickel-NTA-Säule aufgetragen werden. Die detaillierte Beschreibung der Aufreinigung ist in Kapitel 4.2.10 zu finden.

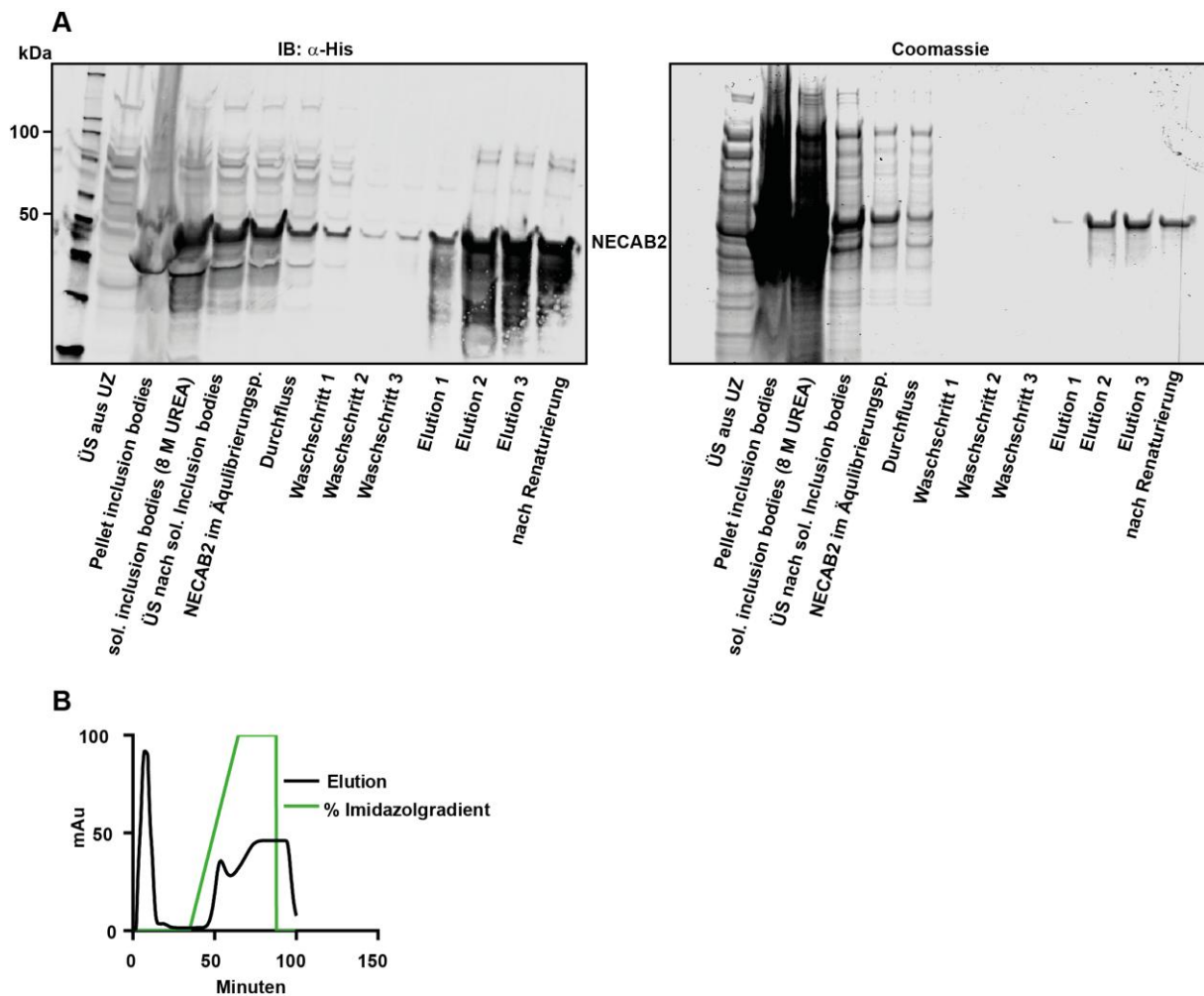


Abbildung 5.5: Aufreinigung von His-NECAB2 mittels Nickelaffinitätschromatographie.

(A) Immunoblot der Aufreinigung von His-NECAB2. Nach der Solubilisierung der „Inclusion bodies“ wurde His-NECAB2 mittels Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt. Nach der Elution erfolgte die Renaturierung von NECAB2. Detektion der NECAB2-Bande bei ca. 46 kDa durch den Antikörper Anti-His und durch Anfärbung von Coomassie. (B) Exemplarisches Nickelchromatogramm zur Aufreinigung von His-NECAB2. Aufgetragen ist die Absorption gegen die Zeit. Es wurde mit einem Gradienten von 30-250 mM Imidazol eluiert (grüne Linie). Die schwarze Linie zeigt die Elution von NECAB2 an. Die Elution erfolgte bei einer Imidazolkonzentration von 150 mM nach 45 Minuten.

Die Fraktionen des Durchflusses (Spalte 7) sowie der Waschschriffe (Spalten 8-10) zeigten ebenfalls eine NECAB2 Bande. Dies könnte eventuell auf eine Überladung der Säule hindeuten. Die Elution von His-NECAB2 erfolgte mit 150 mM Imidazol und ist in den Spalten 11-13 zu sehen. Die Elutionsfraktionen zeigten jeweils nur eine

Bande, was deutlich macht, dass eine hohe Reinheit bei der Aufreinigung von His-NECAB2 erzielt werden konnte. Abbildung 5.5B zeigt exemplarisch ein Chromatogramm einer Nickelaufreinigung der Äkta prime. Die grüne Linie stellt den Gradienten von 30-150 mM Imidazol dar, während die schwarze Linie die Proteinabsorption zeigt. Der erste Peak bei 0-20 Minuten zeigt eine Verunreinigung in der Probe. Die Elution von His-NECAB2 von der Nickelsäule fand bei einer Konzentration von 150 mM Imidazol nach 45 Minuten statt. Die Fraktionen unter dem Peak wurden gesammelt und für weitere Aufreinigungen verwendet. Da His-NECAB2 nach der Aufreinigung noch in seiner denaturierten Form (8 M UREA) vorlag, war es notwendig, das Protein für weiterführende Experimente zu renaturieren. Die Renaturierung erfolgte wie in Kapitel 4.2.11 beschrieben. Dazu wurde der Renaturierungspuffer langsam zur Elutionslösung getropft. Anschließend wurde His-NECAB2 mittels Ultrafiltration ankonzentriert. Es konnte eine Ausbeute von 0,5 mg/ml erreicht werden. Nachfolgende Experimente wurden mit dem renaturierten His-NECAB2 durchgeführt.

5.5 Renaturiertes NECAB2 zeigt keine NADPH Aktivität

NECAB2 ist aus zwei EF-Hand Domänen, einer *NECAB homology region*-(NHR) und einer antibiotischen Monooxygenase (ABM) Domäne aufgebaut. Die Funktion der C-terminalen ABM Domäne bei NECAB2 ist nicht bekannt. Es wurden bisher nur bakterielle Homologe aus *E. coli* gefunden, die ebenfalls eine ABM Domäne besitzen. Diese bakteriellen Homologen sind vermutlich an der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffstoffspezies beteiligt (Lemieux et al., 2006; Adams and Jia, 2005; Sciara et al., 2003). Einige Monooxygenasen sind NADP⁺-abhängige Oxidoreduktasen, die ein Sauerstoffatom aus O₂ in das Substrat als Hydroxylgruppe einbauen, während das andere Sauerstoffatom zu H₂O reduziert wird. Andere Monooxygenasen benötigen kein NADPH und nutzen zwei Elektronen des Substrates um ihre Funktion auszuführen. Um zu überprüfen, ob die ABM Domäne des renaturierten, aufgereinigten His-NECAB2 eine NADPH-abhängige Monooxygenaseaktivität zeigt, wurde ein NADPH Assay mittels UV Spektroskopie durchgeführt. Falls das aufgereinigte His-NECAB2 eine NADPH-abhängige Monooxygenaseaktivität besitzt, käme es zu einem Verbrauch an NADPH.

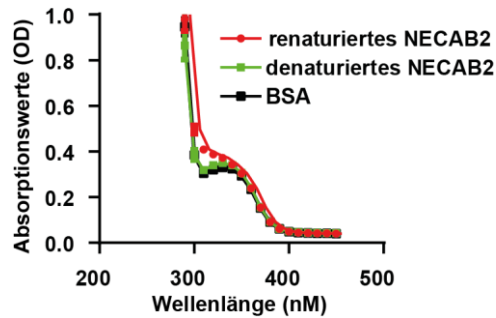


Abbildung 5.6: Renaturiertes NECAB2 zeigt keine NADPH Aktivität.

Renaturiertes NECAB2 wurde bis zu 70 Minuten mit 100 μM NADPH in einer 96 Lochnapfschale inkubiert. Alle 10 Minuten wurde ein Absorptionsspektrum bei einer Wellenlänge von 340 nm aufgenommen. Dargestellt ist das Absorptionsspektrum nach 70 Minuten. Als Kontrolle diente BSA und denaturiertes, rekombinantes NECAB2.

Wird NADPH zu NADP^+ oxidiert kommt es zu einer Erniedrigung bei 340 nm und zu einer Erhöhung der Absorptionswerte bei 260 nm. Für die Messung der UV Spektroskopie wurden das renaturierte und denaturierte His-NECAB2 Protein sowie BSA als Kontrollprotein in eine 96-Lochnapfschale pipettiert und jeweils mit 100 μM NADPH bzw. Wasser bis zu 70 Minuten inkubiert. Abbildung 5.6 zeigt die Absorptionswerte der Inkubation mit NADPH in Abhängigkeit der Wellenlänge. Im Vergleich zu dem denaturierten NECAB2 und zu BSA zeigt das renaturierte His-NECAB2 keine veränderte NADPH Aktivität bei 340 nm. Es konnten sogar höhere Absorptionswerte als bei den Kontrollen detektiert werden. Die Kontrollreaktion mit der Inkubation mit Wasser zeigte ebenfalls keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich jedoch nicht schließen, ob NECAB2 generell keine NADPH Aktivität zeigt oder ob es sich hier um ein methodisches Problem handelt. Eventuell ist es notwendig den Reaktionspuffer des rekombinanten NECAB2 Proteins zu modifizieren. Monooxygenasen benötigen häufig Kofaktoren-, wie Flavin, Eisen oder Molybdän. Daher wäre eine Wiederholung des Versuchs unter Beteiligung der Kofaktoren sinnvoll. Da es aber schwierig ist das rekombinante, kofaktorfreie „Apo“-Protein mit den entsprechenden Kofaktoren zu rekonstituieren wäre eine weitere Möglichkeit NECAB2 in einem eukaryotischen System mit beispielsweise dem Baculovirus zu exprimieren und anschließend daraus nativ aufzureinigen. Anschließend wäre es möglich die Aktivität oder die Kofaktoren zu identifizieren. Ein weiterer NADPH Assay wurde mit NECAB2 überexprimierenden WT und Mutantenzelllinien durchgeführt (vgl. Generierung der NECAB2 Zelllinien im Kapitel 4.3.5). Das Experiment zeigte keine reproduzierbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt) und wurde aufgrund der Heterogenität nicht weiter verfolgt.

5.6 NECAB2 liegt als Homodimer vor

Wie bereits erwähnt, besitzt NECAB2 zwei EF Hand Domänen, eine *NECAB homology region*-(NHR) und eine ABM Domäne. Eine Kristallstrukturanalyse des

ABM *Streptomyces* Protein deutet daraufhin, dass das aktive Enzym als Dimer vorliegt (Sciara et al., 2003). Um zu überprüfen, ob das humane, ABM-Domäne enthaltene, NECAB2 ebenfalls als Dimer vorliegt, wurde zunächst das rekombinante, aufgereinigte His-NECAB2 untersucht. His-NECAB2 wurde mit und ohne Reduktionsmittel auf ein SDS Gel aufgetragen. Das Gel wurde anschließend mit dem Farbstoff Coomassie angefärbt. Abbildung 5.7A zeigt, dass unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine schwache Bande bei 50 kDa, sowie eine starke Bande bei ca. 90 kDa detektiert werden konnte, während unter reduzierenden Bedingungen eine starke Bande bei 50 kDa und eine schwache Bande bei ca. 90 kDa detektiert werden konnte.

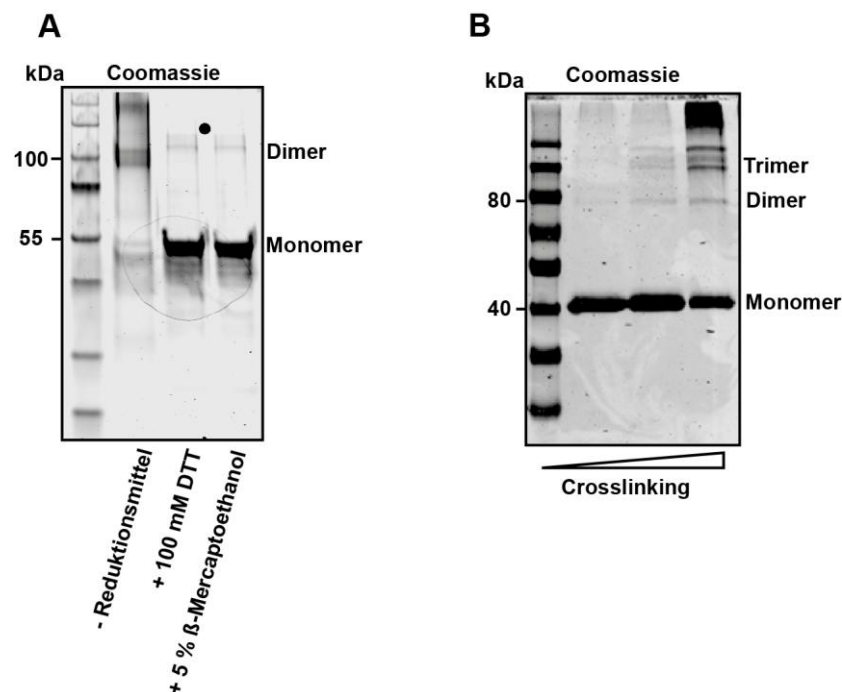


Abbildung 5.7: Rekombinantes His-NECAB2 dimerisiert.

(A) Coomassiegel zur oxidierten und reduzierten Form von NECAB2. Das renaturierte His-NECAB2 wurde mit den Reduktionsmitteln Dithiothreitol (DTT) und β -Mercaptoethanol für 5 Minuten inkubiert. NECAB2 liegt in seiner oxidativen Form als Dimer vor. (B) Coomassiegel zum *Crosslinken* vom rekombinanten His-NECAB2. His-NECAB2 wurde für 30 Minuten mit ansteigenden Konzentrationen an Disuccinimidylsuberat (DSS) inkubiert und anschließend per SDS-Gel analysiert. Ansteigende DSS-Konzentrationen zeigen eine Verschiebung des NECAB2-Monomers zu einem Dimer bzw. auch zu einem Trimer. Als Kontrolle dient DMSO.

Da NECAB2 als Monomer ein Molekulargewicht von ca. 43 kDa hat, deutet die untere Bande auf das Monomer und die obere Bande bei ca. 90 kDa auf das Dimer hin. Die Banden laufen etwas höher als erwartet. Das ist auf den zusätzlich

exprimierten His-Anhang zurückzuführen. Es ist jedoch zu erwähnen, dass es sich hierbei um ein aufgereinigtes, rekombinantes Protein aus *E.coli* handelt. Die Ausbildung der Disulfidbrücken findet in Eukaryoten im Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Da Prokaryoten kein ER besitzen, ist His-NECAB2 möglicherweise nicht korrekt nativ gefaltet und besitzt keine korrekt ausgebildeten Disulfidbrücken. In einem weiteren Experiment wurde anhand von chemischen *Crosslinking* die Dimerisierung von NECAB2 untersucht. Eine Beschreibung der Methode, sowie die Durchführung dieses Experiments sind in Kapitel 4.2.20 dieser Arbeit zu finden. Das rekombinante His-NECAB2 wurde mit ansteigenden Konzentrationen des chemischen *Crosslinkers* (Vernetzungsreagenz) Disuccinimidylsuberat (DSS) für 30 Minuten versetzt und anschließend per Coomassiegel analysiert. In Abbildung 5.7B ist zu sehen, dass mit ansteigenden Konzentrationen an DSS (0-200 μM) zusätzliche Banden auf Höhe eines Dimers bzw. auch Trimers sichtbar wurden. Diese Ergebnisse aus Untersuchungen mit dem rekombinanten NECAB2 lassen auf eine Dimerisierung des humanen NECAB2 schließen.

Zur Überprüfung der *in vitro* Ergebnisse mit dem rekombinanten NECAB2 wurden Hirnlysate der Maus mit 2,5 mM DSS für 30 Minuten inkubiert und anschließend per Immunoblot gegen Anti-NECAB2 analysiert. In Abbildung 5.8A ist unter *Crosslinking*bedingungen zusätzlich zur NECAB2 und NECAB2_s Monomerbande eine Dimerbande erkennbar.

Um die Dimerisierung auf Zellkulturebene zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Dafür wurden CHO Zellen transient mit HA-NECAB2 und Myc-NECAB2 entweder alleine oder zusammen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und mit immobilisierten Myc-Antikörpern inkubiert (siehe Kapitel 4.2.19). Die eluierten Proteine wurden anschließend per Immunoblot untersucht. Abbildung 5.8B zeigt auf der linken Seite die Lysatkontrolle und auf der rechten Seite die Immunpräzipitation (IP). Die Lysatkontrolle wies die erfolgreiche Expression der Konstrukte bei ca. 50 kDa auf, sodass die anschließende IP durchgeführt werden konnte. Aus dem immunologischen Nachweis der IP wird deutlich, dass HA-NECAB2 mit Myc-NECAB2 interagiert.

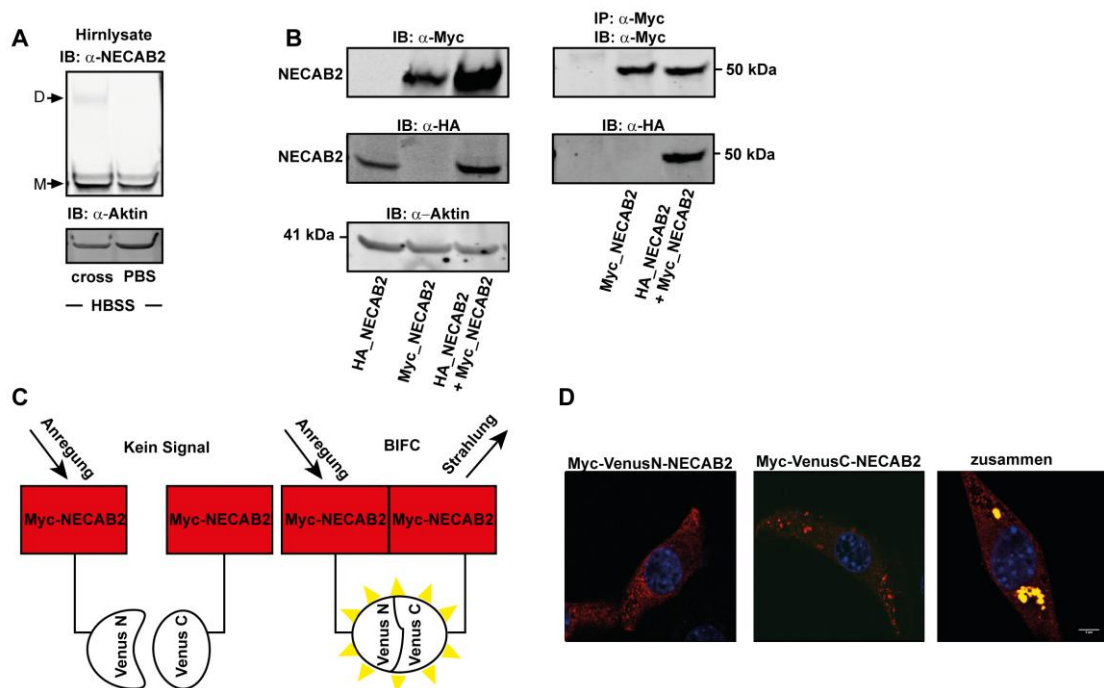


Abbildung 5.8: Nachweis der Homodimerisierung von NECAB2.

(A) Immunoblot des *Crosslinking* der WT Hirnlysate. Hirnlysate der WT Maus wurden 30 Minuten mit 2,5 mM DSS inkubiert. 100 µg Protein wurden anschließend aufs Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. NECAB2 zeigt zusätzlich zu den NECAB2 Monomerbanden bei 39 kDa und 43 kDa unter Crosslinkingbedingungen eine zusätzliche Dimerbande. (B) CHO-Zellen wurden transient mit Myc-NECAB2 und HA-NECAB2 entweder alleine transfiziert oder ko-transfiziert. Linke Blots zeigen den Nachweis der Expression bei ca. 50 kDa mit einem Anti-Myc und einem Anti-HA Antikörper. Aktin dient als Ladekontrolle. Rechte Blots zeigen die Immunpräzipitation, gezogen durch einen Anti-Myc Antikörper. HA-NECAB2 ist nach der IP erkennbar. (C) Schema der Bimolekularen Fluoreszenz Komplementationsmethode (BIFC) (D) HT22 Zellen wurden einerseits alleine mit den folgenden Konstrukten: Myc-Venus-C-NECAB2-WT alleine und mit Myc-Venus-N-NECAB2-WT kotransfiziert. Dargestellt sind die konfokalmikroskopischen Aufnahmen. Der Myc-Anhang wurde mit einem sekundären Antikörper sichtbar gemacht. Venus zeigt die Dimerisierung an. NECAB2-WT dimerisiert, während NECAB2-ΔCC1 eine signifikante Verminderung der Dimerisierung anzeigt. Die Myc-Fluoreszenz dient als Transfektionskontrolle. Der Größenmaßstab beträgt 5 µm.

Um die Homodimerisierung von NECAB2 mikroskopisch zu bestätigen, wurde das Prinzip der Bimolekularen Fluoreszenz Komplementations Methode (BIFC) angewendet (Hu et al., 2002). Das Prinzip dient zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen. Dabei wird der N-terminale Teil eines Fluorophors an ein Protein gebunden und der C-terminale Teil des Fluorophors an ein anderes. Interagieren diese Proteine miteinander, kann Fluoreszenz detektiert werden. In dieser Arbeit wurde der N-terminale Teil von Venus an Myc-NECAB2 und der C-terminale Teil von Venus an ein anderes Myc-NECAB2 kloniert (Kapitel 4.1.15). Kommt es zu einer

Interaktion bzw. Homodimerisierung von NECAB2, fusionieren der N-terminale und der C-terminale Teil von Venus aufgrund der räumlichen Nähe (Abbildung 5.8C). Die emittierte Fluoreszenz kann anschließend mittels konfokaler Mikroskopie analysiert werden. Für eine Transfektionskontrolle wurden die transfizierten Zellen noch mit einem Myc-Antikörper gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahme in Abbildung 5.8D zeigt die beiden Negativkontrollen der allein transfizierten, sowie der zusammen transfizierten Konstrukte. Die Transfektionskontrolle ist in rot dargestellt, während die gelb-fluoreszierenden Fluorophore die erfolgreiche Homodimerisierung im Zytosol anzeigen (grün+rot). Die Untersuchungen am rekombinanten NECAB2 und in Hirnlysaten der Maus, sowie die Immunpräzipitation und die BIFC in Zellen konnten zeigen, dass NECAB2 als Homodimer vorliegt.

5.7 Ca^{2+} induziert die Dimerisierung von NECAB2

Da NECAB2 zwei Ca^{2+} -bindende EF-Hand Domänen besitzt, sollte geklärt werden, ob die in Kapitel 5.6 gezeigte Homodimerisierung möglicherweise durch Ca^{2+} induziert wird. Zunächst wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Jacek Kuźnicki (Internationales Institut für Molekular- und Zellbiologie, Warschau, Polen) die Ca^{2+} -Bindung mittels $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Autoradiogramm überprüft. Dafür wurde das rekombinante, aufgereinigte His-NECAB2 mittels SDS-PAGE separiert und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membran wurde mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ inkubiert und für 11 Tage exponiert.

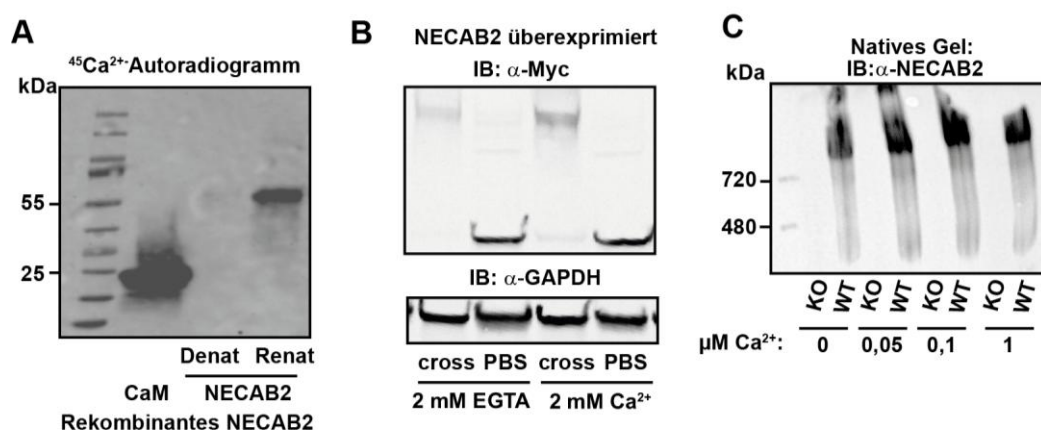


Abbildung 5.9: Ca^{2+} induziert Dimerisierung von NECAB2.

(A) $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Autoradiogramm vom rekombinanten His-NECAB2. 1 mg/ml Protein wurde per SDS Gel separiert und anschließend per Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das renaturierte NECAB2 Protein konnte im $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Autoradiogramm detektiert werden. Die Exposition mit Ca^{2+} betrug 11 Tage. Als Positivkontrolle dient Calmodulin (CaM) und als Negativkontrolle das denaturierte NECAB2. (B) Immunoblot zum Crosslinken von NECAB2 in HT22 Zellen. HT22 Zellen

wurden mit Myc-NECAB2 transfiziert und am nächsten Tag zunächst mit HBSS, EGTA oder 2 mM Ca^{2+} für 15 Minuten inkubiert und anschließend 30 Minuten gecrosslinkt. NECAB2 dimerisiert in der Anwesenheit von Ca^{2+} stärker als in der Anwesenheit von HBSS und EGTA. Als Kontrolle dient DMSO. (C) Immunoblot vom nativen Gel zur Calcium-abhängigen Dimerisierung von NECAB2. Die homogenisierten Hirne der NECAB2^{-/-} (KO) und NECAB2^{+/+} (WT) Tiere wurden mit ansteigenden Ca^{2+} -Konzentration für 15 Minuten inkubiert und per nativem Gel analysiert. Die Oligomerisierung von NECAB2 wird mit ansteigender Ca^{2+} Konzentration stärker. Zur Kontrolle dient Wasser.

Abbildung 5.9A zeigt die erfolgreiche $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Bindung des renaturierten NECAB2 Proteins bei ca. 55 kDa. Die Bande lief etwas höher als erwartet. Da jedoch auch Calmodulin (hier bei 25 kDa) als Kontrollprotein etwas höher lief als erwartet (normalerweise 19 kDa), lässt sich die zu hoch laufende Bande für NECAB2 vernachlässigen.

Um zu überprüfen, ob Ca^{2+} für die Homodimerisierung verantwortlich ist, wurden Crosslinkingexperimente in NECAB2 überexprimierenden transfizierten HT22 Zellen durchgeführt. Die mit Myc-NECAB2 transient transfizierten HT22 Zellen wurden mit und ohne *Crosslinker* für 30 Minuten bei 37°C in 2 mM EGTA bzw. 2 mM Ca^{2+} inkubiert, anschließend lysiert und mittels Immunoblot gegen Anti-Myc analysiert. Abbildung 5.9B zeigt eine stärkere Dimerbande bei der Inkubation mit Ca^{2+} als mit EGTA. In Abbildung 5.9C ist ein Immunoblot eines nativen Gels zu sehen. Die in PBS homogenisierten Hirne aus der NECAB2 KO und WT Maus wurden für 15 Minuten mit ansteigenden Ca^{2+} Konzentrationen inkubiert, anschließend mit nativem Gel separiert und mit Immunoblot analysiert (Kapitel 4.2.17). Man erkennt mit ansteigenden Ca^{2+} -Konzentrationen einen Anstieg der Bandenstärke auf der Höhe der oligomeren Strukturen. Die Crosslinkingexperimente und das native Gel deuten daraufhin, dass Ca^{2+} für die Homodimerisierung verantwortlich ist.

5.8 NECAB2 interagiert mit dem metabotropischen Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5)

Über die physiologische Funktion von NECAB2 ist bisher noch nicht viel bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass NECAB2 mit dem Adenosin $\text{A}_{2\text{A}}$ Rezeptor und dem metabotropischen Glutamat Rezeptor 5 interagiert (Canela et al., 2009; Canela et al., 2007). Die Interaktion von NECAB2 mit mGluR5 sollte in dieser Arbeit überprüft werden. Dazu wurden HT22 Zellen mit YFP-mGluR5 und Myc-NECAB2 kotransfiziert. Der Myc-Anhang wurde mit einem fluoreszenten Antikörper gegen Anti-Myc sichtbar gemacht.

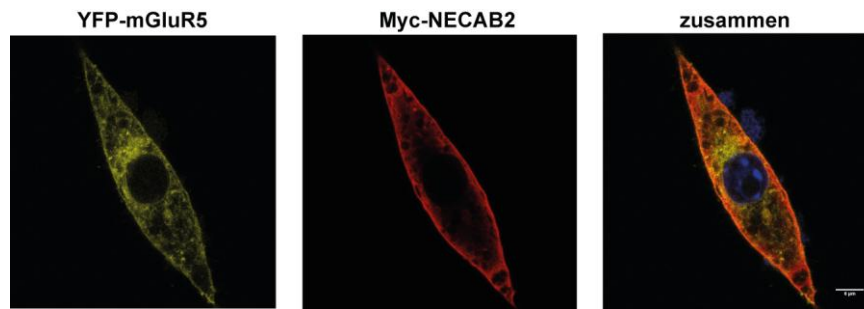


Abbildung 5.10: (A) NECAB2 interagiert mit dem metabotropischen Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5).

HT22 Zellen wurden mit YFP-mGluR5 und Myc-NECAB2-Wildtyp kotransfiziert. Der Myc-Anhang wurde mit einem sekundären Antikörper sichtbar gemacht. NECAB2-WT zeigt eine Kollokalisierung mit YFP-mGluR5 an der Plasmamembran. Der Größenmaßstab entspricht 6 µm.

Abbildung 5.10 zeigt die konfokalmikroskopische Aufnahme der Immunzytochemie. mGluR5 wurde sowohl an der Plasmamembran, als auch im Zytosol exprimiert. NECAB2 zeigt ebenfalls bei der Kotransfektion mit mGluR5 eine Expression an der Plasmamembran. Aus dem überlagerten Bild wird deutlich, dass NECAB2 mit mGluR5 an der Plasmamembran interagiert (orange). Die alleinige Transfektion von Myc-NECAB2 weist eine eher zytosoläre Expression auf (Daten nicht gezeigt). Beide Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Daten überein (Canela et al., 2009)

5.9 Strukturelle Organisation von NECAB2

NECAB2 besitzt zwei EF-Hand Domänen, eine NHR Region, sowie eine ABM Domäne. Die Bedeutung der unterschiedlichen Domänen sollte im Rahmen dieser Arbeit herausgefunden werden. Mithilfe der Parcoil- und der I-Tasser Analyse ist es möglich, Sekundärstrukturen bioinformatisch vorschlagen zu lassen (McDonnell et al., 2006). Abbildung 5.11A zeigt die Parcoil und die I-Tasser Analyse von NECAB2. Dabei wurde deutlich, dass die NHR Region aus zwei coiled-coiled Domänen besteht. In dieser Arbeit wurden diese beiden Domänen als coiled-coiled 1 (CC1) und coiled-coiled 2 (CC2) bezeichnet. Um detailliertere Einblicke auf die Proteinstruktur zu bekommen, bedient man sich der Röntgenkristallstrukturanalyse (Kendrew et al., 1958). Dafür ist es allerdings notwendig, das aufgereinigte Protein einerseits sehr rein und andererseits in einer sehr hohen Ausbeute vorliegen zu haben. Die Konzentration des in dieser Arbeit aufgereinigten Proteins war zu gering, um eine Röntgenkristallstrukturanalyse durchzuführen. Eine schnellere und einfachere Methode ist die CD-Spektroskopie, mit der es möglich ist, Informationen zur allgemeinen Konformation zu bekommen. Mithilfe der CD Spektroskopie lassen sich Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur ziehen (Johnson, 1990; Greenfield, 2006).

Abbildung 11B zeigt das CD-Spektrum des rekombinanten, aufgereinigten und renaturierten His-NECAB2. His-NECAB2 wurde gegen einen NaPi Puffer dialysiert und anschließend im CD Spektrometer gemessen. Der Puffer allein diente als Hintergrund, der später von den gemessenen Werten von NECAB2 abgezogen wurde. Die detaillierte Beschreibung der Methode sowie die Durchführung des Experiments sind in Kapitel 4.4.1 dieser Arbeit zu finden. His-NECAB2 zeigt eine eher α -helicale Struktur. Die α -helicale Struktur lässt sich mit den beiden coiled-coiled Domänen erklären, die aus α -Helices aufgebaut sind und einen Großteil des gesamten Proteins ausmachen.

Für die Untersuchung der Domänen wurden NECAB2 überexprimierende, stabile HT22 Zelllinien mit unterschiedlichen Mutanten generiert. Neben NECAB2-Wildtyp (WT) wurden Mutanten generiert, denen entweder die CC1 Domäne (NECAB2- Δ CC1), die CC2 Domäne (NECAB2- Δ CC2) oder die ABM Domäne (NECAB2- Δ ABM) fehlt. Eine weitere mutierte Zelllinie besitzt zwei Punktmutationen im aktiven Zentrum der EF-Hand Domäne (NECAB2-Ala(E84A-E118A)). Die Generierung der stabilen Zelllinien ist in Kapitel 4.3.5 zu finden. Der Immunoblot zeigt den erfolgreichen Nachweis der stabilen überexprimierenden NECAB2 Mutanten mit HA-Anhang (Abbildung 11C). Auffällig ist, dass NECAB2- Δ CC1 und NECAB2- Δ ABM keine zusätzliche Bande auf der Höhe eines möglichen Dimers zeigten, was darauf hindeuten könnte, dass die CC1- oder die ABM Domäne an der Dimerisierung beteiligt sind.

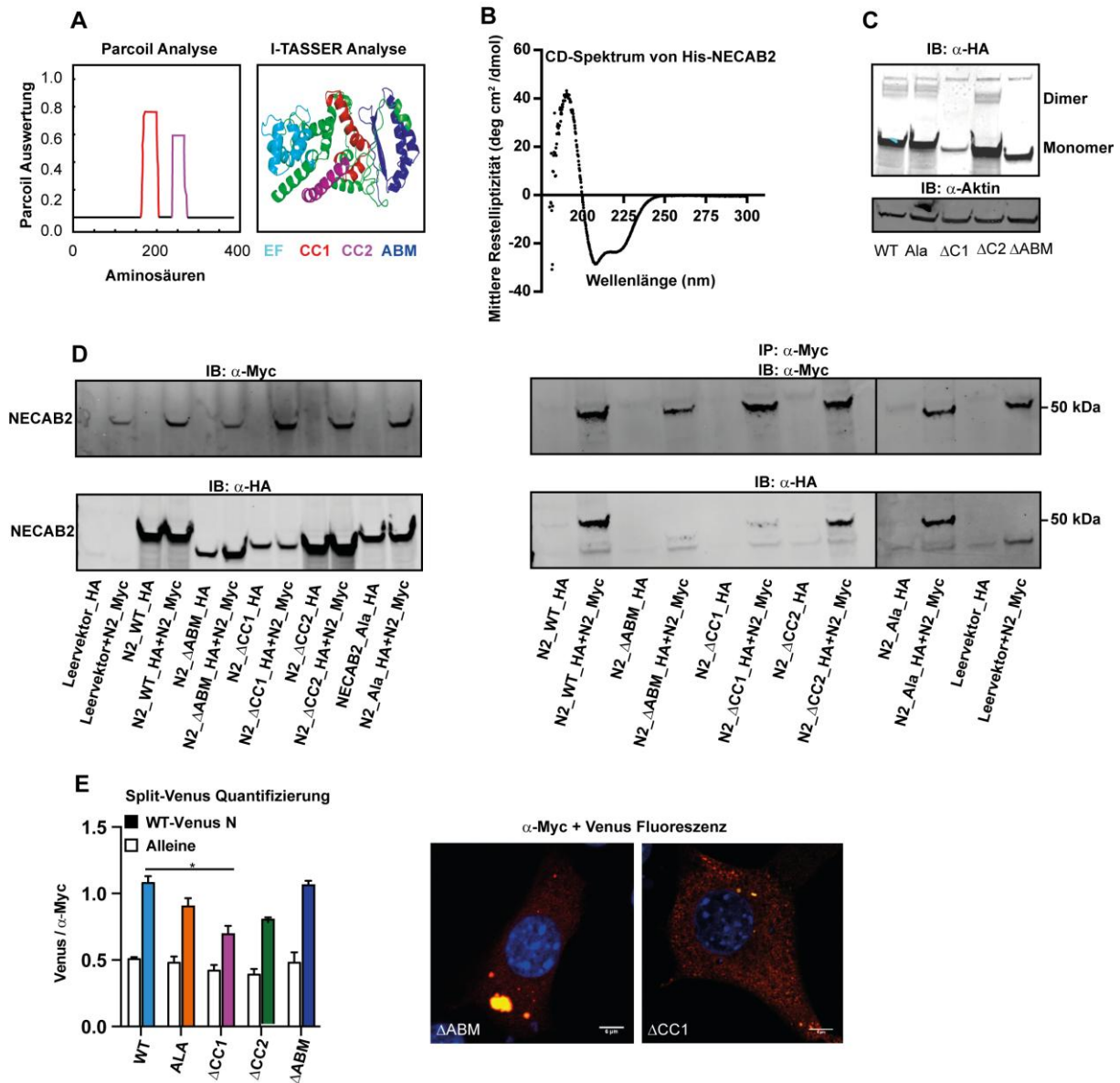


Abbildung 5.11: Dimerisierung wird von der *coiled-coiled 1* Domäne vermittelt.

(A) Vorgeschlagene Sekundärstrukturen von NECAB2 mittels Parcoil- und Tasseranalyse. NECAB2 besitzt zwei EF-Hand Domänen, zwei coiled-coil Domänen und eine ABM Domäne. (B) CD-Spektrum von His-NECAB2 in 30 mM NaPi-Puffer. Renaturiertes His-NECAB2 wurde in 30 mM NaPi umgepuffert und im CD-Spektrometer gemessen. His-NECAB2 zeigt eine α -helicale Struktur. Das Experiment wurde insgesamt zweimal mit neu aufgereinigtem Protein wiederholt. (C) Immunoblot zum Nachweis der stabilen NECAB2 Zelllinien mit HA-Anhang. HT22 Zellen wurden mit verschiedenen NECAB2 Mutanten stabil transfiziert. Dargestellt sind NECAB2 Wildtyp (NECAB2-WT), NECAB2-Ala mit Punktmutationen in der EF-Hand Domäne (E84A-E118A), NECAB2 mit fehlender coiled-coiled1-, coiled-coiled2 oder ABM Domäne (NECAB2- Δ CC1, NECAB2- Δ CC2 oder NECAB2- Δ ABM). NECAB2-WT, NECAB2-Ala(E84A-E118A) und NECAB2- Δ CC2 weisen zusätzlich zur monomeren auch eine dimere Form auf. Die Detektion erfolgte mit Anti-HA. Als Ladekontrolle dient Aktin. (D) Immunoblot zum Nachweis der Dimerisierungsdomäne (N2=NECAB2). Stabil transfizierte NECAB2-Mutanten Zelllinien mit HA-Anhang wurden mit Myc-NECAB2 transfiziert. Die linken Blots zeigen den Nachweis

der Expression bei ca. 50 kDa mit Anti-Myc und Anti-HA. Als Kontrolle diente die Transfektion der Leervektorzelllinie. Die rechten Blots zeigen den Immunoblot der Immunpräzipitation (IP), gezogen mit Anti-Myc. Als Kontrolle diente die Transfektion der Leervektorzelllinie. NECAB2- Δ ABM und NECAB2- Δ CC1 interagieren weniger stark mit NECAB2-WT als die anderen Konstrukte. (E) HT22 Zellen wurden einerseits alleine mit den folgenden Konstrukten: Myc-Venus-C-NECAB2-WT, Myc-Venus-C-NECAB2- Δ ABM, Myc-Venus-C-NECAB2- Δ CC1, Myc-Venus-C-NECAB2- Δ CC2 oder Myc-Venus-C-NECAB2-Ala(E84A-E118A) transfiziert und andererseits jeweils zusammen mit Myc-Venus-N-NECAB2-WT kotransfiziert. Dargestellt sind exemplarisch die konfokalmikroskopischen Aufnahmen von NECAB2-WT, NECAB2- Δ ABM und NECAB2- Δ CC1, sowie die dazugehörige Quantifizierung. Der Myc-Anhang wurde mit einem sekundären Antikörper sichtbar gemacht. Venus zeigt die Dimerisierung an. NECAB2-WT dimerisiert, während NECAB2- Δ CC1 eine signifikante Verminderung der Dimerisierung anzeigt. Die Quantifizierung zeigt die Ratio zwischen der Venus Fluoreszenz und der Myc-Fluoreszenz an. Die Myc-Fluoreszenz dient als Transfektionskontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei verschiedenen Experimenten in Triplikaten. Der Vergleich der Säulen zeigt eine Signifikanz zwischen NECAB2-WT und NECAB2- Δ CC1, sowie NECAB2-WT und NECAB2- Δ CC2 von $P < 0,05$ bei einem One way anova an.

5.10 Dimerisierung wird von der coiled-coiled 1 Domäne vermittelt

Um herauszufinden, welche Domäne für die in 5.6 und 5.7 gezeigte Dimerisierung verantwortlich ist, wurden Immunpräzipitationsuntersuchungen durchgeführt. Dafür wurden die stabilen, mit HA-Anhang markierten, NECAB2 Wildtyp und Mutanten überexprimierenden Zelllinien, sowie die Leervektorzelllinie mit Myc-NECAB2-WT transfiziert, nach 48 Stunden lysiert und die Lysate per Immunoblot kontrolliert. Abbildung 5.11D zeigt auf der linken Seite die Immunoblots der Lysatkontrolle gegen Anti-Myc und Anti-HA. Alle Konstrukte konnten erfolgreich bei ca. 50 kDa detektiert werden, sodass anschließend eine IP durchgeführt werden konnte. Aus dem immunologischen Nachweis der IP auf der rechten Seite in Abbildung 5.11D wird deutlich, dass HA-NECAB2- Δ ABM und HA-NECAB2- Δ CC1 weniger stark mit Myc-NECAB2-WT interagierten als HA-NECAB2-WT, HA-NECAB2- Δ CC2 oder HA-NECAB2-Ala(E84A-E118A). Wichtig ist allerdings zu erwähnen, dass HA-NECAB2- Δ ABM und HA-NECAB2- Δ CC1 eine schwächere Expression bereits in der Lysatkontrolle gezeigt hatten. Daher lässt sich nicht sicher sagen, ob die CC1 oder die ABM Domäne für die Interaktion verantwortlich sind. Um das Problem der schwachen Expression zu umgehen und die Bindung in der lebenden Zelle zu untersuchen, wurde die Bimolekulare Fluoreszenz Komplementations Methode (BIFC) angewendet (vgl. Kapitel 5.6). Dabei wurden hier der N-terminale Teil von Venus an Myc-NECAB2-WT und der C-terminale Teil von Venus an die unterschiedlichen NECAB2 Mutanten kloniert. Die Konstrukte wurden entweder alleine oder zusammen transfiziert und mittels High Content Imaging analysiert. Interagieren die Proteine miteinander, können gelbe Fluorophore detektiert werden.

Als Transfektionskontrolle diente die Färbung mit Anti-Myc und dem entsprechenden sekundären Antikörper (rot). Die genaue Beschreibung der Methode ist in Kapitel 4.1.15 zu finden. In den exemplarisch dargestellten konfokalmikroskopischen Bildern sieht man deutlich, dass NECAB2- Δ ABM dimerisiert, während NECAB2- Δ CC1 nur eine schwache gelbe Fluoreszenz aufweist (Abbildung 5.11E). Die graphische Darstellung zeigt die Ratio zwischen Venus und α -Myc an. Venus repräsentiert die Dimerisierungsstärke, während α -Myc die Transfektion anzeigt. Die Dimerisierungsstärke war bei NECAB2- Δ CC1 signifikant reduziert, während NECAB2- Δ ABM eine ähnliche Dimerisierungsstärke wie NECAB2-WT anzeigte. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass im physiologischen Umfeld der Zelle hauptsächlich CC1 für die Dimerisierung von NECAB2 verantwortlich ist.

5.11 Interaktion von NECAB2 mit mGluR5 wird durch die coiled-coiled 1 Domäne vermittelt

Die von Canela et al. (2009) gezeigte Interaktion von NECAB2 mit mGluR5 konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Kapitel 5.8). Des Weiteren konnten Canela et al. (2009) zeigen, dass die *NECAB homology region* von NECAB2 für die Interaktion verantwortlich ist. Da im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Parcoil- und der I-Tasser Analyse zwei coiled-coiled Domänen identifiziert werden konnten, war es nun notwendig herauszufinden, welche Domäne für die Interaktion verantwortlich ist. Dafür wurden HT22 Zellen mit YFP-mGluR5 und den verschiedenen Myc-NECAB2 Mutanten kotransfiziert und mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Die Kolokalisationsanalyse erfolgte mit der von Steensel Auswertung des Plugins JaCoP von ImageJ (Bolte and Cordelières, 2006).

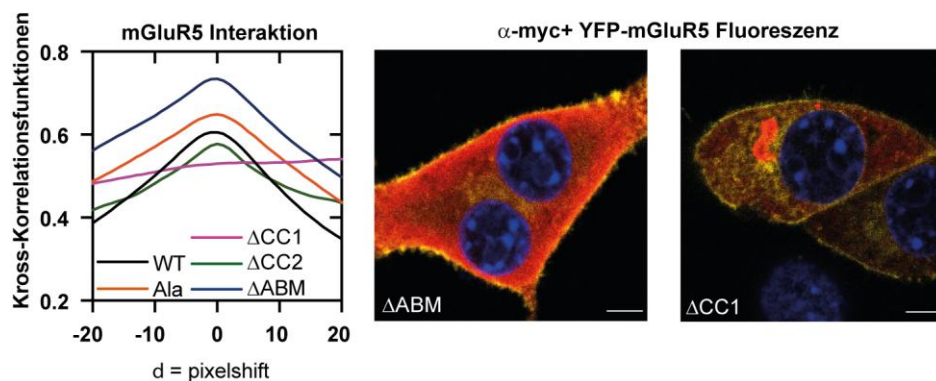


Abbildung 5.12: Interaktion von NECAB2 mit mGluR5 wird durch die coiled-coiled 1 Domäne vermittelt.

HT22 Zellen wurden mit YFP-mGluR5 und entweder Myc-NECAB2-WT, Myc-NECAB2- Δ CC1, Myc-NECAB2- Δ CC2, Myc-NECAB2- Δ ABM oder Myc-NECAB2-Ala(E84A-E118A) kotransfiziert. Dargestellt

sind konfokalmikroskopische Aufnahmen exemplarisch für NECAB2- Δ ABM und NECAB2- Δ CC1 und die dazugehörige Quantifizierung. NECAB2- Δ CC1 kolokalisiert nicht mit YFP-mGluR5. Die Kolokalisationsanalysen wurden mit dem JACoP Programm von ImageJ durchgeführt. Die van Steensel Auswertung wurde für die Quantifizierung (n=5 Zellen) genommen. Der Größenmaßstab entspricht 6 μ m.

Abbildung 5.12 zeigt exemplarisch die konfokalmikroskopischen Bilder der Kotransfektion von YFP-mGluR5 mit Myc-NECAB2- Δ ABM und Myc-NECAB2- Δ CC1 (rechts). Die Bilder zeigen, dass NECAB2- Δ ABM wie NECAB2-WT mit mGluR5 an der Plasmamembran interagiert, während NECAB2- Δ CC1 hier eine eher zytosoläre Expression aufweist. Auf der linken Seite ist die Quantifizierung der Kolokalisation dargestellt. Eine hohe Kolokalisation wird durch eine Kurve mit dem Peak bei d=0 festgelegt, während eine niedrige bzw. keine Kolokalisation keinen Peak zeigt. Dabei wird deutlich, dass neben NECAB2-WT (schwarze Linie) auch die Mutanten NECAB2- Δ ABM (blaue Linie), NECAB2-Ala(E84A-E118A) (orange Linie) und NECAB2- Δ CC2 (grüne Linie) eine Kolokalisation mit mGluR5 zeigten. NECAB2- Δ CC1 interagiert demnach nicht mit mGluR5 (rosa Linie). Diese Ergebnisse zeigen, dass die CC1 Domäne auch für die Interaktion von mGluR5 und NECAB2 verantwortlich ist, während es bei einem Fehlen der ABM Domäne sogar zu einer höheren Kolokalisation mit mGluR5, im Vergleich zum WT, kommt. Möglicherweise kommt es bei NECAB2-WT zu einer geringen sterischen Hinderung der ABM Domänen bei der Interaktion mit mGluR5. Bei einem Fehlen der ABM Domäne fällt die sterische Hinderung weg und NECAB2 kann stärker mit mGluR5 interagieren.

5.12 Induzierte, gezwungene Dimerisierung bestätigt CC1 als Dimerisierungsdomäne

In Kapitel 5.10 wurde herausgefunden, dass die CC1 Domäne vermutlich für die Dimerisierung verantwortlich ist. Zur weiteren Überprüfung wurden Konstrukte ohne CC1 Domäne generiert, die mit Hilfe eines chemischen Induktors gezwungenermaßen dimerisieren können. Ein chemischer Induktor ist ein zellpermeables organisches Molekül, welches mit hoher Affinität an spezifische Proteine bindet und diese zusammenbringt. In dieser Arbeit wurde der Induktor AP20187 von der Firma Clontech zur Homodimerisierung verwendet. Für die Generierung der Konstrukte wurden vor dem HA-Anhang, der Venus C/N-Sequenz und der NECAB2-Sequenz FKBP Domänen kloniert. Der Induktor AP20187 bringt die

FKBP Domänen des NECAB2-Fusionproteins zusammen (Eggert et al., 2009), sodass NECAB2 ohne CC1 Domäne zwangsdimerisiert (Abbildung 5.13A). Zusätzlich zu den Mutanten mit deletierter CC1 Domäne (FKBP-VenusC/N-NECAB2- Δ CC1) wurden Mutanten generiert, bei der nicht nur die CC1 Domäne deletiert ist, sondern auch das aktive Zentrum in der EF-Hand mutiert wurde (FKBP-VenusC/N-Ala(E84A-E118A)-NECAB2- Δ CC1). In Abbildung 5.13B ist der Immunoblot zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung und Transfektion der Konstrukte zu sehen. Die induzierbaren VenusC/VenusN Konstrukte sind auf der Höhe von ca. 50 kDa detektierbar und besitzen zusätzlich zum HA-Anhang noch einen IRES-mcherry-Anhang mit NLS (*nucleus location sequence*) für die Transfektionskontrolle.

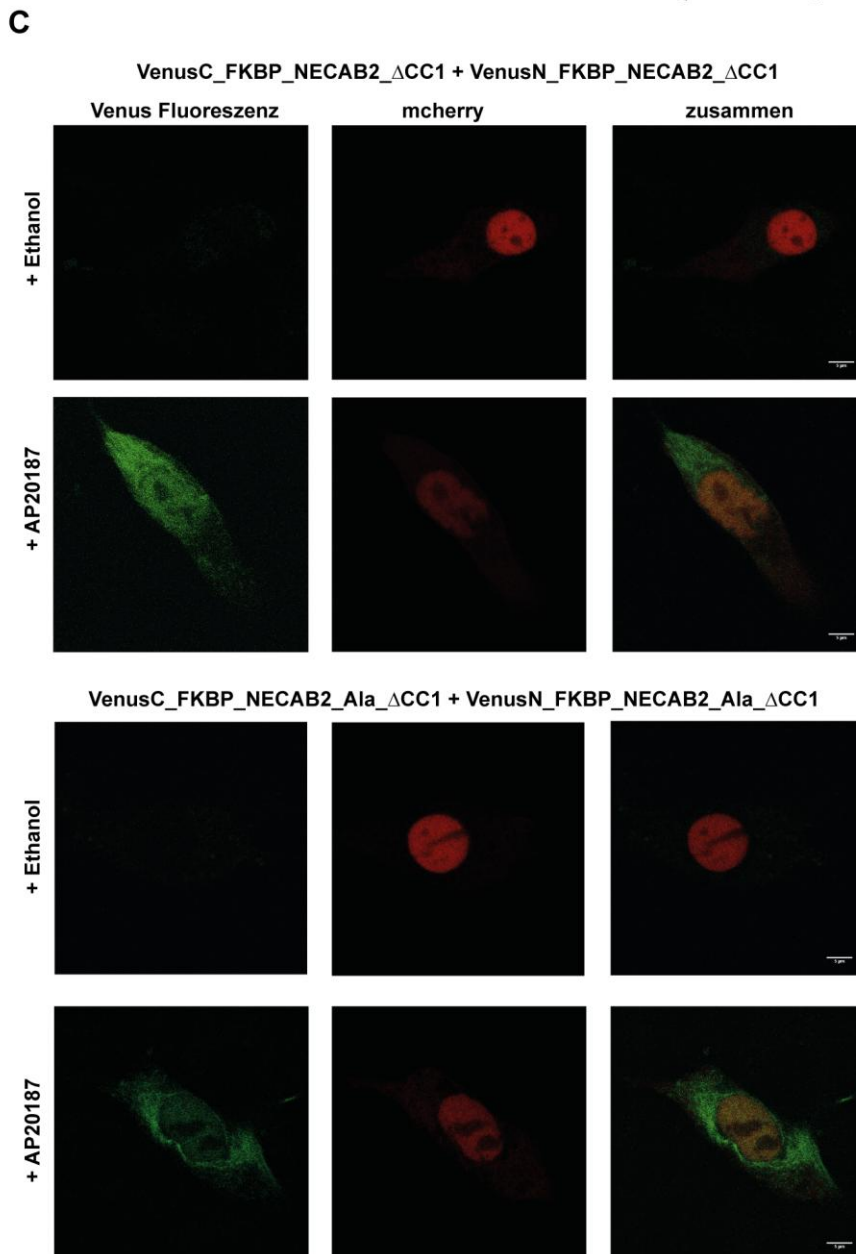
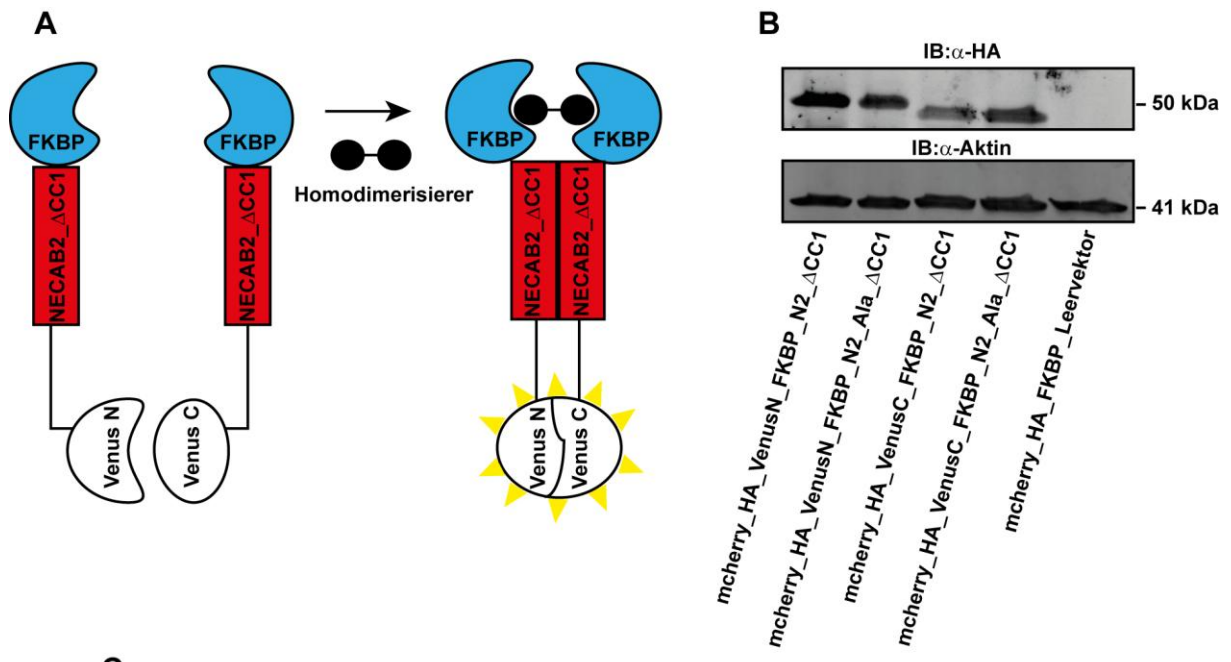


Abbildung 5.13: Induzierte, gezwungene Dimerisierung bestätigt CC1 als Dimerisierungsdomäne.

(A) Schema der induzierten Bimolekularen Fluoreszenzkomplementationsmethode (BIFC) (B) Immunoblot zum Nachweis der NECAB2-Venus-Konstrukte. HT22 Zellen wurden mit den folgenden Konstrukten transfiziert: mcherry_HA_N2_ΔCC1_Venus-N, mcherry_HA_N2_Ala(E84A-E118A)_ΔCC1_Venus-N, mcherry_HA_N2_ΔCC1_Venus-C, mcherry_HA_N2_Ala(E84A-E118A)_ΔCC1_Venus-C und mcherry_HA_Leervektor. Zur Detektion bei ca. 50 kDa diente der Anti-HA Antikörper. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. (C) HT22 Zellen wurden mit mcherry_HA_N2_ΔCC1_Venus-N und mcherry_HA_N2_ΔCC1_Venus-C, bzw. mcherry_HA_N2_Ala(E84A-E118A)_ΔCC1_Venus-N und mcherry_HA_N2_Ala(E84A-E118A)_ΔCC1_Venus-C kotransfiziert und jeweils mit 100 nM des Induktors AP20187 für 5 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dient Ethanol. mcherry dient als Transfektionskontrolle, Venus repräsentiert die Dimerisierung. NECAB2 kann ohne CC1 Domäne mit Hilfe eines Induktors zur Dimerisierung unabhängig von der Mutation in der EF-Hand Domäne gezwungen werden. Der Größenmaßstab beträgt 6 μm.

Für die Durchführung der gezwungenen Dimerisierung wurden die Konstrukte mcherry-FKBP-HA-VenusC-NECAB2-ΔCC1, mcherry-FKBP-HA-VenusN-NECAB2-ΔCC1, sowie mcherry-FKBP-HA-VenusC-NECAB2-Ala(E84A-E118A)-ΔCC1 und mcherry-FKBP-HA-VenusN-NECAB2-Ala(E84A-E118A)-ΔCC1 allein und zusammen in HT22 Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen für 5 Stunden mit dem Induktor AP20187 inkubiert, auf Deckgläschen umplattiert (75.000/Loch) und am Tag darauf fixiert und eingedeckelt. Abbildung 5.13C zeigt die konfokalmikroskopischen Bilder der zwangsdimerisierten Konstrukte. Unter Kontrollbedingungen (mit Ethanol) konnten sowohl die NECAB2-ΔCC1 Konstrukte als auch die NECAB2-Ala(E84A-E118A)-ΔCC1 Konstrukte nicht dimerisieren. Unter Zugabe des Induktors konnte eine Fluoreszenz im Venus Kanal bei beiden Konstrukten detektiert werden. Da die Konstrukte einen mcherry-NLS-Anhang besitzen, kann eine schwache bzw. keine Transfektion bei der Kontrolle mit Ethanol ausgeschlossen werden. Letztendlich konnte NECAB2 ohne CC1 Domäne mit Hilfe eines Induktors unabhängig von den Mutationen in der EF-Hand Domäne zur Dimerisierung gezwungen werden. Damit liegt nun ein Werkzeug zur Untersuchung des Dimers ohne Bindung an GPCRs vor.

5.13 Proteinexpressionsanalysen in den NECAB2 KO Mäusen

Zur näheren Charakterisierung von NECAB2 wurden Experimente mit den NECAB2 KO Mäusen durchgeführt. Für die Charakterisierung der NECAB2 KO Mäuse wurde in Bezug auf die vorherigen Ergebnisse die Expression des mGluR5 und des A_{2A}R Rezeptors in diesen Tieren untersucht. Des Weiteren wurde analysiert, ob es durch

das Fehlen von NECAB2 zu einer Veränderung der Expression der synaptischen Marker kommt.

5.13.1 Tendenziell herunterregulierte Expression von mGluR5 und A_{2A}R in den NECAB2^{-/-} Hirnlysaten

Wie in Kapitel 1.5.4 dieser Arbeit beschrieben, interagiert NECAB2 mit den beiden Rezeptoren A_{2A}R und mGluR5 (Canela et al., 2007; Canela et al., 2009). Um herauszufinden, ob es durch einen KO von NECAB2 zu einer Deregulierung der beiden Rezeptoren kommt, wurde die Expression dieser Rezeptoren auf Proteinebene untersucht.

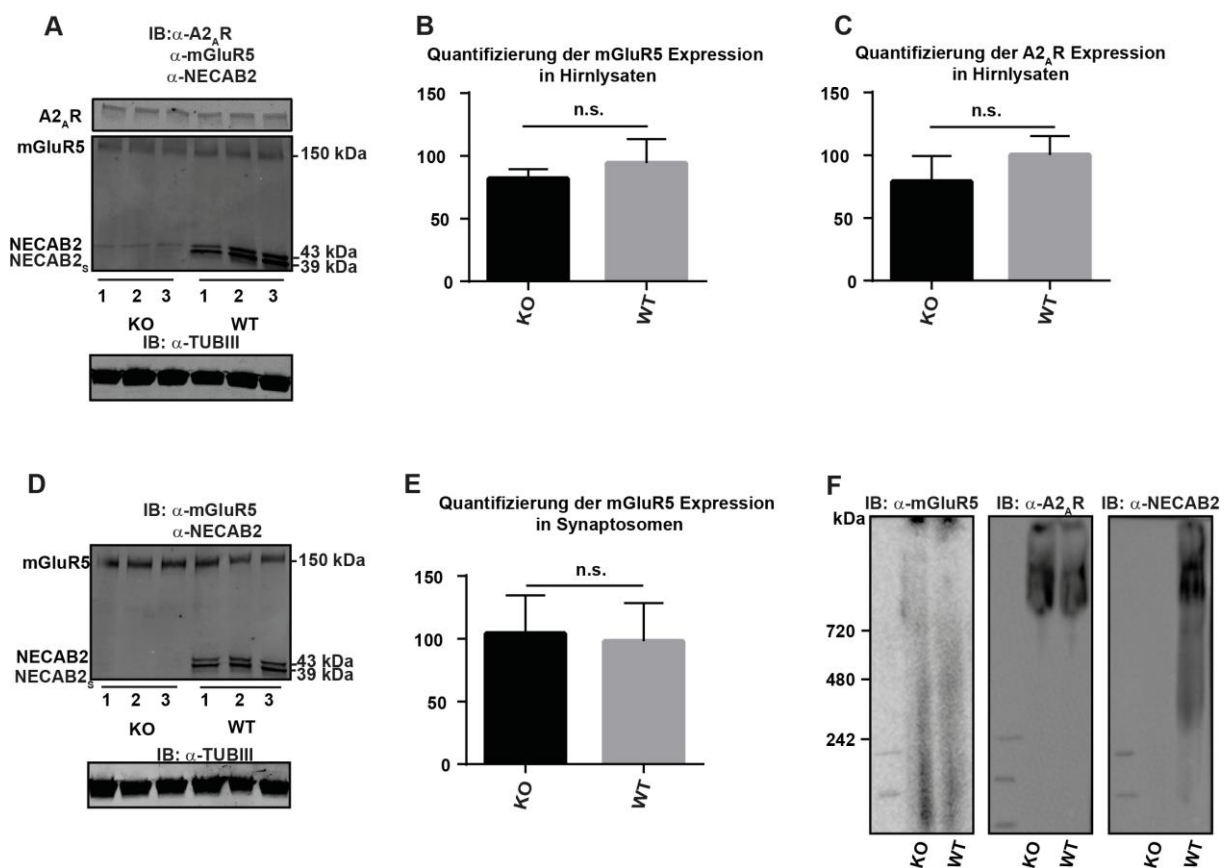


Abbildung 5.14: Kein signifikanter Expressionsunterschied von mGluR5 und A_{2A}R in den NECAB2^{-/-} Hirnlysaten und Synaptosomen.

(A) Immunoblot zur mGluR5 und A_{2A}R Expression in 12 Wochen alten NECAB2^{-/-}-Hirnlysaten. Zur Detektion von mGluR5 und A_{2A}R wurde der Anti-mGluR5 bzw. A_{2A}R Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle diente Anti-TubulinIII. Es wurden gleiche Mengen an Protein in die Taschen aufgetragen. (B) Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Quantifizierung von mGluR5 von jeweils 5 Mäusen mittels ImageJ an. Die TUBIII-Bande als Ladekontrolle dient zur Normalisierung der mGluR5-Expression. Der Vergleich der Säulen zeigt keine Signifikanz zwischen NECAB2^{-/-} und WT von $P < 0,05$ bei einem student's T-test an. (C) Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Quantifizierung von A_{2A}R von jeweils 5 Mäusen mittels ImageJ an. Die TUBIII-Bande als Ladekontrolle dient zur Normalisierung der A_{2A}R-Expression. Der Vergleich der Säulen zeigt keine Signifikanz zwischen NECAB2^{-/-} und WT von $P < 0,05$ bei einem student's T-test an. (D) Immunoblot zur mGluR5 Expression in NECAB2^{-/-} (KO) und NECAB2^{+/+} (WT) Synaptosomen.

Synaptosomen. Zur Detektion von mGluR5 wurde der Anti-mGluR5 Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle dient Anti-TubulinIII. Es wurden gleiche Mengen an Protein in die Taschen aufgetragen. (E) Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Quantifizierung von mGluR5 von jeweils 5 Mäusen mittels ImageJ an. Die TUBIII-Bande als Ladekontrolle dient zur Normalisierung der mGluR5-Expression. Der Vergleich der Säulen zeigt keine Signifikanz zwischen NECAB2 $-/-$ und WT von $P < 0,05$ bei einem student's t-test an. (F) Immunoblot vom nativen Gel zur Komplexbildung von mGluR5, A_{2A}R und NECAB2. Die homogenisierten Hirne der NECAB2 KO und WT Tiere wurden mittels Antikörper gegen mGluR5, A_{2A}R und NECAB2 im Immunoblot analysiert. Die Detektion der A_{2A}R Bande ist auf der gleichen Höhe wie die NECAB2 Bande. Die mGluR5 Bande befindet sich sowohl im Komplex als auch auf der Höhe von kleineren Molekulargewichtsgrößen.

Dafür wurden die Hirne und die Synaptosomen von fünf NECAB2 $-/-$ (KO) und fünf WT Mäusen präpariert und die Lysate mittels Immunoblot gegen Anti-A_{2A}R und Anti-mGluR5 untersucht (Abbildung 5.14A). Die Quantifizierung zeigt, dass sowohl die mGluR5- (Abbildung 5.14B) als auch die A_{2A}R Expression (Abbildung 5.14C) auf Proteinebene in den KO Hirnlysaten tendenziell herunterreguliert waren. Die Herunterregulierung war jedoch nicht signifikant. Der Immunoblot der mGluR5 Expression in den Synaptosomen der KO Mäuse zeigte hingegen keinen Unterschied (Abbildung 5.14D und 5.14E).

Da A_{2A}R mit mGluR5 einen Komplex bilden und NECAB2 jeweils mit mGluR5 und A_{2A}R interagieren kann, wurde für eine mögliche Komplexbildung von NECAB2 mit A_{2A}R und mGluR5 ein Immunoblot eines nativen Gels durchgeführt, da hierbei Komplexe nachgewiesen werden können. Dafür wurden die Hirnlysate einer KO und einer WT Maus auf ein natives Gel aufgetragen und anschließend per Immunoblot analysiert. Abbildung 5.14F zeigt, dass A_{2A}R auf der gleichen Höhe läuft wie NECAB2, mGluR5 hingegen auf der Höhe eines niedrigeren Molekulargewichts. Daraus könnte geschlossen werden, dass NECAB2 hauptsächlich mit A_{2A}R und nicht mit mGluR5 einen Komplex eingeht. Insgesamt ist die Komplexbildung auf der Höhe eines sehr hohen Molekulargewichts, was darauf hindeuten könnte, dass noch andere Proteine an dieser Komplexbildung beteiligt sind. Des Weiteren war kein Unterschied im Molekulargewicht bei der Expression von A_{2A}R zwischen KO und WT zu erkennen.

5.13.2 Kein signifikanter Expressionsunterschied der prä- und postsynaptischen Marker in den NECAB2 KO Synaptosomen

NECAB2 ist wie in Kapitel 5.2 beschrieben vorwiegend präsynaptisch exprimiert. Zur weiteren Charakterisierung sollte untersucht werden ob es möglicherweise durch das

Fehlen von NECAB2 zu einem Verlust der Synapsen kommt. Dafür wurden jeweils fünf Synaptosomen von NECAB2 KO und WT Tieren präpariert und mittels Immunoblot analysiert. Abbildung 5.15A zeigt die Expression des postsynaptischen Markers PSD95 bei 95 kDa und des präsynaptischen Markers Synaptobrevin 2 bei 19 kDa.

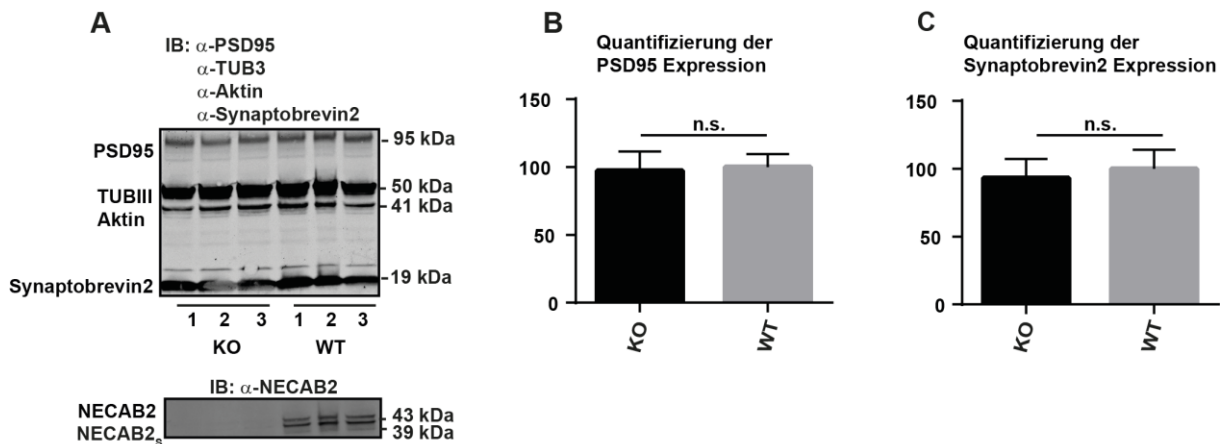


Abbildung 5.15: Kein signifikanter Expressionsunterschied der prä- und postsynaptischen Marker in den NECAB2 $-/-$ Synaptosomen.

(A) Immunoblot zum Nachweis der prä- und postsynaptischen Marker in 12 Wochen alten NECAB2 $-/-$ (KO) und Wildtyp (WT) Synaptosomen. Zur Detektion der Postsynapse wurde Anti-PSD95 (95 kDa) und zur Detektion der Präsynapse Anti-Synaptobrevin2 (19 kDa) verwendet. Als Ladekontrolle dient Tubulin III und Aktin. Es wurden gleiche Mengen an Protein in die Taschen aufgetragen. (B) Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Quantifizierung von PSD95 von jeweils 5 Mäusen mittels ImageJ an. Die TUBIII-Bande als Ladekontrolle dient zur Normalisierung der PSD95-Expression. Der Vergleich der Säulen zeigt keine Signifikanz zwischen NECAB2 $-/-$ und WT von $P < 0,05$ bei einem student's T-test an. (C) Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Proteinquantifizierung von Synaptobrevin2 von jeweils 5 Mäusen mittels ImageJ an. Die TUBIII-Bande als Ladekontrolle dient zur Normalisierung der Synaptobrevin2-Expression. Der Vergleich der Säulen zeigt keine Signifikanz zwischen NECAB2 $-/-$ und WT von $P < 0,05$ bei einem student's t-test an.

Die Quantifizierung von PSD95 (Abbildung 5.15B) und Synaptobrevin 2 (Abbildung 5.15C) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den NECAB2 KO und WT Tieren. Daraus lässt sich schließen, dass es durch das Fehlen von NECAB2 nicht zu einem Verlust von Synapsen kommt.

5.14 Kein signifikanter Expressionsunterschied von NECAB2 in phox47 $-/-$ Mäusen

Phox47 ist eine Untereinheit der NOX2, der Isoform der NADPH Oxidase in Neuronen. Die NADPH Oxidase ist die Hauptquelle für NMDAR-induziertes Superoxid. Fehlt also die phox47 Untereinheit, kommt es zu einer Verringerung der

Superoxidproduktion (Brennan et al., 2009; Brennan-Minnella et al., 2013b). Da NECAB2 aufgrund seiner Monooxygenasedomäne möglicherweise auch eine Rolle im Schutz vor oxidativen Stress spielen könnte, wurde die NECAB2 Expression in Hirnlysaten und Synaptosomen von *phox47*^{-/-} Mäusen untersucht. Dazu wurden jeweils fünf Hirnlysate und Synaptosomen von *phox47*^{-/-} und entsprechenden WT Mäusen präpariert und anschließend per Immunoblot analysiert. Die untersuchten *phox47*^{-/-} Mäuse wurden von der AG Prof. Dr. Kaina (Institut für Toxikologie, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt.

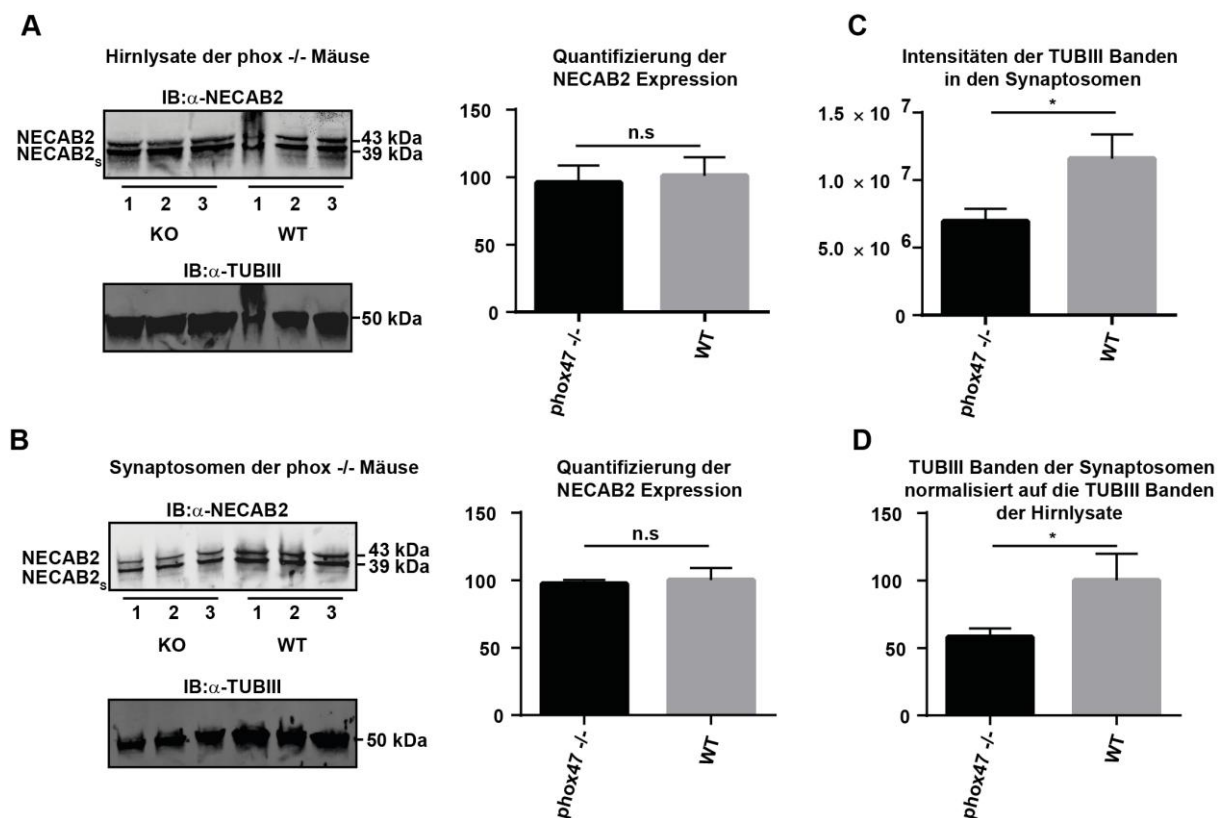


Abbildung 5.16: Kein signifikanter Expressionsunterschied von NECAB2 in Hirnlysaten und Synaptosomen von *phox47*^{-/-} Mäusen.

(A) Immunoblot zu den Hirnlysaten der 6 Monate alten *phox 47*^{-/-} Mäuse. Nachweis der NECAB2 Expression bei 39 kDa (NECAB_S) und 43 kDa (43 kDa) durch Anti-NECAB2 Antikörper. NECAB2 zeigt in den *phox 47*^{-/-} Mäusen keinen signifikanten Expressionsunterschied im Vergleich zu den WT Mäusen. Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte +/- SEM der Quantifizierung von jeweils 5 Mäusen mittels ImageJ an. Es wurden gleiche Mengen an Protein in die Taschen aufgetragen. Die TUBIII-Bande dient als Ladekontrolle zur Normalisierung der NECAB2-Expression. Der Vergleich der Säulen zeigt keine Signifikanz zwischen *phox 47*^{-/-} und WT von $P < 0,05$ bei einem student's t-test an. (B) Immunoblot zu den Synaptosomen der *phox 47*^{-/-} Mäuse. Nachweis der NECAB2 Expression bei 39 kDa (NECAB_S) und 43 kDa (43 kDa) durch Anti-NECAB2 Antikörper. NECAB2 zeigt in den *phox 47*^{-/-} Mäusen keinen signifikanten Expressionsunterschied im Vergleich zu den WT Mäusen. Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte +/- SEM der Quantifizierung von jeweils 5 Mäusen mittels ImageJ an. Es wurden gleiche Mengen an Protein in die Taschen aufgetragen. Die TUBIII-Bande dient als Ladekontrolle zur Normalisierung der NECAB2-Expression. Der Vergleich der Säulen zeigt keine Signifikanz zwischen *phox 47*^{-/-} und WT von $P < 0,05$ bei einem student's t-test an. (C) Die

graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Quantifizierung der absoluten Intensitätswerte der TUBIII Banden an. Der Vergleich der Säulen zeigt eine Signifikanz zwischen phox 47 $-/-$ und WT von $P < 0,05$ bei einem student's t-test an. (D) Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Quantifizierung der Normalisierung der TUBIII Banden an. Die TUBIII Banden der Synaptosomen wurden auf die TUBIII Banden der Hirnlysate der WT Tiere normalisiert. Der Vergleich der Säulen zeigt eine Signifikanz zwischen phox 47 $-/-$ und WT von $P < 0,05$ bei einem student's t-test an.

Die Quantifizierung der Immunoblots zeigt, dass es weder bei den Hirnlysaten (Abbildung 5.16A) noch bei den Synaptosomen (Abbildung 5.16B) einen signifikanten Unterschied in der NECAB2 Expression zwischen den phox47 $-/-$ und den WT Mäusen gab. Daraus lässt sich ableiten, dass NECAB2 vermutlich unabhängig von der NOX2 Maschinerie reguliert wird. Eine genauere Analyse der Immunoblots zeigt, dass die TubulinIII Bande, die normalerweise als Ladekontrolle fungiert, im Immunoblot der Synaptosomen signifikant herunterreguliert war (Abbildung 5.16B, Abbildung 5.16C). Die Normalisierung der TubulinIII Banden des Immunoblots der Synaptosomen auf die jeweiligen TubulinIII Banden des Immunoblots der jeweiligen Hirnlysate ergab ebenfalls eine signifikante Herunterregulierung von TubulinIII in den phox47 $-/-$ Mäusen (Abbildung 5.16D). Möglicherweise kommt es also zu einem neuronalen Verlust in den phox 47 $-/-$ Mäusen.

5.15 Signifikante Beeinträchtigung der sensorischen Reizverarbeitung und eine signifikant reduzierte Motivation in den NECAB2 KO Mäusen

Für eine funktionelle Charakterisierung von NECAB2 wurden NECAB2 KO Mäuse unterschiedlichen Verhaltenstests unterzogen. In Kooperation mit Prof. Dr. Konstantin Radyushkin (Mouse Behaviour Unit, Mainz) wurden jeweils 16 männliche NECAB2 KO und 12 männliche WT Mäuse im Alter von 12-20 Wochen auf motorische Defizite, Angst, Belohnung, Motivation, Lernen, Sozialverhalten und sensorische Reizverarbeitung hin untersucht. Dabei wurden Methoden wie *Morris water maze* für das räumliche Lernen, *elevated plus maze* und *Open field* zur Untersuchung des Angstverhaltens, *cat walk* für die Analyse der lokomotorischen Fähigkeiten, das *Progressive ratio training* zur Untersuchung des Motivationsverhaltens und der Belohnung sowie der Präpulsinhibitorstest für die Analyse der sensorischen Reizverarbeitung durchgeführt (Graham, 1975; Morris,

1984; Vrinten and Hamers, 2003; Richardson and Roberts, 1996; Hodos, 1961; Pellow et al., 1985). Abbildung 5.17A zeigt den Präpulsinhibitionstest. Die Versuche wurden mit drei unterschiedlich starken Präpulsen durchgeführt. Der Präpulsinhibitionstest dient der Untersuchung der sensorischen Reizverarbeitung. Normalerweise bewirkt ein Schreckreiz ein schreckhaftes Verhalten. Wird hingegen ein schwächerer Schreckreiz dem normalen Schreckreiz vorangestellt, resultiert daraus eine Verminderung des Erschreckungseffekts (Graham, 1975).

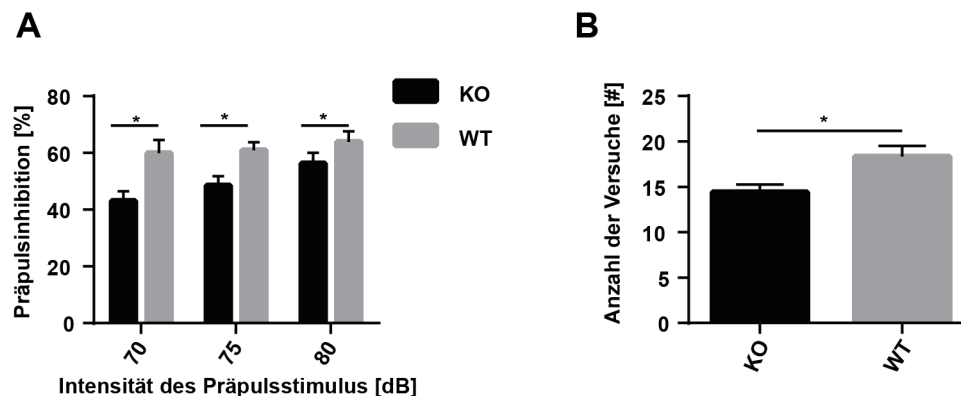


Abbildung 5.17: Signifikante Beeinträchtigung der sensorischen Reizverarbeitung und eine signifikant reduzierte Motivation in den NECAB2 KO Mäusen.

15 NECAB2 KO und 12 WT Mäuse wurden verschiedenen Verhaltenstests unterzogen. Zur Analyse der sensorischen Reizverarbeitung wurde der Präpulsinhibitionstest und für die Analyse der Motivation der *progressive ratio schedule* durchgeführt. (A) Graphische Darstellung des Präpulsinhibitionstests. Aufgetragen ist die Präpulsinhibition (in %) gegen den Präpulsstimulus (in dezibel: dB). Die NECAB2 KO Mäuse zeigen eine signifikant reduzierte Präpulsinhibition. Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte +/- SEM der Quantifizierung an. Der Vergleich der Säulen zeigt eine Signifikanz zwischen NECAB2 KO und WT von $P < 0,05$ bei einem Two-Way-Anova an. (B) Graphische Darstellung des *progressive ratio schedule*. Aufgetragen ist die Anzahl der Versuche. Die NECAB2 KO Mäuse zeigen eine signifikant reduzierte Anzahl der Versuche. Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte +/- SEM der Quantifizierung an. Der Vergleich der Säulen zeigt eine Signifikanz zwischen NECAB2 KO und WT von $P < 0,05$ bei einem student's t-test an.

Aus Abbildung 5.17A wird deutlich, dass mit steigendem Präpuls auch die Präpulsinhibition sowohl bei WT als auch bei NECAB2 KO zunahm. Die NECAB2 KO Mäuse zeigten jedoch im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine verminderte Präpulsinhibition und konnten demnach weniger gut die äußeren Reize filtern. Abbildung 5.17B zeigt die graphische Auftragung der Ergebnisse des Motivationstests. Im *progressive ratio training* werden die Mäuse so trainiert, dass sie eine wirksame Antwort abgeben müssen, um eine Belohnung (z.B. Nahrung) zu bekommen (Hodos, 1961). In diesem Versuch mussten die Mäuse nach jedem Lichtstimulus ihre Nase durch ein Loch stecken. Nach jeder Belohnung wird die

erforderliche Anzahl an Antworten erhöht, um die nächste Belohnung zu erhalten. Nach zwei Lichtimpulsen muss die Maus somit zweimal die Nase durch das Loch stecken usw.. Die Erhöhung der Anzahl der erforderlichen Antworten wird solange weitergeführt, bis die Maus nicht mehr weitermacht. Die NECAB2 KO Mäuse zeigten eine signifikant reduzierte Anzahl an Antworten auf den Lichtstimulus. Daraus lässt sich schließen, dass die NECAB2 KO Mäuse weniger motiviert sind eine Belohnung zu erhalten.

Die NECAB2 KO Mäuse zeigten im Vergleich zu den Kontrollmäusen kein verändertes Sozialverhalten, keine motorischen Defizite, keine Einschränkungen im Lernen sowie keine Unterschiede im Angstverhalten (Daten nicht gezeigt). Die verminderte Motivation in den NECAB2 Mäusen lässt sich somit nicht mit motorischen Defiziten erklären. Die Mäuse sind demnach motorisch in der Lage, den Versuch genauso oft und schnell wie die Kontrollmäuse durchzuführen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NECAB2 eine Rolle bei der sensorischen Reizverarbeitung sowie bei der Motivation spielt.

6. Diskussion

Ziel meiner Arbeit war es, das **Neuronale Ca²⁺-Bindende Protein 2 (NECAB2)** näher zu charakterisieren. Zusammen mit anderen konnte ich zeigen, dass NECAB2 im Hirn hauptsächlich im Striatum, in den Habenulae und in der CA2 Region des Hippocampus exprimiert wird. Eine genaue Analyse der striatalen Neuronen mittels STED Mikroskopie ließ vermuten, dass NECAB2 vorwiegend präsynaptisch exprimiert wird. Des Weiteren konnte NECAB2 erfolgreich als rekombinantes Protein exprimiert und aufgereinigt werden. Sowohl Experimente mit dem rekombinanten Protein und mit Hirnlysaten als auch mikroskopische Experimente mit überexprimierenden NECAB2-Zellen zeigten eine Ca²⁺-abhängige Homodimerisierung. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass die coiled-coiled 1 (CC1) Domäne für die Homodimerisierung verantwortlich ist. Die CC1 Domäne konnte ebenfalls als Domäne für die Interaktion mit dem metabotropischen Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5) identifiziert werden. In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass NECAB2 die Rezeptoraktivität von A_{2A}R und mGluR5 unter basalen Bedingungen erhöht (Canela et al., 2007; Canela et al., 2009). Kommt es entweder durch postsynaptische NMDA Rezeptoraktivität oder durch Aktivierung präsynaptischer, spannungsgesteuerter Calciumkanäle zum Calciumeinstrom, dissoziiert NECAB2 vom NECAB2/mGluR5 und NECAB2/A_{2A}R Komplex und dimerisiert Ca²⁺-abhängig. Des Weiteren konnte in Synaptosomen und Hirnlysaten von NECAB2 KO Mäusen keine Deregulierung prä- oder postsynaptischer Marker gefunden werden. Eine mögliche kompensatorische Hochregulierung des NECAB2 KO durch andere Proteine der Necab Familie, NECAB1 und NECAB3, konnte vorhergehend mittels qPCR ausgeschlossen werden. Zur weiteren Charakterisierung konnten Proteinexpressionsanalysen des A_{2A}R und mGluR5 mit NECAB2 KO Hirnlysaten eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Herunterregulierung von A_{2A}R und mGluR5 zeigen. Ferner wiesen Verhaltensexperimente mit NECAB2 KO und WT Mäusen eine signifikant beeinträchtigte sensorische Reizverarbeitung sowie eine verminderte Motivation in den NECAB2 KO Mäusen auf.

6.1 NECAB2 dimerisiert Ca²⁺ abhängig und hat mutmaßlich eine protektive Wirkung

Wie in der Einleitung beschrieben, besitzen Calciumbindende Proteine ein spezifisches Aminosäuremotiv, um Ca²⁺ binden zu können. NECAB2 enthält

ebenso ein solches Aminosäuremotiv welches als sogenanntes Helix-Loop Helix Motiv und als EF-Hand bezeichnet wird (Kretsinger and Nockolds, 1973). Es konnte gezeigt werden, dass NECAB2 Ca^{2+} abhängig dimerisiert (s. Kap. 5.6 und 5.7). In der Literatur sind EF-Hand Proteine beschrieben, die ebenfalls Ca^{2+} abhängig dimerisieren. Ein Beispiel dafür ist die humane lösliche Nukleotidase (Yang et al., 2006). Die Dimerisierung ist auf Konformationsänderungen in Folge der Ca^{2+} -Bindung zurückzuführen. Am Beispiel des EF-Hand Proteins Calmodulin lässt sich die Konformationsänderung gut beschreiben. Wird Ca^{2+} gebunden, unterziehen sich die Carboxy- und die Aminoternale Domäne einer großen Konformationsänderung. Beide EF Hände liegen in der geschlossenen, Ca^{2+} ungebundenen Form, als β -Faltblätter parallel zueinander vor, während in der offenen, Ca^{2+} gebundenen Form, die beiden Helices fast senkrecht zueinander vorliegen (Ikura, 1996; Lewit-Bentley and Réty, 2000; Kuboniwa et al., 1995). Während einige EF-Hand Proteine größere strukturelle Veränderungen zeigen, kommt es bei anderen EF-Hand Proteinen nur zu kleinen Veränderungen. Es konnte ferner gezeigt werden, dass strukturelle Änderungen in Folge der Ca^{2+} Bindung und dessen biologische Funktion zusammenhängen. So sind Ca^{2+} -bindende Proteine, wie z.B. Calmodulin, Tenascin C oder Recoverin, die sich einer großen Konformationsänderung unterziehen, bekannt dafür, dass sie eine bestimmte Schlüsselrolle bei der Aktivierung von Zielproteinen spielen (Ikura, 1996).

Im Falle von NECAB2 kommt es in Folge der Ca^{2+} -Bindung zur Homodimerisierung des Proteins. Die Homodimerisierung spielt mutmaßlich eine entscheidene Rolle für die enzymatische funktionelle Aktivität des Proteins. In prokaryotischen Homologen der ABM Domäne von NECAB2 war die Homodimerisierung Voraussetzung für die enzymatische Aktivität (Adams and Jia, 2005; Lemieux et al., 2006; Sciara et al., 2003).

Die ABM Domäne gehört zur Familie neuer Monooxygenasen. Diese sind für die Synthese großer Polyketid-aromatischer Stoffe in den synthetischen Signalwegen der Gram-positiven Bakterien verantwortlich. ActCA-Orf6 gehörte zu den ersten Enzymen dieser Monooxygenasen, dessen Struktur aufgeklärt werden konnte. ActCA-Orf6 ist ein kleines Enzym, welches Drei-Ring aromatische Substrate oxidiert. Dabei verleiht ActCA-Orf6 Dihydrokalafungin dessen Funktionalität. Dihydrokalafungin ist ein Wirkstoff mit antifungiemer Aktivität. Neben ActCA-Orf6

wurde die Struktur von zwei weiteren Monooxygenasen der gleichen Familie aufgeklärt: YgiN (QuMo) (Adams and Jia, 2005) und Rv0793 (Lemieux et al., 2006). Diese drei Monooxygenasen sind strukturell homolog miteinander und benötigen keine Metalle oder Kofaktoren für ihre Katalyse. Des Weiteren wurden alle drei als Homodimer kristallisiert. Jede Untereinheit besitzt dabei ein *ferredoxin-fold* (Adams and Jia, 2005; Lemieux et al., 2006; Sciara et al., 2003).

Der Aminosäurerest Trp-66 ist dabei in allen Mitgliedern dieser funktionellen Gruppe streng konserviert und spielt mutmaßlich eine wichtige Rolle bei der Katalyse (Kendrew et al., 1997; Sciara et al., 2003; Kendrew et al., 2000). Das eukaryotische NECAB2 besitzt ebenfalls an Aminosäureposition 66 der ABM Domäne ein Tryptophan, was die strukturelle Homologie zu den Prokaryoten unterstreicht. Einige andere wichtige Aminosäuren, die bei der Kristallisation der drei Monooxygenasen gefunden wurden, sind dabei nur für das jeweilige Enzym relevant, konnten jedoch nicht in den anderen beiden Monooxygenasen gefunden werden. Beispielsweise sind Tyr-51, Asn-62 und Tyr-72 in den katalytischen Mechanismus von ActCA-Orf6 involviert, fehlen jedoch bei QuMo. Daraus lässt sich schließen, dass diese Aminosäurenreste substratspezifisch sind. NECAB2 besitzt außer dem bereits benannten Tryptophanrest 66 keine anderen konservierten Aminosäurereste in der ABM Domäne. Das Trp-66, das bei QuMo gefunden wurde, wird als der wichtigste Aminosäurerest für die radikalische Reaktion betrachtet. Trp-66 erkennt die Hydroxylgruppe an Position C-11 und bildet mit dieser eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Diese Bindung hilft dem Substrat, in diesem Fall Quinol, sich hin zum aktiven Zentrum des Enzyms zu orientieren. Mit seinem Indol NH-Rest, welcher als Hydrogendonor dient, erhöht Tryptophan-66 die Formierung eines Netzwerks von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zum Substrat und begünstigt die Deprotonierung einer Hydroxylgruppe. Dies wiederum führt zunächst zur Formierung eines C-6 Carbanions und dann unmittelbar zum Angriff des molekularen Sauerstoffs. Das entstehende Peroxyintermediat wird durch Asn62 und Tyr51 stabilisiert. Das Substrat wird anschließend protoniert und dehydriert (Adams and Jia, 2005). Obwohl alle drei ABM Domänen strukturell homolog zueinander sind, besitzen sie unterschiedliche Substrate. Während ActVA-Orf6 vermutlich eine Rolle in der Biosynthese von aromatischen Polyketiden, beispielsweise Actinorhodin, spielt (Sciara et al., 2003), ist QuMo vermutlich an der Quinol Oxidation beteiligt (Adams and Jia, 2005). QuMo regeneriert Menadion aus

Menadiol in einem enzymatischen Redoxzyklus. In *E. coli* reduziert MdaB (*Modulator of drug discovery b*) Menadion zu Menadiol, während QuMo Menadiol zurück zu Menadion oxidiert. Quinon-Produkte sind relativ instabil. Daher ist es für die Zellen schwierig interne Speicher ohne die Formierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beizubehalten. Des Weiteren sind Quinone weit in der Natur verbreitet und können von vielen Zellen, unter anderem auch von Säugetierzellen, aufgenommen werden. Innerhalb der Zelle können Quinone dann ebenfalls ROS generieren. Demnach könnte der QuMo-MdaB Zyklus als Quinon-Puffer agieren (Kendrew et al., 1997; Wang and Maier, 2004). Rv0793, eine ABM-enthaltende, hypothetische Monooxygenase von *M. tuberculosis*, könnte ebenfalls als Superoxidfänger agieren (Lemieux et al., 2006). Bei der Einkapselung von Makrophagen wird das Bakterium durch das Selbstverteidigungssystem des Wirtes ROS und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) ausgesetzt (Nathan and Shiloh, 2000). Die Inhibierung dieser Verteidigung führt zu einer erhöhten Infektionsrate und dem Tod. Die ABM Homologen könnten demnach auch bei der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sein.

Die enzymatische Funktion von NECAB2 in der Physiologie des Säugerhirns ist bislang noch unklar. Darüberhinaus gibt es keine Hinweise auf das Substrat der ABM Domäne von NECAB2. Möglicherweise ist die ABM Domäne von NECAB2 jedoch ebenfalls an der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt und dient ebenfalls als eine Art Puffersystem. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, entstehen ROS bzw. speziell Superoxide hauptsächlich durch den NMDA-induzierten Calciumeinstrom. Kommt es zum NMDA-vermittelten Calciumeinstrom, wird PI3K induziert um $\text{Pi}(3,4,5)\text{P}_3$ zu bilden. $\text{Pi}(3,4,5)\text{P}_3$ aktiviert PKC_ζ , welches die $\text{p}47^{\text{phox}}$ Untereinheit von NOX2 phosphoryliert. Die Phosphorylierung von $\text{p}47^{\text{phox}}$ induziert daraufhin den Zusammenschluss des aktiven NOX2 Komplexes an der Zelloberfläche und die Produktion von Superoxid (Brennan-Minnella et al., 2013b). Die Homologie der ABM Domäne von NECAB2 zu den Prokaryoten sowie die Formierung des Homodimers könnten auf eine ähnliche Funktion wie bei den beschriebenen Prokaryoten hindeuten. Möglicherweise könnte NECAB2 ebenso an der Detoxifikation von ROS und/oder der Beibehaltung des physiologischen Gleichgewichts beteiligt sein. Eventuell könnte NECAB2 aber auch eine andere Rolle in der Physiologie der Eukaryoten spielen. Zu den Monooxygenasen gehören auch die sogenannten Häm-Oxygenasen (HO) (Tenhunen et al., 1968). Häm-Oxygenasen sind sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vorhanden. Häm-Oxygenase 1

(HO1) ist ein mikrosomales Enzym, welches mittels eines C-terminalen hydrophoben Schwanzes an der Membran verankert ist (Poulos, 2005). HO katalysieren den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der oxidativen Degradation von Häm zu Kohlenmonoxid, Fe^{3+} und Biliverdin-IX. Das Enzym bindet Häm in einem molaren Verhältnis von 1:1. Das HO-gebundene Häm agiert dabei als prosthetische Gruppe und als Substrat. Die Reaktion benötigt 3 Moleküle molekularen Sauerstoffs (O_2) pro oxidiertem Hämmolekül. Die reduzierenden Äquivalenten kommen von NADPH oder NADH und werden mittels Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat: Cytochrom P-450 Reduktase zur Oxygenase transferiert. In einer schrittweisen Reaktion wird Häm, über α -meso-Hydroxyhäm und Verdohäm als Intermediate, oxidiert. Es folgt daraufhin die Dissoziation von Kohlenmonoxid und Fe^{2+} (Liu and Montellano, 2000). Es wird angenommen, dass HO-1 verschiedene Funktionen ausübt. Unter anderem ist HO-1 ein zytoprotektives Enzym, welches bei einem erhöhten zellulären Stressspiegel für das Aufrechterhalten der physiologischen Homöostase verantwortlich ist (Ryter et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass bei erhöhtem Blutdruck, beim Zigarettenrauchen und oxidierten Lipiden HO-1 hochreguliert ist (Ishizaka et al., 1997; Favatier and Polla, 2001; Ishikawa et al., 1997). Daher wurde angenommen, dass HO-1 eine protektive Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen spielt. Möglicherweise gehört die ABM Domäne von NECAB2 zu einer ähnlichen Gruppe wie Häm-Oxygenasen und ist damit eventuell auch am Abbau von Häm beteiligt. Analog zur protektiven Rolle von HO-1 im kardiovaskulären System könnte NECAB2 auf neuronaler Ebene eine zytoprotektive Rolle spielen. Um herauszufinden, welche enzymatische Funktion NECAB2 unter physiologischen Bedingungen im Säugerhirn spielt, müsste zunächst das spezifische Substrat herausgefunden werden. Weiter müssten Experimente hinsichtlich einer möglichen Kofaktorbeteiligung mit dem rekombinanten Protein durchgeführt werden. Um herauszufinden, ob NECAB2 analog zu den prokaryotischen Homologen ebenso eine protektive Rolle spielt, könnten Experimente mit den hier generierten stabil überexprimierenden NECAB2 Zelllinien durchgeführt werden. Eine Möglichkeit wäre die Menge der entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies nach Stimulation mittels *High performance liquid chromatography* (HPLC) zu messen. Dabei wäre anzunehmen, dass die Zelllinie mit dem überexprimierten NECAB2 Wildtyp im Vergleich zum Leervektor weniger reaktive gemessene Sauerstoffspezies aufweist. Ferner könnten Röntgenkristallstrukturanalysen mit dem rekombinanten,

kristallisierten Protein Auskunft über den genauen Enzymmechanismus von NECAB2 geben.

6.2 Coiled-coiled 1 (CC1) Domäne vermittelt sowohl die Homodimerisierung als auch die Interaktion mit mGluR5

Es konnte herausgefunden werden, dass die coiled-coiled 1 (CC1) Domäne sowohl die Homodimerisierung als auch die Interaktion mit mGluR5 vermittelt (s. Kapitel 5.10, 5.11, 5.12). Während der Immunoblot (IB) der stabil überexprimierenden NECAB2 WT und Mutantenzelllinien und die Immunpräzipitation (IP) der verschiedenen NECAB2 Mutanten zeigten, dass sowohl die CC1 als auch die ABM Domäne mutmaßlich für die Dimerisierung verantwortlich sind, bestätigten die immunzytochemischen Experimente die CC1 Domäne als Dimerisierungsdomäne. Studien mit prokaryotischen Homologen der ABM Domäne ließen vermuten, dass auch die ABM Domäne bei Eukaryoten für die Dimerisierung verantwortlich ist (Adams and Jia, 2005; Lemieux et al., 2006; Sciara et al., 2003). Der oben beschriebene Widerspruch könnte mit der unterschiedlichen Expressionsstärke erklärt werden. Die Lysatkontrolle der IP (Abb. 5.11D) und der IB der stabilen Zelllinien (Abb. 5.11C) zeigten eine geringere Expression der NECAB2- Δ CC1 und NECAB2- Δ ABM Konstrukte an. Dadurch war im IB der stabil exprimierten NECAB2 Zelllinien keine Dimerbande zu sehen. Auch in der IP wurden für NECAB2- Δ CC1 und NECAB2- Δ ABM zwei schwächere Banden detektiert. Um das Problem der unterschiedlichen Expressionsstärken zu lösen, wurden immunzytochemische Experimente mit der Bimolekularen Fluoreszenz Komplementationsmikroskopie (BIFC) durchgeführt, bei denen auf eine Expressionskontrolle (hier α -Myc bzw. IRES-mcherry) normalisiert wurde (Abb. 5.11E und Abb. 5.13C). Aufgrund der nun normalisierten Expressionsrate, ist der Widerspruch in beiden Methoden erklärbar und es zeigte sich, dass NECAB2 auch mit fehlender ABM Domäne dimerisiert und damit im physiologischen Umfeld der Zelle hauptsächlich die CC1 Domäne für die Homodimerisierung verantwortlich ist (Abb. 5.11E, Abb. 5.13C). Wird im Falle von NECAB2 Ca^{2+} gebunden, kommt es zu einer Konformationsänderung der EF-Hände und dadurch zu einer Dimerisierung der coiled-coiled Domänen. Coiled-coiled Domänen wurden erstmals 1952 von Francis Crick erwähnt. Coiled-coiled Domänen sind stabile lineare Domänen, die mindestens aus zwei Einzelhelices bestehen. Dabei bestehen die Einzelhelices aus α -Helices, die sich umeinander und damit zu

einer Mehrfachhelix winden (Crick, 1952). Coiled-coiled Domänen besitzen ein sogenanntes Heptadenmuster. Die Positionen in diesem wiederholenden Aminosäuremuster werden als abcdefg bezeichnet, wobei an den Position a und d hydrophobe Reste lokalisiert sind wie beispielsweise Leucin, Isoleucin und Valin. Die hydrophoben Aminosäuren sind dabei für die Stabilisierung der coiled-coiled Domänen verantwortlich (Burkhard et al., 2001; Apgar et al., 2008). Ein weiteres Indiz dafür, dass NECAB2 coiled-coiled Domänen besitzt, zeigt das CD-Spektrum des rekombinanten Proteins (Abbildung 5.11B). Das Spektrum zeigt eine α -helicale Struktur, was bedeutet, dass der Großteil der Struktur von NECAB2 zusätzlich zu den coiled-coiled Domänen aus α -Helices besteht. Mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse wäre es möglich, die genaue Struktur von NECAB2 aufzuklären und die detaillierten Mechanismen der Dimerbildung zu verstehen. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich NECAB2 zu kristallisieren. Die Ausbeute des aufgereinigten Proteins (0,5 mg/ml) war zu gering, um Kristallisationsansätze anzusetzen. Die Mindestkonzentration sollte 1 mg/ml betragen. Zahlreiche Publikationen konnten in der Vergangenheit die strukturellen Mechanismen diverser Proteine mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse zeigen. Dabei wird deutlich, dass coiled-coiled Domänen oft zur Dimerbildung verschiedener Proteine beitragen (Joslyn et al., 1993; Lu et al., 2012; Chang et al., 2003).

Des Weiteren ist die CC1 Domäne für die Interaktion mit mGluR5 verantwortlich. Coiled-coiled Domänen sind nicht nur für die Dimerbildung verantwortlich, sondern spielen häufig eine wichtige Rolle bei Protein-Protein Interaktionen (Strauss and Keller, 2008). In einer bioinformatischen Studie über Protein-Protein Interaktionen in Hefen konnte eine hohe Anzahl an interagierenden Proteinen mit coiled-coiled Domänen gefunden werden (Newman et al., 2000; Hu, 2000). Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems wurden die Interaktionen anschließend überprüft. Die biologische Funktion der Interaktionen sind zum Teil jedoch unklar (Newman et al., 2000). Ein Beispiel für eine coiled-coiled abhängige Interaktion sind Homer-Proteine. Diese interagieren ebenfalls mit den Gruppe I mGluRs. Dabei konnte festgestellt werden, dass nur diejenigen Homer Proteine, die eine coiled-coiled Domäne besitzen, mit den mGluRs interagierten, während diejenigen, denen die coiled-coiled Domänen fehlen, keine Interaktion eingingen (M.Soloviev et al., 2000).

Wie bereits ebenfalls in der Einleitung beschrieben, interagieren NECAB2 und mGluR5 Ca^{2+} abhängig. Experimente mit ansteigenden physiologisch relevanten Ca^{2+} Konzentrationen zeigten eine reduzierte Bindung von NECAB2 an mGluR5 aber auch an $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ an. Dabei konnte eine 50%ige Hemmung bei der Interaktion von NECAB2 und $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$, sowie eine 85%ige Hemmung bei der Interaktion von NECAB2 und mGluR5 erreicht werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NECAB2 die basale Expression von mGluR5 oder $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ nicht erhöht. Kommt es jedoch zur Stimulierung der beiden Rezeptoren durch Quisqualisäure (mGluR5) und CGS21680 ($\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$), ist eine signifikant erhöhte ERK1/2 Phosphorylierung die Folge (Canela et al., 2009; Canela et al., 2007). Daraus lässt sich schließen, dass NECAB2 die Kupplungseffizienz von $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ und mGluR5 zur Signaltransduktionsmaschinerie erhöht, ohne dabei die Zelloberflächenexpression der Rezeptoren zu verändern. Eine mögliche Funktion von NECAB2 lässt sich wie folgt erklären: Kommt es durch NMDA-induzierten bzw. mGluR5-induzierten Ca^{2+} Einstrom in die Zelle, binden die EF-Hand Domänen von NECAB2 Ca^{2+} und NECAB2 homodimerisiert als Konsequenz der Ca^{2+} -Bindung mit Hilfe der CC1 Domäne. Parallel kommt es zur Dissoziation vom mGluR5/NECAB2 und $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ /NECAB2 Komplex und zu einer reduzierten Phosphorylierungsrate von Erk1/2. Im Rahmen der möglichen Funktion von NECAB2 stellt sich die Frage was passiert wenn NECAB2 nicht da ist bzw. herunterreguliert wird. Darauf wird in den nächsten Kapiteln dieser Arbeit eingegangen.

6.3 Tendenziell reduzierte Expression von mGluR5 und $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ in den NECAB2 KO Mäusen

In der Literatur gibt es bisher weder Hinweise zur Funktion von NECAB2 noch zu Untersuchungen von NECAB2 *Knock-Out* oder *Knock-down* Modellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Untersuchungen an NECAB2 KO Mäusen durchgeführt. Eine kompensatorische Regulation des NECAB2 KO durch die beiden Proteine NECAB1 und NECAB3 der NECAB-Familie konnte mittels qPCR ausgeschlossen werden. Proteinexpressionsuntersuchungen mittels Immunoblot von mGluR5 und $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ in den NECAB2 KO und WT Hirnlysaten zeigte eine tendenziell reduzierte Expression der Rezeptoren (Abbildung 5.14). Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Möglicherweise wäre der Unterschied statistisch signifikant, wenn mehr Tiere untersucht würden. Die Herunterregulation ist nur in den Hirnlysaten der NECAB2 KO Mäuse und nicht in den Synaptosomen derselben Tiere zu detektieren.

Dies könnte auf ein technisches Problem zurückgeführt werden. Die Synaptosomenpräparation sowie die Hirnlysate müssten demnach mit neuen Mäusen erneut durchgeführt werden.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, können $A_{2A}R$ und mGluR5 interagieren. Beide Rezeptoren können sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sein. Im Striatum sind diese Rezeptoren in den GABA-ergen striatopallidalen Neuronen exprimiert (Schiffmann et al., 1991; Testa et al., 1995). Eine strukturelle Analyse des Rattenstriatums konnte ferner zeigen, dass $A_{2A}R$ in glutamatergen symmetrischen und asymmetrischen Synapsen exprimiert wird. Viele der Axonendigungen besitzen asymmetrische, exzitatorische Kontakte mit striatalen Elementen (Hettinger et al., 2001). Daher wurde von Hettinger et al. (2001) angenommen, dass $A_{2A}R$ eine wichtige Rolle in der Regulation des glutamatergen Beitrags auf die striatalen GABA-ergen Neuronen spielt. Frühere Studien konnten ebenso zeigen, dass die Bindung von Adenosin an $A_{2A}R$ die Glutamatausschüttung innerhalb des Striatums reguliert (Corsi et al., 1999; Popoli et al., 1995). Die Existenz der synergistischen $A_{2A}R$ /mGluR5 Interaktion konnte erstmals mittels *in vivo* Mikrodialyse gefunden werden (Díaz-Cabiale et al., 2002). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte den $A_{2A}R$ /mGluR5 heteromeren Komplex mittels Membranpräparation von transient co-transfizierten HEK-293 Zellen und Rattenstriata später bestätigen (Ferré et al., 2002). Ob es sich dabei um eine direkte Protein-Protein Interaktion (Heterodimere) handelt oder beide Rezeptoren durch zusätzliche zytosolische Proteine verlinkt sind, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Ein Beispiel für zytosolisch verlinkende Proteine sind Homer Proteine oder die Shank Familie der Scaffold Proteine, die vermutlich an der Interaktion zwischen mGluR5 und NMDA Rezeptoren beteiligt sind (Sheng and Kim, 2000). Des Weiteren konnte eine Kolo-kalisation sowie eine funktionelle Interaktion von mGluR5 und $A_{2A}R$ in glutamatergen Nervenendigungen im Rattenstriatum gefunden werden (Rodrigues et al., 2005).

Die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion von NECAB2 mit mGluR5 und die bereits publizierten Ergebnisse der Interaktionen von NECAB2 mit mGluR5 und $A_{2A}R$ lassen aufgrund des $A_{2A}R$ /mGluR5 Komplexes auf eine mögliche Komplexbildung von NECAB2 schließen. Untersuchungen zur Komplexbildung von $A_{2A}R$, NECAB2 und mGluR5 in Hirnlysaten der NECAB2 KO und WT Maus mit dem nativen Gel ergaben kein eindeutiges Ergebnis. Die Bande von $A_{2A}R$ läuft im Hirnlysate der NECAB2 KO

Maus auf der gleichen Höhe wie im Hirnlysate der WT Maus. Insgesamt läuft die Bande sehr hoch und auf der gleichen Höhe wie NECAB2 in der WT Maus. Die Bande von mGluR5 läuft auf einer sehr viel geringeren Höhe und ist ebenso identisch im NECAB2 KO und WT Hirnlysate. Daraus ist zu schließen, dass NECAB2 mit A_{2A}R einen Komplex eingeht. Zu erwarten war jedoch ein Unterschied der Bandenhöhe in NECAB2 KO und WT Hirnlysaten. Möglicherweise sind in dem Komplex überproportional viele A_{2A}R Moleküle und nur wenige NECAB2 Moleküle vorhanden, was auch das hohe Molekulargewicht erklären würde. Ebenso deutet das hohe Molekulargewicht auf eine Beteiligung anderer Proteine wie beispielsweise Dopaminrezeptoren hin. Die ebenso in MSNs exprimierten Dopaminrezeptoren D2 (D2R) wurden in Komplexen mit mGluR5 allein, mit A_{2A}R allein oder zusammen mit mGluR5 und A_{2A}R gefunden (Fuxe et al., 2015; Díaz-Cabiale et al., 2002). Dabei zeigten beispielsweise Ligandenbindeassays in Membranpräparationen des Rattenstriatum eine Interaktion von A_{2A}R, mGluR5 und D2R an der Membran in den GABA-ergen striatopallidalen Neuronen (Ferré et al., 1999; Popoli et al., 2001; Rimondini et al., 1999). Eine Wiederholung des nativen Gels mit Hilfe eines Antikörpers gegen den Dopamin-D2-Rezeptor und/oder pull-down Assays könnten Aufschluss über eine mögliche Beteiligung des D2R geben. Leider gibt es jedoch keine spezifischen Antikörper gegen D1- und D2-Rezeptoren (Aussage von Olivier Civelli, UCI, Kalifornien, USA).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Fehlen von NECAB2 eine tendenzielle Herunterregulation von mGluR5 und A_{2A}R zur Folge hat. Dadurch käme es mutmaßlich zu einer herunterregulierten MAPK Signaltransduktion. Möglicherweise hat das Fehlen von NECAB2 eine Auswirkung auf den mGluR5/A_{2A}R/D2R Komplex und es kommt infolgedessen zu einer gestörten A_{2A}R/D2R Rezeptoraktivität. Eine gestörte A_{2A}R/D2R Rezeptoraktivität könnte sich im cAMP Signalweg widerspiegeln. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, aktiviert die Stimulierung des A_{2A}Rs die Adenylatzyklase, die wiederum cAMP aus ATP synthetisiert. Bei der Aktivierung des Dopamin D2 Rezeptors wird hingegen die Adenylatzyklase inhibiert und die Synthese von cAMP gehemmt (Hillion et al., 2002; Kull et al., 1999). cAMP ist ein *second messenger* und vermittelt neben der Steuerung von *cyclic-nucleotide gated* (CNG) Ionenkanälen (Kaupp and Seifert, 2002) und *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs; de Rooij et al., 2000) die meisten seiner Effekte über die Aktivierung der cAMP-abhängigen Kinase A (PKA) (Johnson, 2001). PKA besteht aus zwei

katalytischen Untereinheiten, die von einem Dimer aus regulatorischen Untereinheiten zusammen gehalten werden (Corbin et al., 1973; Corbin et al., 1978; Potter et al., 1978). Die PKA selbst besitzt ca. 150 physiologisch relevante Substrate. Im Hirn spielt die PKA eine wichtige Rolle bei der Modifikation von Synapsen und der Regulierung von Ionenkanälen. Wird der cAMP-Spiegel und dadurch auch die PKA-Aktivität durch die Desensibilisierung von Rezeptoren und der Aktivierung von Phosphodiesterasen (PDE) reduziert, wird der cAMP-abhängige Signaltransduktionsweg gestoppt (Beavo et al., 1994; Mons and Cooper, 1994). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, können die A_{2A} Rezeptoren Heteromere mit den Dopamin D2 Rezeptoren bilden. Die Heteromerbildung besteht aus einer elektrostatischen Epitop-Epitop Interaktion zwischen einer Argininreichen Domäne des D2Rs und einem Phosphoserin, welches im C-Terminus des A_{2A}R lokalisiert ist (Ciruela et al., 2004). Die Rezeptoraktivität des A_{2A}Rs und D2Rs zeigen eine Crossfunktion hinsichtlich des cAMP Signalwegs. Die Blockierung des A_{2A}R begünstigt die Aktivierung des Dopamin D2 Rezeptor Signalwegs und damit die Inhibierung der Adenylatzyklase. Daraus resultiert ein reduzierter cAMP Spiegel und eine gehemmte PKA Aktivität, was zu einer reduzierten neuronalen Erregbarkeit führt. Hohe Konzentrationen an Adenosin und Glutamat stärken hingegen die synergistische A_{2A}R-mGluR5 Interaktion. Die synergistische Interaktion des A_{2A}R-mGluR5 Komplexes wirkt dem D2R Signalweg anhand von in der Membran stattfindenden Interaktionen des A_{2A}-D2-mGlu5 heteromeren Rezeptorkomplexes entgegen. Die Interaktion bewirkt dabei die Synthese von cAMP und die Aktivierung der PKA. Das begünstigt wiederum neuronale Erregbarkeit und synaptische Übertragung (Schiffmann et al., 2007). NECAB2 könnte aufgrund der gezeigten Interaktion mit mGluR5 und A_{2A}R sowie einer möglichen Interaktion mit D2R eine entscheidende Rolle bei der Crossfunktion des cAMP Signalwegs spielen. NECAB2 ist mutmaßlich an der synergistischen Interaktion von mGluR5-A_{2A}R beteiligt und erhöht damit vermutlich dessen Rezeptoraktivitäten. Unter aktivierten Bedingungen mit hohen Konzentrationen an Adenosin und Glutamat wird die Adenylatzyklase stimuliert, cAMP aus ATP synthetisiert und in Folge die PKA aktiviert. In den NECAB2 KO Mäusen wurde eine tendenzielle Herunterregulierung des A_{2A}R und des mGluR5 gefunden. Somit kann mGluR5/A_{2A}R nicht im ausreichenden Maße stimuliert werden und die Aktivierung des Dopamin D2 Rezeptor Signalwegs wird begünstigt. In Folge wird die Adenylatzyklase inhibiert, der cAMP Spiegel reduziert und die

Aktivierung der PKA gehemmt. Es ist demnach zu vermuten, dass in den NECAB2 KO Mäusen ein niedrigerer cAMP Spiegel zu erwarten ist als in den Kontrollmäusen. Hierfür müssten Experimente hinsichtlich der Rezeptoraktivität des A_{2A}R mittels cAMP als *read-out* angeschlossen werden.

6.4 NECAB2 KO Mäuse zeigen eine signifikante Beeinträchtigung der sensorischen Reizverarbeitung sowie eine signifikant reduzierte Motivation

Die Verhaltensexperimente zeigten eine signifikant reduzierte Präpulsinhibition sowie eine signifikant reduzierte Anzahl an Versuchen im Motivationstest (*progressive ratio schedule*) (Abbildung 5.17). Alle anderen Verhaltensexperimente hinsichtlich Angst, kognitiver und motorischer Fähigkeiten sowie hinsichtlich des Sozialverhaltens wiesen keine Unterschiede zwischen den NECAB2 KO- und den Kontrollmäusen auf (Daten nicht gezeigt). Daraus ist zu schließen, dass die gefundenen signifikanten Unterschiede im Motivationstest nicht aufgrund von motorischen Dysfunktionen erklärt werden können.

Der Präpulsinhibitionstest ist bei Mäusen wie auch beim Menschen ein Test für die Filterfunktion des Gehirns. Als Präpulsinhibition wird die normale Unterdrückung eines Startle-Reflexes bezeichnet. Dabei ist der Startle-Reflex eine reflexartige Kontraktion des Skelettmuskels als Folge eines intensiven und plötzlichen Stimulus. Geht dem intensiven plötzlichen Stimulus ein ähnlicher aber schwächerer Stimulus voran wird der Startle-Reflex unterdrückt bzw. abgeschwächt (Graham, 1975). Lebewesen, die eine verminderte Präpulsinhibition zeigen, haben eine beeinträchtigte sensorische Reizverarbeitung. Das bedeutet, dass sie nicht in der Lage sind Wichtiges von Unwichtigem zu trennen. Eine verminderte Präpulsinhibition und damit eine beeinträchtigte sensorische Reizverarbeitung werden im Zusammenhang mit einem Ungleichgewicht des Dopaminhaushalts gebracht. Überzeugende Daten konnten in der Vergangenheit zeigen, dass es zu einer Erhöhung der dopaminergen Neurotransmission im Striatum kommt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gibt es zwei verschiedene Subtypen der GABA-ergen striatalen Neurone. Charakterisiert werden sie durch ihre enthaltenen Peptide und unterschiedlichen Subtypen von Dopaminrezeptoren (Yung et al., 1995; Alexander and Crutcher, 1990). D1-Klasse Rezeptoren mit D1 und D5 Subtypen und D2-Klasse Rezeptoren (D2S/L kurz und lange Isoformen) mit D2, D3 und D4 Subtypen (Gingrich

and Caron, 1993). Die pallidalen GABA-ergen Neurone enthalten Enkephalin und Dopamin D2 Rezeptoren. Die strionigralen und strioentepeduncularen GABA-ergen Neurone enthalten die Peptide Dinorphin und Substanz P sowie die Dopamin D1 Rezeptoren (Yung et al., 1995; Alexander and Crutcher, 1990).

Patienten, die unter Schizophrenie leiden, zeigen ebenfalls eine verminderte Präpulsinhibition (Parwani et al., 2000; Grillon et al., 1992). Die Patienten besitzen einen Dopaminüberschuss und werden häufig mit dem Dopamin D2 Rezeptor (D2R) Antagonisten Haloperidol behandelt. Experimente mit Dopamin D2 und Dopamin D1 Agonisten konnten zeigen, dass die Präpulsinhibition mit Dopamin D2 aber nicht mit Dopamin D1 Agonisten beeinträchtigt ist. Das Medikament Haloperidol blockiert in diesem Zusammenhang den Dopamin D2 Rezeptor und vermindert die Beeinträchtigungen der sensorischen Reizverarbeitung (Goodman et al., 1983). Die NECAB2 KO Mäuse zeigen ebenfalls eine beeinträchtigte sensorische Reizverarbeitung und haben eventuell einen erhöhten Dopaminüberschuss. Zur Überprüfung dieser These müssten immunchemische und immunhistochemische Experimente hinsichtlich der Dopamin D1 und D2 Rezeptorexpression in den NECAB2 KO Tieren durchgeführt werden. Die Interaktion von NECAB2 mit mGluR5 und $A_{2A}R$ könnte vermuten lassen, dass es ferner möglich ist, dass NECAB2 ebenso mit D2R interagieren kann. Eine Kolo-kalisation von $A_{2A}R$ und D2R konnte zumindest in früheren Publikationen gezeigt werden (Yung et al., 1995; Fink et al., 1992; Svenningsson et al., 1995). Beide Rezeptoren werden striatopallidal prä- und postsynaptisch exprimiert. Es wird angenommen, dass zwischen Adenosin und Dopamin eine starke antagonistische Interaktion im Striatum existiert. Frühere Studien haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass eine striatale Infusion des $A_{2A}R$ Agonisten CGS 21680 einer D2R Agonist-induzierten Erniedrigung des extrazellulären GABA Spiegels im ipsilateralen Globus pallidus entgegenwirkt. Auf der anderen Seite konnten striatale Infusionen des Adenosin Rezeptor Antagonisten Theophyllin die D2R Agonisten-vermittelten Effekte des pallidalen GABA extrazellulären Spiegels erhöhen (Ferre et al., 1993). Die Stimulierung der A_{2A} Rezeptoren bewirkt eine Verringerung der Affinität der D2 Rezeptoren für ihre Agonisten, während sich die Affinität gegenüber den Antagonisten nicht verändert (Ferre et al., 1991a). Zusammenfassend lässt sich sagen: Werden die A_{2A} Rezeptoren durch einen Agonisten stimuliert, bewirkt dies einen ähnlichen Effekt wie bei einer Blockierung des Dopamin D2 Rezeptors durch einen Antagonisten. Des

Weiteren konnte gezeigt werden, dass ebenso die synergistische Interaktion von A_{2A}R und mGluR5 dem inhibitorischen Effekt von D2R entgegenwirkt. Kommt es zu einem Fehlen von NECAB2, wie in den NECAB2 KO Tieren, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass A_{2A}R und mGluR5 tendenziell herunterreguliert sind. Diese tendenziell herunterregulierte Expression in den NECAB2 KO Tieren könnte demnach einen Einfluss auf die dopaminerge Transmission haben. Es ist zu vermuten, dass durch die Herunterregulierung des A_{2A}R dieser nicht im ausreichenden Maße stimuliert werden kann. Dadurch kommt es vermutlich zur erhöhten Stimulation des D2R und damit zu einem Dopaminüberschuss im Striatum. Dies würde die signifikant reduzierte Präpulsinhibition und damit die verminderte sensorische Reizverarbeitung erklären. In weiterführenden Experimenten müsste die Expressionrate der Dopamin Rezeptoren im Striatum mittels Autoradiographie, Immunhistochemie und Immunoblot analysiert werden. Ferner könnten Ko-Immunopräzipitationsanalysen und Experimente mit dem nativen Gel zeigen, ob NECAB2 auch mit D2R interagiert und ob es möglicherweise zu einer Komplexbildung aller beteiligten Rezeptoren kommt. Es wäre auch zu vermuten, dass NECAB2 eine Art verbindendes Protein aller Rezeptoren ist und damit eventuell ähnliche Funktionen wie die Homer Proteine übernimmt (Sheng and Kim, 2000).

Der *progressive ratio schedule* Test wird durchgeführt, um die Belohnungsstärke und die Motivation der Tiere zu messen. In den NECAB2 KO Mäusen zeigte der Motivationstest eine signifikant reduzierte Anzahl an Versuchen an und damit eine deutlich verminderte Motivation dieser Tiere. Belohnung und Motivation wird neben dem Striatum stark mit den Habenulae in Verbindung gebracht (Morissette and Boye, 2008; Hikosaka, 2010). Die Habenulae haben im Hirn mutmaßlich das Potential verschiedene Regionen des Mittelhirns zu kontrollieren. Die Habenulae sind Teil des Epithalamus und sind aus der lateralen Habenula und der medialen Habenula zusammengesetzt. Beide besitzen verschiedene Funktionen und eine einzigartige anatomische Struktur. Besonders die laterale Habenulae ist vermehrt in Belohnungs-, Motivations- aber auch in Lernaktivität involviert (Andres et al., 1999; Shelton et al., 2012). Die Habenulae erhalten ihre hauptsächlichsten Afferenzen vom Septum und der Stria medullaris (Herkenham and Nauta, 1979). Ferner projizieren die Neurone der Habenulae in viele Regionen des Mittelhirns. Das Mittelhirn sendet anschließend Signale an das Vorderhirn, Dopamin in das Striatum freizulassen (Hikosaka, 2010; Baldwin et al., 2011). Die laterale Habenula empfängt dopaminerge Informationen

von der Substantia nigra und von dem ventralen Tegmentum und enthält D2 Dopamin Rezeptoren (Méndez et al., 2001). Auf der anderen Seite projiziert die laterale Habenula auf die Mittelhirnkerne des ventralen Tegmentum ventralen tegmentalen Region und der Substantia nigra (Araki et al., 1988). Daher wird vermutet, dass die laterale Habenula eine wichtige Rolle in der Kontrolle des nigrostriatalen und mesocortikolimbischen dopaminergen Systems spielt. Störungen in den Habenulae können somit einen Einfluss auf das Motivations- und Belohnungsverhalten zeigen (Méndez et al., 2001). Läsionen der lateralen Habenula führen zu einer Erhöhung der Dopaminausschüttung in den Nucleus accumbens, in das Striatum, in den Frontalcortex oder dem Olfactory tubercle. Daraus ist zu schließen, dass die laterale Habenula einen starken inhibitorischen Einfluss auf die dopaminergen Neurone des Mittelhirns hat (Nishikawa et al., 1986; Lisoprawski et al., 1980).

Wie bereits weiter oben beschrieben weisen die NECAB2 KO Mäuse ein signifikant beeinträchtigt Motivationsverhalten auf. Interessanterweise wird NECAB2 nicht nur im Striatum, sondern auch stark in den Habenulae exprimiert (Abbildung 5.1). Es ist daher anzunehmen, dass NECAB2 wie im Striatum auch in den Habenulae eine wichtige Rolle im dopaminergen System spielt. Da bei den NECAB2 KO Mäusen eine tendenzielle Herunterregulierung des $A_{2A}R$ und des mGluR5 gefunden wurde, liegt die Vermutung nahe, dass auch $A_{2A}R$ und mGluR5 bei der Motivation und der Belohnung eine Rolle spielen. In der Literatur gibt es zwar keine Hinweise auf eine Expression der beiden Rezeptoren in den Habenulae, dennoch haben folgende Publikationen einen Einfluss der Rezeptoren auf das Motivationsverhalten im Striatum gezeigt. Experimente mit einerseits MPEP, einem Antagonisten von mGluR5, und andererseits mit mGluR5 KO Mäusen zeigten ebenfalls ein vermindertes Motivationsverhalten (Chiamulera et al., 2001; Popik and Wróbel, 2002). Injektionen des $A_{2A}R$ Agonisten CGS21680 zeigten hingegen ähnliche Effekte wie bei einer Gabe des Dopamin D2 Antagonisten (Mingote et al., 2008; Font et al., 2008). Experimente mit Mäusen, die mit Dopamin D2 Antagonisten behandelt wurden, zeigen dabei im Vergleich zu den Kontrollmäusen, ein beeinträchtigt Motivationsverhalten (Rusk and Cooper, 1994; Rolls et al., 1974; Fibiger et al., 1976; Salamone, 1986). Weiter konnte gezeigt werden, dass Antagonisten des $A_{2A}R$ die Effekte eines Dopamin D2 Rezeptor Antagonisten umkehren können (Farrar et al., 2006). Die Herunterregulierung des $A_{2A}R$ und des mGluR5, bedingt durch den

NECAB2 KO, könnte demnach eine unterschiedliche Funktion in der sensorischen Reizverarbeitung und der Motivation spielen. Das könnte den Widerspruch erklären, dass zum einen ein eventuell erhöhter Dopaminspiegel beim Fehlen von NECAB2 im Falle des Präpulsinhibitionstestes vorliegt und zum anderen ein Dopaminmangel wie im Falle des *Progressive ratio schedules* Tests. Eine verminderte Motivation wird häufig mit einem Dopaminmangel in Verbindung gebracht. Zusammenfassend lässt sich insofern sagen, dass es bei einem Fehlen von NECAB2 vermutlich zu einer Störung der Inhibition auf die dopaminergen Neuronen kommt. Dadurch tritt in Folge ein derreguliertes Dopaminsignalling sowohl in den Habenulae als auch im Striatum auf. Dies bewirkt demnach vermutlich eine verminderte sensorische Reizverarbeitung sowie eine verminderte Motivation. Insofern müssten hier noch Experimente hinsichtlich der Expression der Dopaminrezeptoren angeschlossen werden, um herauszufinden, ob und wo ein Dopaminüberschuss oder Dopaminmangel in den NECAB2 KO Mäusen vorliegt.

6.5 Physiologische Rolle von NECAB2: Ein Modell

Basierend auf den generierten Ergebnissen lässt sich eine mögliche physiologische Rolle für NECAB2 anhand eines Modells erklären (Abbildung 6.1). Unter unaktivierten basalen Bedingungen interagiert die CC1 Domäne von NECAB2 mit mGluR5 und A_{2A}R. Dabei erhöht NECAB2 die Kupplungseffizienz von A_{2A}R und mGluR5 zur Signaltransduktionsmaschinerie ohne dabei die Zelloberflächenexpression der Rezeptoren zu verändern. Während es in der Präsynapse im aktivierten Zustand zur Aktivierung spannungsgesteuerter Calciumkanäle kommt, werden in der Postsynapse die NMDA-Rezeptoren aktiviert. Die Aktivierung bedingt einen direkten Ca²⁺-Einstrom in die Zelle. Ein indirekter Ca²⁺-Einstrom wird durch die Aktivierung des mGluR5 durch Glutamat begünstigt. Die Signalkaskade wird angeschaltet, sodass infolgedessen der IP3 Rezeptor aktiviert und Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol ausgeschüttet wird.

Durch die Aktivierung des A_{2A}Rs wird die Adenylatzyklase aktiviert, cAMP aus ATP synthetisiert und PKA stimuliert. NECAB2 dissoziiert vom NECAB2/mGluR5 und NECAB2/A_{2A}R Komplex und homodimerisiert aufgrund des Ca²⁺ Einstroms. Als aktives Dimer ist NECAB2 vermutlich dann für die Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich. Die Hypothese beruht jedoch nur auf bereits vorher publizierten Daten eines bakteriellen ABM Homologs von NECAB2. Auch wenn im

Rahmen dieser Arbeit keine Hinweise zur enzymatischen Funktion von NECAB2 gefunden werden konnten, war es hingegen möglich, eine potentiell wichtige Rolle von NECAB2 in der sensorischen Reizverarbeitung und der Motivation zu ermitteln. Dabei deuten die durchgeführten Verhaltensexperimente ebenfalls an, dass NECAB2 einen Einfluss auf das dopaminerge System haben könnte (vgl. Kapitel 6.4).

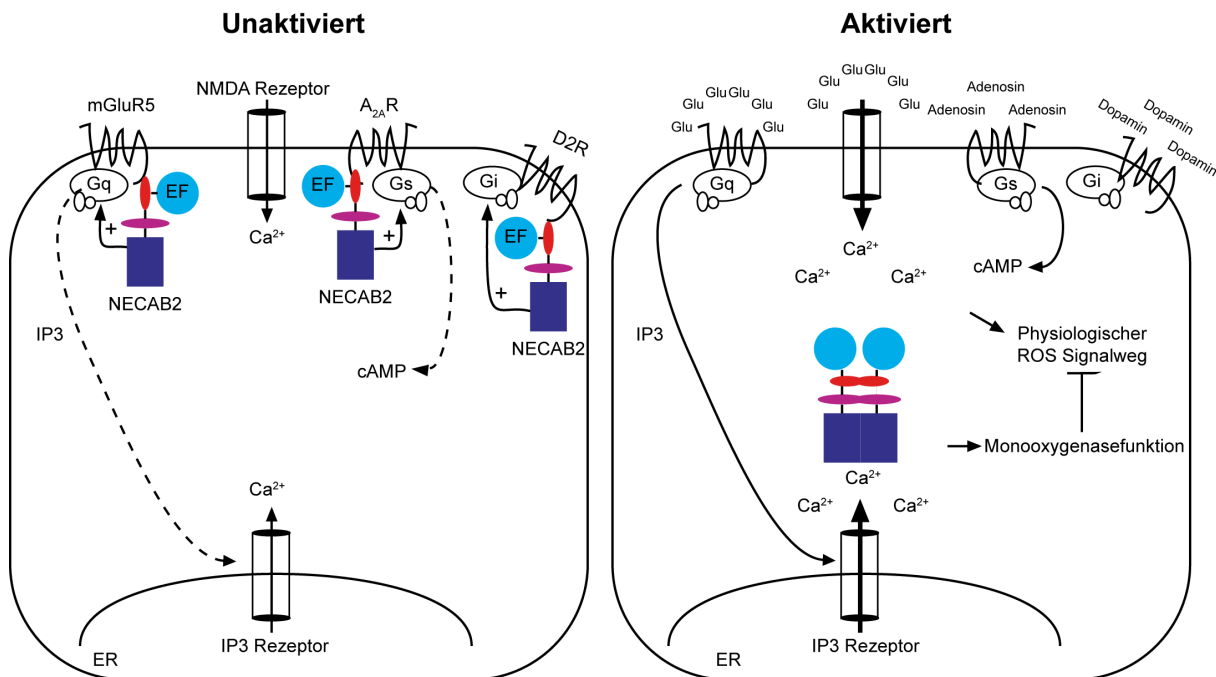


Abbildung 6.1: Modell für die physiologische Rolle von NECAB2.

Eine mögliche Interaktion von NECAB2 mit dem Dopamin D2 Rezeptor (D2R) ist ebenfalls in Abbildung 6.1 dargestellt. Aufgrund der publizierten Interaktion zwischen A_{2A}R und D2R und einem gefundenen A_{2A}R/D2R/mGluR5 Komplex anderer Gruppen ist anzunehmen, dass NECAB2 möglicherweise auch mit D2R interagiert oder als eine Art verbindendes Protein alle drei Rezeptoren zusammenhält. Wird NECAB2 nicht exprimiert, kommt es zu einer Herunterregulierung von A_{2A}R und mGluR5. Das bewirkt vermutlich einen Anstieg der Dopamin D2 Rezeptor Aktivierung. Infolgedessen kommt es zu einem gestörten Dopaminsignalling und einer verminderten sensorischen Reizverarbeitung und einer reduzierten Motivation. Ob es aufgrund des Fehlens von NECAB2 zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies und damit zu einem neuronalen Verlust kommt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Ebenso konnte nicht abschließend geklärt werden, inwiefern die Interaktionen von NECAB2 mit den Rezeptoren auf prä- oder postsynaptischer Seite stattfindet. NMDAR, mGluR5, A_{2A}R und D2R sind sowohl auf der prä- als auch auf

der postsynaptischen Seite lokalisiert. Normalerweise ist davon auszugehen, dass es sich um eine postsynaptische Aktivierung handelt. Da jedoch in dieser Arbeit eine primär präsynaptische Lokalisation von NECAB2 gefunden wurde, ist nicht offensichtlich, welche Rolle NECAB2 auf der präsynaptischen Seite spielen könnte. Möglicherweise hat NECAB2 aber auch eine Funktion auf der prä- und postsynaptischen Seite. NECAB2 könnte aufgrund der verminderten sensorischen Reizverarbeitung und der reduzierten Motivation in den NECAB2 KO Mäusen eine Rolle bei den neuronalen Erkrankungen Schizophrenie oder Chorea Huntington spielen. Der Präpulsinhibitionstest sowie der *progressive ratio schedule* sind sowohl bei Schizophrenie- als auch bei Chorea Huntington Patienten bzw. Mausmodellen beeinträchtigt (Swerdlow et al., 1995; Oakeshott et al., 2012; Cilia et al., 2001; Parwani et al., 2000). Ferner ist bei diesen Patienten ein gestörter Dopaminhaushalt gefunden worden (Chen et al., 2010; Hess et al., 1987).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NECAB2 eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit den Rezeptoren mGluR5 und A_{2A}R und vermutlich auch bei der Interaktion mit dem Dopamin D2 Rezeptor spielt. Ferner hat das Fehlen von NECAB2 einen erheblichen Einfluss auf die sensorische Reizverarbeitung und die Motivation. Der genaue Zusammenhang zwischen den genannten Rezeptoren und NECAB2 sowie die enzymatische Funktion der ABM Domäne von NECAB2 müssen in weiterführenden Experimenten aufgeklärt werden.

7. Zusammenfassung

NECAB2 (**N**eural **C**alcium-**B**inding protein 2) gehört zur NECAB Familie (NECAB1-3) und ist ein neuronales Protein mit 389 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 43 kDa. Im Hirn wird es vorwiegend im Striatum und in der CA1 und CA2 Region des Hippocampus exprimiert. NECAB2 besteht aus zwei EF-Hand Domänen, einer *NECAB homology region* (NHR) Domäne und einer antibiotischen Monooxygenasedomäne (ABM). Strukturelle und funktionelle Analysen eines bakteriellen ABM Homologs aus *Streptomyces* ließen vermuten, dass das Protein als Dimer vorliegt und möglicherweise an der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt ist. Des Weiteren interagiert NECAB2 mit dem metabotropen Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5) und dem Adenosin Rezeptor 2A ($A_{2A}R$) und erhöht deren Rezeptoraktivitäten. Ziel dieser Arbeit war es NECAB2 näher zu charakterisieren und Hinweise zur Funktion zu bekommen. Mithilfe von immunhistochemischen Methoden konnte die Expression von NECAB2 im Striatum und in der CA2 Region, jedoch nicht in der CA1 Region des Hippocampus bestätigt werden. Ferner wurde erstmals eine starke Expression in den Habenulae gefunden. Des Weiteren konnten *Stimulated emission depletion* (STED)-mikroskopische Aufnahmen eine vorwiegend präsynaptische Expression von NECAB2 in striatalen Neuronen von E16-E18 Embryos zeigen. Sowohl Experimente mit dem eigens in dieser Arbeit aufgereinigten, rekombinanten NECAB2 Protein und mit Hirnlysaten als auch mikroskopische Experimente mit überexprimierenden NECAB2-Zelllinien zeigten eine Ca^{2+} -abhängige Dimerisierung. Um herauszufinden, welche Domäne zum einen für die Homodimerisierung und zum anderen für die Interaktion mit mGluR5 verantwortlich ist, wurden Mutanten generiert, denen entweder die Coiled-coiled 1 (CC1), die Coiled-coiled 2 (CC2) oder die ABM Domäne fehlt. Eine weitere Mutante besitzt zwei Punktmutationen (E84A-E118A) im aktiven Zentrum der EF-Hand Domäne. Die CC1 Domäne konnte sowohl als Dimerisierungsdomäne als auch als Interaktionsdomäne von mGluR5 identifiziert werden. Des Weiteren wurde der Effekt des NECAB2 KO untersucht. Dabei zeigten Proteinexpressionsanalysen in den NECAB2 KO Mäusen eine tendenzielle, aber nicht signifikante Herunterregulierung von mGluR5 und $A_{2A}R$. Verhaltensexperimente mit NECAB2 KO Mäusen konnten im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine signifikant beeinträchtigte sensorische Reizverarbeitung sowie eine signifikant verminderte Motivation aufweisen. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass NECAB2 einen Einfluss auf das dopaminerge System spielen könnte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass NECAB2 vorwiegend im Striatum exprimiert wird und striatale Funktionen zeigt. Die Interaktion mit mGluR5 erfolgt mittels der CC1 Domäne von NECAB2. Kommt es zur Aktivierung des mGluR5 und damit zum Calciumeinstrom aus dem ER, dimerisiert NECAB2 Ca^{2+} -abhängig mittels der CC1 Domäne. Beim Fehlen von NECAB2 kommt es zu einer tendenziellen Herunterregulierung von mGluR5 und $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ und damit zu einer beeinträchtigten sensorischen Reizverarbeitung und zu einer verminderten Motivation. Vor diesem Hintergrund spielt NECAB2 vermutlich eine wichtige Rolle bei der Interaktion des $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ -mGluR5-Dopamin D2R Komplexes und hat damit sowohl Einfluss auf das dopaminerge System als auch auf den cAMP Spiegel im Striatum.

8. Summary

NECAB2 (*Neuronal Calcium-binding protein 2*), a member of the NECAB family, is a neuronal protein with 389 amino acids and a molecular weight of 43 kDa. In the brain, it is mainly expressed in the striatum and in the hippocampal CA1 and CA2 area. NECAB2 consists of two EF-hand domains, one NECAB homology region (NHR) and one antibiotic monooxygenase domain (ABM). Structural and functional analyses of a bacterial homolog from *Streptomyces* indicate that the protein forms a dimer and is likely involved in detoxification of reactive oxygen species. Furthermore, NECAB2 interacts with metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) and adenosine receptor 2A (A_{2A}R) thereby increasing receptor signaling. The aim of this study was to more precisely characterize the function of NECAB2. Immunohistochemical studies revealed a strong expression of NECAB2 in the striatum and in the hippocampal CA2 area. Previous studies, indicating expression of this protein in the CA1 area, could not be confirmed. Additionally, there was a strong expression of NECAB2 in the habenulae. *Stimulated emission depletion* (STED) microscope imaging showed a predominantly presynaptic expression in striatal neurons of E16-E18 embryos. Assays with recombinant NECAB2 protein, which was generated as part of this thesis, and with brain lysates showed a Ca²⁺-dependent dimerization of NECAB2. Confocal microscopy with overexpressed NECAB2 cell lines confirmed these findings. NECAB2 mutants lacking either the coiled-coiled 1 (CC1), the coiled-coiled 2 (CC2), the ABM domain or containing two point mutations (E84A-E118A) in the active site of the EF-hand were generated to identify the domains responsible for homodimerization and the interaction with mGluR5. Furthermore, NECAB2 knockout (KO) in mice resulted in moderate, but not significant, downregulation of mGluR5 and A_{2A}R-according to protein expression analyses. In comparison to wild type animals, NECAB2 KO animals showed a significant impairment in sensorimotor gating and reduced motivation. These results lead to the hypothesis that NECAB2 might influence the dopaminergic system. In conclusion, these results demonstrate that NECAB2 is mainly expressed in the striatum, that the protein modulates striatal functions and that the CC1 domain of NECAB2 mediates the interaction with mGluR5. Activation of mGluR5 leads to calcium release from the ER and Ca²⁺-dependent dimerization of NECAB2 via its CC1 domain. In NECAB2 KO mice a downregulation of mGluR5 and A_{2A}R occur. Furthermore, the sensorimotor gating is impaired in these mice and their motivation is reduced. It is probable that NECAB2

plays an important role in the interaction of the A_{2A}R-mGluR5-Dopamine D2R complex. For this reason NECAB2 has putative influence on the dopaminergic system and on cAMP levels in the striatum.

9. Literaturverzeichnis

- Abe, T., Sugihara, H., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1992). Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J. Biol. Chem.* *267*, 13361–13368.
- Adams, M.A., and Jia, Z. (2005). Structural and biochemical evidence for an enzymatic quinone redox cycle in *Escherichia coli*: identification of a novel quinol monooxygenase. *J. Biol. Chem.* *280*, 8358–8363.
- Albin, R.L., Young, A.B., and Penney, J.B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* *12*, 366–375.
- d'Alcantara, P., Ledent, C., Swillens, S., and Schiffmann, S.N. (2001). Inactivation of adenosine A2A receptor impairs long term potentiation in the accumbens nucleus without altering basal synaptic transmission. *Neuroscience* *107*, 455–464.
- Alekseenko, A.V., Lemeshchenko, V.V., Pekun, T.G., Waseem, T.V., and Fedorovich, S.V. (2012). Glutamate-induced free radical formation in rat brain synaptosomes is not dependent on intrasynaptosomal mitochondria membrane potential. *Neurosci. Lett.* *513*, 238–242.
- Alexander, G.E., and Crutcher, M.D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* *13*, 266–271.
- Alexander, G.E., DeLong, M.R., and Strick, P.L. (1986). Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* *9*, 357–381.
- Andersen, P.H., Gingrich, J.A., Bates, M.D., Dearry, A., Falardeau, P., Senogles, S.E., and Caron, M.G. (1990). Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol. Sci.* *11*, 231–236.
- Andres, K.H., Düring, M.V., and Veh, R.W. (1999). Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *J. Comp. Neurol.* *407*, 130–150.
- Apgar, J.R., Gutwin, K.N., and Keating, A.E. (2008). Predicting helix orientation for coiled-coil dimers. *Proteins* *72*, 1048–1065.
- Araki, M., McGeer, P.L., and Kimura, H. (1988). The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. *Brain Res.* *441*, 319–330.
- Augustine, G.J., Charlton, M.P., and Smith, S.J. (1987). Calcium Action in Synaptic Transmitter Release. *Annu. Rev. Neurosci.* *10*, 633–693.
- Baldwin, P.R., Alanis, R., and Salas, R. (2011). The Role of the Habenula in Nicotine Addiction. *J. Addict. Res. Ther. Suppl* *1*.
- Beavo, J.A., Conti, M., and Heasley, R.J. (1994). Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol. Pharmacol.* *46*, 399–405.
- Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* *87*, 245–313.

- Behrens, M.M., Ali, S.S., Dao, D.N., Lucero, J., Shekhtman, G., Quick, K.L., and Dugan, L.L. (2007). Ketamine-Induced Loss of Phenotype of Fast-Spiking Interneurons Is Mediated by NADPH-Oxidase. *Science* 318, 1645–1647.
- Benfenati, F., Onofri, F., and Giovedì, S. (1999). Protein–protein interactions and protein modules in the control of neurotransmitter release. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 354, 243–257.
- Bernard, P., and Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* 226, 735–745.
- Bolte, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232.
- Bouyer, J.J., Park, D.H., Joh, T.H., and Pickel, V.M. (1984). Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. *Brain Res.* 302, 267–275.
- Bradley, A., Anastassiadis, K., Ayadi, A., Battey, J.F., Bell, C., Birling, M.-C., Bottomley, J., Brown, S.D., Bürger, A., Bult, C.J., et al. (2012). The mammalian gene function resource: the International Knockout Mouse Consortium. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 23, 580–586.
- Brennan, A.M., Won Suh, S., Joon Won, S., Narasimhan, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P.H., and Swanson, R.A. (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat. Neurosci.* 12, 857–863.
- Brennan-Minnella, A.M., Shen, Y., El-Benna, J., and Swanson, R.A. (2013a). Phosphoinositide 3-kinase couples NMDA receptors to superoxide release in excitotoxic neuronal death. *Cell Death Dis.* 4, e580.
- Brennan-Minnella, A.M., Shen, Y., El-Benna, J., and Swanson, R.A. (2013b). Phosphoinositide 3-kinase couples NMDA receptors to superoxide release in excitotoxic neuronal death. *Cell Death Dis.* 4, e580.
- Bruzzone, R., and Ressot, C. (1997). Connexins, Gap Junctions and Cell-Cell Signalling in the Nervous System. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1–6.
- Burgueño, J., Blake, D.J., Benson, M.A., Tinsley, C.L., Esapa, C.T., Canela, E.I., Penela, P., Mallol, J., Mayor, F., Lluís, C., et al. (2003). The Adenosine A2A Receptor Interacts with the Actin-binding Protein α -Actinin. *J. Biol. Chem.* 278, 37545–37552.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S.V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11, 82–88.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., and Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat. Neurosci.* 17, 1022–1030.
- Canela, L., Luján, R., Lluís, C., Burgueño, J., Mallol, J., Canela, E.I., Franco, R., and Ciruela, F. (2007). The neuronal Ca²⁺-binding protein 2 (NECAB2) interacts with the adenosine A2A receptor and modulates the cell surface expression and function of the receptor. *Mol. Cell. Neurosci.* 36, 1–12.
- Canela, L., Fernández-Dueñas, V., Albergaria, C., Watanabe, M., Lluís, C., Mallol, J., Canela, E.I., Franco, R., Luján, R., and Ciruela, F. (2009). The association of metabotropic glutamate receptor type 5 with the neuronal Ca²⁺-binding protein 2 modulates receptor function. *J. Neurochem.* 111, 555–567.
- Carlsson, A. (2001). A paradigm shift in brain research. *Science* 294, 1021–1024.

- Carlsson, A., Lindqvist, M., and Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* *180*, 1200.
- Chang, J.-F., Hall, B.E., Tanny, J.C., Moazed, D., Filman, D., and Ellenberger, T. (2003). Structure of the coiled-coil dimerization motif of Sir4 and its interaction with Sir3. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *11*, 637–649.
- Chen, H., Yoshioka, H., Kim, G.S., Jung, J.E., Okami, N., Sakata, H., Maier, C.M., Narasimhan, P., Goeders, C.E., and Chan, P.H. (2010). Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 1505–1517.
- Chiamulera, C., Epping-Jordan, M.P., Zocchi, A., Marcon, C., Cottiny, C., Tacconi, S., Corsi, M., Orzi, F., and Conquet, F. (2001). Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nat. Neurosci.* *4*, 873–874.
- Choe, E.S., Parelkar, N.K., Kim, J.Y., Cho, H.W., Kang, H.S., Mao, L., and Wang, J.Q. (2004). The protein phosphatase 1/2A inhibitor okadaic acid increases CREB and Elk-1 phosphorylation and c-fos expression in the rat striatum in vivo. *J. Neurochem.* *89*, 383–390.
- Choi, D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* *1*, 623–634.
- Cilia, J., Piper, D.C., Upton, N., and Hagan, J.J. (2001). Clozapine enhances breakpoint in common marmosets responding on a progressive ratio schedule. *Psychopharmacology (Berl.)* *155*, 135–143.
- Ciruela, F., Burgueño, J., Casadó, V., Canals, M., Marcellino, D., Goldberg, S.R., Bader, M., Fuxe, K., Agnati, L.F., Lluís, C., et al. (2004). Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Anal. Chem.* *76*, 5354–5363.
- Ciruela, F., Casadó, V., Rodrigues, R.J., Luján, R., Burgueño, J., Canals, M., Borycz, J., Rebola, N., Goldberg, S.R., Mallol, J., et al. (2006a). Presynaptic Control of Striatal Glutamatergic Neurotransmission by Adenosine A1–A2A Receptor Heteromers. *J. Neurosci.* *26*, 2080–2087.
- Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Cunha, R.A., Lluís, C., and Franco, R. (2006b). Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *63*, 2427–2431.
- Ciruela, F., Albergaria, C., Soriano, A., Cuffí, L., Carbonell, L., Sánchez, S., Gandía, J., and Fernández-Dueñas, V. (2010). Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): Behind the biology of adenosine signaling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1798*, 9–20.
- Collingridge, G.L., and Lester, R.A. (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* *41*, 143–210.
- Conn, P.J., and Pin, J.-P. (1997). Pharmacology and Functions of Metabotropic Glutamate Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *37*, 205–237.
- Corbin, J.D., Soderling, T.R., and Park, C.R. (1973). Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. I. Preliminary characterization of the adipose tissue enzyme in crude extracts. *J. Biol. Chem.* *248*, 1813–1821.
- Corbin, J.D., Sugden, P.H., West, L., Flockhart, D.A., Lincoln, T.M., and McCarthy, D. (1978). Studies on the properties and mode of action of the purified regulatory subunit of bovine heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *253*, 3997–4003.

- Corsi, C., Melani, A., Bianchi, L., Pepeu, G., and Pedata, F. (1999). Effect of adenosine A2A receptor stimulation on GABA release from the striatum of young and aged rats in vivo. *Neuroreport* *10*, 3933–3937.
- Crick, F.H.C. (1952). Is α -Keratin a Coiled Coil? *Nature* *170*, 882–883.
- Cunha, G.M.A., Canas, P.M., Melo, C.S., Hockemeyer, J., Müller, C.E., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2008). Adenosine A2A receptor blockade prevents memory dysfunction caused by β -amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Exp. Neurol.* *210*, 776–781.
- Damian, M., Martin, A., Mesnier, D., Pin, J.-P., and Banères, J.-L. (2006). Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. *EMBO J.* *25*, 5693–5702.
- Dang, P.M., Fontayne, A., Hakim, J., Benna, J. El, and Périanin, A. (2001). Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *166*, 1206–1213.
- Devi, L.A. (2001). Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol. Sci.* *22*, 532–537.
- Díaz-Cabiale, Z., Vivó, M., Del Arco, A., O'Connor, W.T., Harte, M.K., Müller, C.E., Martínez, E., Popoli, P., Fuxe, K., and Ferré, S. (2002). Metabotropic glutamate mGlu5 receptor-mediated modulation of the ventral striopallidal GABA pathway in rats. Interactions with adenosine A(2A) and dopamine D(2) receptors. *Neurosci. Lett.* *324*, 154–158.
- Dittmer, S., Sahin, M., Pantlen, A., Saxena, A., Toutzaris, D., Pina, A.-L., Geerts, A., Golz, S., and Methner, A. (2008). The constitutively active orphan G-protein-coupled receptor GPR39 protects from cell death by increasing secretion of pigment epithelium-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* *283*, 7074–7081.
- Domenici, M.R., Pepponi, R., Martire, A., Tebano, M.T., Potenza, R.L., and Popoli, P. (2004). Permissive role of adenosine A2A receptors on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)-mediated effects in the striatum. *J. Neurochem.* *90*, 1276–1279.
- Eggert, S., Midthune, B., Cottrell, B., and Koo, E.H. (2009). Induced Dimerization of the Amyloid Precursor Protein Leads to Decreased Amyloid- β Protein Production. *J. Biol. Chem.* *284*, 28943–28952.
- Enjalbert, A., and Bockaert, J. (1983). Pharmacological characterization of the D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol. Pharmacol.* *23*, 576–584.
- Farrar, A.M., Pereira, M., Velasco, F., Hockemeyer, J., Müller, C.E., and Salamone, J.D. (2006). Adenosine A2A receptor antagonism reverses the effects of dopamine receptor antagonism on instrumental output and effort-related choice in the rat: implications for studies of psychomotor slowing. *Psychopharmacology (Berl.)* *191*, 579–586.
- Favatiér, F., and Polla, B.S. (2001). Tobacco-smoke-inducible human haem oxygenase-1 gene expression: role of distinct transcription factors and reactive oxygen intermediates. *Biochem. J.* *353*, 475–482.
- Ferre, S., Euler, G. von, Johansson, B., Fredholm, B.B., and Fuxe, K. (1991a). Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 7238–7241.

- Ferre, S., Euler, G. von, Johansson, B., Fredholm, B.B., and Fuxe, K. (1991b). Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 7238–7241.
- Ferre, S., O'Connor, W.T., Fuxe, K., and Ungerstedt, U. (1993). The striopallidal neuron: a main locus for adenosine-dopamine interactions in the brain. *J. Neurosci.* *13*, 5402–5406.
- Ferré, S., Popoli, P., Rimondini, R., Reggio, R., Kehr, J., and Fuxe, K. (1999). Adenosine A2A and group I metabotropic glutamate receptors synergistically modulate the binding characteristics of dopamine D2 receptors in the rat striatum. *Neuropharmacology* *38*, 129–140.
- Ferré, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B.T., Popoli, P., Burgueño, J., Gutiérrez, M.A., Casadó, V., Fuxe, K., Goldberg, S.R., Lluís, C., et al. (2002). Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: Implications for striatal neuronal function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 11940–11945.
- Ferré, S., Ciruela, F., Woods, A.S., Lluís, C., and Franco, R. (2007a). Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci.* *30*, 440–446.
- Ferré, S., Agnati, L.F., Ciruela, F., Lluís, C., Woods, A.S., Fuxe, K., and Franco, R. (2007b). Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in “local modules”: The striatal spine module. *Brain Res. Rev.* *55*, 55–67.
- Fibiger, H.C., Carter, D.A., and Phillips, A.G. (1976). Decreased intracranial self-stimulation after neuroleptics or 6-hydroxydopamine: evidence for mediation by motor deficits rather than by reduced reward. *Psychopharmacology (Berl.)* *47*, 21–27.
- Fillenz, M. (1995). Physiological release of excitatory amino acids. *Behav. Brain Res.* *71*, 51–67.
- Fink, J.S., Weaver, D.R., Rivkees, S.A., Peterfreund, R.A., Pollack, A.E., Adler, E.M., and Reppert, S.M. (1992). Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Mol. Brain Res.* *14*, 186–195.
- Flower, D.R. (1999). Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim. Biophys. Acta* *1422*, 207–234.
- Font, L., Mingote, S., Farrar, A.M., Pereira, M., Worden, L., Stopper, C., Port, R.G., and Salamone, J.D. (2008). Intra-accumbens injections of the adenosine A2A agonist CGS 21680 affect effort-related choice behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* *199*, 515–526.
- Fredholm, B.B. (1995). Purinoceptors in the Nervous System *. *Pharmacol. Toxicol.* *76*, 228–239.
- Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.-N., and Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol. Rev.* *53*, 527–552.
- Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Linden, J., and Müller, C.E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol. Rev.* *63*, 1–34.
- Freund, T.F., Powell, J.F., and Smith, A.D. (1984). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* *13*, 1189–1215.

- Fuxe, K., Guidolin, D., Agnati, L.F., and Borroto-Escuela, D.O. (2015). Dopamine heteroreceptor complexes as therapeutic targets in Parkinson's disease. *Expert Opin. Ther. Targets* 19, 377–398.
- Gerfen, C.R. (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* 15, 133–139.
- Gerfen, C.R. (2000). Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci.* 23, S64–S70.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345.
- Ginés, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E.I., Rondin, S., Lew, J.Y., Watson, S., Zoli, M., et al. (2000). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8606–8611.
- Gingrich, J.A., and Caron, M.G. (1993). Recent Advances in the Molecular Biology of Dopamine Receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 299–321.
- Girouard, H., Wang, G., Gallo, E.F., Anrather, J., Zhou, P., Pickel, V.M., and Iadecola, C. (2009). NMDA Receptor Activation Increases Free Radical Production through Nitric Oxide and NOX2. *J. Neurosci.* 29, 2545–2552.
- Goldman, P.S., and Nauta, W.J.H. (1977). An intricately patterned prefronto-caudate projection in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 171, 369–385.
- Goodman, I., Zacny, J., Osman, A., Azzaro, A., and Donovan, C. (1983). Dopaminergic nature of feeding-induced behavioral stereotypies in stressed pigeons. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18, 153–158.
- Graham, F.K. (1975). The More or Less Startling Effects of Weak Prestimulation. *Psychophysiology* 12, 238–248.
- Graybiel, A.M. (1984). Correspondence between the Dopamine islands and striosomes of the mammalian striatum. *Neuroscience* 13, 1157–1187.
- Greenfield, N.J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* 1, 2876–2890.
- Grillon, C., Ameli, R., Charney, D.S., Krystal, J., and Braff, D. (1992). Startle gating deficits occur across prepulse intensities in schizophrenic patients. *Biol. Psychiatry* 32, 939–943.
- Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2008). How and why do GPCRs dimerize? *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 234–240.
- Hall, Z.W., and Sanes, J.R. (1993). Synaptic structure and development: The neuromuscular junction. *Cell* 72, *Supplement*, 99–121.
- Hamm, H.E., and Gilchrist, A. (1996). Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 189–196.
- Hattori, T., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (1979). Fine structural analysis of the cortico-striatal pathway. *J. Comp. Neurol.* 185, 347–353.

- Hell, S.W., and Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* *19*, 780.
- Herkenham, M., and Nauta, W.J.H. (1979). Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* *187*, 19–47.
- Hermans, E., and Challiss, R.A. (2001). Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* *359*, 465–484.
- Hess, E.J., Stefan Bracha, H., Kleinman, J.E., and Creese, I. (1987). Dopamine receptor subtype imbalance in schizophrenia. *Life Sci.* *40*, 1487–1497.
- Hettinger, B.D., Lee, A., Linden, J., and Rosin, D.L. (2001). Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. *J. Comp. Neurol.* *431*, 331–346.
- Higley, M.J., and Sabatini, B.L. (2010). Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat. Neurosci.* *13*, 958–966.
- Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat. Rev. Neurosci.* *11*, 503–513.
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallol, J., et al. (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J. Biol. Chem.* *277*, 18091–18097.
- Hodos, W. (1961). Progressive Ratio as a Measure of Reward Strength. *Science* *134*, 943–944.
- Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned Glutamate Receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* *17*, 31–108.
- Hu, J.C. (2000). A guided tour in protein interaction space: Coiled coils from the yeast proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 12935–12936.
- Hu, C.-D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* *9*, 789–798.
- Ikura, M. (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 14–17.
- Ishikawa, K., Navab, M., Leitinger, N., Fogelman, A.M., and Lusic, A.J. (1997). Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J. Clin. Invest.* *100*, 1209–1216.
- Ishizaka, N., León, H.D., Laursen, J.B., Fukui, T., Wilcox, J.N., Keulenaer, G.D., Griendling, K.K., and Alexander, R.W. (1997). Angiotensin II-Induced Hypertension Increases Heme Oxygenase-1 Expression in Rat Aorta. *Circulation* *96*, 1923–1929.
- Ji, T.H., Grossmann, M., and Ji, I. (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* *273*, 17299–17302.
- Johnson, L.N. (2001). Structural basis for substrate recognition and control in protein kinases. *Ernst Scher. Res. Found. Workshop* 47–69.

Johnson, W.C. (1990). Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 7, 205–214.

Jolkkonen, J., Puurunen, K., Koistinaho, J., Kauppinen, R., Haapalinna, A., Nieminen, L., and Sivenius, J. (1999). Neuroprotection by the α 2-adrenoceptor agonist, dexmedetomidine, in rat focal cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* 372, 31–36.

Joly, C., Gomeza, J., Brabet, I., Curry, K., Bockaert, J., and Pin, J.P. (1995). Molecular, functional, and pharmacological characterization of the metabotropic glutamate receptor type 5 splice variants: comparison with mGluR1. *J. Neurosci.* 15, 3970–3981.

Joslyn, G., Richardson, D.S., White, R., and Alber, T. (1993). Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 11109–11113.

Kaupp, U.B., and Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* 82, 769–824.

Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., and Emson, P.C. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J. Neurosci.* 10, 3421–3438.

Kebabian, J.W., and Greengard, P. (1971). Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: possible role in synaptic transmission. *Science* 174, 1346–1349.

Keelan, J., Vergun, O., and Duchon, M.R. (1999). Excitotoxic mitochondrial depolarisation requires both calcium and nitric oxide in rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 520, 797–813.

Kemp, J.M., and Powell, T.P.S. (1971). The Synaptic Organization of the Caudate Nucleus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 262, 403–412.

Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H., and Phillips, D.C. (1958). A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature* 181, 662–666.

Kendrew, S.G., Hopwood, D.A., and Marsh, E.N. (1997). Identification of a monooxygenase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) involved in biosynthesis of actinorhodin: purification and characterization of the recombinant enzyme. *J. Bacteriol.* 179, 4305–4310.

Kendrew, S.G., Federici, L., Savino, C., Miele, A., Marsh, E.N., and Vallone, B. (2000). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a monooxygenase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) involved in the biosynthesis of the polyketide actinorhodin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56, 481–483.

Kobilka, B.K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 794–807.

Kovacs, Z., Schacht, T., Herrmann, A.-K., Albrecht, P., Lefkimmiatis, K., and Methner, A. (2014). Protein kinase inhibitor β enhances the constitutive activity of G-protein-coupled zinc receptor GPR39. *Biochem. J.* 462, 125–132.

Kretsinger, R.H., and Nockolds, C.E. (1973). Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.* 248, 3313–3326.

Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C.B., and Bax, A. (1995). Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat. Struct. Biol.* 2, 768–776.

- Kull, B., Ferré, S., Arslan, G., Svenningsson, P., Fuxe, K., Owman, C., and Fredholm, B.B. (1999). Reciprocal interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors. *Biochem. Pharmacol.* *58*, 1035–1045.
- Kumar, N.M., and Gilula, N.B. (1996). The Gap Junction Communication Channel. *Cell* *84*, 381–388.
- Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., and Bockaert, J. (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* *364*, 535–537.
- Lee, D.S., Tomita, S., Kirino, Y., and Suzuki, T. (2000). Regulation of X11L-dependent amyloid precursor protein metabolism by XB51, a novel X11L-binding protein. *J. Biol. Chem.* *275*, 23134–23138.
- Lemieux, M.J., Ference, C., Cherney, M.M., Wang, M., Garen, C., and James, M.N.G. (2006). The crystal structure of Rv0793, a hypothetical monooxygenase from *M. tuberculosis*. *J. Struct. Funct. Genomics* *6*, 245–257.
- Lewit-Bentley, A., and Réty, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *10*, 637–643.
- Lipton, S.A. (2004). Failures and Successes of NMDA Receptor Antagonists: Molecular Basis for the Use of Open-Channel Blockers like Memantine in the Treatment of Acute and Chronic Neurologic Insults. *NeuroRx* *1*, 101–110.
- Lisoprawski, A., Herve, D., Blanc, G., Glowinski, J., and Tassin, J.P. (1980). Selective activation of the mesocortico-frontal dopaminergic neurons induced by lesion of the habenula in the rat. *Brain Res.* *183*, 229–234.
- Liu, Y., and Montellano, P.R.O. de (2000). Reaction Intermediates and Single Turnover Rate Constants for the Oxidation of Heme by Human Heme Oxygenase-1. *J. Biol. Chem.* *275*, 5297–5307.
- Liu, F., Ma, X.-H., Ule, J., Bibb, J.A., Nishi, A., DeMaggio, A.J., Yan, Z., Nairn, A.C., and Greengard, P. (2001). Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and casein kinase 1 by metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 11062–11068.
- Liu, F., Virshup, D.M., Nairn, A.C., and Greengard, P. (2002). Mechanism of Regulation of Casein Kinase I Activity by Group I Metabotropic Glutamate Receptors. *J. Biol. Chem.* *277*, 45393–45399.
- Lopes, L.V., Cunha, R.A., and Ribeiro, J.A. (1999). Cross Talk Between A1 and A2A Adenosine Receptors in the Hippocampus and Cortex of Young Adult and Old Rats. *J. Neurophysiol.* *82*, 3196–3203.
- Lu, Q., Ye, F., Wei, Z., Wen, Z., and Zhang, M. (2012). Antiparallel coiled-coil-mediated dimerization of myosin X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 17388–17393.
- Mainen, Z.F., and Sejnowski, T.J. (1996). Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* *382*, 363–366.
- Mao, L., and Wang, J.Q. (2001). Selective activation of group I metabotropic glutamate receptors upregulates preprodynorphin, substance P, and preproenkephalin mRNA expression in rat dorsal striatum. *Synapse* *39*, 82–94.

- Mao, L., and Wang, J.Q. (2003). Group I metabotropic glutamate receptor-mediated calcium signalling and immediate early gene expression in cultured rat striatal neurons. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 741–750.
- Marala, R.B., and Mustafa, S.J. (1993). Direct evidence for the coupling of A2-adenosine receptor to stimulatory guanine nucleotide-binding-protein in bovine brain striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *266*, 294–300.
- Marino, M.J., and Conn, P. (2002). Modulation of the Basal Ganglia by Metabotropic Glutamate Receptors: Potential for Novel Therapeutics. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets Former. Curr. Drug Targets - CNS Neurol. Disord.* *1*, 239–250.
- Marino, M.J., Valenti, O., and Conn, D.P.J. (2012). Glutamate Receptors and Parkinson's Disease. *Drugs Aging* *20*, 377–397.
- Martel, M.-A., Ryan, T.J., Bell, K.F.S., Fowler, J.H., McMahon, A., Al-Mubarak, B., Komiyama, N.H., Horsburgh, K., Kind, P.C., Grant, S.G.N., et al. (2012). The subtype of GluN2 C-terminal domain determines the response to excitotoxic insults. *Neuron* *74*, 543–556.
- Marti, M., Paganini, F., Stocchi, S., Mela, F., Beani, L., Bianchi, C., and Morari, M. (2003). Plasticity of glutamatergic control of striatal acetylcholine release in experimental parkinsonism: opposite changes at group-II metabotropic and NMDA receptors. *J. Neurochem.* *84*, 792–802.
- Maruyama, K., Mikawa, T., and EBASHI, S. (1984). Detection of Calcium Binding Proteins by ⁴⁵Ca Autoradiography on Nitrocellulose Membrane after Sodium Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis. *J. Biochem. (Tokyo)* *95*, 511–519.
- Mayer, M.L., and Westbrook, G.L. (1987). The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.* *28*, 197–276.
- McDonnell, A.V., Jiang, T., Keating, A.E., and Berger, B. (2006). Paircoil2: improved prediction of coiled coils from sequence. *Bioinformatics* *22*, 356–358.
- Meador-Woodruff, J.H., Mansour, A., Healy, D.J., Kuehn, R., Zhou, Q.Y., Bunzow, J.R., Akil, H., Civelli, O., and Watson, S.J. (1991). Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *5*, 231–242.
- De Mei, C., Ramos, M., Iitaka, C., and Borrelli, E. (2009). Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* *9*, 53–58.
- Meldrum, B.S. (1993). Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *3*, 405–412.
- Méndez, P., Echevarría, E., Garcia del Caño, G., Saracíbar, G., Casis, O., and Casis, L. (2001). Chronic amphetamine administration decreases D2 dopamine receptor immunostaining in the lateral habenular nucleus. *Neurosci. Res. Commun.* *29*, 59–68.
- Minakami, R., Katsuki, F., Yamamoto, T., Nakamura, K., and Sugiyama, H. (1994). Molecular Cloning and the Functional Expression of Two Isoforms of Human Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *199*, 1136–1143.
- Mingote, S., Font, L., Farrar, A.M., Vontell, R., Worden, L.T., Stopper, C.M., Port, R.G., Sink, K.S., Bunce, J.G., Chrobak, J.J., et al. (2008). Nucleus Accumbens Adenosine A2A Receptors Regulate

- Exertion of Effort by Acting on the Ventral Striatopallidal Pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 9037–9046.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., and Caron, M.G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* *78*, 189–225.
- Mons, N., and Cooper, D.M. (1994). Adenylyl cyclase mRNA expression does not reflect the predominant Ca²⁺/calmodulin-stimulated activity in the hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* *6*, 665–671.
- Morissette, M.-C., and Boye, S.M. (2008). Electrolytic lesions of the habenula attenuate brain stimulation reward. *Behav. Brain Res.* *187*, 17–26.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* *11*, 47–60.
- M.Soloviev, M., Ciruela, F., Chan, W.-Y., and McIlhinney, R.A.J. (2000). Molecular characterisation of two structurally distinct groups of human homers, generated by extensive alternative splicing1. *J. Mol. Biol.* *295*, 1185–1200.
- Mukherjee, P.K., DeCoster, M.A., Campbell, F.Z., Davis, R.J., and Bazan, N.G. (1999). Glutamate Receptor Signaling Interplay Modulates Stress-sensitive Mitogen-activated Protein Kinases and Neuronal Cell Death. *J. Biol. Chem.* *274*, 6493–6498.
- Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* *258*, 597–603.
- Nakanishi, S. (1994). Metabotropic glutamate receptors: Synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* *13*, 1031–1037.
- Nathan, C., and Shiloh, M.U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 8841–8848.
- Newman, J.R., Wolf, E., and Kim, P.S. (2000). A computationally directed screen identifying interacting coiled coils from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 13203–13208.
- Nishi, A., Liu, F., Matsuyama, S., Hamada, M., Higashi, H., Nairn, A.C., and Greengard, P. (2003). Metabotropic mGlu5 receptors regulate adenosine A2A receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 1322–1327.
- Nishikawa, T., Fage, D., and Scatton, B. (1986). Evidence for, and nature of, the tonic inhibitory influence of habenulointerpeduncular pathways upon cerebral dopaminergic transmission in the rat. *Brain Res.* *373*, 324–336.
- Niznik, H.B., and Van Tol, H.H. (1992). Dopamine receptor genes: new tools for molecular psychiatry. *J. Psychiatry Neurosci.* *17*, 158–180.
- Oakeshott, S., Port, R., Cummins-Sutphen, J., Berger, J., Watson-Johnson, J., Ramboz, S., Paterson, N., Kwak, S., Howland, D., and Brunner, D. (2012). A mixed fixed ratio/progressive ratio procedure reveals an apathy phenotype in the BAC HD and the z_Q175 KI mouse models of Huntington's disease. *PLoS Curr.* *4*.

- O'Neill, M.J., Hicks, C.A., Ward, M.A., Cardwell, G.P., Reymann, J.-M., Allain, H., and Bentué-Ferrer, D. (1998). Dopamine D2 receptor agonists protect against ischaemia-induced hippocampal neurodegeneration in global cerebral ischaemia. *Eur. J. Pharmacol.* *352*, 37–46.
- Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* *87*, 315–424.
- Pang, Z.P., Melicoff, E., Padgett, D., Liu, Y., Teich, A.F., Dickey, B.F., Lin, W., Adachi, R., and Südhof, T.C. (2006). Synaptotagmin-2 is essential for survival and contributes to Ca²⁺ triggering of neurotransmitter release in central and neuromuscular synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 13493–13504.
- Parent, A., and Hazrati, L.-N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev.* *20*, 91–127.
- Parwani, A., Duncan, E.J., Bartlett, E., Madonick, S.H., Efferen, T.R., Rajan, R., Sanfilippo, M., Chappell, P.B., Chakravorty, S., Gonzenbach, S., et al. (2000). Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* *47*, 662–669.
- Patel, M., Day, B.J., Crapo, J.D., Fridovich, I., and McNamara, J.O. (1996). Requirement for Superoxide in Excitotoxic Cell Death. *Neuron* *16*, 345–355.
- Peavy, R.D., and Conn, P.J. (1998). Phosphorylation of Mitogen-Activated Protein Kinase in Cultured Rat Cortical Glia by Stimulation of Metabotropic Glutamate Receptors. *J. Neurochem.* *71*, 603–612.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., and Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* *14*, 149–167.
- Phillips, A.G., and Fibiger, H.C. (1973). Dopaminergic and noradrenergic substrates of positive reinforcement: differential effects of d- and l-amphetamine. *Science* *179*, 575–577.
- Pin, J.-P., and Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology* *34*, 1–26.
- Pin, J.-P., Galvez, T., and Prézeau, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* *98*, 325–354.
- Pin, J.-P., Kniazeff, J., Goudet, C., Bessis, A.-S., Liu, J., Galvez, T., Acher, F., Rondard, P., and Prézeau, L. (2004). The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *96*, 335–342.
- Pisani, A., Gubellini, P., Bonsi, P., Conquet, F., Picconi, B., Centonze, D., Bernardi, G., and Calabresi, P. (2001). Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons. *Neuroscience* *106*, 579–587.
- Pizzi, M., Boroni, F., Benarese, M., Moraitis, C., Memo, M., and Spano, P. (1999). Neuroprotective effect of thyrotropin-releasing hormone against excitatory amino acid-induced cell death in hippocampal slices. *Eur. J. Pharmacol.* *370*, 133–137.
- Poisik, O.V., Mannaioni, G., Traynelis, S., Smith, Y., and Conn, P.J. (2003). Distinct Functional Roles of the Metabotropic Glutamate Receptors 1 and 5 in the Rat Globus Pallidus. *J. Neurosci.* *23*, 122–130.
- Popik, P., and Wróbel, M. (2002). Morphine conditioned reward is inhibited by MPEP, the mGluR5 antagonist. *Neuropharmacology* *43*, 1210–1217.

- Popoli, P., Betto, P., Reggio, R., and Ricciarello, G. (1995). Adenosine A2A receptor stimulation enhances striatal extracellular glutamate levels in rats. *Eur. J. Pharmacol.* *287*, 215–217.
- Popoli, P., Pèzzola, A., Torvinen, M., Reggio, R., Pintor, A., Scarchilli, L., Fuxe, K., and Ferré, S. (2001). The selective mGlu(5) receptor agonist CHPG inhibits quinpirole-induced turning in 6-hydroxydopamine-lesioned rats and modulates the binding characteristics of dopamine D(2) receptors in the rat striatum: interactions with adenosine A(2a) receptors. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *25*, 505–513.
- Potter, R.L., Stafford, P.H., and Taylor, S. (1978). Regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase I from porcine skeletal muscle: purification and proteolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* *190*, 174–180.
- Poulos, T.L. (2005). Structural biology of heme monooxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *338*, 337–345.
- Pozzi, L., Håkansson, K., Usiello, A., Borgkvist, A., Lindskog, M., Greengard, P., and Fisone, G. (2003). Opposite regulation by typical and atypical anti-psychotics of ERK1/2, CREB and Elk-1 phosphorylation in mouse dorsal striatum. *J. Neurochem.* *86*, 451–459.
- Rankin, M.L., Marinec, P.S., Cabrera, D.M., Wang, Z., Jose, P.A., and Sibley, D.R. (2006). The D1 dopamine receptor is constitutively phosphorylated by G protein-coupled receptor kinase 4. *Mol. Pharmacol.* *69*, 759–769.
- Rebola, N., Lujan, R., Cunha, R.A., and Mulle, C. (2008). Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron* *57*, 121–134.
- Reyes, R.C., Brennan, A.M., Shen, Y., Baldwin, Y., and Swanson, R.A. (2012). Activation of Neuronal NMDA Receptors Induces Superoxide-Mediated Oxidative Stress in Neighboring Neurons and Astrocytes. *J. Neurosci.* *32*, 12973–12978.
- Richardson, N.R., and Roberts, D.C.S. (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J. Neurosci. Methods* *66*, 1–11.
- Rimondini, R., Fuxe, K., and Ferré, S. (1999). Multiple intramembrane receptor-receptor interactions in the regulation of striatal dopamine D2 receptors. *Neuroreport* *10*, 2051–2054.
- Rodrigues, R.J., Alfaro, T.M., Rebola, N., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2005). Co-localization and functional interaction between adenosine A2A and metabotropic group 5 receptors in glutamatergic nerve terminals of the rat striatum. *J. Neurochem.* *92*, 433–441.
- Roerig, B., and Feller, M.B. (2000). Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits. *Brain Res. Rev.* *32*, 86–114.
- Rolls, E.T., Rolls, B.J., Kelly, P.H., Shaw, S.G., Wood, R.J., and Dale, R. (1974). The relative attenuation of self-stimulation, eating and drinking produced by dopamine-receptor blockade. *Psychopharmacologia* *38*, 219–230.
- Romano, C., Smout, S., Miller, J.K., and O'Malley, K.L. (2002). Developmental regulation of metabotropic glutamate receptor 5b protein in rodent brain. *Neuroscience* *111*, 693–698.
- Rondou, P., Haegeman, G., and Van Craenenbroeck, K. (2010). The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *67*, 1971–1986.

- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J. Biol. Chem.* *275*, 20829–20836.
- Rosin, D.L., Robeva, A., Woodard, R.L., Guyenet, P.G., and Linden, J. (1998). Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* *401*, 163–186.
- Roth, B.L., Sheffler, D.J., and Kroeze, W.K. (2004). Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat. Rev. Drug Discov.* *3*, 353–359.
- Rothstein, J.D. (2009). Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* *65 Suppl 1*, S3–S9.
- Rusk, I.N., and Cooper, S.J. (1994). Parametric studies of selective D1 or D2 antagonists: effects on appetitive and feeding behaviour. *Behav. Pharmacol.* *5*, 615–622.
- Ryter, S.W., Alam, J., and Choi, A.M.K. (2006). Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol. Rev.* *86*, 583–650.
- Sadikot, A.F., Parent, A., Smith, Y., and Bolam, J.P. (1992). Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey: A light and electron microscopic study of the thalamostriatal projection in relation to striatal heterogeneity. *J. Comp. Neurol.* *320*, 228–242.
- Sahin, M., Saxena, A., Joost, P., Lewerenz, J., and Methner, A. (2006). Induction of Bcl-2 by functional regulation of G-protein coupled receptors protects from oxidative glutamate toxicity by increasing glutathione. *Free Radic. Res.* *40*, 1113–1123.
- Salamone, J.D. (1986). Different effects of haloperidol and extinction on instrumental behaviours. *Psychopharmacology (Berl.)* *88*, 18–23.
- Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W.-Y., Hafner, M., MacDonald, J.F., and Tymianski, M. (1999). Specific Coupling of NMDA Receptor Activation to Nitric Oxide Neurotoxicity by PSD-95 Protein. *Science* *284*, 1845–1848.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* *199*, 223–231.
- Schiffmann, S.N., Libert, F., Vassart, G., and Vanderhaeghen, J.-J. (1991). Distribution of adenosine A2 receptor mRNA in the human brain. *Neurosci. Lett.* *130*, 177–181.
- Schiffmann, S.N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R.A., and Ferré, S. (2007). Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog. Neurobiol.* *83*, 277–292.
- Schneggenburger, R., and Neher, E. (2000). Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* *406*, 889–893.
- Sciara, G., Kendrew, S.G., Miele, A.E., Marsh, N.G., Federici, L., Malatesta, F., Schimperna, G., Savino, C., and Vallone, B. (2003). The structure of ActVA-Orf6, a novel type of monooxygenase involved in actinorhodin biosynthesis. *EMBO J.* *22*, 205–215.
- Sebastião, A.M., and Ribeiro, J.A. (2000). Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.* *21*, 341–346.

- Seeman, P. (2006). Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia. *Expert Opin. Ther. Targets* 10, 515–531.
- Shelton, L., Becerra, L., and Borsook, D. (2012). Unmasking the mysteries of the habenula in pain and analgesia. *Prog. Neurobiol.* 96, 208–219.
- Sheng, M., and Kim, E. (2000). The Shank family of scaffold proteins. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 11), 1851–1856.
- Sibley, D.R. (1999). New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 313–341.
- Sibley, D.R., and Monsma, F.J. (1992). Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 61–69.
- Skarnes, W.C., Rosen, B., West, A.P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A.O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., et al. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474, 337–342.
- Snyder, S.H., Taylor, K.M., Coyle, J.T., and Meyerhoff, J.L. (1970). The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am. J. Psychiatry* 127, 199–207.
- Sokoloff, P., Diaz, J., Le Foll, B., Guillin, O., Leriche, L., Bezard, E., and Gross, C. (2006). The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5, 25–43.
- Somogyi, P., Bolam, J.P., and Smith, A.D. (1981). Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the golgi-peroxidase transport-degeneration procedure. *J. Comp. Neurol.* 195, 567–584.
- Sorce, S., and Krause, K.-H. (2009). NOX Enzymes in the Central Nervous System: From Signaling to Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2481–2504.
- Stout, A.K., Raphael, H.M., Kanterewicz, B.I., Klann, E., and Reynolds, I.J. (1998). Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat. Neurosci.* 1, 366–373.
- Strauss, H.M., and Keller, S. (2008). Pharmacological interference with protein-protein interactions mediated by coiled-coil motifs. *Handb. Exp. Pharmacol.* 461–482.
- Südhof, T.C. (2012a). The presynaptic active zone. *Neuron* 75, 11–25.
- Südhof, T.C. (2012b). Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011353.
- Südhof, T.C., and Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Sugita, S., and Südhof, T.C. (2000). Specificity of Ca²⁺-dependent protein interactions mediated by the C2A domains of synaptotagmins. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 2940–2949.
- Sugita, S., Ho, A., and Südhof, T.C. (2002). NECABs: a family of neuronal Ca(2+)-binding proteins with an unusual domain structure and a restricted expression pattern. *Neuroscience* 112, 51–63.

- Sumioka, A., Imoto, S., Martins, R.N., Kirino, Y., and Suzuki, T. (2003). XB51 isoforms mediate Alzheimer's β -amyloid peptide production by X11L (X11-like protein)-dependent and -independent mechanisms. *Biochem. J.* *374*, 261.
- Svenningsson, P., Nomikos, G.G., and Fredholm, B.B. (1995). Biphasic changes in locomotor behavior and in expression of mRNA for NGFI-A and NGFI-B in rat striatum following acute caffeine administration. *J. Neurosci.* *15*, 7612–7624.
- Swerdlow, N.R., Paulsen, J., Braff, D.L., Butters, N., Geyer, M.A., and Swenson, M.R. (1995). Impaired prepulse inhibition of acoustic and tactile startle response in patients with Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *58*, 192–200.
- Takei, N., Skoglösa, Y., and Lindholm, D. (1998). Neurotrophic and neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (pACAP) on mesencephalic dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Res.* *54*, 698–706.
- Tenhunen, R., Marver, H.S., and Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *61*, 748–755.
- Tepper, J.M., and Bolam, J.P. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* *14*, 685–692.
- Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* *5*, 30–34.
- Testa, C.M., Standaert, D.G., Landwehrmeyer, G.B., Penney, J.B., and Young, A.B. (1995). Differential expression of mGluR5 metabotropic glutamate receptor mRNA by rat striatal neurons. *J. Comp. Neurol.* *354*, 241–252.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., and Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* *28*, 1–8.
- Tu, J.C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M., et al. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 Complexes by the Shank Family of Postsynaptic Density Proteins. *Neuron* *23*, 583–592.
- Uchigashima, M., Narushima, M., Fukaya, M., Katona, I., Kano, M., and Watanabe, M. (2007). Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 3663–3676.
- Usiello, A., Baik, J.-H., Rougé-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P.V., and Borrelli, E. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* *408*, 199–203.
- Valenti, O., Conn, P.J., and Marino, M.J. (2002). Distinct physiological roles of the Gq-coupled metabotropic glutamate receptors co-expressed in the same neuronal populations. *J. Cell. Physiol.* *191*, 125–137.
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Fisone, G., and Girault, J.-A. (2009). Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* *32*, 538–547.
- Vallone, D., Picetti, R., and Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *24*, 125–132.

- Vrinten, D.H., and Hamers, F.F.T. (2003). "CatWalk" automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain* 102, 203–209.
- Wang, G., and Maier, R.J. (2004). An NADPH Quinone Reductase of *Helicobacter pylori* Plays an Important Role in Oxidative Stress Resistance and Host Colonization. *Infect. Immun.* 72, 1391–1396.
- Wilson, C.J., and Groves, P.M. (1980). Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: A study employing intracellular injection of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 194, 599–615.
- Wirkner, K., Gerevich, Z., Krause, T., Günther, A., Köles, L., Schneider, D., Nörenberg, W., and Illes, P. (2004). Adenosine A2A receptor-induced inhibition of NMDA and GABAA receptor-mediated synaptic currents in a subpopulation of rat striatal neurons. *Neuropharmacology* 46, 994–1007.
- Wisden, W., and Seeburg, P.H. (1993). Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 291–298.
- Wise, R.A. (1985). The anhedonia hypothesis: Mark III. *Behav. Brain Sci.* 8, 178–186.
- Wolf, L.V., Yang, Y., Wang, J., Xie, Q., Braunger, B., Tamm, E.R., Zavadil, J., and Cvekl, A. (2009). Identification of Pax6-Dependent Gene Regulatory Networks in the Mouse Lens. *PLoS ONE* 4, e4159.
- Yang, M., Horii, K., Herr, A.B., and Kirley, T.L. (2006). Calcium-dependent Dimerization of Human Soluble Calcium Activated Nucleotidase CHARACTERIZATION OF THE DIMER INTERFACE. *J. Biol. Chem.* 281, 28307–28317.
- Yasui, M., and Kawasaki, K. (1995). CCKB receptor activation protects CA1 neurons from ischemia-induced dysfunction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 191, 99–102.
- Yoo, J.C., Chang, J.R., Kim, S.H., Jang, S.K., Wolgemuth, D.J., Kim, K., and Rhee, K. (2004). NIP1/XB51/NECAB3 is a potential substrate of Nek2, suggesting specific roles of Nek2 in Golgi. *Exp. Cell Res.* 292, 393–402.
- Yung, K.K.L., Bolam, J.P., Smith, A.D., Hersch, S.M., Ciliax, B.J., and Levey, A.I. (1995). Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: Light and electron microscopy. *Neuroscience* 65, 709–730.
- Zang, T. (2008). Neurologin Function in Excitatory and Inhibitory Synapses. Dissertation. URL: <https://repositories.tdl.org/utswmed-ir/bitstream/handle/2152.5/557/zangtong.pdf?sequence=3>. [Stand: 19.07.2015, 15:59].
- Zhang, M.-D., Tortoriello, G., Hsueh, B., Tomer, R., Ye, L., Mitsios, N., Borgius, L., Grant, G., Kiehn, O., Watanabe, M., et al. (2014). Neuronal calcium-binding proteins 1/2 localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E1149–E1158.
- Zhu, L., Tamvakopoulos, C., Xie, D., Dragovic, J., Shen, X., Fenyk-Melody, J.E., Schmidt, K., Bagchi, A., Griffin, P.R., Thornberry, N.A., et al. (2003). The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *J. Biol. Chem.* 278, 22418–22423.
- Zimmermann, B., Girard, F., Mészàr, Z., and Celio, M.R. (2013). Expression of the calcium binding proteins Necab-1, -2 and -3 in the adult mouse hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res.* 1528, 1–7.

Anhang

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Verwendete Enzyme	24
Tabelle 3.2	Verwendete Kits	24
Tabelle 3.3	Verwendete Primärantikörper	25
Tabelle 3.4	Verwendete Sekundärantikörper	26
Tabelle 3.5	Verwendete Puffer	26
Tabelle 3.6	Verwendete Genotypisierungsprimer	29
Tabelle 3.7	Verwendete Plasmide	29
Tabelle 3.8	Verwendete Klonierungsprimer	31
Tabelle 3.9	Verwendete Geräte	31
Tabelle 4.1	Lysepuffer (DNA-Isolierung)	34
Tabelle 4.2	Reaktionsansatz für cDNA-Synthese	35
Tabelle 4.3	PCR-Programm für cDNA-Synthese	36
Tabelle 4.4	Reaktionsansatz für qPCR	36
Tabelle 4.5	Reaktionsansatz für LR-Reaktion	40
Tabelle 4.6	Lysepuffer für Testexpression	44
Tabelle 4.7	Lysepuffer	44
Tabelle 4.8	Puffer für Testsolubilisierung	45
Tabelle 4.9	Puffer für den Test der Aufreinigung der „Inclusion bodies“	46
Tabelle 4.10	Waschpuffer für die Aufreinigung der „Inclusion bodies“	46
Tabelle 4.11	Puffer für die Solubilisierung und Aufreinigung von His-NECAB2	47
Tabelle 4.12	Bindungs- und Elutionspuffer	48
Tabelle 4.13	Renaturierungspuffer	48
Tabelle 4.14	Verwendete Puffer für die Immunzytochemie	53
Tabelle 4.15	Verwendete Puffer für die Immunhistochemie	53
Tabelle 4.16	Puffer für die Synaptosomenpräparation	55
Tabelle 4.17	Gradientenpuffer	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer striatalen Synapse einer Wildtyp-Maus (aufgenommen von Andrea Hellwig, Heidelberg).	4
Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des G α -vermittelten GPCR Signalweges.	8
Abbildung 1.3: Domänenstruktur von NECAB2.	18
Abbildung 5.1: NECAB2 wird ausschließlich im Hirn und vorwiegend im Striatum exprimiert.	62
Abbildung 5.2: Keine kompensatorische Regulation von NECAB2 in den NECAB2 $-/-$ Mäusen durch NECAB1 oder NECAB3.	63
Abbildung 5.3: NECAB2 ist vorwiegend präsynaptisch in striatalen Neuronen exprimiert. ..	66
Abbildung 5.4: Rekombinantes humanes NECAB2 wird in unlöslichen „Inclusion bodies“ exprimiert.	67
Abbildung 5.5: Aufreinigung von His-NECAB2 mittels Nickelaffinitätschromatographie.	69
Abbildung 5.6: Renaturiertes NECAB2 zeigt keine NADPH Aktivität.	71
Abbildung 5.7: Rekombinantes His-NECAB2 dimerisiert.	72
Abbildung 5.8: Nachweis der Homodimerisierung von NECAB2.	74
Abbildung 5.9: Ca ²⁺ induziert Dimerisierung von NECAB2.	75
Abbildung 5.10: (A) NECAB2 interagiert mit dem metabotropischen Glutamat Rezeptor 5 (mGluR5).	77
Abbildung 5.11: Dimerisierung wird von der <i>coiled-coiled 1</i> Domäne vermittelt.	79
Abbildung 5.12: Interaktion von NECAB2 mit mGluR5 wird durch die coiled-coiled 1 Domäne vermittelt.	81
Abbildung 5.13: Induzierte, gezwungene Dimerisierung bestätigt CC1 als Dimerisierungsdomäne.	85
Abbildung 5.14: Kein signifikanter Expressionsunterschied von mGluR5 und A _{2A} R in den NECAB2 $-/-$ Hirnlysaten und Synaptosomen.	86
Abbildung 5.15: Kein signifikanter Expressionsunterschied der prä- und postsynaptischen Marker in den NECAB2 $-/-$ Synaptosomen.	88
Abbildung 5.16: Kein signifikanter Expressionsunterschied von NECAB2 in Hirnlysaten und Synaptosomen von <i>phox47</i> $-/-$ Mäusen.	89
Abbildung 5.17: Signifikante Beeinträchtigung der sensorischen Reizverarbeitung und eine signifikant reduzierte Motivation in den NECAB2 KO Mäusen.	91
Abbildung 6.1: Modell für die physiologische Rolle von NECAB2	109

KOMP PCR Design

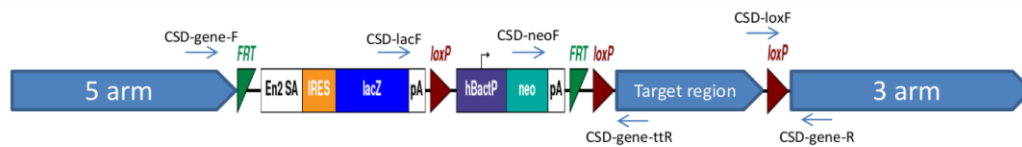
Mouse PCR Protocol (version 1)
 Strain ID: Necab2^{tm1a(KOMP)Wtsi}
 Design ID: 42356
 Project ID: CSD34541
 Selection Cassette: L1L2_Bact.P



Suggested DNA Prep: DNeasy[®]Tissue Kit

Reagent	1X (μ L)	Cycling Parameters	
		Temperature $^{\circ}$ C	Time
water (biological grade)	10.725	94	5 min
betain 5M (Sigma)	6.5	94	15 sec
DMSO (Sigma)	0.325	65	30 sec
10X buffer w/o MgCl ₂ (AB)	2.5	72	40 sec
25 mM MgCl ₂ (AB)	1.75	94	15 sec
10 mM dNTPs (Invitrogen)	0.5	55	30 sec
primers (20 μ M each)	0.5	72	40 sec
Taq 5U/ μ L (AmpliTaQ, AB)	0.2	72	5 min
total cocktail	23	4	finished
template	2		
reaction volume	25		

Primer Strategy



Cassette Primers

CSD-lacF: GCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTC
 CSD-neoF: GGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCG
 CSD-loxF: GAGATGGCGAACGCAATTAATG

Gene Specific Primers

CSD-Necab2-R: GTGTGTGTCTTTGTGTGTGTAGGGG
 CSD-Necab2-ttR: AAACAATAACCCTTCCCCTCCTGGG
 CSD-Necab2-F: GTGAGTTGCAGGACACAGAGAAACC

Genotype	Forward Primer	Reverse Primer	Amplicon size (bp)
Floxed	CSD-loxF	CSD-Necab2-R	327
PreCre	CSD-neoF	CSD-Necab2-ttR	586
PostCre	CSD-lacF	CSD-Necab2-R	674
Wildtype	CSD-Necab2-F	CSD-Necab2-ttR	567
PostFlp	CSD-Necab2-F	CSD-Necab2-ttR	690
PostFlp & Cre	CSD-Necab2-F	CSD-Necab2-R	778