

Die Rolle von LRP1 in der Funktion des NMDA-Rezeptors

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Von

Wladislaw Maier

geboren am 1. Oktober 1981
in Kant

Mainz im Juni 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 15.8.2013

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Die Familie der LDL-Rezeptoren	1
1.1.1	Struktur und Funktionen des Lipoprotein Rezeptor-related Protein 1 (LRP1)	3
1.1.2	Die Rolle des LRP1 in der neuronalen Signaltransduktion	5
1.2	Glutamat-Rezeptoren	7
1.2.1	Ionotrope Glutamat-Rezeptoren.....	7
1.2.2	Aufbau und Signaltransduktion des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors	7
1.2.3	Regulation der NMDA-Rezeptoren durch die Phosphorylierung.....	9
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2	Material	15
2.1	Chemikalien.....	15
2.2	Antibiotika	16
2.3	Geräte und Laborhilfsmittel	16
2.4	Verbrauchsmaterialien.....	17
3	Methoden	19
3.1	Primäre Zellkultur	19
3.1.1	Präparation und Kultivierung primärer kortikaler Neurone	19
3.1.2	Bestimmung der Zellvitalität im AlamarBlue Assay	20
3.1.3	Behandlung primärer Neurone mit Cycloheximid.....	21
3.2	Proteinbiochemische Methoden	21
3.2.1	Zellyse und Proteinbestimmung.....	21
3.2.2	Herstellung der Hirnlysate.....	22
3.2.3	Dephosphorylierung der Proteine mit alkalischer Phosphatase	22
3.2.4	Oberflächenbiotinylierung von Neuronen.....	23
3.2.5	Internalisierungsexperimente mit spaltbarem Sulfo-NHS-SS-Biotin.....	24
3.2.6	Co-Immunopräzipitation	25
3.2.7	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
3.2.8	Western Blot	27
3.2.9	Immunologischer Nachweis der Zielproteine	28
3.2.10	Densitometrische Auswertung der Westen Blots und Statistik.....	28
3.3	Verhaltensexperimente.....	28
3.3.1	Open Field Paradigma	28

3.3.2	Morris Water Maze.....	29
3.3.3	Monitoring des Verhaltens	29
3.4	Antikörper	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Primäre kortikale LRP1 Δ NPxY2 Neurone zeigen keine Abweichungen in der Zellvitalität oder in der Expression der synaptischen Marker	33
4.2	NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1/NR2B zeigen höhere Expressionsraten an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone	35
4.3	LRP1 und NR1/NR2B-Rezeptoruntereinheiten demonstrieren verminderte Internalisierungsraten in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen.....	37
4.4	Die NR2B-Rezeptoruntereinheit weist ein verändertes Phosphorylierungsmuster in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen auf.....	43
4.4.1	Die Internalisierungssignale der NR2B-Rezeptoruntereinheit sind in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen verstärkt aktiviert.....	43
4.4.2	Die Expression und die Regulierung der CKII und Fyn Kinasen demonstrieren in den LRP1 Δ NPxY2-Neuronen keine Abweichungen	45
4.5	LRP1 bindet stärker an die NR2B-Rezeptoruntereinheit in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen	46
4.6	Die Interaktion zwischen LRP1 und NR2B wird durch die Phosphorylierung reguliert	47
4.7	LRP1 Δ NPxY2 Tiere sind hyperaktiv und haben Defizite im direkten und umgekehrten räumlichen Lernvermögen.....	49
4.7.1	Die knock-in Mutation in das NPxY2 Motiv von LRP1 führt zu einer verminderten Aktivierung der Erk1/2 und GSK3 α/β Kinasen	51
5	Diskussion.....	54
6	Ausblick.....	65
7	Zusammenfassung.....	67
8	Literaturverzeichnis	67
9	Anhang.....	77
9.1	Eidesstattliche Erklärung	77

1 Einleitung

1.1 Die Familie der LDL-Rezeptoren

Lipoproteinrezeptoren sind transmembrane Zelloberflächenproteine, die ihre Liganden spezifisch erkennen, binden und mittels Endozytose in die Zelle transportieren können.

Die Proteinfamilie der LDL-Rezeptoren (*low density lipoprotein*, LDL) umfasst sieben strukturverwandte Kernmitglieder, die in unterschiedlichen Gewebearten und Organen exprimiert werden und eine Vielfalt an biologischen Funktionen erfüllen. Zu den Kernmitgliedern der Familie gehören LDL-Rezeptor, *LDL receptor-related protein 1* (LRP1), LRP1b, Megalin, VLDL-Rezeptor, Apolipoprotein E Rezeptor 2 (ApoER2) und MEGF7 (*multiple epidermal growth factor (EGF) repeat containing protein*). Der namensgebende Rezeptor der Familie, der LDL-Rezeptor, wurde zuerst entdeckt und ist in der Leber an der Cholesterinhomöostase beteiligt. Der LDL-Rezeptor bindet die LDL-Partikel und entfernt sie aus der Zirkulation mittels Endozytose. In der familiären Hypercholesterolämie ist der LDL-Rezeptor durch die Mutationen in seiner Funktionalität eingeschränkt, was zu einem dramatisch erhöhten Cholesteringehalt im Blutplasma der Betroffenen führt. Die homozygoten Träger der mutierten *Ldlr*-Allele sterben an einem Herzinfarkt innerhalb der ersten zwanzig Lebensjahre. Dies unterstreicht die physiologische Funktion des LDL-Rezeptors im Lipidstoffwechsel und der Cholesterinhomöostase (Herz and Bock 2002). Ursprünglich wurde die hypothetische Funktion anderer LDL-Rezeptorfamilienmitglieder ebenfalls auf den Lipidstoffwechsel beschränkt. Weitere Studien demonstrierten allerdings, dass die biologische Funktionalität dieser Rezeptoren viel breiter gefächert ist (May and Herz 2003). So werden die Rezeptoren VLDLR und ApoER2 nicht nur in der Leber, sondern auch in den Neuronen verstärkt exprimiert. Dort fungieren sie als Rezeptoren für das Signalprotein Reelin und spielen eine entscheidende Rolle in der Steuerung der neuronalen Zellmigration während der Embryogenese (Novak 1996; Tissir and Goffinet 2003). LRP1 ist einer der größten Vertreter der LDL-Rezeptorfamilie und wird verstärkt in der Leber und den Neuronen exprimiert. Anfangs wurde ihm eine Rolle in der Internalisierung der Chylomicronen und der mit Triglyceriden angereicherten Partikel zugeschrieben (Rohlfmann 1998). Weitere Untersuchungen demonstrierten allerdings, dass LRP1 eine Rolle in der Regulation von Proteasen und ihrer Inhibitoren sowie in der Embryogenese (Strickland 1990; Bu

1992; Herz 1992). Zwei weitere größte Vertreter der LDL-Rezeptorfamilie sind LRP1b und Megalin (LRP2). LRP1b hat eine ungefähr 60%ige Sequenzhomologie mit LRP1 und fungiert vermutlich als ein Tumorsuppressorgen (Liu and Rice 2000). Megalin wurde als ein renaler Endozytoserezeptor identifiziert und ist für die Internalisierung von Vitamin- und Steroid-bindender Proteine zuständig (Christensen and Willnow 1999; Nykjaer 1999). Die Letalität der Megalin *knock-out* Tiere, die schwere Defekte in der Entwicklung des Vorderhirns zeigen, demonstriert allerdings, dass dieser Rezeptor ebenfalls eine Rolle in der Embryogenese zu spielen scheint (Willnow 1996). Über die Funktion des MEGF7 ist zur Zeit nur wenig bekannt (Herz and Bock 2002).

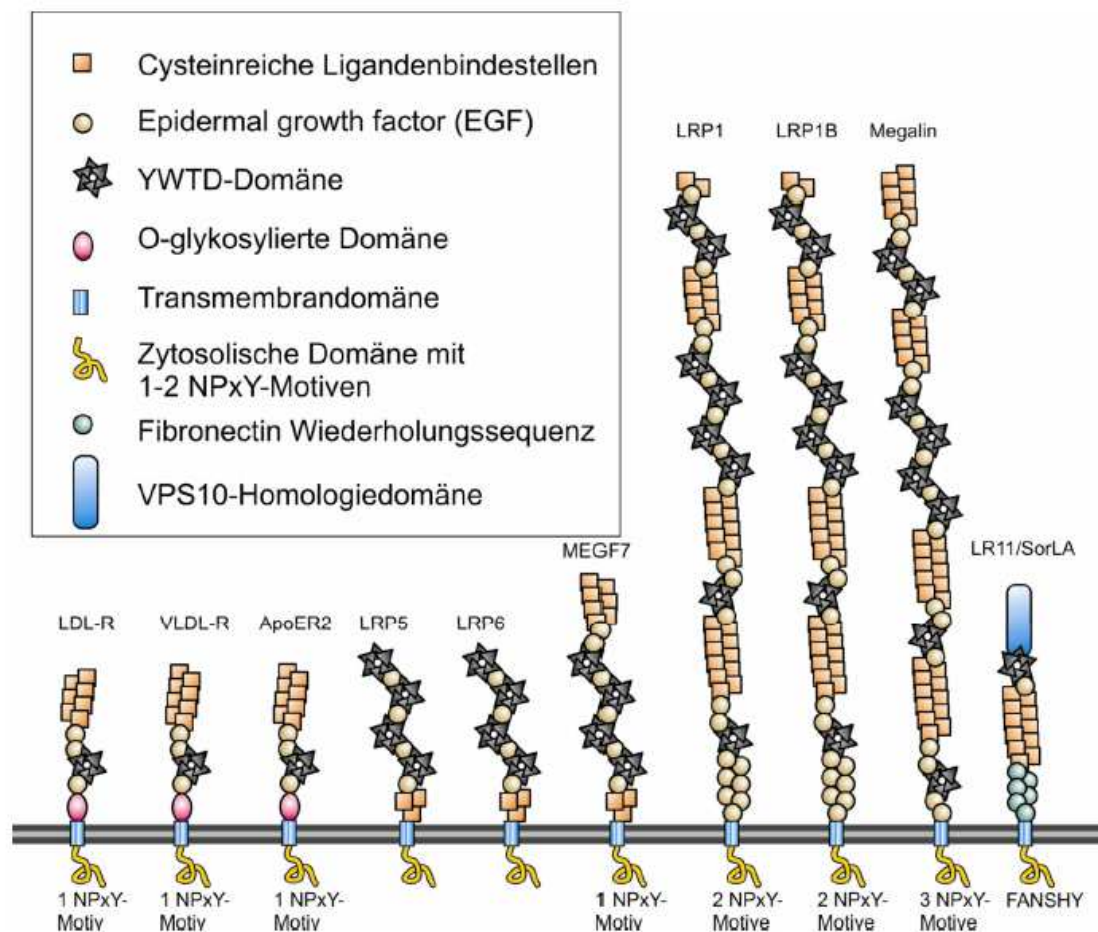


Abbildung I. Die Kernmitglieder der LDL-Rezeptorfamilie. (verändert aus Herz und Bock, Annu. Rev. Biochem., 2002)

Alle Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie haben fünf typische strukturelle Merkmale gemeinsam. Die Anwesenheit aller fünf Merkmale wurde als ein notwendiges Kriterium für die Zugehörigkeit eines Proteins zu den Kernmitgliedern der Familie

festgelegt. Die Anzahl der Merkmale kann zwischen unterschiedlichen Rezeptoren variieren, doch die Reihenfolge bleibt stets erhalten (Abb. I). So zählt zu den typischen Merkmalen mindestens eine Ligandenbindungsdomäne, die sich aus aufeinanderfolgenden cysteinreichen Wiederholungssequenzen zusammensetzt. Nach der Ligandenbindungsdomäne folgt eine propellerähnliche β -Faltblattstruktur, die sich aus den YWTD-Domänen zusammensetzt. Diese wird von EGF-ähnlichen (*epidermal growth factor*) cysteinreichen Wiederholungssequenzen flankiert (Springer 1998; Jeon 2001). Darauf folgen eine einzelne Transmembrandomäne und der zytosolische C-terminale Teil des Rezeptors mit mindestens einem NPxY Motiv. Die Buchstaben N, P und Y stehen für die entsprechenden Aminosäuren Asparagin, Prolin und Tyrosin. Das x kann jede beliebige Aminosäure repräsentieren. Das NPxY Motiv ist von zentraler Bedeutung für die Internalisierung der Rezeptoren. Darüber hinaus fungiert es als Bindestelle für die zytoplasmatischen Interaktionspartner der LDL-Rezeptorfamilienmitglieder, dabei ist die Phosphorylierung des Tyrosins innerhalb des Motivs von entscheidender Bedeutung (Krieger and Herz 1994; Willnow 1999; Barnes 2001; Boucher 2002; Betts 2008).

Neben den Kernmitgliedern der Familie, die alle fünf Merkmale beinhalten, existieren Rezeptorproteine, die strukturell ähnlich sind, aber nicht alle LDL-Rezeptorfamilientypischen Domänen haben. Diese Rezeptoren werden zwar nicht zu den Kernmitgliedern der Familie gezählt, gelten trotzdem als nahe verwandte Proteine. Drei Vertreter dieser Gruppe sind LRP5, LRP6 und LR11 (SorLA). LRP5 und LRP6 haben keine NPxY Motive in ihrem C-terminalen Teil, spielen aber eine wichtige Rolle im Wnt-Signaltransduktionsweg, welcher für die Embryonalentwicklung von großer Bedeutung ist (Pinson 2000; Tamai 2000). LR11/SorLA enthält zusätzlich eine VPS10 (*vascular protein sorting*) Domäne, welche in die Sortierungsvorgänge der intrazellulären Vesikeln involviert ist (Marcusson 1994).

1.1.1 Struktur und Funktionen des Lipoprotein Rezeptor-related Protein 1 (LRP1)

LRP1 ist ein ca. 600kDa großes transmembranes Glykoprotein des Typ I. LRP1 wird in fast allen Gewebearten exprimiert, die höchste Expressionsrate wurde jedoch in Gehirn und der Leber ermittelt (Herz 1988; Bu 1994). Es wird als ein Vorläuferprotein in das Innere des Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert und nach der vollständigen Glykosylierung im späten Golgi durch die Protease Furin in zwei

Fragmente geschnitten, die als α - oder β -Kette bezeichnet werden. Die größere ca. 515kDa schwere α -Kette bleibt jedoch mit der kleineren 85kDa schweren membrangebundenen β -Kette nicht-kovalent assoziiert (Herz 1990; Willnow 1996). Die α -Kette wird nach der Integration des LRP1 in die Zellmembran in den extrazellulären Raum exponiert. Sie enthält vier Ligandenbindungsdomänen, die mehr als 40 unterschiedliche Liganden binden können (Lillis 2005). Die genaueren Untersuchungen des Bindungsverhaltens von LRP1 demonstrierten, dass die Mehrheit der Liganden an die Ligandenbindungsdomänen II und IV bindet (Strickland and Ranganathan 2003). Die große Anzahl der Liganden trägt vermutlich zu dem breiten Spektrum an biologischen Prozessen bei, in die LRP1 involviert zu sein scheint (May and Herz 2003; Lillis 2005). Zu den wichtigsten Liganden des LRP1 zählen ApoE, aktiviertes α 2-Makroglobulin, gewebespezifischer Plasminogenaktivator (tPa), Amyloid Beta ($A\beta$) und PDGF (Lillis 2005). Nach der Bindung der Liganden wird LRP1 internalisiert und entlässt seine Ladung in das Endosom. Anschließend wird der Rezeptor zurück zu der Zelloberfläche transportiert. Während des Reifungsprozesses von LRP1 im Endoplasmatischen Retikulum werden die Ligandenbindungsdomänen durch das Protein RAP (*receptor associated protein*) besetzt, um eine spontane Bindung der Liganden zu unterbinden und damit die korrekte Faltung des LRP1 zu ermöglichen. RAP dient als Chaperon für alle Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie und verhindert die unerwünschte Bindung von Liganden während der Reifung und des Transports zur Zelloberfläche (Willnow 1996).

Die β -Kette enthält die Transmembrandomäne und den zytoplasmatischen C-terminalen Teil von LRP1. Im zytoplasmatischen Teil des LRP1 sind zwei NPxY Motive und ein YxxL Internalisierungsmotiv enthalten. Das distale NPxY2 Motiv überlappt mit dem YxxL Motiv in der Anordnung NPxYxxL, sodass beide Motive sich ein Tyrosin teilen (Liu and Rice 2000). Die NPxY Motive sind für die Bindung der intrazellulären Adapterproteine verantwortlich, dabei bindet die Mehrheit der Interaktionspartner an das NPxY2 Motiv und die Phosphorylierung der Tyrosine innerhalb der NPxY Motive durch z. B. Src oder Proteinkinase A scheint für die Bindung essentiell zu sein (Barnes 2001; Barnes 2003; Guttman 2009). Darüber hinaus verläuft die Phosphorylierung beider NPxY Motive sequenziell, sodass das Tyrosin Y4507 im NPxY2 Motiv zuerst phosphoryliert werden muss, bevor das

Tyrosin Y4473 im NPxY1 Motiv phosphoryliert werden kann. Darüber hinaus scheint die Phosphorylierung des NPxY2 Motivs eine verstärkte Exposition des NPxY1 Motivs zur Umgebung zu bewirken (Betts 2008). Die Wichtigkeit der NPxY2 Motive für die Funktionalität des LRP1 wurde von Anton Roebroek und Kollegen demonstriert. Diese Gruppe stellte drei transgene Mauslinien her, in denen das NPxY1 (LRP1 Δ NPxY1), das NPxY2 (LRP1 Δ NPxY2) oder beide Motive (LRP1 Δ NPxY1/2) durch Alanine substituiert wurden. Während die Inaktivierung des NPxY1 Motivs oder beider Motive zum perinatal-letalen Phänotyp der Tiere führte, zeigten die Tiere mit dem substituierten NPxY2 Motiv keinen direkt auffallenden Phänotyp (Roebroek 2006). Die genauere biochemische Untersuchung der MEF-Zellen (*mouse embryonic fibroblasts*), die aus diesen Tieren generiert wurden, demonstrierten jedoch, dass LRP1 Δ NPxY2 Zellen eine verminderte Internalisierungsrate von LRP1 aufweisen (Reekmans 2010).

Nach seiner Entdeckung im Jahr 1988 wurde LRP1 eine Rolle in der Internalisierung der Chylomikronen und der mit Triglyceriden angereicherten Partikeln zugeschrieben (Herz 1988; Rohlmann 1998). Mit der Entdeckung weiterer Liganden wurde allerdings das funktionelle Wirkungsspektrum des Rezeptors stetig erweitert. So wurde demonstriert, dass LRP1 als Rezeptor für das aktivierte α 2M fungiert (Strickland 1990) und eine wichtige Rolle in der Regulation der Protease-Aktivitäten spielt (Strickland 1990; Bu 1992). Eine Untersuchung der Tiere mit dem konditionellen LRP1 *knock-out* in der glatten Muskulatur demonstrierte eine wichtige Rolle von LRP1 in der Regulierung der Aktivierungsrate von *platelet-derived growth factor* (PDGF) und in der Entstehung von Atherosklerose (Boucher 2002). Die Fähigkeit von LRP1 das *Amyloid Precursor Protein* (APP) zu binden und seine Prozessierung zu beeinflussen, brachte LRP1 in den Zusammenhang mit der Entstehung der Alzheimer Krankheit (Kounnas 1995; Guenette 1996; Ulery and Strickland 2000; Pietrzik 2002). Die Experimente mit dem konventionellem *knock-out* des *Lrp1* Gens führten zu einem pränatal letalen Phänotypen der LRP1^{-/-} Tiere und demonstrierten, dass LRP1 eine entscheidende Rolle in der Embryogenese spielt (Herz 1992).

1.1.2 Die Rolle des LRP1 in der neuronalen Signaltransduktion

Neben der Leber ist die Expressionsrate von LRP1 im Gehirn am höchsten. LRP1 wird in Gliazellen und in Neuronen hauptsächlich am Zellkörper und Dendriten

exprimiert (Bu 1994). Die Entwicklung der konditionellen *knock-out* Techniken erlaubte eine spezifische Deletion des *Lrp1* Gens in Neuronen und dadurch eine Untersuchung der Funktionen von LRP1 im Gehirn. Diese *knock-out* Tiere demonstrierten massive neuronale Störungen wie Hyperaktivität, Muskelzittern, Ataxie und frühzeitigen Tod (May 2004). Darüber hinaus führte ein konditioneller *knock-out* von LRP1 im Vorderhirn zu einer reduzierten Expression von Synaptophysin und *post synaptic density protein* (PSD95) in den Gehirnen der Tiere (Liu 2010). Die Expressionsrate dieser Proteine dient als Marker für die Anzahl der Synapsen sowie für die Dichte der synaptischen Verknüpfungen im Gehirn. Eine Reduktion der Expressionsrate dieser Proteine indiziert somit eine verminderte synaptische Verknüpfung sowie eine verminderte Anzahl der gebildeten Synapsen. Die Tiere mit neuronalem LRP1 *knock-out* zeigen darüber hinaus Verhaltensdefizite wie Hyperaktivität und eingeschränktes Lernvermögen (May 2004; Liu 2010). Als eine mögliche molekulare Grundlage dieser Defizite demonstrierten die Autoren eine reduzierte Expression der Rezeptoruntereinheit NR1 des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDAR) in den Hirnschnitten der Tiere. Ein weiterer Hinweis auf die Rolle des LRP1 in der Signalübertragung durch den NMDA-Rezeptor lieferten in dieser Studie die Messungen der Langzeitpotenzierung (LTP) in den Hirnschnitten der Tiere mit konditionellem neuronalem LRP1 *knock-out*. Diese Experimente zeigten, dass in den Hirnschnitten der *knock-out* Tiere die LTP-Induktion wesentlich später eintrat (Liu 2010). Die Hinweise auf eine mögliche Rolle von LRP1 in der Signalübertragung durch NMDA-Rezeptoren wurden bereits früher publiziert. So wurde demonstriert, dass LRP1 den gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tPa) bindet und in die Signalübertragung von tPa auf den NMDA-Rezeptor vermittelt (Martin 2008). Diese Daten werden von Ergebnissen früher publizierter Immunopräzipitationsexperimente unterstützt, in denen eine funktionelle Interaktion zwischen LRP1 und PSD95 sowie NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2A und NR2B belegt wurde (May 2004). Zusammengefasst zeigen diese Studien, dass LRP1 in der exzitatorischen Signalübertragung durch NMDA-Rezeptoren und dadurch in den initialen Prozessen der Gedächtnisbildung eine Rolle zu spielen scheint wie zum Beispiel bei der Langzeitpotenzierung der Neurone.

1.2 Glutamat-Rezeptoren

Die exzitatorische Signalübertragung im ZNS wird hauptsächlich durch zwei Typen von Rezeptoren gewährleistet. Beide Typen werden durch den Neurotransmitter L-Glutamat aktiviert und tragen sowohl zur basalen Signalübertragung als auch zur Induktion der Langzeitpotenzierung der Neurone und solcher Prozesse wie das Lernen und die Gedächtnisbildung bei (Haberny 2002). Die Typen der L-Glutamat-Rezeptoren werden anhand des Mechanismus, welcher zur Veränderung des Membranpotenzials nach der Aktivierung der Rezeptoren führt, unterschieden. Der ionotrope Rezeptortyp stellt selbst einen Ionenkanal dar. Er verändert das Membranpotenzial durch eine Konformationsänderung, die zum Öffnen der Kanals führt und den Einstrom der Ione in das Zellinnere erlaubt. Im Gegensatz dazu verändert der metabotrope Rezeptortyp das Membranpotenzial durch die Aktivierung anderer in die Zellmembran integrierter Ionenkanäle. Dieser Mechanismus impliziert eine intrazelluläre Signalübertragung durch die G-Proteine (Dingledine 1999).

1.2.1 Ionotrope Glutamat-Rezeptoren

Drei Typen der ionotropen Glutamat-Rezeptoren existieren im ZNS. Sie werden anhand ihrer pharmakologischen Eigenschaften unterschieden. Die selektive Sensitivität zu dem synthetischen Agonisten, anhand derer die Rezeptoren identifiziert wurden, führten zu der entsprechenden Namensgebung: N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR); α -amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol Propionsäure-Rezeptor (AMPA) und Kainat-Rezeptor. Alle drei Rezeptortypen werden von insgesamt 6 Genfamilien kodiert (Dingledine 1999).

NMDA-Rezeptoren spielen eine Rolle in praktisch allen exzitatorischen synaptischen Signalübertragungen, in der synaptischen Plastizität sowie in der prä- und postnatalen Entwicklung des ZNS und stellen dadurch den wichtigsten Typ der ionotropen L-Glutamat-Rezeptoren dar (Lalonde and Joyal 1993; Haberny 2002).

1.2.2 Aufbau und Signaltransduktion des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors

Der NMDA-Rezeptor besteht aus mehreren Komponenten, die für die Erkennung und die Bindung des Liganden L-Glutamat und des Co-Agonisten Glycin zuständig sind. Der Rezeptor ist ein Heterotetramer und besteht aus zwei obligatorischen NR1- und zwei modulatorischen NR2- oder NR3-Untereinheiten. Eine Besonderheit des NMDA-Rezeptors besteht darin, dass zusätzlich zum Agonisten L-Glutamat der Co-Agonist Glycin gebunden werden muss, um den Rezeptor zu aktivieren (Erreger 2004). Die

Glycin-Bindestelle befindet sich an der NR1 Untereinheit. Dieser Umstand macht die Anwesenheit der NR1 Untereinheit in einem funktionellen NMDA-Rezeptor obligatorisch (Hirai 1996). Die Bindestelle für das Glutamat wird an der Interaktionsstelle zwischen den Untereinheiten NR1 und NR2 gebildet, deswegen muss ein funktioneller NMDA-Rezeptor beide Untereinheiten enthalten (Laube 1997; Anson 1998). Darüber hinaus zeichnet sich der NMDA-Rezeptor durch einen spannungssensitiven Mg^{2+} -Block aus, welcher durch das extrazellulär an die NR2-Rezeptoruntereinheiten gebundenes Mg^{2+} -Ion zustande kommt (Cull-Candy 2001). Die Untereinheiten des NMDA-Rezeptors werden durch insgesamt drei Genfamilien kodiert. Die NR1 Untereinheit wird durch ein Gen kodiert, existiert jedoch in acht Varianten, die durch das alternative Spleißen zustande kommen. Die Untereinheiten NR2A-D und NR3A-B stellen jede ein einzelnes Genprodukt dar (Hollmann and Heinemann 1994; Cull-Candy 2001). Strukturell sind die Untereinheiten aller ionotropen Glutamat-Rezeptoren ähnlich aufgebaut (Abb. II).

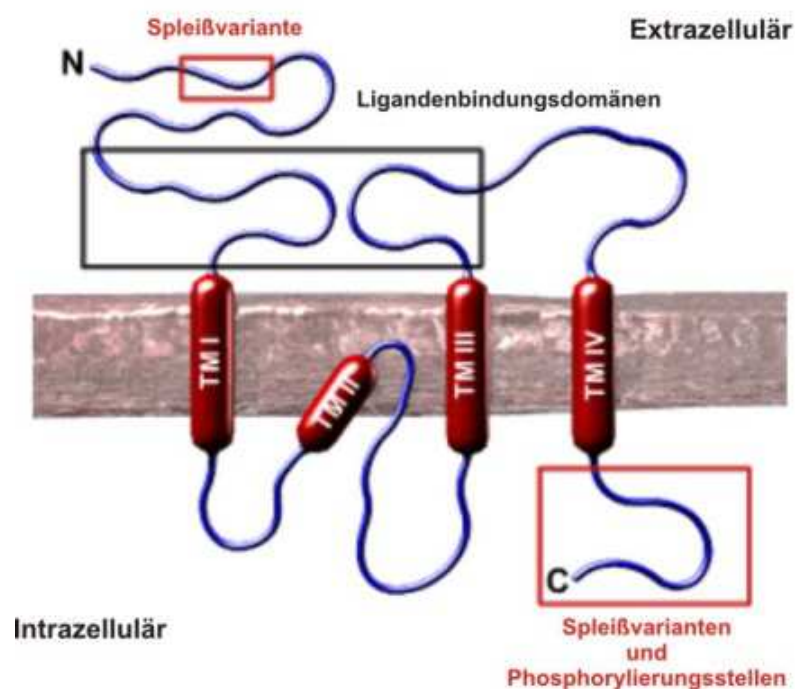


Abbildung II. Struktureller Aufbau der NMDA-Rezeptoruntereinheiten.

(verändert von Homepage University of Bristol;
<http://www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors/figures/nmdar-structure.gif>)

Sie enthalten vier Transmembrandomänen (M1, M2, M3 und M4), von denen nur drei die Membran komplett durchspannen, während die M2 Domäne eine Rückwärtsschleife in der Membran bildet und im Zellinneren wieder aus der Membran austritt. Der Teil der M2 Domäne, der in der Membran liegt, bildet die

Innenseite des Ionenkanals. Die extrazellulär liegende Schleife zwischen den Transmembrandomänen M3 und M4 beinhaltet die Bindestelle für Glycin oder Glutamat. Der C-terminale Teil der Rezeptoruntereinheit, der im Zellinneren liegt, enthält zahlreiche Phosphorylierungsstellen sowie Bindestellen für die Interaktion mit den Adapterproteinen. Die Unterschiede in der Komposition der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors modulieren dadurch die Signaltransduktionswege, die durch den Rezeptor angesprochen werden (Dingledine 1999). Ein direkter Effekt der Aktivierung des NMDA-Rezeptors ist der Ca^{2+} -Einstrom durch den Rezeptor in die Zelle. Neben einer Depolarisierung der Zellmembran aktiviert Ca^{2+} zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden und Kinasen. Der Ionenkanal ist allerdings im Ruhezustand durch ein von außen gebundenes Mg^{2+} -Ion blockiert. Dieser Magnesiumblock stellt eine weitere Besonderheit des NMDA-Rezeptors dar. Eine initiale Depolarisierung der Membran ist notwendig, um das Mg^{2+} -Ion zu entfernen. Dank dieser Eigenschaft erkennt der NMDA-Rezeptor die Koinzidenz zwischen der präsynaptischen (die Ausschüttung von Glutamat) und der postsynaptischen Aktivität (genügend starke Depolarisierung der postsynaptischen Zellmembran). Dadurch muss eine gewisse synaptische Aktivität bereits vorhanden sein, damit die Membran depolarisiert und die NMDA-Rezeptoren aktiviert werden. Dies wird in der Regel durch die AMPA-Rezeptoren gewährleistet (Collingridge and Bliss 1995). Die Komposition der NMDA-Rezeptoren variiert zwischen Hirnarealen und ändert sich während der Entwicklung des Gehirns. Die NR2A-Rezeptoruntereinheit ist die dominante Form im adulten Vorderhirn, Hippokampus und Cerebellum. Während im embryonalen Gehirn die NR2B-Untereinheiten dominiert. Diese wird in den ersten zwei Wochen nach der Geburt allmählich durch die NR2A-Untereinheit ersetzt (Barria and Malinow 2002; Bellone and Nicoll 2007). Die Expression der NR2B-Untereinheiten ist im Riechkolben, Hippokampus und im zerebralen Kortex am stärksten (Haberny 2002).

1.2.3 Regulation der NMDA-Rezeptoren durch die Phosphorylierung

Die Variationen in der Anzahl, der Lokalisierung und der Komposition an der Zelloberfläche exprimierter NMDA-Rezeptoren stellen einen wichtigen regulatorischen Mechanismus ihrer Aktivität dar. Diese werden im Zuge der Entwicklung und als Antwort auf neuronale Aktivität verändert. Die Regulierung dieser Prozesse erfolgt hauptsächlich durch die Modifizierung der C-terminalen Domänen der NMDA-Rezeptoruntereinheiten. Die C-terminalen Domänen stellen die

variabelsten Regionen der NMDA-Rezeptoruntereinheiten dar und spielen eine kritische Rolle in der Feinregulierung der Funktion und Komposition der Rezeptoren. So regulieren sie die Interaktionen mit einer Bandbreite an intrazellulären Adapterproteinen. Diese Interaktionen dirigieren unter anderem den intrazellulären Transport und die Lokalisierung des Rezeptors innerhalb der Zellmembran. Darüber hinaus koppeln die unterschiedlichen NMDA-Rezeptoruntereinheiten den Rezeptor zu den unterschiedlichen Signaltransduktionswegen, was das Wirkungsspektrum der Rezeptoren zusätzlich erweitert (Chen and Roche 2007).

Wie bereits erwähnt, stellen die NR2A und NR2B Rezeptortypen die wichtigsten NMDA-Rezeptortypen im Gehirn dar (Cull-Candy 2001). Während der NR2A Typ sich durch relativ schnelle Kinetiken mit ca. 100ms Deaktivierungszeit auszeichnet, demonstriert NR2B Rezeptor langsamere Kinetiken mit ca. 250ms Deaktivierungszeit (Cull-Candy and Leszkiewicz 2004). Das Verhältnis zwischen NR2B/NR2A Expression sinkt mit der Entwicklung des Gehirns, nichtsdestotrotz bleibt die Expressionsrate des NR2B-Rezeptors auch im adulten Gehirn im Vorderhirn und Hippokampus relativ hoch (Cull-Candy 2001). Viele spezifische Eigenschaften der NMDA-Rezeptoren wie die Bindung von Glutamat, der Mg^{2+} -Block und die Aktivierungs-/Deaktivierungskinetiken werden durch die NR2-Rezeptoruntereinheiten gewährleistet (Furukawa 2005). Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Expression und Lokalisation dieser Untereinheiten einer strikten Kontrolle unterliegen. Die Phosphorylierung stellt einen wichtigen Mechanismus zur Regulierung der Expression von NMDA-Rezeptoren und ihrer Untereinheitenkomposition dar. Die NMDA-Rezeptoruntereinheiten werden hauptsächlich in ihren intrazellulären C-terminalen Domänen speziell an den Serinen/Threoninen oder Tyrosinen phosphoryliert. Während die Phosphorylierung der NR2A und NR2B-Rezeptoruntereinheiten an Serinen eher einen Einfluss auf die Rezeptorströme oder die Aktivierbarkeit der Rezeptoren ausübt, reguliert die Phosphorylierung an Tyrosinen die Expression an der Zelloberfläche (Chen and Roche 2007). Die Regulation der Expression an der Zelloberfläche durch die Phosphorylierung ist für die NMDA-Rezeptoren, die NR2B-Untereinheiten enthalten, am besten charakterisiert (Abb. III).

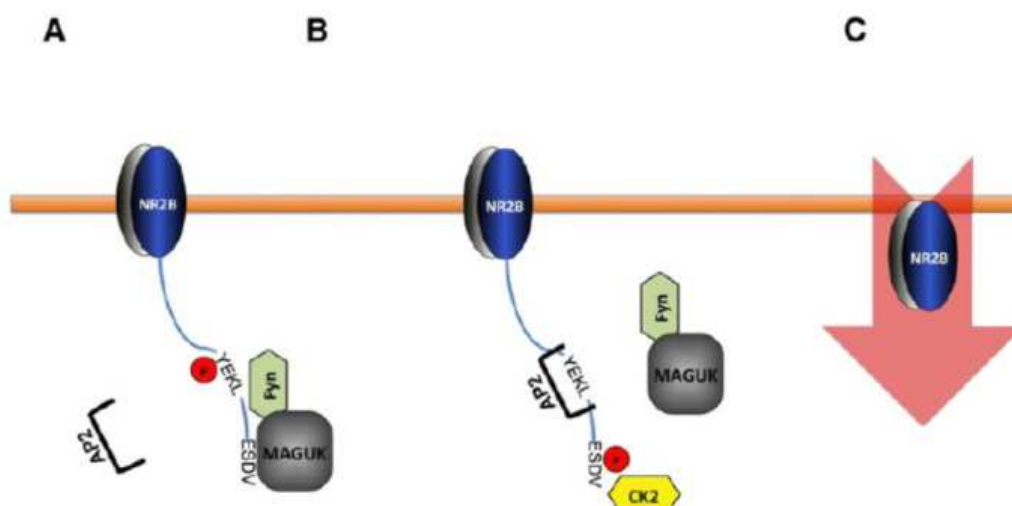


Abbildung III. Regulierung der Expression von NR2B-Rezeptoruntereinheit an der Zelloberfläche. **(A)** Eine Phosphorylierung am Tyrosin 1472 verhindert die Bindung des Adapterproteins 2 (AP2). Das Serin 1480 ist dephosphoryliert und bindet an PSD95. **(B)** Eine Phosphorylierung von S1480 durch Kasein Kinase II (CKII) löst die Bindung zwischen NR2B und PSD95 und entfernt die Kinase Fyn von Y1472. Anschließende Dephosphorylierung von Y1472 ermöglicht die Bindung von AP2. **(C)** NR2B-Rezeptoruntereinheit wird internalisiert. (verändert nach A. Sanz-Clemente, Neuron 2010).

In diesem Mechanismus sind zwei Phosphorylierungspositionen von entscheidender Bedeutung. Bei diesen Positionen handelt es sich um das Serin 1480 und das Tyrosin 1472. Das Serin 1480 (S1480) liegt innerhalb des ESDV-Motivs am C-terminalen Ende der NR2B-Untereinheit. Dieses Motiv ist für die Interaktion der Untereinheit mit der PDZ-Domäne (*PSD95/Dlg1/Zo-1*) des *post synaptic density* Proteins (PSD95) verantwortlich. Eine Phosphorylierung am Serin 1480 innerhalb dieses Motivs durch die Kasein Kinase II (CKII) unterbindet die Interaktion von NR2B mit PSD95 (Suzuki and Okumura-Noji 1995; Chung 2004). Dies führt zur Auslösung des NR2B NMDA-Rezeptors aus den postsynaptischen Rezeptoren-Clustern und entfernt den Rezeptor von der Kinase Fyn, die in diese Cluster integriert und für die Phosphorylierung des Tyrosins 1472 zuständig ist (Nakazawa 2001). Das Tyrosin 1472 (Y1472) liegt innerhalb des YEKL-Motivs der NR2B-Rezeptoruntereinheit. Das Motiv ist für die Interaktion mit dem Adapterprotein 2 (AP2) verantwortlich. Die Bindung des AP2 an das YEKL-Motiv vermittelt die Interaktion mit Clathrin und führt zur Endozytose des Rezeptors (Roche 2001; Lavezzari 2003). Die Phosphorylierung des Tyrosins 1472 innerhalb des YEKL Motivs durch die Fyn-Kinase unterbindet die Interaktion zwischen NR2B NMDA-Rezeptoren und AP2, unterbindet dadurch die Endozytose des Rezeptors und stabilisiert ihn an der Zelloberfläche (Nakazawa

2001; Chen and Roche 2007). Eine Dephosphorylierung am Tyrosin 1472 bei gleichzeitiger Phosphorylierung des Serins 1480 am C-terminus der NR2B-Rezeptoruntereinheit stellen damit ein Signal für die Internalisierung des Rezeptors dar (Perez-Otano 2001; Chen and Roche 2007; Sanz-Clemente 2010).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Aus früheren Arbeiten ist es bekannt, dass LRP1 und die NMDA-Rezeptoren eine funktionelle Interaktion eingehen können und vermutlich zusammen in der Zellmembran exprimiert werden (May 2004). Darüber hinaus wurde demonstriert, dass LRP1 bei der Signalübertragung von tPa auf NMDA-Rezeptor eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Dies wurde damit belegt, dass die Effekte von tPa auf NMDA-Rezeptor durch eine Blockade der Ligandenbindungsdomänen von LRP1 durch RAP (*receptor associated protein*) unterbunden werden konnte (Martin 2008). Darüber hinaus wurde mit Hilfe der primären LRP1 Δ NPxY2 Neurone gezeigt, dass eine Substitution des NPxY2 Motivs durch Alanine diese Signalübertragung erheblich beeinträchtigt. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass ein intaktes NPxY2 Motiv von LRP1 für die funktionelle Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor von entscheidender Bedeutung ist (Roebroek 2006; Martin 2008). Zusätzlich demonstrierten Verhaltensstudien an Tieren mit einem konditionellen neuronalen LRP1 *knock-out* Defizite im Lernvermögen und Hyperaktivität (May 2004; Liu 2010). Diese Defizite wurden in früheren Arbeiten unter anderem mit einer eingeschränkten Funktion oder veränderten Expression der NMDA-Rezeptoren des Typs NR2A oder NR2B in den Zusammenhang gebracht (Morris 1986; Tang 1999; Dalton 2011). Darüber hinaus wurde eine Reduktion der Expressionsrate der NR1 NMDA-Rezeptoruntereinheit in den Hirnlysaten der Tiere mit einem LRP1 *knock-out* im Vorderhirn festgestellt (Liu 2010). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf eine wichtige Rolle von LRP1 bei der Signaltransduktion des NMDA-Rezeptors hin. Wie bereits erwähnt, unterliegt die Regulierung der Expression von NMDA-Rezeptoren an der Zelloberfläche einer strikten Kontrolle und das YEKL Motiv in der NR2B-Untereinheit spielt bei der Internalisierung der NMDA-Rezeptoren offensichtlich eine wichtige Rolle. Nichtsdestotrotz werden die NR2B-Untereinheiten, bei denen das YEKL-Motiv durch Alanine substituiert wurde, in einem verminderten Maße internalisiert (Lavezzari 2003). Dieser Umstand deutet daraufhin, dass die Internalisierung der NMDA-Rezeptoren nicht ausschließlich durch eine direkte Clathrin-vermittelte Endozytose stattfindet, sondern auch andere, noch unbekannte Mechanismen impliziert. Eine Bindung von LRP1 an NMDA-Rezeptor Untereinheiten NR2A und NR2B wurde bereits demonstriert (May 2004). Zusätzlich wurde ein Mechanismus für die Co-Internalisierung anderer Proteine mit LRP1 beschrieben, in dem das APP (*Amyloid Precursor Protein*) durch einen intrazellulären Adapterprotein

Fe65 an LRP1 gebunden und zusammen mit LRP1 internalisiert wird (Pietrzik 2002; Pietrzik 2004). In Anlehnung an diese Daten kann ein Mechanismus zur Regulierung der Aktivität des NMDA-Rezeptors durch LRP1 vorgeschlagen werden, in dem der NMDA-Rezeptor zusammen mit LRP1 internalisiert wird. Die bisher veröffentlichten Studien zu diesem Thema befassten sich ausschließlich mit der Expression des NMDA-Rezeptors in den Lysaten primärer Neurone oder Hirnlysaten der Tiere mit neuronalem LRP1 *knock-out*. Dementsprechend wurde eine mögliche regulatorische Rolle von LRP1 in der Expression der NMDA-Rezeptoren an der Zelloberfläche nicht ausreichend untersucht (May 2004; Liu 2010). Die LRP1 Δ NPxY2 Tiere stellen in diesem Zusammenhang ein geeignetes Modell dar, da eine wichtige Rolle des NPxY2 Motivs in der tPa-vermittelten Signaltransduktion des LRP1 auf NMDA-Rezeptor mit Hilfe der primären Neurone aus diesen Tieren bereits demonstriert wurde (Roebroek 2006; Martin 2008). Darüber hinaus führte diese Substitutionsmutation zu einer verminderten Endozytoserate des LRP1 in *mouse embryonic fibroblasts* Zelllinie (Reekmans 2010). In dieser Arbeit wurde überprüft, ob die eingeschränkte Funktionalität des NPxY2 Motivs von LRP1 der LRP1 Δ NPxY2 Tiere ebenfalls zu einer reduzierten Internalisierungsrate von LRP1 in primären kortikalen Neuronen führt. Des Weiteren wurde untersucht, welche Auswirkungen eine reduzierte Internalisierungsrate des LRP1 in den LRP1 Δ NPxY2 Neuronen auf die Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1, NR2A und NR2B im Zytosol sowie an der Zelloberfläche hat. Anschließend wurde die Rolle des NPxY2 Motivs von LRP1 in der Regulierung der Interaktion mit der NR2B-Rezeptoruntereinheit, sowie in der LRP1-vermittelten Internalisierung des NMDA-Rezeptors ermittelt. Nach der Charakterisierung des biochemischen Phänotyps der primären LRP1 Δ NPxY2 Neurone wurden die Auswirkungen der Alanin Substitution auf die Aktivität und das Lernverhalten der *knock-in* Tiere untersucht.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid 40% (29:1)/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	GIBCO/BRL, Eggenstein
Agarose-G-Beads	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat(APS)	Sigma, Deisenhofen
B-Merkaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Biotin NHS-LC-LC	Thermo, Rockford, USA
Biotin NHS-S-S	Thermo, Rockford, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA (Bovine Serum Albumin)	Pierce, Bonn
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue	Merck, Darmstadt
dNTPs	PeqLab, Erlangen
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FBS)	Gibco Paisley, Schottland
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Serva, Heidelberg
Igepal (NP-40)	Sigma, Deisenhofen
Immobilisierte Agarose-Neutravidin-Beads	Thermo, Rockford, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Ralphs, Kalifornien
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck/Gibco, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
Poly-L-Ornithin	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Rinderalbumin	Sigma, Deisenhofen

Sodiumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
SuperSignal [®] Substrat für Western Blot	Pierce, Rockford, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Gibco Paisley, Schottland
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

2.2 Antibiotika

Gentamycin	Gibco Paisley, Schottland
Penicillin/Streptomycin	Gibco Paisley, Schottland

2.3 Geräte und Laborhilfsmittel

Agarose Gel Elektrophorese System	BioRad, München
Agarose Geldokumentation Intas Gel Imager	INTAS, Göttingen
CO ₂ - Brutschränke	New Brunswick, USA
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Flachbettschüttler	Infors, Boltmingen, Schweiz
Gefrier- und Kühlschränke	-80°C Heraeus -20°C Liebherr +4°C Liebherr
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
LAS 3000 FujiFilm	Fuji, Japan
Lichtmikroskope	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer RCT	IKA, Staufen
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Inthas, Mikrosysteme
Mini Protean III, Western Elektrophorese System	BioRad, München
Mini Protean III, Western Blotting System	BioRad, München
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
pH-Meter	inoLab, Weilheim
Pipetten 1 µl-1 ml	Gilson
Pipettierhilfe accu-jet	VWR, Darmstadt
Power Pac 300	BioRad, München
Protan Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell,
Dassel	
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen
Sterilbank SterilGrad	Nunc, Wiesbaden

UV-Photometer GeneRay	Bioimetra, Göttingen
Vortex-Genie 2™ Zürich Waagen	Bender & Hobein AG, Sartorius BP 21005 Mettler PL1200
Wasserbad GFL1086	GFL, Burgwedel
Xcell II Surelock Elektrophorese Tank	Novex
Zentrifuge Hettrich Universal 32	Hettrich, Tuttlingen
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Hereaus Fresco	Kendro, Langenselbold
Zentrifuge Sorvall RC5B	Kendro, Langenselbold
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman, Krefeld
2.4 Verbrauchsmaterialien	
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml Schweiz	TPP, Trasadingen,
Filterpapier Dassel	Schleicher & Schuell,
Glaspipetten 1 ml-20 ml	VWR, Darmstadt
Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm ² Schweiz	TPP, Trasadingen
Gewebekulturschalen (Ø 3 cm, 6 cm, 10 cm) Schweiz	TPP, Trasadingen
Mikrotest Platten 96-well	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulose-Transfermembran	Hartenstein, Würzburg
NuPage™ 4-12 %ige Bis-Tris Gradientengele	Invitrogen, Karlsruhe
Parafilm® American National Can™	Neeah, USA
Petrischalen ø 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µl-1000 µl	Starlab, Ahrensburg
Kryoröhrchen	Apogent, Wiesbaden
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter, Minisart, 0,2 mm Nitrocellulose	Sartorius, Göttingen
sterile Plastikröhrchen 15 ml	Greiner, Nürtingen
sterile Plastikröhrchen 50 ml	Sarstedt, Braunschweig
Zellschaber Schweiz	TPP, Trasadingen

Zentrifugenröhrchen
Schweiz

TPP, Trasadingen

3 Methoden

3.1 Primäre Zellkultur

3.1.1 Präparation und Kultivierung primärer kortikaler Neurone

Primäre kortikale Neurone wurden aus C57BL6 Wildtyp oder C57BL6 LRP1 Δ NPxY2 *knock-in* Mäuseembryonen (E15-16) isoliert. Die *knock-in* Mäuse beherbergen eine Mutation im *Lrp1* Gen. Diese Mutation führt zu einer Aminosäuresubstitution innerhalb des distalen NPxY Motivs (NPxY2) der β -Kette von LRP1 und bewirkt einen Austausch der Aminosäuren Asparagin (N), Prolin (P) und Tyrosin (Y) durch Alanine (NPVYATL \rightarrow AAVAATL). Sie wurde durch die Rekombinase-vermittelte Kassettenaustausch-Technik (RMCE) in das LRP1 Gen eingeführt (Roebroek 2006). Bedingt durch den Umstand, dass das Tyrosin im NPxY2 Motiv von LRP1 auch zu dem Endozytose-Motiv YxxL (YATL) gehört, ist das Letztere von der Mutation ebenfalls betroffen (Liu and Rice 2000). Diese Mutation ist insofern von Bedeutung, dass die Phosphorylierung des Tyrosins Y4507 in NPVYATL Motiv durch Proteinkinasen den Rezeptor aktiviert und die Interaktion mit den Adapterproteinen ermöglicht (Guttman 2009). Darüber hinaus führt diese Substitution im Endozytose-Motiv YATL zu einer verminderten Internalisierungsrate von LRP1 (Reekmans 2010). Zur Isolierung kortikaler Neurone wurde zunächst das trächtige (E15-16) Weibchen mit Hilfe von Isofluran (Forene[®] Abbot) narkotisiert und durch eine Cervicalwirbel-Dislokation getötet. Die Entnahme der Embryonen erfolgte per Kaiserschnitt (*sectio caesarea*). Anschließend wurden die Embryonen aus der Gebärmutter und Fruchtblase freigelegt, dekapitiert und die Köpfe im eiskalten PBS aufbewahrt. Direkt im Anschluss wurden die Gehirne aus den Schädeln entnommen und im eiskalten PBS bis zur weiteren Aufbereitung aufbewahrt. Die Kortices wurden freipräpariert und die Meningen entfernt. Alle Kortices der Embryonen eines Muttertieres wurden in einer Schale mit eiskalten HBSS gesammelt, vorsichtig zerteilt und für 15min bei Raumtemperatur auf einer Wippe trypsinisiert. Die Gewebefragmente wurden anschließend 2min bei 1200rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die Gewebefragmente mit 10ml Neurobasalmedium überschichtet und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch eine doppelte Gaze filtriert und der Durchfluss 5min bei 1200rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10ml Neurobasalmedium resuspendiert und die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt. Die Zellen

wurden anschließend in Poly-L-Ornithin-beschichteten 6-well Platten ($1,5 \times 10^6$ Zellen) oder 6 cm ($6,5 \times 10^5$ Zellen) Schalen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte für weitere 14 Tage (*days in vitro* DIV14) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank ohne Mediumwechsel.

Neurobasalmedium

Neurobasal mit Phenolrot
2% (v/v) B27-Supplement
10µg/ml Gentamycin
100U/ml Penicillin
100µg/ml Streptomycin
1 X Glutamax

HBSS

CaCl₂
MgCl₂
Phenolrot
10µg/ml Gentamycin

PBS (pH 7,4)

137mM NaCl
2,7mM KCl
10mM NaHPO₄
1,8mM KH₂PO₄

Poly-L-Ornithin

100 µg/ml in PBS

Trypsin/EDTA in PBS

0,05% (w/v) Trypsin
0,02% (w/v) EDTA

3.1.2 Bestimmung der Zellvitalität im AlamarBlue Assay

Für die Bestimmung der Zellvitalität wurde ein AlamarBlue-Assay auf Basis von Resazurin durchgeführt. Resazurin ist ein blauer Farbstoff, welcher durch eine Reduktion zum rosafarbenen Resorufin umgesetzt wird. Das Resazurin ist ungiftig und eignet sich aufgrund dieser Eigenschaften zur Bestimmung des Redoxpotentials der Zelle. In dieser Arbeit wurde eine fertige Komplettlösung „AlamarBlue“ (Invitrogen, Karlsruhe) zu diesem Zweck verwendet. Die primären Neurone wurden in einer 6-well Platte bis DIV5 kultiviert. Die 1x AlamarBlue Lösung wurde durch eine Verdünnung der 10x AlamarBlue Stammlösung mit NBS Medium im Verhältnis 1:10, wie vom Hersteller angegeben, hergestellt. Anschließend wurde das Kultivierungsmedium abgenommen und mit 1x AlamarBlue Lösung ersetzt. Die Platten wurden für 4h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Parallel wurde eine zellfreie leere 6-well Platte mit AlamarBlue Lösung gefüllt und ebenfalls im Brutschrank für 4h platziert. Sie wurde als Negativkontrolle verwendet. Zur Auswertung wurden nach 4h

jeweils 200µl Medium pro Well in eine 96-well Platte überführt und die Adsorption bei 562nm (Resorufin) und 590nm (Resazurin) in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Anthos 2010) gemessen. Der prozentuale Anteil an reduziertem Resazurin wurde aus dem Verhältnis der Adsorption 562nm/590nm berechnet. Die Daten wurden auf die Werte der zellfreien Negativkontrolle korrigiert.

3.1.3 Behandlung primärer Neurone mit Cycloheximid

Zur Untersuchung der Degradierungsrate der Proteine im Zellinneren oder an der Zelloberfläche wurden die Neurone mit Cycloheximid (CHX) behandelt. Das Cycloheximid ist ein vom Bakterium *Streptomyces griseus* stammendes Antibiotikum, welches die Translation in eukaryotischen Zellen hemmt. Die Wirkung kommt durch eine Hemmung der Peptidyltransferase-Aktivität der 60S Untereinheit eukaryotischer Ribosomen zustande.

Die primären Neurone am DIV14 in 6cm Schalen wurden eingesetzt. Das Neurobasalmedium wurde zu den festgelegten Zeitpunkten von den Zellen abgenommen mit 20µg/ml CHX versetzt und wieder auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden zurück in den Brutschrank transportiert und für, 4, 6 und 8 Stunden inkubiert. Die Oberflächenproteine der Neurone wurden mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung markiert, die Zellen anschließend lysiert und mit Hilfe der SDS-PAGE-Technik und des Western-Blots analysiert.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Zellyse und Proteinbestimmung

Zur weiteren Untersuchung der Proteine wurden die Zellen lysiert. Hierzu wurde die Kulturschale auf Eis überführt, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1,5ml eiskaltem PBS versetzt und mit einem Zellspatel vom Boden der Schale abgekratzt. Die Zellsuspension wurde 5min bei 7000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden je nach Größe mit 15-50µl RIPA-Lysispuffer resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und in neue Gefäße überführt.

Für die Proteinbestimmung wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce (Bonn) verwendet. Dazu wurden 5µl des erhaltenen Zellysats 1:10 mit ddH₂O

verdünnt, mit 1ml BCA-Reagenz versetzt und für 30min bei 60°C inkubiert. Die Gesamtproteinkonzentration des Zellextrakts wurde anschließend anhand einer BSA-Eichgeraden photometrisch in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Anthos 2010) bei 560nm bestimmt und mit der ANTHOS-Software ausgewertet.

3.2.2 Herstellung der Hirnlysate

Die Tiere wurden mit Hilfe von Isofluran (Forene® Abbot) narkotisiert und durch eine Cervicalwirbel-Dislokation getötet. Die Gehirne wurden sofort entnommen, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Lyse wurden die Gehirne gewogen und mit 6 x Volumen vom Gewicht mit eiskaltem RIPA-Puffer versetzt. Anschließend wurde das Gewebe in einem vorgekühlten Homogenisator so lange zerkleinert, bis eine homogene Lösung ohne sichtbare Stückchen entstand. Die erhaltene Suspension wurde 20min auf Eis inkubiert und anschließend 30min bei 55000rpm in einer Ultrazentrifuge (Optima TLX, Beckman) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Assays (s.o.) bestimmt. Jeweils 20µg vom Gesamtprotein wurden für die SDS-PAGE eingesetzt.

RIPA-Lysispuffer

50mM Tris-HCl pH 8.0

1% (v/v) NP40

0,5 % (w/v) Na-deoxycholat

0,1 % (w/v) SDS

1mM Natriumorthovanadat

1 x Proteaseinhibitor (complete, Roche)

1 x Phosphataseinhibitor (phosSTOP, Roche)

3.2.3 Dephosphorylierung der Proteine mit alkalischer Phosphatase

Zur Dephosphorylierung der Proteine wurden die neuronale Zelllysate mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die alkalischen Phosphatasen sind eine Enzymgruppe, die die Hydrolyse der Phosphorsäureester katalysiert und dadurch im Stande ist, die Phosphatgruppen vom Substrat abzuspalten. In dieser Arbeit wurde die intestinale alkalische Phosphatase aus Kälberdarm verwendet (CIP) (NEB, Frankfurt a. M.). Diese Phosphatase besitzt unter anderem die Fähigkeit die phosphorylierten Serine, Threonine oder Tyrosine in den Proteinen zu dephosphorylieren. Dabei weist sie

eine größere Spezifität für die phosphorylierten Tyrosine auf, während die Serine und Threonine weniger effizient dephosphoryliert werden.

Zur Dephosphorylierung von Proteinen wurden die Neurone in RIPA-Lysispuffer lysiert und die Proteinbestimmung durchgeführt. Für diese Experimente wurde zum RIPA-Puffer lediglich der Proteaseinhibitor hinzugefügt, auf das Natriumorthovanadat und die Phosphataseinhibitoren wurde verzichtet. Anschließend wurden 90µg von dem Gesamtprotein mit CIP im Verhältnis 10 Units CIP pro 1µg Protein versetzt und der 10 x NEB Puffer 3 hinzugefügt. Der Ansatz wurde auf 90µl mit RIPA-Puffer aufgefüllt und für 30min bei 37°C inkubiert. Die Proteininteraktionen wurden mit Hilfe der Co-Immunopräzipitationstechnik, SDS-PAGE und Western Blot untersucht.

<u>CIP-Dephosphorylierungsansatz</u>	1 x <u>NEB Puffer 3</u>
90µg Gesamtprotein	50mM Tris-HCl
9µl NEB Puffer 3	100mM NaCl
9µl CIP (90 Units)	10mM MgCl ₂
Xµl RIPA Lysispuffer	1mM Dithiotreitol
Gesamtvolumen 90µl	pH 7,9

3.2.4 Oberflächenbiotinylierung von Neuronen

Die Änderungen in der Proteinexpression an der Zelloberfläche primärer Neurone wurden mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung durchgeführt. Dazu wurden die Schalen auf Eis platziert, um die Endozytose zu unterbinden. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und zweimal für 20min bei 4°C in Biotin-Lösung (2,5mg/ml Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin in PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit 50mM NH₄Cl-Lösung gewaschen, um das nicht gebundenen Biotin abzubauen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen lysiert, die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt und die gleichen Mengen an Proteinen mit jeweils 30µl NeutrAvidin-Agarose-Beads (Thermo) für die Streptavidin-Präzipitation eingesetzt. Die Präzipitations-Ansätze wurden auf einem Drehrad bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Beads zweimal mit RIPA-Lysispuffer gewaschen, die gebundenen Proteine durch das Kochen für 10min bei 95°C mit 30µl 2xSDS-Ladepuffer (Roth) eluiert und mit Hilfe der SDS-PAGE und des Western-Blots untersucht.

Biotin-Lösung

2,5 mg/ml Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin in PBS

NH₄Cl-Lösung

50mM NH₄Cl in PBS

Alle Lösungen wurden vor dem Experiment frisch angesetzt.

3.2.5 Internalisierungsexperimente mit spaltbarem Sulfo-NHS-SS-Biotin

Zur Untersuchung der Internalisierungsraten der Oberflächenproteine in Neuronen wurden die Internalisierungsexperimente mit spaltbarem Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo) durchgeführt. Im Sulfo-NHS-SS-Biotin ist in das Linker-Molekül, welches die Sulfo-NHS gruppe mit dem Biotin-Molekül verbindet, eine Disulfidbrücke eingefügt. Aus diesem Grund kann das Biotin von der Sulfo-NHS-Gruppe unter reduzierenden Bedingungen abgespalten werden. In folgenden Experimenten wurde dazu 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (MesNa, Sigma-Aldrich) als Dissoziationsreagenz eingesetzt. Zur Untersuchung der Internalisierungsraten von Oberflächenproteinen wurden die Zellen auf Eis platziert, um die Endozytose zu unterbinden. Das Medium abgesaugt und bei 37°C aufgehoben, die Zellen wurden viermal mit eiskaltem PBS gewaschen und für 30min bei 4°C mit NHS-SS-Biotin (2,5mg/ml in PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Schalen auf Eis überführt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die 100% und 0% Kontrollen wurden mit kaltem PBS überschichtet und während des gesamten Experiments auf Eis belassen, um die Internalisierung zu unterbinden. Die 100% Kontrolle wurde dabei nicht mit MesNa behandelt. Die Werte dieser Kontrolle dienten später als 100%-Referenz und repräsentieren das gesamte an der Oberfläche markierte Proteinpool. Die 0%-Kontrolle wurde ebenfalls auf Eis belassen, allerdings wurde diese später mit MesNa-Puffer behandelt, um das Biotin von der Oberfläche abzuspalten. Die Werte dieser Kontrolle dienten bei der Auswertung als 0%-Referenz, um das Hintergrundsignal zu ermitteln. Die Internalisierungsansätze wurden mit dem vorgewärmten Medium überschichtet und für 7min oder 15min in dem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ platziert, um die Internalisierung zu ermöglichen. Anschließend wurden sie auf Eis überführt, dreimal mit PBS gewaschen und zusammen mit der 0%-Kontrolle 20min

mit MesNa-Puffer bei 4°C behandelt. Bei diesem Schritt wurde das restliche an der Zelloberfläche gebundene Biotin abgespalten und abgefangen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10min mit der Iodacetamid-Lösung (IAA, Sigma-Aldrich) inkubiert, um den restlichen MesNa-Puffer zu neutralisieren. Danach wurden die Zellen lysiert, die Streptavidin-Präzipitation und die weitere Analyse der Proteine erfolgte wie in dem Abschnitt „Oberflächenbiotinylierung“ beschrieben.

Biotin-Lösung

2,5 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin in PBS

IAA-Lösung

20mM Iodacetamid in PBS

MesNa-Puffer

20mM MesNa

50mM Tris-HCl pH 8,6

100mM NaCl

dd H₂O

Alle Lösungen wurden vor dem Experiment frisch angesetzt.

3.2.6 Co-Immunopräzipitation

Co-Immunopräzipitation ist eine Methode zur Untersuchung von Proteininteraktionen, die sich von der Immunopräzipitation ableitet. Bei der Immunopräzipitation wird das Zielprotein mit einem spezifischen Antikörper im Zelllysat gebunden und der Antikörper mit Hilfe der G-Protein-beschichteter Sepharose-Beads präzipitiert. Der anschließende immunologische Nachweis im Western Blot erfolgt bei der Immunopräzipitation mit dem Antikörper, der gegen das präzipitierte Protein gerichtet ist. Im Gegensatz dazu, erfolgt der immunologische Nachweis bei der Co-Immunopräzipitation (Co-IP) mit einem Antikörper, der gegen den hypothetischen Interaktionspartner vom präzipitierten Protein gerichtet ist und erlaubt dadurch die Rückschlüsse über die Interaktion beider Proteine.

Die primären kortikalen Neurone am DIV14 wurden lysiert und nach einer Proteinbestimmung jeweils 80µg vom Gesamtprotein für jeden Co-IP-Ansatz eingesetzt. Die Ansätze wurden mit RIPA-Lysispuffer auf 300µl aufgefüllt, mit 30µl von Protein-G-Sepharose (GE Healthcare) versetzt und der Antikörper in entsprechender Verdünnung hinzugefügt (vgl. Tabelle 1). Ein Co-IP-Ansatz mit einem unspezifischen Antikörper diente als Negativkontrolle. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad wurden die Proben zweimal mit 300µl RIPA-Lysispuffer gewaschen, die präzipitierten Proteine durch das Kochen für 10min bei

95°C mit 30µl 2xSDS-Ladepuffer (Roth) von der Sepha rose eluiert und mit Hilfe der SDS-PAGE und des Western-Blots untersucht.

3.2.7 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*; Lämmli 1970) ist eine Methode zur Proteinauftrennung für die spätere Analyse. Die Proteine werden auf ein Polyacrylamid-Gel geladen und in einem elektromagnetischen Feld aufgetrennt. Die Porengröße und damit auch die Laufeigenschaften hängen vom Polyacrylamid-Anteil im Gel ab. Die Proteine werden vor dem Auftragen durch den Zusatz von reduzierenden Agenzien (z.B. β -Mercapto-Ethanol) und das Erhitzen auf 95°C denaturiert. Unter Denaturierung versteht man das Auflösen der dreidimensionalen Strukturen von Proteinen. Die Elektrophorese findet zusätzlich in der Anwesenheit von SDS (*sodium dodecyl sulfate*) statt. Dieses anionische Detergenz bewirkt eine Dissoziation oligomerer Proteine in ihre Untereinheiten und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Neben diesen Effekten löst SDS die membrangebundenen Proteine aus der Zellmembran und versieht sie mit einer einheitlichen negativen Nettoladung, so dass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Die Auftrennung der Proteine erfolgt nun ausschließlich aufgrund ihrer Molekulargewichte. Das Gel wirkt in diesem Fall wie ein molekulares Sieb, die kleinen Proteine wandern schneller durch die Poren des Polyacrylamids, die Größeren langsamer. Das Gel wird aus zwei Komponenten gegossen: ein engporiges Trenngel, in dem die Proteine durch im elektrischen Feld aufgetrennt werden, und ein großporiges Sammelgel für die gleichmäßige Verteilung der Proteine. Zur Analyse wurden jeweils 20µg Gesamtprotein mit 4 x SDS-Ladepuffer im Verhältnis 1:3 versetzt, 10min bei 95 °C aufgeköcht, gekühlt, abzentrifugiert und auf ein 10%iges Polyacrylamid BisTris Gel geladen. Der Lauf erfolgte bei 120V in 1 x SDS Puffer in Elektrophoresekammern (Mini-Protean) der Firma BioRad (München) so lange, bis die Lauffront den unteren Rand des Trenngels erreichte. Nach Beendigung des Laufs wurden die Ladetaschen abgetrennt und das Gel für den Western Blot vorbereitet.

4 x Trenngelpuffer (pH 8,8)

1,5M Tris
0,4% (w/v) SDS

4 x Sammelgelpuffer (pH6,8)

0,6M Tris-HCl
0,4% (w7v) SDS

Laufpuffer (pH 8,3)

192mM Glycin
25mM Tris-Base
0,1% (w/v) SDS

4 x SDS Ladepuffer

62,5mM Tris-HCl pH 6,8
10% (v/v) Glycerin
2% (w/v) SDS
0,02% (w/v) Bromphenolblau

3.2.8 Western Blot

Der Western Blot ist ein etabliertes Verfahren für die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose Membran (Burnette 1981). Dazu wird auf das Gel ein senkrechtes elektrisches Feld angelegt, so dass die Proteine auf die Membran übertragen und gebunden werden. Anschließend werden die Proteine immunologisch nachgewiesen. Der Transfer erfolgte mit 1 x Transferpuffer in BioRad Nassblotkammern bei 250mA für 2 Stunden auf Eis. Anschließend wurde die Membran kurz mit ddH₂O gewaschen und mit Ponceau S angefärbt, um die Qualität des Transfers zu überprüfen. Nach dem Entfärben in TBST wurde die Membran für eine Stunde in Blockierungspuffer inkubiert, um freie Proteinbindestellen zu sättigen. Für den immunologischen Nachweis von phosphorylierten Proteinen wurde die Membran mit 3%ger BSA-TBST Lösung blockiert, um die Hintergrundsignale der phosphorylierten Milchproteine zu umgehen.

Transferpuffer (pH 8,8)

25mM Tris-Base
192mM Glycin

Blockierungspuffer

5% (w/v) Magermilchpulver
(3% BSA für Phospho-Proteine)
TBS-T

TBS-T (pH 7,4)

25mM Tris-Base
137mM NaCl
270µMkCl
0,01% (v/v) Tween-20

Ponceau S

0,5% (w/v) Ponceau S
1% (v/v) Essigsäure
ddH₂O

3.2.9 Immunologischer Nachweis der Zielproteine

Nach Absättigung der Nitrozellulosemembran durch Milch- oder BSA-Proteine wurde diese mit dem gegen das Zielprotein gerichteten Primärantikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einer Wippe. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 1 angegeben. Anschließend wurde die Membran 4 x 10min mit TBS-T gewaschen und dem HRP-gekoppelten (*horse radish peroxidase*) Sekundärantikörper (vgl. Tabelle 2), der gegen das Spezies-spezifische Fc-Fragment der Erstantikörpers gerichtet ist, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Detektion erfolgte nach dem mehrfachen Waschen mit TBS-T mittels Chemilumineszenz. Dabei wird das Substrat Luminol (Pierce) durch die Meerrettichperoxidase (HRP) zu 3-Aminophthalat umgesetzt. Die während der Reaktion freigesetzte Energie in Form von Licht wurde mit einer Digitalkamera (Fuji LAS-3000 mini) detektiert.

3.2.10 Densitometrische Auswertung der Westen Blots und Statistik

Die Western Blots wurden durch eine densitometrische Auswertung mit der Software ImageJ 1.44 quantifiziert. Die gemessenen Signalintensitäten der untersuchten Proteine wurden auf die Signalintensitäten des Aktins in der entsprechenden Gelspur normalisiert. Alle graphischen Darstellungen und statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4 (La Jolla, CA) durchgeführt. Die Daten wurden mit einer einseitigen Analyse der Varianz (ANOVA) gekoppelt an Newman-Keuls Test für multiple Analysen oder mit einem zweiseitigen Studentschen *t*-Test analysiert. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

3.3 Verhaltensexperimente

Für die Verhaltensstudien wurden 26 gleichaltrige Männchen im Alter von mindestens 3 Monate eingesetzt.

3.3.1 Open Field Paradigma

Allgemeine Aktivität der Mäuse wurde während der 10min-Sitzungen in der *open field* Paradigma beurteilt. Die Testfläche mit Abmessungen 60 x 60 x 40cm wurde eingesetzt. Die erfassten Parameter waren: Insgesamt zurückgelegte Wegstrecke (cm), die allgemeine Verweildauer (% der gesamten Aufnahmezeit ohne Bewegung), die Verweildauer an den Wänden des Labyrinths (10cm Korridor; % der Gesamtzeit)

und die Häufigkeit des Betretens des offenen Mittelfelds des Labyrinths (30 cm Durchmesser, Anzahl der Beschreitungen)

3.3.2 Morris Water Maze

Die Plattform blieb im selben Quadranten für alle Versuche und die Tiere wurden von vier verschiedenen Positionen am Schwimmbeckenrand freigesetzt. Die Mäuse absolvierten vier Versuchsläufe pro Tag an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit einer maximalen Dauer von 60s und einer Pause von 90s. Die Mäuse konnten 10s auf der Plattform verweilen. Am fünften Tag wurde eine Probestudie (60s) ohne Plattform durchgeführt. Der Lernerfolg wurde durch Bestimmung der benötigten Zeit, um die Plattform zu finden und die dafür zurückgelegte Strecke beurteilt.

3.3.3 Monitoring des Verhaltens

Ein EDV-gestütztes Videoüberwachungssystem registrierte den Bewegungspfad und die Dauer des Aufenthalts in *open field* und *MWM* Paradigmen. Die Hardware bestand aus einem IBM-Typ AT-Rechner mit einem Video-Digitizer kombiniert mit einer CCD-Videokamera. Für die Erfassung und Analyse der Messdaten wurde die Software EthoVision XT ® Release 8.0 (Noldus Information Technology, Utrecht, Niederlande) verwendet.

3.4 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
1704	Kaninchen	1:10000 WB 1:300 IP	Pietrzik, 2002
LRP1 pY4507	Kaninchen	1:100 WB	SantaCruz
NMDA-Rezeptor Untereinheit NR2B	Maus	1:1000 WB 1:150 IP	Thermo
NMDA-Rezeptor Untereinheit NR2A	Ziege	1:1000 WB	SantaCruz
NMDA-Rezeptor Untereinheit NR2B pS1480	Kaninchen	1:500 WB	Thermo
NMDA-Rezeptor Untereinheit NR2B pY1472	Kaninchen	1:500 WB	Millipore
NMDA-Rezeptor Untereinheit NR1	Maus	1:300 WB	Zymed
Casein Kinase II	Kaninchen	1:500 WB	Upstate
Erk 1/2	Kaninchen	1:500 WB	Cell Signaling
Phospho Erk 1/2	Maus	1:500 WB	Cell Signaling
Fyn	Maus	1:250 WB	B&D Systems
Phospho Fyn Y418	Kaninchen	1:1000 WB	Invitrogen
GSK 3 α/β	Maus	1:1000 WB	Zymed
Phospho GSK 3 α/β pS21/pS9	Kaninchen	1:1000 WB	Cell Signaling
Aktin	Kaninchen	1:5000 WB	Sigma

Tabelle 1. Primäre Antikörper

In der Tabelle sind alle verwendeten primären Antikörper aufgeführt. Abkürzungen: WB – Western Blot; IP – Immunopräzipitation. Hinter den Verdünnungen sind die entsprechenden Anwendungen angegeben.

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
HRP Ziege anti Kaninchen	Ziege	1:10000 WB 1:5000 WB	Jackson Immunoresearch
HRP Esel anti Maus	Esel	1:5000 WB	Sigma
HRP Kaninchen anti Ziege	Kaninchen	1:5000 WB	Jackson Immunoresearch

Tabelle 2. Sekundäre Antikörper

In der Tabelle sind alle eingesetzten sekundären Antikörper aufgeführt. HRP – *horse radish peroxidase*.

4 Ergebnisse

Die Aktivität und die Signalmodulation der NMDA-Rezeptoren sind unter anderem durch die Veränderungen der Expressionsraten an der Zelloberfläche und der Verteilung der Rezeptoren zwischen synaptischen und extrasynaptischen Abschnitten der neuronalen Zellmembran reguliert (Prybylowski 2005; Snyder 2005; Zhang 2008). Zahlreiche vorangegangene Arbeiten haben einen Zusammenhang zwischen LRP1 und der Signaltransduktion des NMDA-Rezeptors demonstriert (May 2004; Martin 2008; Liu 2010). Unter anderem ist eine funktionelle Interaktion zwischen LRP1 und NMDA-Rezeptoruntereinheiten mit Hilfe von Co-Immunopräzipitation gezeigt worden (May 2004). Die zytosolische Sequenz des LRP1 enthält zwei NPxY Motive, die für die Internalisierung des Rezeptors und die Bindung der intrazellulären Interaktionspartner von Bedeutung sind (Liu and Rice 2000; Guttman 2009). Eine Alanin Substitution beider Motive führt zum perinatal-letalen Phänotyp der Tiere und demonstriert dadurch eine entscheidende Rolle der Motive für die Funktionalität des Rezeptors. Die Alanin Substitution im distalen NPxY2 Motiv des LRP1 zieht allerdings keine Einschränkungen in der Vitalität oder Fertilität der LRP1 Δ NPxY2 Tiere nach sich (Roebroek 2006). Eine genauere Untersuchung der *mouse embryonic fibroblasts* (MEF) Zelllinie, die aus LRP1 Δ NPxY2 *knock-in* Tieren generiert wurde, demonstrierte allerdings, dass LRP1 in diesen Zellen eine signifikant reduzierte Internalisierungsrate aufweist (Reekmans 2010). Darüber hinaus wurde die Rolle des NPxY2 Motivs von LRP1 in der Signalvermittlung des gewebespezifischen Plasminogenaktivators (tPa) auf die NMDA-Rezeptoren untersucht. Dazu wurden primäre hippokampale Neurone aus der LRP1 Δ NPxY2 *knock-in* Mauslinie oder Wildtyp-Kontrollen mit tPa behandelt und die Effekte auf die Aktivierung der *extracellular regulated kinase 1/2* (Erk1/2) untersucht. Die Aktivierungsrate der Erk1/2 Kinase durch tPa war in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen signifikant reduziert. Diese Experimente demonstrierten, dass ein intaktes NPxY2 Motiv des LRP1 eine entscheidende Bedeutung für die LRP1-vermittelte Aktivierung des NMDA-Rezeptors durch tPa hat. (Roebroek 2006; Martin 2008). Die Arbeiten anderer Gruppen, die einen konditionellen neuronalen *knock-out* des *Lrp1* Gens generierten, demonstrierten signifikante Defizite im räumlichen Lernvermögen und eine Hyperaktivität der LRP1 *knock-out* Tiere (May 2004; Liu 2010). Diese Verhaltensdefizite könnten auf eine

beeinträchtigte Signalübertragung durch NMDA-Rezeptoren zurückgeführt werden (Collingridge and Bliss 1995; Tang 2009). Darüber hinaus konnten die Autoren eine signifikante Reduktion der Expressionsrate der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 in den Hirnlysaten der Tiere mit neuronalem LRP1 *knock-out* feststellen (Liu 2010). Der NMDA-Rezeptor wird allerdings ausschließlich als ein Komplex bestehend aus NR1 und NR2 Untereinheiten zur Zelloberfläche transportiert (Perez-Otano 2001). Die Veränderungen in der Expressionsrate der NMDA-Rezeptoren an der Zelloberfläche der Neurone stellen ebenfalls einen wichtigen Mechanismus für die Regulation der Rezeptoraktivität dar (Tang 2009). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des NPxY2 Motivs von LRP1 in der Regulierung der Expression der NMDA-Rezeptoren an der Zelloberfläche sowie die Mechanismen zur Regulierung der Interaktion beider Rezeptoren eingehend untersucht. Darüber hinaus wurden die LRP1 Δ NPxY2 Tiere auf mögliche Auswirkungen der *knock-in* Mutation auf das Verhalten und das Lernvermögen getestet.

4.1 Primäre kortikale LRP1 Δ NPxY2 Neurone zeigen keine Abweichungen in der Zellvitalität oder in der Expression der synaptischen Marker

Wie bereits erwähnt, führte ein neuronaler LRP1 *knock-out* in der Maus zu erheblichen Verhaltensdefiziten, die mit einem beeinträchtigten Signalgeschehen der NMDA-Rezeptoren erklärt werden könnten (May 2004; Liu 2010). Darüber hinaus berichteten die Autoren von einer reduzierten Expression der synaptischen Marker-Proteine Synaptophysin und PSD95 (*Post Synaptic Density 95*) in den Hirnlysaten der Tiere mit einer LRP1 *knock-out* Mutation im Vorderhirn. Diese Ergebnisse wurden als eine verminderte Vitalität der Neurone sowie eine reduzierte Anzahl der Synapsen in den Gehirnen betroffener Tiere interpretiert (Liu 2010). Das in dieser Arbeit untersuchte LRP1 Δ NPxY2 *knock-in* Maus-Modell stellt einen partiellen funktionellen *knock-out* des LRP1-Rezeptors dar, welcher den Letzteren lediglich in seiner Funktionalität einschränkt (Gordts 2009; Reekmans 2010; Pflanzner 2011). Im Hinblick auf diese Aspekte wurde in dieser Studie getestet, ob der *knock-in* in das NPxY2 Motiv von LRP1 und der damit einhergehende partielle Funktionsverlust des Rezeptors zu einem ähnlichen biochemischen Phänotyp führt. Dazu wurde die Vitalität der primären kortikalen LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp Neurone mit Hilfe des AlamarBlue Assays untersucht.

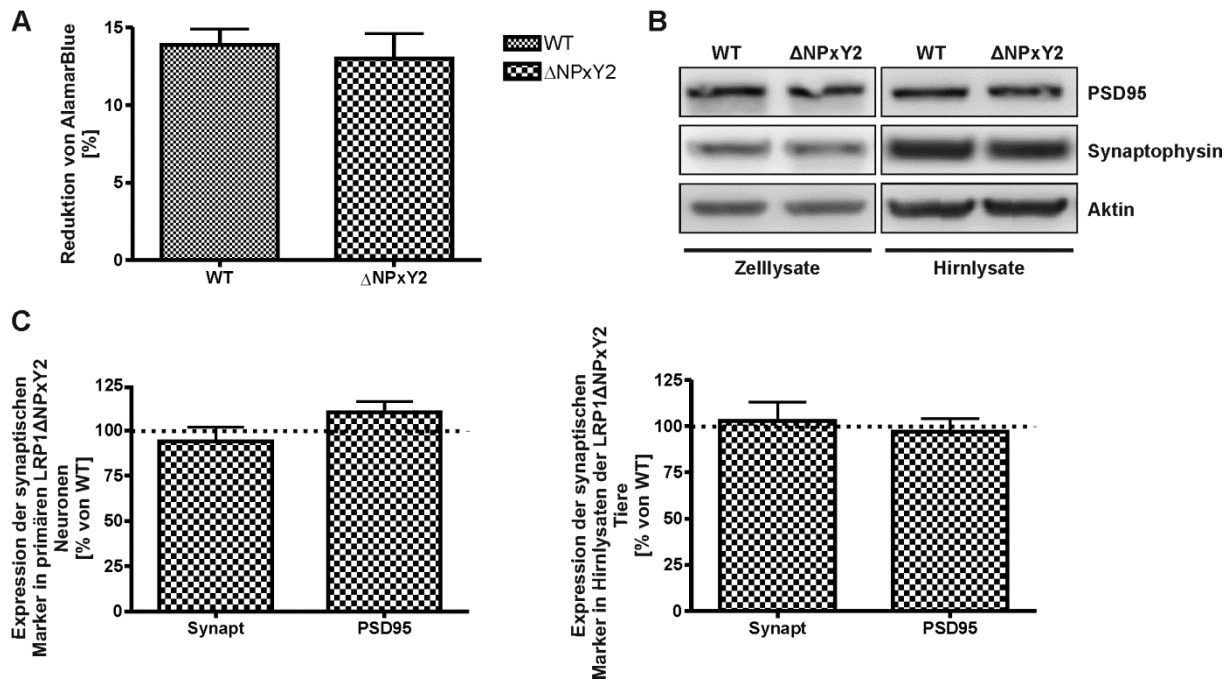


Abbildung 1. Primäre LRP1 Δ NPxY2 Neurone zeigen keine Abweichungen in Zellvitalität oder Expression der synaptischen Marker.

(A) LRP1 Δ NPxY2 Neurone zeigen keine signifikanten Abweichungen in der Reduktionsrate von AlamarBlue-Reagenz. Der Assay wurde wie im „Methoden“-Abschnitt beschrieben durchgeführt. Das demonstrierte Verhältnis zwischen Adsorption bei 562nm zu der Adsorption bei 590nm repräsentiert den prozentualen Anteil an reduziertem AlamarBlue nach 4h. Die Werte wurden vorher auf zellfreie Leerkontrollen normalisiert. Für die LRP1 Δ NPxY2 Neurone wurde ein prozentualer Anteil von 13% an reduziertem AlamarBlue Reagenz berechnet, für Wildtyp-Kontrollen 13,9% (beide n=3 6-well Platten). **(B)** Repräsentative Western Blots demonstrieren, dass keine Abweichungen in den Expressionsraten synaptischer Marker PSD95 und Synaptophysin in Zelllysaten primärer Neurone oder Hirnlysaten der LRP1 Δ NPxY2 Tiere im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden konnten. **(C)** Die Proteinexpression in den Zell- oder Hirnlysaten wurde mit Hilfe densitometrischer Analyse mehrerer Western Blots quantifiziert. Die berechneten Werte für Wildtyp-Kontrollen wurden als 100% gesetzt. Die Diagrammbalken repräsentieren den Mittelwert der prozentualen Unterschiede in der Expression der entsprechenden Rezeptorproteine in den Hirn- oder Zelllysaten primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone verglichen mit den Wildtyp-Kontrollen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen konnten ermittelt werden.

Wie in der Abbildung 1A demonstriert, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Reduktionsrate von AlamarBlue zwischen LRP1 Δ NPxY2 Neuronen und Wildtyp-Kontrollen festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine normale Vitalität der LRP1 Δ NPxY2 Neurone hin. Darüber hinaus wurde die Expression der synaptischen Marker PSD95 und Synaptophysin in den Zelllysaten primärer Neurone oder Hirnlysaten der Tiere untersucht. Bei dieser Untersuchung konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp Tieren bzw. Neuronen festgestellt werden (Abb. 1B, C). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die

knock-in Mutation und der damit einhergehende partielle Funktionsverlust von LRP1 keinen direkten Einfluss auf die Zellvitalität oder die Anzahl der Synapsen hat.

4.2 NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1/NR2B zeigen höhere Expressionsraten an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone

In vorangegangenen Arbeiten wurde eine verminderte Internalisierungsrate für LRP1 in MEF-Zellen (*mouse embryonic fibroblasts*) mit der LRP1 Δ NPxY2 Mutation demonstriert (Reekmans 2010). Unter Berücksichtigung dieser Daten wurde die LRP1-Expression im Zelllysate und an der Zelloberfläche primärer kortikaler LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp Neurone (DIV14) mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung untersucht. Wie in den Abbildungen 2A und 2B gezeigt, demonstrieren die LRP1 Δ NPxY2 Neurone eine verstärkte Expression des LRP1 an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone verglichen mit den Wildtyp-Kontrollen, während die basale Expression des Rezeptors in den Zelllysaten keine Unterschiede zwischen den Genotypen aufweist (Abb.2A, B). Eine funktionelle Interaktion zwischen LRP1 und NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2A und NR2B wurde mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation demonstriert (May 2004). Zusätzlich wurde die Reduktion der Expressionsrate von NR1 in den Hirnlysaten der Mäuse mit einer *knock-out* Mutation von LRP1 im Vorderhirn gezeigt (Liu 2010). In Bezug auf diese Daten wurde geprüft, ob der beobachtete Anstieg in der Expressionsrate des LRP1 an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone einen Effekt auf die Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten im Zelllysate oder an der Zelloberfläche hat. Die NR2A und NR2B-Untereinheiten enthaltende NMDA-Rezeptoren sind die häufigsten Isoformen in hippocampalen und kortikalen Hirnarealen (Yashiro and Philpot 2008), während die NR1 Rezeptoruntereinheit in alle funktionellen NMDA-Rezeptoren obligatorisch integriert ist (Qiu 2005). Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen auf diese Rezeptoruntereinheiten fokussiert.

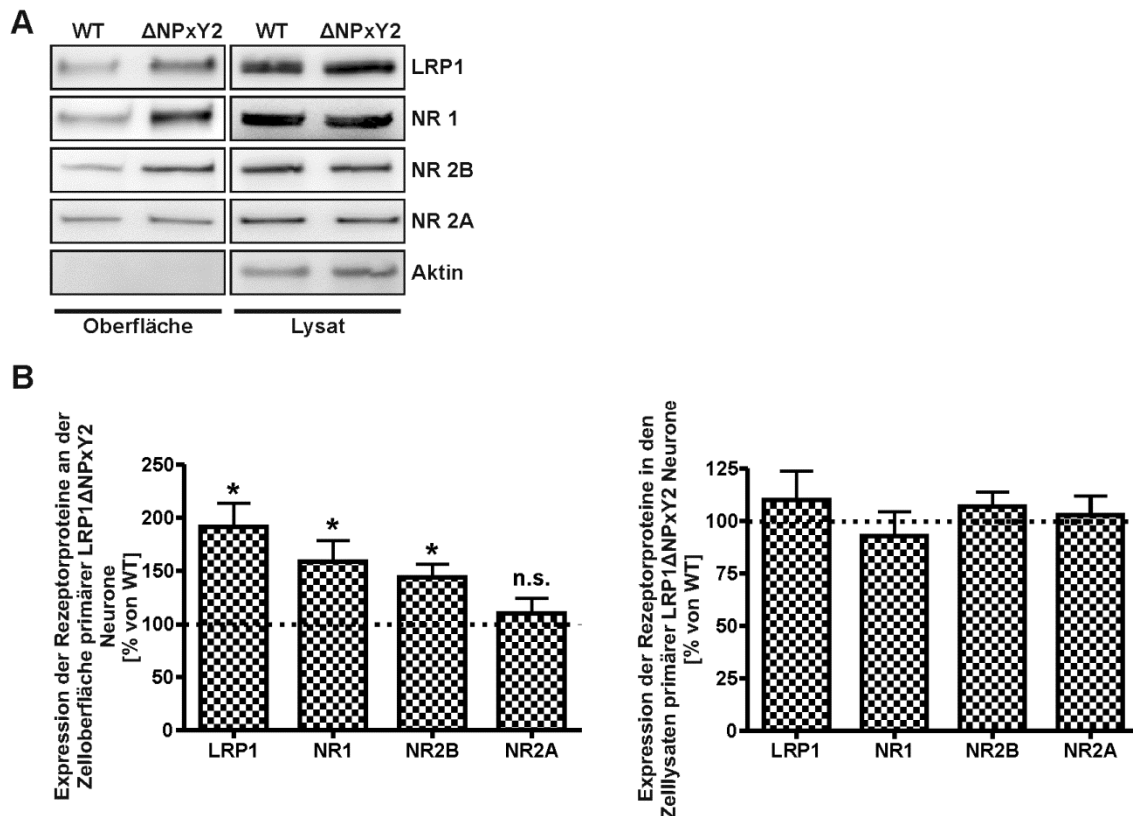


Abbildung 2. Alanin Substitution im NPxY2 Motiv von LRP1 führt zu einer verstärkten Expression von LRP1 und NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1/NR2B an der Zelloberfläche primärer kortikaler Neurone.

(A) Die repräsentativen Western Blots demonstrieren eine verstärkte Expression des LRP1 und der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1 und NR2B an der Zelloberfläche primärer Neurone, während die Expression im Zelllysate nicht verändert ist. Die Expression der NR2A-Untereinheit ist durch die *knock-in* Mutation in LRP1 nicht beeinflusst. Primäre kortikale Neurone von LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp-Tieren am DIV14 wurden bei 4°C biotinyliert und lysiert. Die biotinylierten Proteine wurden mit NeutrAvidin Agarose präzipitiert und mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot untersucht (*Oberfläche*, linke Tafeln). Als Ladekontrollen wurden jeweils 15 μ g der Gesamtproteine aus dem Zelllysate eingesetzt (*Lysat*, rechte Tafeln). Ein polyklonaler Antikörper gegen Aktin wurde zum Nachweis eventuell vorhandener Kontaminationen mit zytosolischen Proteinen in der Oberflächenfraktion und als Ladekontrolle eingesetzt. **(B)** Die Proteinexpression an der Zelloberfläche und in den Zelllysaten wurde mit Hilfe densitometrischer Analyse mehrerer Western Blots quantifiziert. Die Signalintensitäten der Oberflächenproteine wurden auf die Signalintensitäten entsprechender Proteine im Lysate normalisiert. Die berechneten Werte für Wildtyp-Kontrollen wurden als 100% gesetzt. Die Diagrammbalken repräsentieren den Mittelwert der prozentualen Unterschiede in der Expression der entsprechenden Rezeptorproteine an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone verglichen mit den Wildtyp-Kontrollen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Für die Expression des LRP1 an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone wurde ein Anstieg von 90% ($p=0,01$; $n=4$) berechnet. Für NR1 wurde ein Anstieg von 60% ($p=0,04$; $n=4$) und für NR2B von 44% ($p=0,007$; $n=4$) berechnet. Die Signalintensitäten der Lysatekontrollen wurden auf die Signalintensitäten der Aktin-Signale in entsprechenden Gelspuren normalisiert. * $p<0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert, zweiseitiger Studentischer *t*-Test.

Wie in den Abbildungen 2A und 2B demonstriert, werden die NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1 und NR2B auf der Zelloberfläche primärer

LRP1 Δ NPxY2 Neurone verstärkt exprimiert, während ihre Expressionsraten in den Zelllysaten keine signifikanten Änderungen zeigen. Für die Untereinheit NR2A konnten keine signifikanten Änderungen in der Expressionsrate im Zelllysate oder an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 2A, B). Die anschließende densitometrische Analyse mehrerer Western Blots demonstrierte einen 90%igen Anstieg der Expressionsrate von LRP1 an der Zelloberfläche (Abb. 2B; $p=0,01$, $n=4$) der LRP1 Δ NPxY2 Neurone verglichen mit den Wildtyp-Kontrollen. Die Expressionsraten der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1 und NR2B sind an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone um 60% ($p=0.007$; $n=4$) bzw. um 44% ($p=0,04$; $n=4$) erhöht (Abb. 2B). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Einschränkung in der Funktionalität des LRP1 NPxY2 Motivs durch die *knock-in* Mutation in einer Veränderung der Expressionsraten des LRP1 und des NR2B Rezeptorsubtyps an der Zelloberfläche primärer Neurone resultiert.

4.3 LRP1 und NR1/NR2B-Rezeptoruntereinheiten demonstrieren verminderte Internalisierungsraten in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen

Zur Erklärung des beobachteten Anstiegs der Expressionsraten beider Rezeptoren an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone können zwei Erklärungsansätze herangezogen werden. Einerseits kann der Anstieg durch einen verstärkten Transport der Proteine zur Zelloberfläche und andererseits durch die verminderte Internalisierungsrate der Proteine erklärt werden. Zur Überprüfung dieser Ansätze wurden die Neurone mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt. Eine Behandlung mit Cycloheximid führt zur verminderten Proteinexpression in der Zelle und dem entsprechend zum verminderten Transport von neu synthetisierten Proteinen zur Zelloberfläche. Da die Proteine weiterhin internalisiert und degradiert werden, sollte eine niedrigere Endozytoserate sich als eine verstärkte Restexpression der Proteine an der Zelloberfläche nach einer CHX-Behandlung manifestieren. Die primären kortikalen Neurone (DIV14) wurden mit 20 $\mu\text{g/ml}$ CHX für vier, sechs und acht Stunden behandelt, lysiert und die Expression von LRP1 und NR1/NR2B mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung und des Western Blots untersucht. Wie in der Abbildung 3A demonstriert, zeigen die LRP1 Δ NPxY2 Neurone im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen einen signifikanten Anstieg der Restexpression von LRP1 und NR1/NR2B NMDA-Rezeptoruntereinheiten an der Zelloberfläche nach einer CHX-Behandlung. Die stärksten Effekte wurden nach

sechs Stunden Behandlung mit CHX beobachtet. Eine quantitative Auswertung mehrerer Western Blots zeigte, dass nach 6h CHX-Behandlung die Expression von LRP1 um 94% ($p=0,02$; $n=6$), von NR1 um 58% ($p=0,03$; $n=6$) und von NR2B um 51% ($p=0,032$; $n=6$) an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen gesteigert war. Für die Expression der NR2A-Rezeptoruntereinheit konnten keine signifikanten Änderungen zwischen den Genotypen nachgewiesen werden (Abb.3A-C). Eine Untersuchung der Änderungen in den Expressionsraten der Rezeptorproteine in den Zelllysaten demonstrierte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3C).

Interessanterweise zeigen die NR1 und NR2B-Rezeptoruntereinheiten einen ähnlich starken Anstieg der restlichen Expression auf der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone nach der CHX-Behandlung (Abb. 3B).

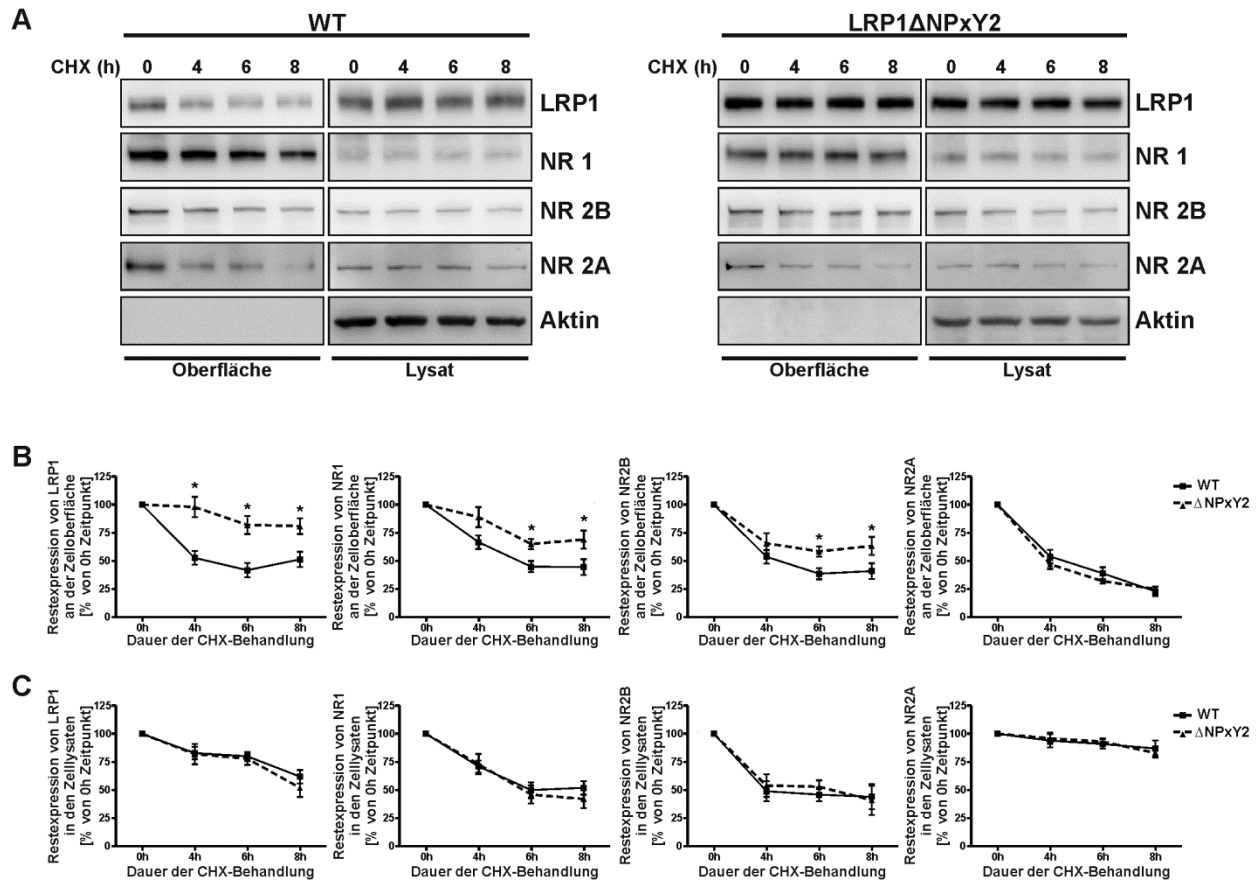


Abbildung 3. Nach einer Behandlung mit CHX ist die restliche Expression von LRP1 und NR1/NR2B an der Zelloberfläche primärer LRP1ΔNPxY2 gesteigert.

(A) Die Western Blots demonstrieren eine verstärkte Restexpression der LRP1 und NR1/NR2B Rezeptoren an der Zelloberfläche primärer LRP1ΔNPxY2 Neurone nach einer Behandlung mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX). Die primären kortikalen Neurone am DIV14 wurden für 4h, 6h und 8h mit 20 µg/ml CHX behandelt, anschließend bei 4°C biotinyliert und lysiert. Die biotinylierten Proteine wurden mit NeutrAvidin Agarose präzipitiert und mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot untersucht. **(B)** Die Proteinexpression an der Zelloberfläche der Neurone wurde mit Hilfe densitometrischer Analyse mehrerer Western Blots quantifiziert. Die Signalintensitäten der Oberflächenproteine wurden auf die Intensitäten entsprechender Proteine im Lysat normalisiert. Die berechneten Werte für 0h Zeitpunkte wurden als 100% gesetzt. Die Diagrammpunkte repräsentieren den Mittelwert der prozentualen Unterschiede in der Expression der entsprechenden Rezeptorproteine an der Zelloberfläche primärer LRP1ΔNPxY2 oder Wildtyp Neurone nach einer Behandlung mit CHX. Die berechneten Werte für LRP1ΔNPxY2 Neurone wurden anschließend mit den Werten der Wildtyp-Kontrollen verglichen. Die Wildtyp-Kontrollen wurden dabei als 100% definiert. Die Berechnung der Expressionsraten an der Zelloberfläche der LRP1ΔNPxY2 Neurone nach einer Behandlung mit CHX demonstrierte für LRP1 einen Anstieg um 89% ($p=0,03$; $n=3$) nach 4h, um 94% ($p=0,02$; $n=6$) nach 6h und um 59% ($p=0,043$; $n=3$) nach 8h. Die Expression von NR1 nach der Behandlung mit CHX stieg um 33% ($p=0,073$; $n=4$) nach 4h, um 58% ($p=0,03$; $n=6$) nach 6h und um 67% ($p=0,042$; $n=5$) nach 8h. Die restliche Expression von NR2B stieg an der Zelloberfläche der LRP1ΔNPxY2 Neurone im Vergleich zum Wildtyp um 22% ($p=0,06$; $n=4$) nach 4h, um 51% ($p=0,032$; $n=6$) nach 6h und um 54% ($p=0,04$; $n=4$) nach 8h an. **(C)** Für die Expression der NR2A-Rezeptoruntereinheit sowie für die untersuchten Proteine in den Zelllysaten konnten keine signifikanten Abweichungen zwischen LRP1ΔNPxY2 und Wildtyp Neuronen festgestellt werden. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. * $p<0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert, zweiseitiger Studentischer t -Test.

Die Behandlung mit CHX demonstrierte, dass der beobachtete Anstieg der Expression von LRP1 und NR1/NR2B an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone nicht auf einen verstärkten Transport zur Zelloberfläche oder eine verminderte Degradierungsrate der Proteine zurückzuführen ist. Dadurch wurde die Hypothese von der verminderten Internalisierungsrate beider Rezeptoren in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen bekräftigt.

Die Internalisierungsraten beider Rezeptorproteine wurden mit Hilfe des spaltbaren Sulfo-NHS-SS-Biotins in Internalisierungsexperimenten untersucht. Dazu wurde die Oberfläche primärer Neurone mit spaltbarem Sulfo-NHS-SS-Biotin markiert. Die Behandlung erfolgte auf Eis, um die Internalisierung zu unterbinden. Anschließend wurden die Neurone für 7min oder 15min in den Brutschrank überführt, um die Internalisierung zu induzieren. Danach wurden die Schalen wieder auf Eis platziert, um die Internalisierung zu stoppen, und das Biotin wurde durch eine Behandlung mit Mercapto-Ethansulfonat-Natrium (MesNa) von der Zelloberfläche abgespalten. Diese Vorgehensweise stellte sicher, dass die biotinylierten Proteine, die anschließend durch eine Präzipitation mit NeutrAvidin-Agarose isoliert wurden, ausschließlich von dem Internalisierungsvorgang stammen. Die Oberflächenbiotinylierung und anschließende Dissoziation von Biotin wurden durch zwei Kontrollen sichergestellt. Die Biotinylierungskontrolle wurde biotinyliert und während des gesamten Experiments auf Eis belassen, ohne das Biotin anschließend durch MesNa zu dissoziieren. Die Quantifizierungen der Western Blots dieser Kontrolle lieferten den 100%-Wert für die späteren Berechnungen. Die Dissoziationskontrolle wurde ebenfalls biotinyliert und auf Eis belassen, allerdings wurde sie anschließend mit MesNa behandelt. Die Quantifizierungen von Western Blots dieser Kontrolle lieferten den 0%-Wert für die späteren Berechnungen und erlaubten das Hintergrundsignal des Experiments zu ermitteln. Beide Kontrollen wurden nicht bei 37°C inkubiert, sodass keine Internalisierung stattfinden konnte. Die errechneten Internalisierungsraten setzen sich folgenderweise zusammen. Alle Werte wurden auf die Hintergrundsignale durch die Subtraktion von Werten der 0%-Kontrolle korrigiert. Die resultierenden Werte für die Internalisierungsansätze wurden durch die entsprechenden 100%-Werte der Biotinylierungskontrollen dividiert. Der resultierende Wert stellt die Internalisierungsrate dar, also den internalisierten Anteil an Protein von dem gesamten an der Oberfläche markierten Proteinpool.

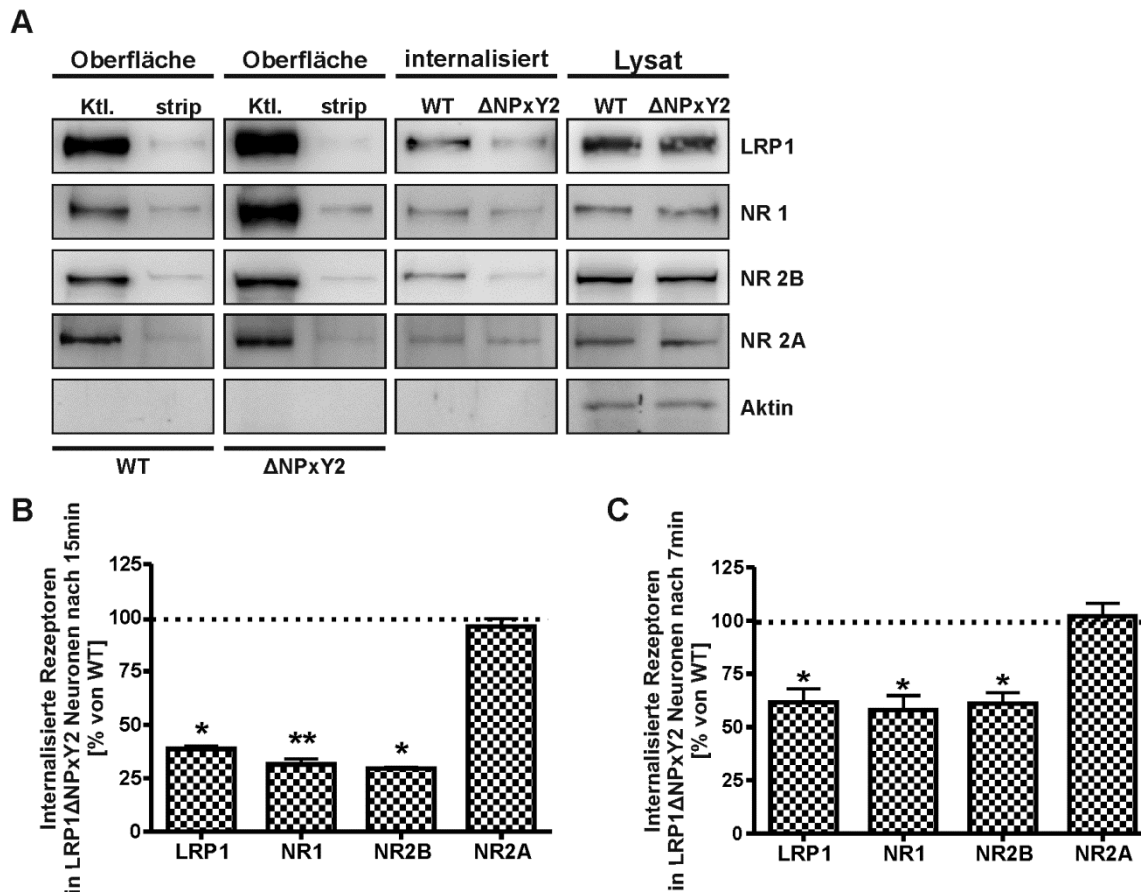


Abbildung 4. Die Akkumulation der LRP1 und NR1/NR2B Rezeptorproteine an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone ist auf reduzierte Internalisierungsraten dieser Proteine in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen zurückzuführen.

(A) Die Internalisierungsraten wurden durch eine Markierung der Oberflächenproteine mit spaltbarem NHS-SS-Biotin ermittelt. Die Western Blots in den Tafeln „Oberfläche“ demonstrieren, dass eine Behandlung mit MesNa-Puffer zur Dissoziation von NHS-SS-Biotin von der Zelloberfläche führt. Die Tafeln „internalisiert“ zeigen die Mengen an Rezeptorproteinen, die nach einer Inkubation für 15min bei 37°C internalisiert wurden. Die Tafeln „Lysat“ belegen, dass die gleichen Mengen von untersuchten Proteinen für das Experiment eingesetzt wurden. **(B)** Die Mengen an internalisierten Proteinen wurden mit Hilfe densitometrischer Analyse mehrerer Western Blots quantifiziert. Die Internalisierungsraten wurden durch die Division der Werte für den gesamten an der Oberfläche biotinylierten Proteinpool (Ktl.) durch die Werte für die internalisierten Proteine (internalisiert) ermittelt. Vorher wurden die Werte auf die entsprechenden Hintergrundsignale („strip“) korrigiert. Die Internalisierungsraten der Wildtyp-Kontrollen wurden als 100% gesetzt. Die Diagrammbalken repräsentieren den Mittelwert der prozentualen Unterschiede in den Internalisierungsraten entsprechender Rezeptorproteine in primären LRP1 Δ NPxY2 Neuronen verglichen mit den Internalisierungsraten der Wildtyp-Kontrollen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Für die Internalisierungsraten in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen nach 15min Internalisierungszeit wurde für LRP1 eine Reduktion von 61% ($p=0,01$; $n=5$); für NR1 eine Reduktion von 69% ($p=0,001$; $n=5$) und für NR2B eine Reduktion von 70% ($p=0,016$; $n=5$) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen ermittelt. **(C)** Für die Internalisierungsraten in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen nach 7min Internalisierungszeit wurde für LRP1 eine Reduktion von 38% ($p=0,043$; $n=4$); für NR1 eine Reduktion von 42% ($p=0,04$; $n=4$) und für NR2B eine Reduktion von 39% ($p=0,044$; $n=5$) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen ermittelt. * $p<0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert, zweiseitiger Studentischer t -Test.

Wie in der Abbildung 4 dargestellt, zeigen die LRP1 Δ NPxY2 Neurone eine verminderte Internalisierungsrate für LRP1 und NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1 und NR2B. Eine quantitative Auswertung der Daten demonstrierte eine 61%ige ($p=0,01$; $n=6$) Reduktion der Internalisierungsraten für LRP1 und 69%ige ($p=0,001$; $n=6$) bzw. 70%ige ($p=0,02$; $n=5$) Reduktion der Internalisierungsraten für NR1 und NR2B in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen verglichen mit den Wildtyp-Kontrollen (Abb. 4A, B). Für die untersuchten Rezeptoren LRP1 und NR2B wurde eine relativ schnelle Recycling-Rate in der Literatur beschrieben, so könnte eine verstärkte Recycling-Rate einen weiteren Erklärungsansatz für die beobachtete Reduktion der Internalisierungsraten in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen darstellen (Chen and Roche 2007). Im Internalisierungsexperiment mit spaltbarem Biotin würde eine verstärkte Recycling-Rate der Proteine nach einer längeren Internalisierungszeit (15min) dazu führen, dass mit Biotin markierte Proteine bereits zurück zur Oberfläche transportiert werden. Dies würde sich als eine scheinbare Reduktion der Internalisierungsraten manifestieren. Im Gegensatz dazu, würde bei einer Untersuchung der Internalisierungsraten nach einer kürzeren Zeitspanne eine verstärkte Recycling-Rate als eine scheinbar verstärkte Internalisierungsrate erscheinen. Diese Annahme wurde überprüft, indem eine kürzere Zeitspanne von 7min für die Internalisierung gewählt wurde. Die ermittelten Internalisierungsraten für LRP1 und NR1/NR2B-Rezeptoruntereinheiten waren bereits nach dieser kurzen Zeitspanne in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen signifikant reduziert (Abb. 4C). Diese Resultate widersprechen der Annahme von den verstärkten Recycling-Raten von LRP1 und NR1/NR2B in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen, da sie die gleiche Tendenz zur Reduktion der Internalisierungsraten zeigen. Darüber hinaus wurden in der Untersuchung der Internalisierungsraten von NR2A Rezeptoreinheit keine signifikanten Unterschiede zwischen LRP1 Δ NPxY2 und Wildtyp-Neuronen festgestellt. Dies demonstriert, dass die beobachteten Effekte der *knock-in* Mutation in LRP1 spezifisch für LRP1 und NR1/NR2B-Rezeptoruntereinheiten sind. Diese Ergebnisse belegen, dass die beobachtete verstärkte Expression von LRP1 und NR1/NR2B Rezeptoren an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone auf eine verminderte Internalisierungsrate zurückzuführen ist.

4.4 Die NR2B-Rezeptoruntereinheit weist ein verändertes Phosphorylierungsmuster in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen auf

Die Regulierung der Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit an der Zelloberfläche wird hauptsächlich durch die Phosphorylierungen der Aminosäuren Serin 1480 (S1480) und Tyrosin 1472 (Y1472) vermittelt. Eine verstärkte Phosphorylierung an S1480 und gleichzeitige Dephosphorylierung an Y1472 innerhalb der NR2B-Aminosäuresequenz dient als ein Signal für die Internalisierung der NR2B-Rezeptoruntereinheit (Sanz-Clemente 2010).

4.4.1 Die Internalisierungssignale der NR2B-Rezeptoruntereinheit sind in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen verstärkt aktiviert

Die Phosphorylierung entsprechender Positionen wurde in den Lysaten und an der Zelloberfläche primärer kortikaler Neurone untersucht. Dazu wurden die Oberflächenproteine primärer kortikaler Neurone mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung markiert und nach einer Präzipitation mit NeutrAvidin-Agarose durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Phosphorylierung der NR2B-Untereinheit an den Positionen pS1480 oder pY1472 wurde mit Hilfe phosphorylierungsspezifischer polyklonaler Antikörper detektiert. Parallel wurde die gesamte Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit mit einem Antikörper, der sie unabhängig vom Phosphorylierungsstatus detektiert, ermittelt. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden mehrere Western Blots quantifiziert und die Signalintensitäten phosphorylierungsspezifischer Antikörper auf die der gesamten NR2B-Expression normalisiert.

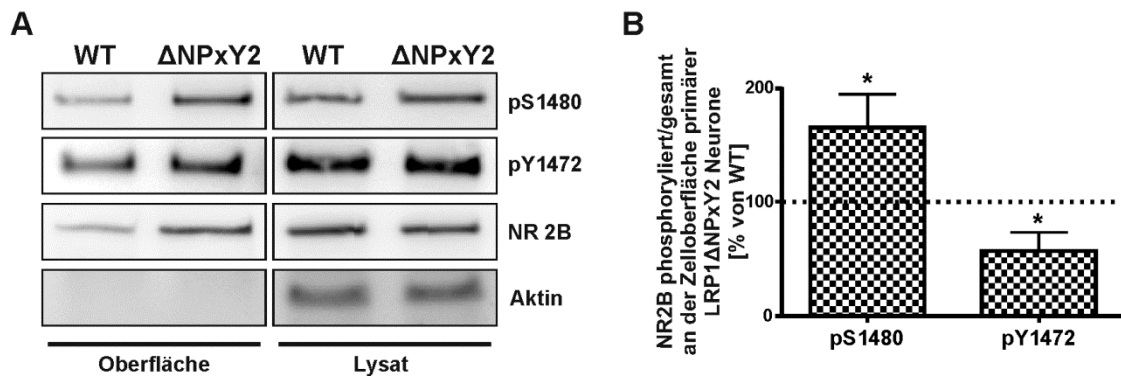


Abbildung 5. Die Mutation im NPxY2 Motiv von LRP1 führt zu einem veränderten Phosphorylierungsmuster an Positionen S1480 und Y1472 der NR2B-Rezeptoruntereinheit an der Oberfläche primärer LRP1ΔNPxY2 Neurone.

(A) Western Blots demonstrieren eine verstärkte Phosphorylierung an der Position S1480 in der NR2B-Rezeptoruntereinheit an der Zelloberfläche primärer LRP1ΔNPxY2 Neurone, während die Phosphorylierung der Position Y1472 unverändert erscheint. Primäre kortikale Neurone von LRP1ΔNPxY2 oder Wildtyp Tieren am DIV14 wurden bei 4°C biotinyliert und lysiert. Die biotinylierten Proteine wurden mit NeutrAvidin Agarose präzipitiert und mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot untersucht (*Oberfläche*, linke Tafeln). Als Ladekontrollen wurden jeweils 15 µg der Gesamtproteine aus dem Zelllysat eingesetzt (*Lysat*, rechte Tafeln). Die phosphorylierten Proteine wurden mit entsprechenden phosphorylierungsspezifischen Antikörpern nachgewiesen. Parallel wurden die gleichen Mengen an präzipitierten Oberflächenproteinen auf dasselbe SDS-PAGE Gel geladen und mit einem phosphorylierungsunspezifischen NR2B-Antikörper nachgewiesen. Die densitometrischen Analysen dieser Western Blots lieferten die Werte für die gesamte Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit an der Zelloberfläche primärer Neurone. **(B)** Die Proteinexpression an der Zelloberfläche der Neurone wurde mit Hilfe densitometrischer Analyse mehrerer Western Blots quantifiziert. Die Signalintensitäten der Oberflächenproteine wurden auf die Intensitäten entsprechender Proteine im Lysat korrigiert. Zusätzlich wurden die Signale der phosphorylierten Proteine auf die Werte der Western Blots von phosphorylierungsunspezifischem NR2B-Antikörper normalisiert. Die berechneten Werte für Wildtyp-Kontrollen wurden als 100% gesetzt. Die Diagrammbalken repräsentieren den Mittelwert der prozentualen Unterschiede in der Phosphorylierung entsprechender Positionen an der Zelloberfläche primärer LRP1ΔNPxY2 Neurone verglichen mit den Wildtyp-Kontrollen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Für die Phosphorylierung an der Position S1480 wurde ein Anstieg von 64% ($p=0,04$; $n=4$) an der Zelloberfläche der LRP1ΔNPxY2 Neurone ermittelt. Durch die Normalisierung der Werte für die Position Y1472 an die Gesamtexpression der NR2B-Rezeptoruntereinheit an der Zelloberfläche wurde eine Reduktion der Y1472 Phosphorylierung um 44% ($p=0,03$; $n=4$) berechnet. $*p<0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert, zweiseitiger Studentischer t -Test.

Wie in der Abbildung 5 demonstriert, weisen die NR2B-Rezeptoruntereinheiten an der Oberfläche primärer LRP1ΔNPxY2 Neurone ein von den Wildtyp-Kontrollen abweichendes Phosphorylierungsmuster auf. Die Phosphorylierungsrate von Serin S1480 ist an der Zelloberfläche der LRP1ΔNPxY2 Neurone um 64% ($p=0,04$; $n=4$) gesteigert, während die Tyrosin-Phosphorylierung an der Position Y1472 um 44% ($p=0,03$; $n=4$) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen reduziert ist.

4.4.2 Die Expression und die Regulierung der CKII und Fyn Kinasen demonstrieren in den LRP1 Δ NPxY2-Neuronen keine Abweichungen

Als eine mögliche Erklärung in der Abbildung 5 dargestellter Ergebnisse könnte eine veränderte Expressions- oder Aktivierungsrate der entsprechenden Kinasen betrachtet werden. Die Position S1480 wird durch die Kasein Kinase II phosphoryliert (Sanz-Clemente 2010), während die Position Y1472 durch die Fyn Kinase phosphoryliert wird (Suzuki and Okumura-Noji 1995). Die Expressionsraten dieser Kinasen wurden in den Lysaten primärer Wildtyp und LRP1 Δ NPxY2 Neurone untersucht. Wie in der Abbildung 6 demonstriert, konnten keine Unterschiede in den Expressionsraten der CKII oder Fyn Kinasen zwischen Wildtyp und LRP1 Δ NPxY2 Neuronen nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist die Phosphorylierungsrate des Aktivierungssignals Y418 der Fyn Kinase (Lin 2004) ebenfalls nicht verändert (Abb. 6), was auf eine unveränderte Aktivität der Kinase in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen hindeutet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die beobachteten Abweichungen im Phosphorylierungsmuster der NR2B-Rezeptoruntereinheit in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen vermutlich nicht auf eine veränderte Aktivität oder Expressionsrate der zuständigen Kinasen zurückzuführen ist.

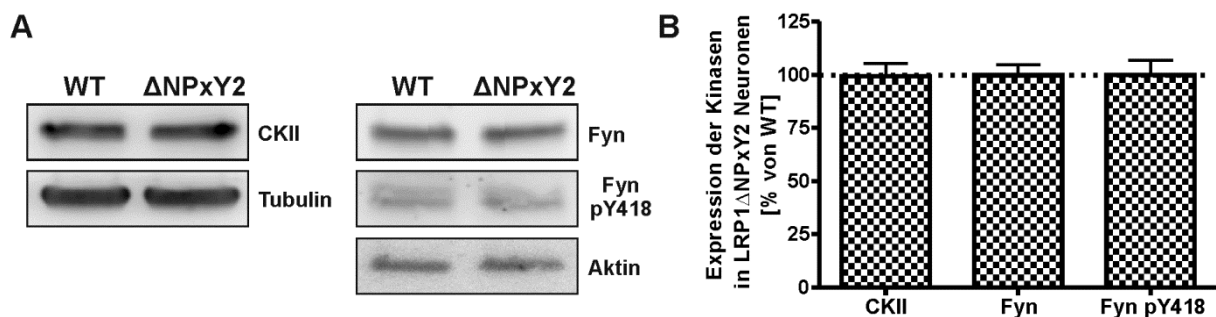


Abbildung 6. Die Expressions- und die Aktivierungsraten von Kasein Kinase II und Fyn sind in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen nicht verändert. **(A)** Die repräsentativen Western Blots demonstrieren, dass die Proteinexpression der Kasein Kinase II (CKII) und Fyn in den Zelllysaten der LRP1 Δ NPxY2 Neurone im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert ist. Die Aktivierungsrate der Fyn Kinase, ermittelt anhand der Phosphorylierungsrate des Aktivierungssignals Y418, ist ebenfalls nicht verändert. Jeweils 15 μ g der Gesamtproteine aus dem Zelllysat wurden eingesetzt. **(B)** Densitometrische Auswertung mehrerer Western Blots zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpressionsrate oder der Phosphorylierung der CKII und Fyn Kinasen. Die ermittelten Werte für Wildtyp-Kontrollen wurden als 100% gesetzt. Die Diagrammbalken repräsentieren den Mittelwert der prozentualen Unterschiede in der Expression entsprechender Proteine im Zelllysat der LRP1 Δ NPxY2 Neurone verglichen mit den Wildtyp-Kontrollen.

Unter Berücksichtigung oben dargelegter Daten von Sanz-Clemente (2010) kann das nachgewiesene Phosphorylierungsmuster der NR2B-Rezeptoruntereinheit an der

Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone als eine verstärkte Aktivierung der Internalisierungssignale interpretiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Internalisierungsrate der NR2B-Untereinheiten in den LRP1 Δ NPxY2 Neuronen trotz aktivierter Internalisierungssignale reduziert ist.

4.5 LRP1 bindet stärker an die NR2B-Rezeptoruntereinheit in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen

Trotz der verstärkt aktivierten Internalisierungssignale der NR2B-Rezeptoruntereinheit, akkumulieren NR1 und NR2B-Rezeptoruntereinheiten an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone. Die beobachtete Akkumulation konnte in vorangegangenen Experimenten mit einer reduzierten Internalisierungsrate der NR1/NR2B-Rezeptoruntereinheiten erklärt werden. Die demonstrierten Ergebnisse indizieren eine Rolle von LRP1 im Internalisierungsprozess von NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1 und NR2B. Ein funktionelles Zusammenspiel beider Rezeptoren wurde bereits in der Literatur demonstriert (May 2004; Martin 2008; Liu 2010). Einen mechanistischen Erklärungsansatz für die Reduktion der Internalisierungsraten dieser Rezeptoruntereinheiten könnten mögliche Abweichungen in den Interaktionseigenschaften der NMDA-Rezeptoruntereinheiten mit LRP1 in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen liefern. Dieser Ansatz wurde mit Hilfe der Co-Immunopräzipitationstechnik untersucht. Dazu wurden die Lysate primärer Neurone über Nacht mit einem LRP1-spezifischen polyklonalen Antikörper 1704 (Pietrzik 2002) und Protein G-Sepharose (GE Healthcare) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch das Erhitzen für 5 min bei 95°C in SDS-Puffer von der Sepharose eluiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit NR1- bzw. NR2B-spezifischen monoklonalen Antikörpern. Diese Vorgehensweise stellte sicher, dass die detektierte NR1- bzw. NR2B-Rezeptoruntereinheiten zusammen mit LRP1 präzipitiert wurden.

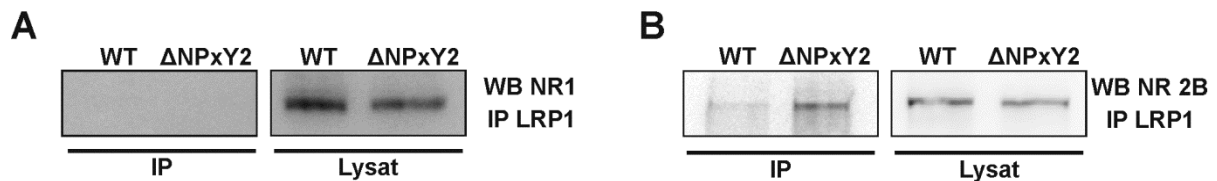


Abbildung 7. LRP1 interagiert mit NR2B, aber nicht mit NR1. Die Bindung von NR2B an LRP1 ist in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen stärker.

(A) NR1 bindet nicht an LRP1. Der repräsentative Western Blot demonstriert, dass die NR1 Rezeptoruntereinheit nicht mit LRP1 co-immunopräzipitiert werden konnte. **(B)** LRP1 bindet stärker an die NR2B-Rezeptoruntereinheit im Zelllysate der LRP1 Δ NPxY2 Neurone. Der repräsentative Western Blot zeigt, dass mehr NR2B-Protein mit LRP1 Δ NPxY2 im Vergleich zu LRP1 aus Wildtyp-Kontrollen co-immunopräzipitiert wird. Die primären kortikalen LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp Neurone am DIV14 wurden lysiert und die gleichen Mengen an Gesamtprotein aus den Lysaten (80 μ g) mit dem C-terminalen LRP1-spezifischen polyklonalen Antikörper 1704 und 30 μ l Protein G Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Erhitzen im 2 x SDS Puffer bei 95°C für 5 min von der Sepharose eluiert und mit Hilfe der SDS-PAGE und Western Blot Techniken analysiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem NR2B- bzw. NR1-spezifischen monoklonalen Antikörper.

Wie in der Abbildung 7A demonstriert, konnte kein NR1-Rezeptorprotein in der Immunopräzipitation mit LRP1-spezifischem Antikörper nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass NR1 vermutlich nicht an LRP1 bindet. Eine Untersuchung der Interaktion von NR2B und LRP1 in LRP1 Δ NxY2 oder Wildtyp Neuronen hat gezeigt, dass wesentlich größere Mengen an NR2B-Rezeptorprotein mit LRP1 Δ NPxY2 als mit Wildtyp LRP1 präzipitiert werden (Abb. 7B). Dieses Ergebnis weist auf eine stärkere Bindung zwischen LRP1 Δ NPxY2 und der NR2B-Rezeptoruntereinheit in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen hin.

4.6 Die Interaktion zwischen LRP1 und NR2B wird durch die Phosphorylierung reguliert

Die Alanin Substitution im NPxY2 Motiv von LRP1 resultiert in einer stärkeren Bindung zwischen LRP1 und NR2B. Dies lässt auf ein mögliches Zusammenspiel beider NPxY Motive von LRP1 in Hinsicht auf ihre Bindungseigenschaften schließen. Der Erklärungsansatz wird von früheren Untersuchungen der Bindungseigenschaften der NPxY Motive unterstützt. In diesen Arbeiten wurde demonstriert, dass die Mehrheit der Interaktionspartner an die NPxY Motive von LRP1 bindet, wenn die Tyrosine in den Motiven phosphoryliert sind (Guttman 2009). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung der Motive sequenziell verläuft. Das NPxY1 Motiv kann erst dann phosphoryliert werden, wenn das NPxY2 Motiv bereits phosphoryliert wurde (Betts 2008). Eine Untersuchung der Effekte einer Dephosphorylierung von

LRP1 und NR2B auf die Interaktion beider Rezeptoren würde damit die Rückschlüsse auf die Rolle einer Phosphorylierung in diesem Prozess erlauben. Dazu wurden die Neurone lysiert und die Lysate durch eine Behandlung mit der intestinalen alkalischen Kälberphosphatase (CIP; 10 U/ μ g Protein) für 30 min bei 37°C dephosphoryliert. Die Effektivität der Dephosphorylierung wurde durch eine SDS-PAGE und Western Blot Analyse überprüft. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit einem phosphorylierungsspezifischen polyklonalen LRP1 Antikörper, der gegen pY4507 im NPxY2 Motiv gerichtet ist.

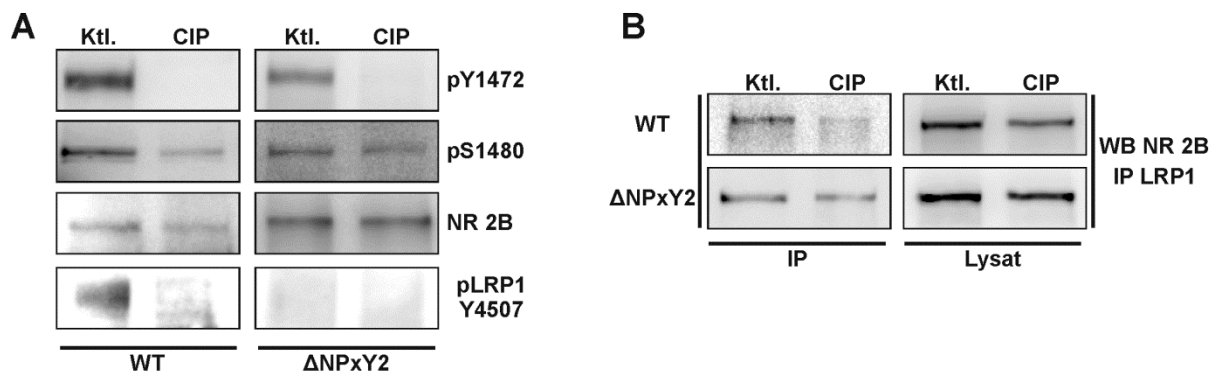


Abbildung 8. Die Interaktion zwischen LRP1 und NR2B wird durch die Phosphorylierung reguliert.

(A) Die repräsentativen Western Blots demonstrieren, dass eine Behandlung mit der intestinalen Kälber-Phosphatase (CIP) zu einer vollständigen Dephosphorylierung der Tyrosine Y4507 in LRP1 und Y1472 in NR2B führte. Eine restliche Phosphorylierung am Serin S1480 im NR2B konnte nach CIP-Behandlung detektiert werden. Die Lysate primärer LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp Neurone am DIV14 wurden für 30 min mit 10U/ μ g Protein CIP bei 37°C behandelt. Jeweils 15 μ g der Gesamtproteine aus dem Zelllysat wurden für die SDS-PAGE eingesetzt. Der immunologische Nachweis erfolgte mit den phosphorylierungsspezifischen Antikörpern. **(B)** Die repräsentativen Western Blots zeigen, dass eine Dephosphorylierung der Proteine in den Zelllysaten der Wildtyp Neuron zur Reduktion der Mengen an NR2B-Protein, die mit LRP1 co-immunopräzipitiert werden, führt. Im Gegensatz dazu, zeigt die Dephosphorylierung keinen Effekt auf die Mengen des NR2B-Rezeptorproteins, die mit LRP1 Δ NPxY2 co-immunopräzipitiert wurden. Jeweils 80 μ g des Gesamtproteins aus den CIP-behandelten oder unbehandelten Kontrollen wurden für die Immunopräzipitation eingesetzt.

Wie in der Abbildung 8A gezeigt ist, konnte kein spezifisches Signal für pY4507 nach der CIP-Behandlung im Lysat primärer Wildtyp Neurone detektiert werden. In den Lysaten primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone konnten weder vor, noch nach der CIP-Behandlung pY4507-spezifischen Signale nachgewiesen werden, da diese Position in der Aminosäuresequenz aufgrund der *knock-in* Mutation nicht mehr existiert (Abb. 8A, unterste Tafel). Die Dephosphorylierung der NR2B-Rezeptoruntereinheit wurde mit oben beschriebenen Antikörpern gegen pS1480 und pY1472 untersucht. Wie in

der Abbildung 8A dargestellt ist, führt eine CIP-Behandlung zu einer vollständigen Dephosphorylierung des Tyrosins Y1472 in der NR2B-Rezeptoruntereinheit, während eine restliche Phosphorylierung am Serin S1480 zu beobachten ist (Abb. 8A obere Tafeln). Dieses Ergebnis deutet auf eine größere Spezifität von CIP für die phosphorylierten Tyrosine unter gewählten Bedingungen hin. Nach der Validierung der CIP-Behandlung wurden die Effekte der Dephosphorylierung auf die Interaktion von LRP1 und NR2B mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation in den Lysaten der LRP1 Δ NPxY2 Neurone und Wildtyp-Kontrollen untersucht. Dazu wurden die Lysate mit LRP1-spezifischen 1704 Antikörper (Pietrzik 2002) und Protein G-Sepharose über Nacht inkubiert. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit einem NR2B-spezifischen monoklonalen Antikörper. Wie in der Abbildung 8B demonstriert, führt eine CIP-Behandlung der Lysate primärer Wildtyp-Neurone zu einer drastischen Reduzierung der Mengen an NR2B-Protein, die mit LRP1 co-immunopräzipitiert wurden (Abb. 8B, obere Tafeln). Im Gegensatz dazu hat die Dephosphorylierung keinen Effekt auf die Bindung zwischen der NR2B-Rezeptoruntereinheit und LRP1 in Lysaten der LRP1 Δ NPxY2 Neurone (Abb. 8B, untere Tafel). Zusammengefasst bestätigen diese Ergebnisse die Annahme, dass die Interaktion beider Rezeptoren durch die Phosphorylierung der Tyrosine in NPxY Motiven von LRP1 reguliert wird.

4.7 LRP1 Δ NPxY2 Tiere sind hyperaktiv und haben Defizite im direkten und umgekehrten räumlichen Lernvermögen

Die folgenden Verhaltensexperimente wurden an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz von Mariola Bednorz unter Anleitung von Prof. Dr. Ulrich Schmitt durchgeführt.

Die vorangegangenen biochemischen Experimente zeigten eine Veränderung in der Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit in den primären LRP1 Δ NPxY2 Neuronen. Die Studien an den Tieren mit einem neuronalen *knock-out* des gesamten *Lrp1*-Gens demonstrierten Verhaltensdefizite, die auf eine gestörte Funktionalität des NMDA-Rezeptors hindeuten (May 2004; Liu 2010). Im Gegensatz zu den Tiermodellen mit dem neuronalen *knock-out* des gesamten *Lrp1*-Gens, stellt das hier eingesetzte Tiermodell lediglich einen partiellen Funktionsverlust des LRP1-Rezeptors dar. Aus diesem Grund wurde getestet, ob die Alanin Substitution im NPxY2 Motiv von LRP1 signifikante Verhaltens- oder Lerndefizite nach sich zieht.

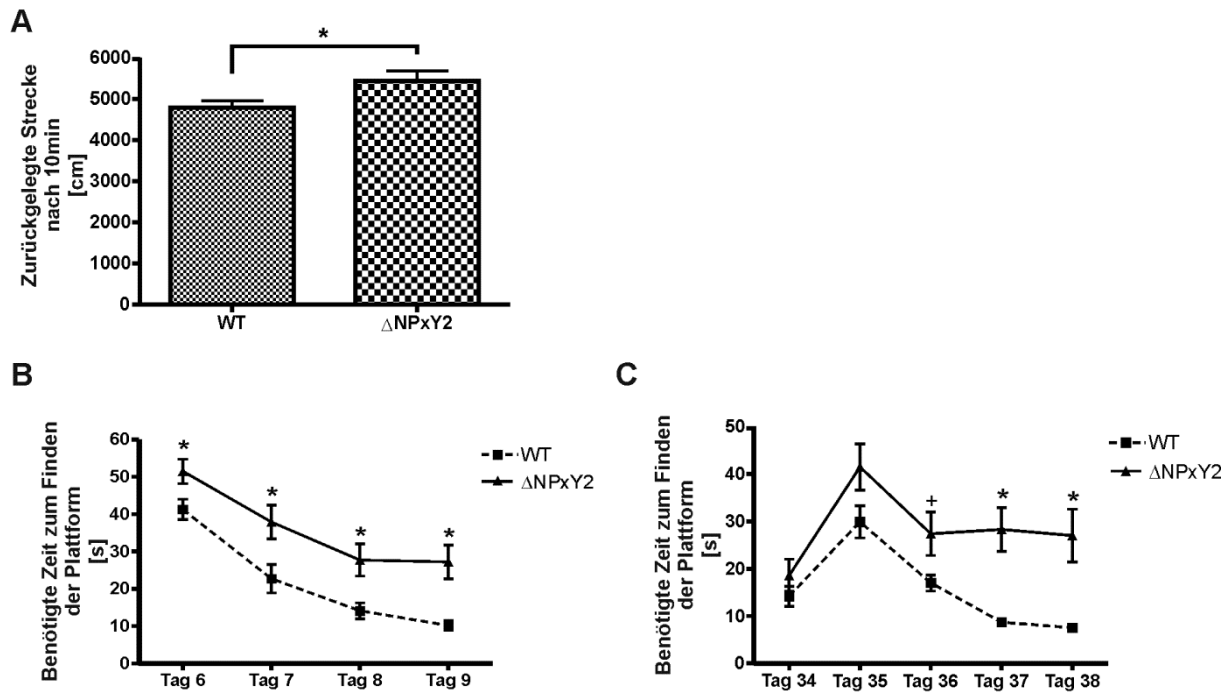


Abbildung 9. Die Tiere mit der *knock-in* Mutation im NPxY2 Motiv von LRP1 sind hyperaktiv und haben Defizite im direkten und umgekehrten räumlichen Lernvermögen.

(A) Die Ermittlung der Aktivität der Tiere in der *open field* Paradigma demonstrierte eine verstärkte Aktivität der LRP1 Δ NPxY2 Mäuse verglichen mit den Wildtyp Geschwistern. Die LRP1 Δ NPxY2 Tiere legten nach 10min im Experiment eine längere Strecke zurück. Die Diagrammbalken repräsentieren den Mittelwert zurückgelegter Strecken nach 10min in cm. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. * $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert, einseitiger ANOVA-Test, für LRP1 Δ NPxY2 $n=11$; für Wildtyp $n=15$. **(B)** Die Ergebnisse des *Morris Water Maze* Tests demonstrieren, dass die LRP1 Δ NPxY2 Tiere längere Zeit benötigen, um die versteckte Plattform im Schwimmbecken zu finden. Die Tiere wurden 4 Tage lang viermal am Tag trainiert. Die Messungen erfolgten an den Tagen 6 bis 9. Die Diagrammpunkte repräsentieren den Mittelwert benötigter Zeit, um die Plattform zu finden, in Sekunden. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert, zweiseitiger ANOVA-Test, für LRP1 Δ NPxY2 $n=11$; für Wildtyp $n=15$. * $p < 0,001$. **(C)** Die Ergebnisse des *Morris Water Maze* Tests mit neuer Positionierung der Plattform zeigen, dass die LRP1 Δ NPxY2 Tiere längere Zeit benötigen, um die neue Position der Plattform im Schwimmbecken zu erlernen. Für das Experiment wurden dieselben Tiere wie im Abschnitt B eingesetzt. Die Plattform wurde neu positioniert. Die Messungen erfolgten an den Tagen 34-38 nach dem Trainingsbeginn. Die Diagrammpunkte repräsentieren den Mittelwert benötigter Zeit in Sekunden, um die neue Position der Plattform zu erlernen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert, zweiseitiger ANOVA-Test, für LRP1 Δ NPxY2 $n=11$; für Wildtyp $n=15$. * $p < 0,001$; + $p = 0,056$

Wie in der Abbildung 9A gezeigt, wurde bei den LRP1 Δ NPxY2 Tieren eine verstärkte Aktivität im *open field* Verhaltensexperiment festgestellt. Dieses Ergebnis deutet auf die Hyperaktivität der LRP1 Δ NPxY2 Tiere hin und demonstriert, dass bereits eine Einschränkung der Funktionalität des NPxY2 Motiv von LRP1 ähnliche Verhaltensdefizite wie ein gesamter neuronaler *Lrp1 knock-out* verursacht (May 2004; Liu 2010).

Die NR2A und NR2B Rezeptorsubtypen sind die häufigste Form der NMDA-Rezeptoren im Hippokampus und Kortex (Yashiro and Philpot 2008). Jegliche Veränderungen in der Expression an der Zelloberfläche, der synaptischen Lokalisierung oder der Aktivität des NR2B Rezeptorsubtyps führen zwangsläufig zu Veränderungen im Lernverhalten und Gedächtnis der Modelltiere (Tang 2009). Darüber hinaus wurden diese Rezeptorsubtypen am häufigsten im Zusammenhang mit der Langzeit-Potenzierung (LTP) der Neurone und folglich mit dem Lernen und Gedächtnis assoziiert (Collingridge and Bliss 1995). Aus diesem Grund wurden die Verhaltensexperimente auf die Untersuchung des räumlichen Lernvermögens der Tiere ausgeweitet. Das Lernverhalten der Tiere wurde mit Hilfe des *Morris Water Maze* Tests (MWM) untersucht. Wie in den Abbildungen 9B und 9C dargestellt, zeigen die LRP1 Δ NPxY2 Tiere signifikante Defizite im direkten und umgekehrten räumlichen Lernvermögen im MWM-Test verglichen mit den Wildtyp-Geschwistern. Diese Verhaltensdefizite werden in der Literatur wiederholt in den Zusammenhang mit einer gestörten Signaltransduktion des NMDA-Rezeptors im hippokampalen und kortikalen Hirnarealen gebracht (Morris 1986; Bannerman 1995; Sakimura 1995; Dalton 2011). Die demonstrierten Verhaltensdefizite der LRP1 Δ NPxY2 Tiere deuten auf eine physiologische Relevanz der Abweichungen in der Zelloberflächenexpression der NR2B-Rezeptoren hin, die in vorangegangenen Experimenten *in vitro* gezeigt wurden.

4.7.1 Die knock-in Mutation in das NPxY2 Motiv von LRP1 führt zu einer verminderten Aktivierung der Erk1/2 und GSK3 α/β Kinasen

Die Ergebnisse vorangegangener Experimente demonstrierten, dass die *knock-in* Mutation in das NPxY2 Motiv von LRP1 in einer verstärkten Expression von LRP1 und NR2B Rezeptors an der Oberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone resultiert. Die beobachteten Änderungen in der Oberflächenexpression beider Rezeptoren konnten mit ihrer verminderten Internalisierungsrate in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen erklärt werden. Darüber hinaus resultiert der beschriebene biochemische Phänotyp der Δ NPxY2 *knock-in* Mutation in Defiziten im Lernverhalten der LRP1 Δ NPxY2 Tiere. Im Hinblick auf diese Ergebnisse wurden molekulare Ursachen für die beobachteten Defizite im Verhalten der Tiere untersucht. Dazu wurden die intrazellulären Signaltransduktionswege der NMDA-Rezeptoren analysiert. Der Signaltransduktionsweg der *extracellular signal regulated kinases 1/2* (Erk1/2) wurde

als ein Signalweg, der unter anderem durch ein Zusammenspiel zwischen LRP1- und NMDA-Rezeptoren reguliert wird, beschrieben (Martin 2008). In Anlehnung an diese Daten wurden die Expression und das Aktivierungsmuster der Erk1/2 in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen und Wildtyp-Kontrollen untersucht.

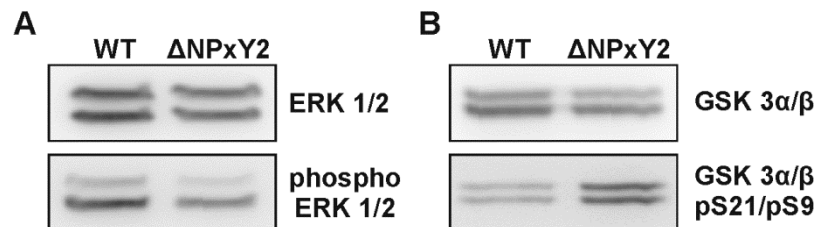


Abbildung 10. Die *knock-in* Mutation in das NPxY2 Motiv von LRP1 führt zu einer verminderten Aktivierung der Erk1/2 und GSK3 α/β Kinasen.

(A) Die repräsentativen Western Blots demonstrieren, dass die Expression der aktiven phosphorylierten Form von *extracellular signal regulated kinases 1/2* (Erk1/2) in primären LRP1 Δ NPxY2 Neuronen reduziert ist, während die basale Expression von Erk1/2 keine Veränderungen zeigt. Die primären LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp Neurone (DIV14) wurden lysiert und jeweils 15 μ g von dem Gesamtprotein aus dem Lysat mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die basale Expression wurde mit Hilfe eines Erk1/2-spezifischen polyklonalen Antikörpers MAPK 42/44 detektiert. Die aktive phosphorylierte Form von Erk1/2 wurde mit einem monoklonalen phospho-spezifischen Antikörper pMAPK 42/44 nachgewiesen. Der Western Blot ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Die Western Blots demonstrieren, dass die Aktivität der Glykogensynthase Kinasen 3 α/β (GSK3 α/β) durch eine verstärkte Phosphorylierung an S21/S9 in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen herabgesetzt ist. Die Basale Expression der Kinasen ist nicht verändert. Die primären LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp Neurone (DIV14) wurden lysiert und jeweils 15 μ g von dem Gesamtprotein aus dem Lysat mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die basale Expression wurde mit Hilfe eines GSK3 α/β -spezifischen polyklonalen Antikörpers GSK3 detektiert. Die inaktive phosphorylierte Form von GSK3 α/β wurde mit einem monoklonalen phospho-spezifischen Antikörper pGSK3 α/β pS21/pS9 nachgewiesen. Der demonstrierten Western Blots sind repräsentative Blots aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Wie in der Abbildung 10A demonstriert, zeigen die LRP1 Δ NPxY2 Neurone keine Unterschiede in der basalen Expression der Erk1/2 Kinasen (Abb. 10A oben). Die Erk1/2 Kinasen werden durch die Phosphorylierung aktiviert (Cargnello and Roux 2011). Die Phosphorylierung der Erk1/2 Kinasen in primären LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp Neuronen wurde mit Hilfe phosphorylierungsspezifischer Antikörper untersucht. Wie in der Abbildung 10 A gezeigt, konnte eine verminderte Menge an aktiven phosphorylierten Erk1/2 Kinasen in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die *knock-in* Mutation in dem NPxY2 Motiv von LRP1 unter anderem zu einer verminderten Aktivierungsrate der Erk1/2 Kinasen in Neuronen führt.

Eine weitere Kinase, die im Zusammenhang mit der Induktion von NMDA-Rezeptor vermittelter Langzeitpotenzierung (LTP) gebracht wurde, ist die Glykogensynthase Kinase 3 (GSK3) (Hooper 2007). Darüber hinaus spielt diese Kinase eine Rolle in der Regulierung der Internalisierungsprozesse der NMDA-Rezeptoren (Chen 2007). In Bezug auf den biochemischen und Verhaltensphänotyp der LRP1 Δ NPxY2 Tiere wurde die Expression und der Aktivierungsstatus dieser Kinase in LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp Neuronen untersucht. Der Western Blot in der Abbildung 10B demonstriert, dass die basale Expression der GSK3 Enzymisoformen α und β in den LRP1 Δ NPxY2 Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen nicht verändert ist (Abb. 10B oben). Die GSK3 α/β Kinasen werden durch die Phosphorylierung an den Positionen Serin 21 (pS21) für GSK3 α und Serin 9 (pS9) für GSK3 β inhibiert (Jope and Johnson 2004). Die Phosphorylierung dieser Positionen wurde mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper untersucht. Wie in der Abbildung 10B dargestellt, konnte eine verstärkte Phosphorylierung der GSK3 Kinasen an diesen Positionen in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 10B unten), Dieses Ergebnis deutet auf eine verminderte Aktivität der GSK3 α/β Kinasen in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen hin.

Diese Resultate verdeutlichen eine verminderte Aktivität der in LTP-Induktion involvierten intrazellulären Signaltransduktionswege (Hooper 2007) in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen. Die beobachteten Effekte der *knock-in* Mutation auf das Lernverhalten der Tiere wurden mittels dieser biochemischer Daten konsolidiert.

Zusammengefasst, deuten die demonstrierten Daten auf einen wichtigen Einfluss vom LRP1 auf die Internalisierung der NR2B-Rezeptoruntereinheit hin. Das Zusammenspiel und die Phosphorylierung der NPxY1 und NPxY2 Motive von LRP1 scheinen in diesem Prozess eine entscheidende regulatorische Rolle zu spielen. Durch die Alanin Substitution im NPxY2 Motiv von LRP1 wird möglicherweise dieser Mechanismus gestört, was in einer stärkeren Bindung zwischen beiden Rezeptoren resultiert. Dadurch wird vermutlich die Endozytoserate von NR2B-Untereinheit in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen reduziert.

5 Diskussion

Eine Reihe bereits publizierter Daten indiziert einen Einfluss von LRP1 auf die Signalübertragung durch NMDA-Rezeptoren (May 2004; Martin 2008; Liu 2010). Die genaue Rolle des LRP1 in diesem Prozess verbleibt allerdings unbekannt. In dieser Arbeit wurde die Rolle des NPxY2 Motivs von LRP1 auf die Expression des NMDA-Rezeptors im Zelllysate und auf der Zelloberfläche primärer kortikaler Neurone untersucht. Dazu wurde die LRP1 Δ NPxY2 *knock-in* Mauslinie, die sich durch eine Alanin Substitution im NPxY2 Motiv des *Lrp1* Gens kennzeichnet, eingesetzt (Roebroek 2006). In Anlehnung an früher publizierten Daten von Liu und Kollegen (2010), die eine signifikant verminderte Zellvitalität sowie eine verminderte Expression der synaptischen Marker Synaptophysin und PSD95 in den primären Neuronen mit einer LRP1 *knock-out* Mutation zeigten, wurden die LRP1 Δ NPxY2 Neurone auf diese Aspekte untersucht. Im Gegensatz zu den Daten von Liu, wurden keine signifikanten Unterschiede in der Zellvitalität sowie in der Expression der synaptischen Marker Synaptophysin und PSD95 in den Zelllysaten primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone festgestellt (Abb. 1). Diese Diskrepanz könnte damit erklärt werden, dass die Alanin Substitution im NPxY2 Motiv einen partiellen Funktionsverlust des LRP1-Rezeptors nach sich zieht und die Effekte der *knock-in* Mutation im NPxY2 Motiv auf die Zellvitalität sowie auf die Anzahl der Synapsen nicht in einem solchen drastischen Maß ausfallen.

Im Rahmen der früheren Charakterisierung der LRP1 Δ NPxY2 Mauslinie wurde eine verminderte Endozytoserate von LRP1 in *mouse embryonic fibroblasts* (MEF) Zelllinie bereits beschrieben (Reekmans 2010). In Anlehnung an diese Ergebnisse konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass die Expression von LRP1 auf der Zelloberfläche primärer kortikaler LRP1 Δ NPxY2 Neurone im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen ebenfalls gesteigert ist (Abb. 2). Zur Erklärung dieser Beobachtung könnte die Tatsache herangezogen werden, dass das NPxY2 Motiv des LRP1 mit dem Internalisierungsmotiv YxxL des Rezeptors überlappt. Die beiden Motive sind in der Aminosäuresequenz des LRP1 in der Reihenfolge NPxYxxL hintereinander angeordnet, sodass das Tyrosin im NPxY2 Motiv ebenfalls zu dem YxxL Motiv gehört (Liu and Rice 2000). Aufgrund dieser Anordnung ist das Internalisierungsmotiv YxxL durch die Alanin Substitution ebenfalls betroffen, was offensichtlich zu einer Reduzierung der Internalisierungsrate von LRP1 in

LRP1 Δ NPxY2-Zellen führt. Überraschenderweise demonstrieren die primären LRP1 Δ NPxY2 Neurone eine verstärkte Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2B und NR1 an der Zelloberfläche, während die Expression der NR2A-Untereinheit unverändert bleibt (Abb. 2). Eine Interaktion zwischen LRP1 und NR2B NMDA-Rezeptoruntereinheit wurde in dieser und in früheren Arbeiten anderer Gruppen belegt (May 2004). Im Gegensatz dazu, existiert kein Nachweis einer Interaktion von LRP1 und der NR1-Rezeptoruntereinheit in der Literatur. Zusätzlich konnte keine Interaktion von NR1 mit LRP1 in dieser Arbeit gezeigt werden (Abb. 7A). Darüber hinaus, wurde die Assoziation anderer NMDA-Rezeptoruntereinheiten mit der NR1 Untereinheit als obligatorisch für den Transport und die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche beschrieben (Perez-Otano 2001; Qiu 2005). Demnach sollte ein Anstieg in der Expressionsrate von NR2B an der Zelloberfläche zwangsläufig zu einem Anstieg der Expression von NR1 führen. Somit könnte angenommen werden, dass die NR2B und NR1-Untereinheiten zu einem NMDA-Rezeptor assoziiert sind. Dementsprechend stellt die beobachtete Steigerung der Expressionsrate von NR1 an der Zelloberfläche vermutlich einen direkten Effekt der gesteigerten Expression von NR2B-Rezeptoruntereinheiten an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone dar. Darüber hinaus wurde die Interaktion der NR2A-Rezeptoruntereinheit mit LRP1 ebenfalls demonstriert (May 2004) Bei der Untersuchung der Expressionsrate dieser Untereinheit im Lysat und an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtyp-Kontrollen festgestellt werden (Abb. 2). Diese Daten deuten darauf hin, dass der gezeigte Anstieg in der Expression der NR2B-Untereinheit an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone einen für diese Rezeptoruntereinheit spezifischen Effekt der *knock-in* Mutation in LRP1 darstellt. Die demonstrierte Interaktion zwischen NR2B und LRP1 (Abb. 7B) sowie bereits beschriebene Reduktion der Internalisierungsraten von LRP1 in LRP1 Δ NPxY2 MEF-Zellen (May 2004; Reekmans 2010) könnten als ein möglicher mechanistischer Erklärungsansatz der beobachteten Akkumulation der Rezeptorproteine LRP1 und NR2B an der Zelloberfläche herangezogen werden. Alternativ könnte eine verstärkte Transportrate dieser Proteine zur Zelloberfläche oder ihre verminderte Degradierungsrate in der Zelle als Erläuterung für die demonstrierten Daten dienen. Diese Hypothesen wurden überprüft, indem die primären kortikalen Neurone mit

Cycloheximid (CHX) behandelt wurden. Das CHX ist ein Inhibitor der Translation in eukaryotischen Zellen. Demnach führt eine Behandlung mit CHX zur Reduktion der Expressionsrate neusynthetisierter Proteine in der Zelle, während die Internalisierung der Proteine von CHX nicht beeinflusst wird. Unter diesen Bedingungen wird der Transport neusynthetisierter Rezeptoren zu der Zelloberfläche reduziert, während die Proteine von der Zelloberfläche weiter internalisiert und anschließend degradiert werden. Eine Behandlung mit CHX erlaubt demnach Aussagen darüber, ob der beobachtete Anstieg der Expression von LRP1 und NR1/NR2B an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone auf eine gesteigerte Transportrate der Proteine zu der Zelloberfläche, eine reduzierte Degradierungsrate der Proteine in den Zellen oder auf eine reduzierte Internalisierungsrate zurückzuführen ist. Nach einer Behandlung mit CHX für 4, 6 oder 8 Stunden wurde ein signifikanter Anstieg der Restexpression von NR1/NR2B und LRP1 an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen beobachtet (Abb. 3B). In den Zelllysaten der LRP1 Δ NPxY2 und Wildtyp Neurone wurden allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Restexpression dieser Proteine festgestellt (Abb. 3C). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass der beobachtete Anstieg in der restlichen Expression von NR1/NR2B und LRP1 an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone vermutlich nicht auf einen gesteigerten Transport dieser Proteine zur Zelloberfläche oder auf eine verlangsamte Degradierung dieser Rezeptorproteine in der Zelle zurückzuführen ist. Die bereits beschriebene Reduktion der Internalisierungsraten von LRP1 in LRP1 Δ NPxY2 MEF-Zellen stellt demnach einen wahrscheinlicheren Erklärungsansatz gezeigter Daten dar (Reekmans 2010).

Eine direkte Messung der Internalisierungsraten von LRP1 und NR1/NR2B in den primären Wildtyp oder LRP1 Δ NPxY2 Neuronen sollte die reduzierte Internalisierung dieser Proteine in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen weiter belegen. Die Internalisierungsraten der Rezeptorproteine wurden in einem Internalisierungsexperiment mit spaltbarem NHS-SS-Biotin bestimmt. Die Ergebnisse dieser Experimente demonstrierten eine signifikante Reduktion der Internalisierungsraten von LRP1 und NR1/NR2B-Rezeptoruntereinheiten in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen. Diese bestätigen außerdem die Hypothese, dass die Akkumulation von LRP1 und NR1/NR2B auf der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone auf eine reduzierte Internalisierungsrate dieser Rezeptoren zurückzuführen ist (Abb. 4). Die Internalisierungsrate der NR2A-

Rezeptoruntereinheiten ist in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen nicht verändert (Abb. 4A, B). Diese Daten bestätigten weiterhin die Annahme, dass die demonstrierten Effekte der *knock-in* Mutation in LRP1 einen spezifischen Effekt auf die NR2B-Rezeptoruntereinheit hat. Zusätzlich wurde die Internalisierungsrate für die untersuchten Rezeptorproteine nach einer kürzeren Zeitspanne von 7min in LRP1 Δ NPxY2 und Wildtyp Neuronen ermittelt. Wie in der Abbildung 4C dargestellt, wurde bereits nach dieser kurzen Zeitspanne eine signifikante Reduktion der Internalisierungsraten für LRP1 und NR1/NR2B, aber nicht für NR2A detektiert. Mit diesem experimentellen Aufbau wurde eine verstärkte Recycling-Rate der Rezeptoren an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone, die sich eventuell als eine apparente Reduktion der Internalisierungsraten manifestieren könnte, ausgeschlossen. Interessanterweise ist die Restexpression der NR1- und NR2B-Rezeptoruntereinheiten an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone nach sechs Stunden Behandlung mit CHX in ähnlicher Rate gesteigert (entsprechend um 58% und um 51% der Restexpression verglichen mit Wildtyp-Kontrollen, Abb. 4). Darüber hinaus zeigen die NR1 und NR2B-Untereinheiten mit 69% bzw. 70% eine ähnliche Reduktion der Internalisierungsraten nach 15min in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Eine Interaktion von LRP1 mit NR1 ist weder in der Literatur belegt noch konnte sie in dieser Arbeit gezeigt werden (Abb. 7A) (May 2004). Zusammengefasst bestätigen diese Daten die oben bereits verfasste Annahme, dass die detektierten Untereinheiten NR1 und NR2B zu einem Rezeptor assoziiert sind. Aus diesem Grund stellen vermutlich die Änderungen in der Expression und Internalisierung der NR1-Rezeptoruntereinheit in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen eher einen Nebeneffekt der verminderten Internalisierungsrate der NR2B-Rezeptoruntereinheit dar.

Die Ergebnisse vorangegangener Experimente verdeutlichen, dass die Alanin Substitution im NPxY2 Motiv von LRP1 zu einer verstärkten Expression der LRP1 und NR1/NR2B Rezeptoren an der Zelloberfläche primärer kortikaler Neurone führt. Dieser Effekt konnte mit einer verminderten Internalisierungsrate dieser Rezeptoren in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen erklärt werden.

Eine regulatorische oder mechanistische Erklärung erhaltener Daten bleibt allerdings immer noch offen. In der Literatur wurde ein Model vorgeschlagen, in dem eine koordinierte Phosphorylierung an zwei Aminosäuren in C-terminaler Sequenz der

NR2B-Rezeptoruntereinheit ihre Expression an der Zelloberfläche primärer Neurone reguliert (Sanz-Clemente 2010). Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um Serin 1480 und Tyrosin 1472 in der Aminosäuresequenz der NR2B-Rezeptoruntereinheit. Das Serin S1480 liegt innerhalb des ESDL-Motivs von NR2B und eine Phosphorylierung an dieser Position durch die Casein Kinase II (CKII) führt zur Unterbrechung der Interaktion mit dem *Post Synaptic Density Protein 95* (PSD 95). Dies zieht unter anderem eine Entfernung der Rezeptoruntereinheit von der Synapse mit anschließender Internalisierung nach sich (Chung 2004; Prybylowski 2005). Das Tyrosin Y1472 liegt innerhalb des YEKL-Internalisierungsmotivs der NR2B-Rezeptoruntereinheit. An dieser Position findet eine Interaktion mit dem Adapterprotein AP2 statt, welche die Clathrin-vermittelte Endozytose ermöglicht. Eine Phosphorylierung an dieser Aminosäure durch die Kinase Fyn unterbindet die Interaktion mit AP2 und stabilisiert dadurch die NR2B-Untereinheit auf der Zelloberfläche (Suzuki and Okumura-Noji 1995; Roche 2001). Demnach dienen eine verstärkte Phosphorylierung an S1480 und eine gleichzeitige Dephosphorylierung an Y1472 innerhalb der NR2B-Aminosäuresequenz als ein Internalisierungssignal. Die Untersuchung entsprechender Phosphorylierungspositionen in den NR2B-Rezeptoruntereinheiten demonstrierte eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung der Position S1480 an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Die Phosphorylierung des Tyrosins Y1472 an der Zelloberfläche von LRP1 Δ NPxY2 Neuronen ist hingegen signifikant reduziert (Abb. 5A, B). In Bezug auf die publizierten Daten zur Regulation der Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit an der Zelloberfläche, sollte dieses Phosphorylierungsmuster zu einer verstärkten Internalisierung des NR2B-Rezeptors in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen führen (Sanz-Clemente 2010). Dennoch weisen die LRP1 Δ NPxY2 Neurone eine verminderte Internalisierungsrate der NR2B-Rezeptoruntereinheiten auf (Abb. 4). Einen Erklärungsansatz für das abweichende Phosphorylierungsmuster der NR2B-Rezeptoruntereinheit in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen liefern mögliche Abweichungen in der Expression oder Regulierung verantwortlicher Kinasen Casein Kinase II (CKII) und Fyn (Suzuki and Okumura-Noji 1995; Sanz-Clemente 2010). Die Untersuchung der Expressions- bzw. Aktivierungsraten der Casein Kinase II (CKII) und Fyn demonstrierten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Expression oder Aktivierung entsprechender

Kinasen in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen (Abb. 6). Diese Daten deuten darauf hin, dass das Signalgeschehen oder die Expression dieser Kinasen durch die Alanin Substitution im NPxY2 Motiv von LRP1 vermutlich nicht beeinflusst wurden. Der beobachtete Effekt der *knock-in* Mutation in LRP1 auf die Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit auf der Zelloberfläche ist demnach eher ein direkter Effekt einer verminderten Internalisierungsrate des LRP1-Rezeptorproteins in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen.

Die bisher demonstrierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Akkumulation der NR2B Rezeptoren auf der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone sich den regulatorischen Mechanismen durch CKII und Fyn Kinasen zu entziehen scheint. Diese Resultate könnten so interpretiert werden, dass in den LRP1 Δ NPxY2 Neuronen das LRP1 die NR2B-Rezeptoruntereinheiten trotz aktivierter Internalisierungssignale an der Zelloberfläche zurückhält. Eine funktionelle Interaktion zwischen LRP1 und NR2B wurde bereits belegt (May 2004). So könnten die Veränderungen in der Regulierung der Interaktion zwischen LRP1 und NR2B in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen einen möglichen Erklärungsansatz für die demonstrierten Ergebnisse liefern. Diese Annahme wurde mit Hilfe der Co-Immunopräzipitationsexperimente überprüft. Ein Nachweis von NR2B in dem Präzipitationsansatz mit einem LRP1-spezifischen Antikörper erlaubte die Bestätigung der Interaktion beider Proteine. Darüber hinaus, resultiert die LRP1 Δ NPxY2 Mutation in einer stärkeren Bindung der NR2B-Rezeptoruntereinheit an das LRP1 (Abb. 7B). Dieses Ergebnis stärkt die Hypothese, dass das LRP1 mit der *knock-in* Mutation die NR2B-Untereinheit aufgrund einer verstärkten Bindung und einer niedrigeren Internalisierungsrate an der Zelloberfläche zurückhält. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Mehrheit der Interaktionspartner von LRP1 an das NPxY2 Motiv bindet, wobei die Phosphorylierung am Tyrosin Y4507 in diesem Motiv für die Interaktion von entscheidender Bedeutung ist (Guttman 2009). Darüber hinaus wurde ein sequenzieller Ablauf der Tyrosin-Phosphorylierungen in den NPxY1 und NPxY2 Motiven von LRP1 demonstriert. Das Tyrosin Y4473 im NPxY1 Motiv von LRP1 kann nur dann phosphoryliert werden, wenn das Tyrosin Y4507 im NPxY2 Motiv bereits phosphoryliert ist. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Phosphorylierung am Y4507 des NPxY2 Motivs zu einer verstärkten Exposition des NPxY1 Motivs zur Umgebung (Lösungsmittel) führt (Betts 2008). In Bezug auf diese

Daten erscheint eine Regulierung der Interaktion zwischen LRP1 und NR2B durch die Phosphorylierung als sehr wahrscheinlich. Diese Annahme wurde in einem Co-Immunopräzipitationsexperiment mit dephosphorylierten Zelllysaten primärer Wildtyp oder LRP1 Δ NPxY2 Neurone überprüft. Die Dephosphorylierung wurde mit Hilfe der intestinalen alkalischen Kälberphosphatase (CIP) durchgeführt. Wie die Validierung der Methode mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper in Abbildung 8A erkennen lässt, zeigte CIP unter gewählten Bedingungen eine größere Spezifität für phosphorylierte Tyrosine, während Serine wesentlich schwächer dephosphoryliert wurden. Weitere Co-Immunopräzipitationsexperimente mit dephosphorylierten Zelllysaten demonstrierten, dass die Dephosphorylierung zu einer erheblichen Abschwächung der Bindungsstärke von LRP1 zu NR2B in Lysaten der Wildtyp Neurone führt (Abb. 8B obere Tafel). Im Gegensatz dazu, zeigt die Dephosphorylierung der Proteine in Zelllysaten der LRP1 Δ NPxY2 Neurone keinen Effekt auf die Interaktion zwischen LRP1 und NR2B-Rezeptoruntereinheit (Abb. 8B untere Tafel). Darüber hinaus ist LRP1 das einzige Protein im untersuchten System, dessen Sequenz direkt von der *knock-in* Mutation betroffen ist. Aus diesen Gründen erscheint die Annahme gerechtfertigt, dass die Bindung von LRP1 mit NR2B-Rezeptoruntereinheit durch die Phosphorylierung der Tyrosine in den NPxY Motiven von LRP1 reguliert wird. Die Regulierung scheint durch die *knock-in* Mutation im NPxY2 Motiv von LRP1 gestört zu sein. Als Grund dafür könnte die bereits erwähnte sequenziell ablaufende Phosphorylierung der NPxY Motive von LRP1 betrachtet werden, die durch mögliche Konformationsänderungen im zytosolischen Teil von LRP1 Δ NPxY2 nicht mehr korrekt ablaufen kann (Betts 2008). Durch die defekte Regulierung der Interaktion von LRP1 und NR2B in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen binden die Rezeptoren stärker aneinander. Die reduzierte Internalisierungsrate von LRP1 in LRP1 Δ PxY2 Neuronen führt schließlich zu einer Akkumulation der LRP1 und NR2B-Rezeptoruntereinheit an der Zelloberfläche.

Als Zusammenfassung aller bisher dargestellten Ergebnisse kann ein Modell vorgeschlagen werden, in dem LRP1 in der Internalisierung der NR2B-Rezeptoruntereinheit eine wichtige Rolle spielt. Die Interaktion beider Rezeptoren wird durch Phosphorylierung reguliert und ein intaktes NPxY2 Motiv von LRP1 ist in diesem Prozess von entscheidender Bedeutung.

Eine korrekte Lokalisierung der NMDA-Rezeptoren an der Zelloberfläche wurde oft als eine zwingende Voraussetzung für eine normale Funktion des Rezeptors demonstriert (Yashiro and Philpot 2008; Tang 2009). Darüber hinaus zeigen Tiere, die eine *knock-out* Mutation des gesamten neuronalen *Lrp1*-Gens tragen, NMDA-Rezeptor-assoziierte Verhaltensdefizite (May 2004; Liu 2010). Die *knock-in* Mutation in der LRP1 Δ NPxY2 Mauslinie, die in dieser Arbeit verwendet wurde, führt lediglich zu einem partiellen Verlust der Funktionalität von LRP1 (Roebroek 2006; Martin 2008; Reekmans 2010; Pflanzner 2011). Dennoch hat die *knock-in* Mutation eine erhebliche Auswirkung auf die Expression von NMDA-Rezeptoren an der Zelloberfläche primärer Neurone (Abb. 2). Aufgrund dessen könnte die untersuchte LRP1 Δ NPxY2 Maus-Linie NMDA-Rezeptor-assoziierte Verhaltensdefizite aufweisen. Die durchgeführten Verhaltensexperimente demonstrierten, dass die LRP1 Δ NPxY2 Tiere eine signifikante Hyperaktivität im *open field* Paradigma im Vergleich mit den Wildtyp-Geschwistern zeigen (Abb. 9A). Dieses Verhaltensdefizit wurde bereits für die Tiere mit der konditionellen neuronalen *knock-out* Mutation im *Lrp1*-Gen beschrieben (May 2004; Liu 2010). Darüber hinaus wurde in der Literatur von der Hyperaktivität der Ratten, die mit NMDA-Rezeptor-Antagonisten behandelt wurden, berichtet (Liljequist 1991; Burns 1994). Die Hyperaktivität der LRP1 Δ NPxY2 Tiere bestätigt die Annahme, dass die beobachteten Abweichungen in der Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone einen von Wildtyp-Kontrollen abweichenden NMDA-Rezeptor-assoziierten Verhaltensphänotyp als Konsequenz haben könnte.

Jegliche Veränderungen in der Zelloberflächenexpression, der synaptischen Lokalisierung oder der Aktivität der NR2B- oder NR2A-Rezeptoren führen zwangsläufig zu Veränderungen im Lernverhalten und Gedächtnis der Modelltiere (Tang 2009). Darüber hinaus wurden diese NMDA-Rezeptorsubtypen am häufigsten im Zusammenhang mit der Langzeit-Potenzierung (LTP) der Neurone und folglich mit Lernverhalten und Gedächtnis assoziiert (Collingridge and Bliss 1995). Aus diesem Grund wurde die Charakterisierung der Tiere auf die Untersuchung des Lernverhaltens im direkten und umgekehrten *Morris Water Maze* Tests (MWM) ausgeweitet. Das Lernverhalten im direkten MWM erlaubt die Rückschlüsse auf die Funktionalität der NMDA-Rezeptoren im Hippokampus, während der umgekehrte MWM die Rückschlüsse auf die Aktivität im Kortex ermöglicht (Morris 1986;

Bannerman 1995; Sakimura 1995; Dalton 2011). Die Ergebnisse des direkten und umgekehrten *Morris Water Maze Tests* (MWM) demonstrierten, dass die LRP1 Δ NPxY2 Tiere signifikante Defizite im räumlichen Lernvermögen in beiden Experimenten im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern zeigen (Abb. 9B, 9C). Diese Ergebnisse stärken die Hypothese, dass die Akkumulation der NR2B-Rezeptoruntereinheiten auf der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone eine veränderte Funktionalität der Rezeptoren in Hippokampus und Kortex nach sich zieht. Hiermit wird die physiologische Relevanz des demonstrierten biochemischen Phänotyps belegt.

Die Autoren früheren Publikationen zum Thema neuronaler LRP1 *knock-out* untersuchten die Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2A und NR2B lediglich im Zelllysat und haben keine signifikanten Unterschiede feststellen können (May 2004; Liu 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung auf die Expression der NMDA-Rezeptoren auf die Zelloberfläche primärer Neurone ausgeweitet. Die nachgewiesene Steigerung der Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2B an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone könnte einen zusätzlichen Erklärungsansatz für die Verhaltensdefizite der Mausmodelle mit einem kompletten neuronalen LRP1 *knock-out* darstellen (May 2004; Liu 2010).

Die bisher demonstrierten Ergebnisse deuten auf eine veränderte Funktionalität der NMDA-Rezeptoren in den LRP1 Δ NPxY2 Tieren hin. Allerdings fehlt ein direkter Nachweis, dass die beobachteten Verhaltensdefizite tatsächlich auf ein abweichendes Signalgeschehen der NMDA-Rezeptoren zurückzuführen ist. Dieser Nachweis wurde erbracht, indem die Expression und die Aktivierungsrate repräsentativer Mitglieder der *down stream*-Signaltransduktionswege der NMDA-Rezeptoren untersucht wurden. Hierzu wurden zwei Kinasen ausgewählt, die durch die Aktivität der NMDA-Rezeptoren reguliert werden. Die *extracellular signal regulated kinases 1/2* (Erk1/2) werden aufgrund des Ca²⁺ Einstroms in die Neurone durch die geöffneten NMDA-Rezeptoren aktiviert (Bading and Greenberg 1991; Kurino 1995). In Neuronen spielen die Erk1/2 Kinasen eine Schlüsselrolle in regulatorischen und Signaltransduktionswegen, die für die Regulierung des Überlebens der Zellen und der neuronalen Plastizität zuständig sind (Bonni 1999; Sweatt 2004). Darüber hinaus belegen frühere Studien, dass die Erk1/2-Aktivierung

überwiegend vom NR2B NMDA-Rezeptorsubtyp induziert wird (Krapivinsky 2003). Die Untersuchung der Aktivitätsmuster von Erk1/2 liefert dadurch eine gute Möglichkeit, eventuelle Abweichungen in der NMDA-Rezeptor Signaltransduktion in primären Neuronen nachzuweisen. Die Untersuchung der basalen Expression von Erk1/2 demonstrierte keine Unterschiede in der Expressionsrate zwischen Wildtyp und LRP1 Δ NPxY2 Neuronen (Abb. 10A oben). Die Aktivierung von Erk1/2 erfolgt durch die Phosphorylierung der Threonine und Tyrosine in den Aktivierungsschleifen des Enzyms (Cargnello and Roux 2011). Der Nachweis der phosphorylierten aktiven Erk1/2 Kinasen in LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp Neuronen verdeutlichte, dass die Phosphorylierungsrate von Erk1/2 in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen wesentlich niedriger als in den Wildtyp-Kontrollen ist (Abb. 10A unten). Dieses Ergebnis deutet auf eine niedrigere Aktivierungsrate der Erk1/2 Kinasen und somit indirekt auf eine niedrigere basale Aktivität der NMDA-Rezeptoren in primären LRP1 Δ NPxY2 Neuronen hin (Martin 2008). Eine der wesentlichen Funktionen des NMDA-Rezeptors in Lernprozessen und Gedächtnis ist seine Rolle in der Induktion der Langzeitpotenzierung. Das Phänomen der Langzeitpotenzierung (LTP) erfolgt unter anderem durch die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren und schrittweise Aktivierung intrazellulärer Kinasen, die ihrerseits zu einer dauerhaften Modifikation der synaptischen Aktivität beitragen (Malenka and Bear 2004). Die Enzymisotypen α und β der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3 α/β) sind Vertreter von intrazellulären Kinasen, die zur Induktion von LTP beitragen (Hooper 2007). Darüber hinaus spielen die GSK3 α/β eine Rolle in der Regulierung des Internalisierungsprozesses der NMDA-Rezeptoren (Chen 2007). In Bezug auf diese Aspekte stellt das Aktivierungsmuster der GSK3 α/β einen wichtigen Hinweis auf die Aktivität der NMDA-Rezeptoren in der Zelle dar. Die Untersuchung basaler Expression der GSK3 α/β in LRP1 Δ NPxY2 oder Wildtyp Neuronen demonstrierte, dass die Neurone keine Unterschiede in der Expressionsrate dieser Proteine zeigen (Abb. 10B oben). Im Gegensatz zu den meisten beschriebenen Kinasen werden die GSK3 α/β durch die Phosphorylierung in ihrer Aktivität gehemmt (Jope and Johnson 2004). Eine Untersuchung der Phosphorylierung der GSK3 α/β in Wildtyp und LRP1 Δ NPxY2 Neuronen zeigte, dass GSK3 α/β in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen stärker phosphoryliert sind. Dies deutet auf eine verminderte Aktivierung dieser Kinasen in LRP1 Δ NPx2 Neuronen hin (Abb. 10B unten).

Zusammengefasst bestätigte die Untersuchung der Aktivität intrazellulärer NMDA-Rezeptor regulierter Kinasen, dass die beobachtete verstärkte Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit und ihre reduzierte Internalisierungsrate in einer verminderten Rezeptoraktivität in primären LRP1 Δ NPxY2 Neuronen resultieren. Darüber hinaus bestätigen diese Ergebnisse die Annahme, dass die demonstrierten Verhaltensdefizite der LRP1 Δ NPxY2 Tiere auf eine verminderte Aktivität der NMDA-Rezeptoren zurückgeführt werden könnten.

Anhand demonstrierter Ergebnisse kann ein Modell zur Regulation der Internalisierung von NMDA-Rezeptoren vorgeschlagen werden, in dem die NR2B NMDA-Rezeptoruntereinheit durch einen LRP1-abhängigen Mechanismus internalisiert wird. Die Interaktion von NR2B und LRP1 scheint bei diesem Prozess von entscheidender Bedeutung zu sein und wird durch die Phosphorylierung von LRP1 an einem oder beiden NPxY Motiven reguliert. Die veränderten Aktivierungsmuster der Erk1/2 und GSK3 α/β Kinasen in primären LRP1 Δ NPxY2 Neuronen sowie NMDA-Rezeptor-spezifische Verhaltensdefizite der LRP1 Δ NPxY2 Tiere indizieren eine beeinträchtigte Signalübertragung durch NMDA-Rezeptoren und liefern eine physiologische Bestätigung demonstrierter biochemischer Daten.

6 Ausblick

Die demonstrierte Rolle des NPxY2 Motivs von LRP1 in der Internalisierung und der Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit an der Zelloberfläche primärer Neurone liefert ein interessantes Modell zur Untersuchung der Regulierung von NR2B-Rezeptoren unter pathologischen Zuständen. Ein Beispiel hierfür ist die Alzheimer Krankheit. Die verstärkte Produktion des Amyloids β (A β) ist neben den Neurofibrillen (*Neurofibrillary Tangles*, NFT) eine der wahrscheinlichsten Ursachen für die frühen zellpathologischen Vorgänge in den Gehirnen der Alzheimer-Patienten (Selkoe 1989). Der genaue Stoffwechselweg oder der Prozess, der zur Schädigung der Neurone durch A β führt, bleibt allerdings weitgehend ungeklärt. Eine der oft diskutierten Hypothesen impliziert die Schädigung der Neurone durch eine exzessive Aktivierung der exzitatorische Signalübertragung durch A β , ein als Exzitotoxizität bezeichneter Prozess (Butterfield 2002; Hynd 2004). Die exzitatorische Signalübertragung wird in den Neuronen hauptsächlich durch die Kainat- (AMPA) und Glutamat-Rezeptoren (NMDAR) gewährleistet (Haberny 2002). Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass A β einen Einfluss auf die entsprechenden Rezeptoren ausüben könnte. Trotz intensiver Forschung auf diesem Feld konnte eine direkte Interaktion von endogenem A β mit NMDA-Rezeptoren nicht demonstriert werden. Aus diesem Grunde werden in der Literatur wiederholt ein oder mehrere Proteine, die mit NMDA-Rezeptoren direkt oder indirekt interagieren und gleichzeitig A β binden können, als potentielle Kandidaten zur Übertragung der pathologischen Effekte von A β auf den Signalweg der NMDA-Rezeptoren diskutiert (May 2004). Zusätzlich ist in der Literatur wiederholt berichtet worden, dass die neurotoxischen Effekte des A β hauptsächlich durch die Aktivierung des NR2B NMDA-Rezeptorsubtyps ausgetragen werden. So wurde demonstriert, dass die Inhibition der LTP-Induktion nach einer Behandlung mit A β -Dimeren und -Oligomeren durch eine verstärkte Aktivierung extrasynaptischer NR2B-Rezeptoren zustande kommt (Li 2011). Darüber hinaus demonstrierten andere Gruppen, dass die frühen zellpathologischen Prozesse, die durch A β verursacht werden, eine verstärkte Aktivierung des NR2B-Rezeptors implizieren (Li 2011; Ronicke 2011). Diese Daten deuten auf eine entscheidende Rolle der NR2B-Rezeptoren in den neuropathologischen Prozessen der Alzheimer Krankheit hin. In Bezug auf diese Fakten stellen die LRP1 Δ NPxY2 Neurone ein interessantes Modell zur Untersuchung

früher pathologischer Prozesse, die durch A β verursacht werden, dar. Die LRP1 Δ NPxY2 Neurone sind zur Untersuchung dieser Aspekte der A β -Toxizität insofern interessant, dass sowohl eine reduzierte Expression von LRP1 in *post mortem* untersuchten Gehirnen von Patienten mit nachgewiesener Alzheimer Erkrankung, als auch publizierte Reduktion der Induktionsraten von LTP in Hirnschnitten, die mit Amyloid β (A β) behandelt wurden, mit dieser Krankheit in Zusammenhang gebracht wurden (Walsh 2002; Wang 2004). Zusammengefasst indizieren diese Daten, dass beide in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren in die Pathologie der Alzheimer Krankheit involviert zu sein scheinen.

Die Untersuchung der Effekte einer Behandlung der primären Wildtyp oder LRP1 Δ NPxY2 Neurone mit A β würde vermutlich neue Erkenntnisse über die Regulierung der Expression des NMDA-Rezeptors auf der Zelloberfläche gewähren.

7 Zusammenfassung

Ein funktionelles Zusammenspiel von LRP1, einem Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie, mit dem NMDA-Rezeptor, einem ionotropen Glutamat Rezeptor, wurde durch die Interaktion beider Proteine sowie eine tPa-vermittelte, LRP1-abhängige Signalübertragung durch den NMDA-Rezeptor belegt. Darüber hinaus zeigen Mäuse mit einem konditionellen neuronalen *knock-out* des *Lrp1* Gens Verhaltensänderungen, die mit einer beeinträchtigten Signalübertragung durch NMDA-Rezeptoren assoziiert werden könnten. Die genaue Rolle von LRP1 in der NMDA-Rezeptor-Funktion bleibt allerdings noch unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von LRP1 bei der Expression der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors an der Zelloberfläche primärer kortikaler Neurone untersucht. Zu diesem Zweck wurde die *knock-in* Mauslinie LRP1 Δ NPxY2, die sich durch eine Alanin Substitution im NPxY2 Motiv des LRP1 auszeichnet, eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass diese *knock-in* Mutation in einer erhöhten Expression von LRP1 und der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1 und NR2B an der Zelloberfläche primärer kortikaler Neurone resultiert. Der Effekt konnte durch eine reduzierte Endozytoserate von LRP1 und der NR1- und NR2B-Untereinheiten in primären LRP1 Δ NPxY2 Neuronen erklärt werden. Darüber hinaus wurde ein verändertes Phosphorylierungsmuster der Internalisierungssignale der NR2B-Rezeptoruntereinheit Serin S1480 und Tyrosin Y1472 an der Zelloberfläche primärer LRP1 Δ NPxY2 Neurone detektiert. Die verantwortlichen Kinasen Fyn und Kaseinkinase II sind allerdings in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen nicht abweichend reguliert. In den Co-Immunopräzipitationsexperimenten wurde gezeigt, dass die Bindung von LRP1 mit NR2B durch die Phosphorylierung reguliert wird und dieser Regulationsmechanismus in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen beeinträchtigt ist. Dies resultiert in einer stärkeren Bindung von NR2B-Rezeptoruntereinheit an LRP1. Aufgrund reduzierter Internalisierungsraten von LRP1 in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen führt dieser Umstand zu einer Akkumulation beider Rezeptorproteine an der Zelloberfläche. Schließlich wurden die NMDA-Rezeptor-assoziierten Verhaltensänderungen wie die Hyperaktivität und die Defizite im direkten und umgekehrten räumlichen Lernvermögen in den LRP1 Δ NPxY2 Tieren nachgewiesen. Zusammengefasst, demonstrieren diese Ergebnisse, dass LRP1 eine kritische Rolle in der Regulierung der NR2B-Expression an der Zelloberfläche spielt.

8 Literaturverzeichnis

- Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R (1998) Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* **18**: 581-589.
- Bading H, Greenberg ME (1991) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science* **253**: 912-914.
- Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RG (1995) Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* **378**: 182-186.
- Barnes H, Ackermann EJ, van der Geer P (2003) v-Src induces Shc binding to tyrosine 63 in the cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein 1. *Oncogene* **22**: 3589-3597.
- Barnes H, Larsen B, Tyers M, van Der Geer P (2001) Tyrosine-phosphorylated low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) associates with the adaptor protein SHC in SRC-transformed cells. *J Biol Chem* **276**: 19119-19125.
- Barria A, Malinow R (2002) Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* **35**: 345-353.
- Bellone C, Nicoll RA (2007) Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron* **55**: 779-785.
- Betts GN, van der Geer P, Komives EA (2008) Structural and functional consequences of tyrosine phosphorylation in the LRP1 cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **283**: 15656-15664.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**: 1358-1362.
- Boucher P, Liu P, Gotthardt M, Hiesberger T, Anderson RG, Herz J (2002) Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae. *J Biol Chem* **277**: 15507-15513.

- Bu G, Maksymovitch EA, Nerbonne JM, Schwartz AL (1994) Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *J Biol Chem* **269**: 18521-18528.
- Bu G, Williams S, Strickland DK, Schwartz AL (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7427-7431.
- Burns LH, Everitt BJ, Robbins TW (1994) Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5 impairs acquisition but not performance of discriminated approach to an appetitive CS. *Behav Neural Biol* **61**: 242-250.
- Butterfield DA (2002) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res* **36**: 1307-1313.
- Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 50-83.
- Chen BS, Roche KW (2007) Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology* **53**: 362-368.
- Chen P, Gu Z, Liu W, Yan Z (2007) Glycogen synthase kinase 3 regulates N-methyl-D-aspartate receptor channel trafficking and function in cortical neurons. *Mol Pharmacol* **72**: 40-51.
- Christensen EI, Willnow TE (1999) Essential role of megalin in renal proximal tubule for vitamin homeostasis. *J Am Soc Nephrol* **10**: 2224-2236.
- Chung HJ, Huang YH, Lau LF, Huganir RL (2004) Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* **24**: 10248-10259.
- Collingridge GL, Bliss TV (1995) Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* **18**: 54-56.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 327-335.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* **2004**: re16.

- Dalton GL, Ma LM, Phillips AG, Floresco SB (2011) Blockade of NMDA GluN2B receptors selectively impairs behavioral flexibility but not initial discrimination learning. *Psychopharmacology (Berl)* **2164**: 525-535.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **511**: 7-61.
- Erreger K, Chen PE, Wyllie DJ, Traynelis SF (2004) Glutamate receptor gating. *Crit Rev Neurobiol* **163**: 187-224.
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **4387065**: 185-192.
- Gordts PL, Reekmans S, Lauwers A, Van Dongen A, Verbeek L, Roebroek AJ (2009) Inactivation of the LRP1 intracellular NPxYxxL motif in LDLR-deficient mice enhances postprandial dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **299**: 1258-1264.
- Guenette SY, Chen J, Jondro PD, Tanzi RE (1996) Association of a novel human FE65-like protein with the cytoplasmic domain of the beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **9320**: 10832-10837.
- Guttman M, Betts GN, Barnes H, Ghassemian M, van der Geer P, Komives EA (2009) Interactions of the NPXY microdomains of the low density lipoprotein receptor-related protein 1. *Proteomics* **922**: 5016-5028.
- Haberny KA, Paule MG, Scallet AC, Sistare FD, Lester DS, Hanig JP, Slikker W, Jr. (2002) Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity. *Toxicol Sci* **681**: 9-17.
- Herz J, Bock HH (2002) Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem* **71**: 405-434.
- Herz J, Clouthier DE, Hammer RE (1992) LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* **713**: 411-421.
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J* **713**: 4119-4127.

- Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, Brown MS (1990) Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J* **9**: 1769-1776.
- Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J (1996) The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6031-6036.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* **17**: 31-108.
- Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, Hernandez F, Anderton B, Rosenblum K, Bliss T, Cooke SF, Avila J, Lucas JJ, Giese KP, Stephenson J, Lovestone S (2007) Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci* **25**: 81-86.
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **45**: 583-595.
- Jeon H, Meng W, Takagi J, Eck MJ, Springer TA, Blacklow SC (2001) Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat Struct Biol* **8**: 499-504.
- Jope RS, Johnson GV (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* **29**: 95-102.
- Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, Strickland DK (1995) LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* **82**: 331-340.
- Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Ivanov A, Tyzio R, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Clapham DE, Medina I (2003) The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* **40**: 775-784.
- Krieger M, Herz J (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* **63**: 601-637.

- Kurino M, Fukunaga K, Ushio Y, Miyamoto E (1995) Activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat hippocampal neurons by stimulation of glutamate receptors. *J Neurochem* **653**: 1282-1289.
- Lalonde R, Joyal CC (1993) Effects of ketamine and L-glutamic acid diethyl ester on spatial and nonspatial learning tasks in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **443**: 539-545.
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* **183**: 493-503.
- Lavezzari G, McCallum J, Lee R, Roche KW (2003) Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology* **456**: 729-737.
- Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ (2011) Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci* **3118**: 6627-6638.
- Liljequist S, Ossowska K, Grabowska-Anden M, Anden NE (1991) Effect of the NMDA receptor antagonist, MK-801, on locomotor activity and on the metabolism of dopamine in various brain areas of mice. *Eur J Pharmacol* **1951**: 55-61.
- Lillis AP, Mikhailenko I, Strickland DK (2005) Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost* **38**: 1884-1893.
- Lin EH, Hui AY, Meens JA, Tremblay EA, Schaefer E, Elliott BE (2004) Disruption of Ca²⁺-dependent cell-matrix adhesion enhances c-Src kinase activity, but causes dissociation of the c-Src/FAK complex and dephosphorylation of tyrosine-577 of FAK in carcinoma cells. *Exp Cell Res* **2931**: 1-13.
- Liu H, Rice AP (2000) Genomic organization and characterization of promoter function of the human CDK9 gene. *Gene* **2521-2**: 51-59.
- Liu Q, Trotter J, Zhang J, Peters MM, Cheng H, Bao J, Han X, Weeber EJ, Bu G (2010) Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration. *J Neurosci* **3050**: 17068-17078.

- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**: 5-21.
- Marcusson EG, Horazdovsky BF, Cereghino JL, Gharakhanian E, Emr SD (1994) The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* **77**: 579-586.
- Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, Jaeger S, Waldron E, Roebroek A, Luhmann HJ, Laatsch A, Weggen S, Lessmann V, Pietrzik CU (2008) The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* **283**: 12004-12013.
- May P, Herz J (2003) LDL receptor-related proteins in neurodevelopment. *Traffic* **4**: 291-301.
- May P, Rohlmann A, Bock HH, Zurhove K, Marth JD, Schomburg ED, Noebels JL, Beffert U, Sweatt JD, Weeber EJ, Herz J (2004) Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol Cell Biol* **24**: 8872-8883.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**: 774-776.
- Nakazawa T, Komai S, Tezuka T, Hisatsune C, Umemori H, Semba K, Mishina M, Manabe T, Yamamoto T (2001) Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* **276**: 693-699.
- Novak S, Hiesberger T, Schneider WJ, Nimpf J (1996) A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse. *J Biol Chem* **271**: 11732-11736.
- Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE (1999) An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* **96**: 507-515.
- Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF (2001) Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* **21**: 1228-1237.

- Pflanzner T, Janko MC, Andre-Dohmen B, Reuss S, Weggen S, Roebroek AJ, Kuhlmann CR, Pietrzik CU (2011) LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid-beta across the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging* **32**12: 2323 e2321-2311.
- Pietrzik CU, Busse T, Merriam DE, Weggen S, Koo EH (2002) The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *EMBO J* **21**21: 5691-5700.
- Pietrzik CU, Yoon IS, Jaeger S, Busse T, Weggen S, Koo EH (2004) FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J Neurosci* **24**17: 4259-4265.
- Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**6803: 535-538.
- Prybylowski K, Chang K, Sans N, Kan L, Vicini S, Wenthold RJ (2005) The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron* **47**6: 845-857.
- Qiu S, Hua YL, Yang F, Chen YZ, Luo JH (2005) Subunit assembly of N-methyl-D-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **280**26: 24923-24930.
- Reekmans SM, Pflanzner T, Gordts PL, Isbert S, Zimmermann P, Annaert W, Weggen S, Roebroek AJ, Pietrzik CU (2010) Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis. *Cell Mol Life Sci* **671**: 135-145.
- Roche KW, Standley S, McCallum J, Dune Ly C, Ehlers MD, Wenthold RJ (2001) Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci* **4**8: 794-802.
- Roebroek AJ, Reekmans S, Lauwers A, Feyaerts N, Smeijers L, Hartmann D (2006) Mutant Lrp1 knock-in mice generated by recombinase-mediated cassette exchange reveal differential importance of the NPXY motifs in the intracellular domain of LRP1 for normal fetal development. *Mol Cell Biol* **26**2: 605-616.
- Rohmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J (1998) Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest* **101**3: 689-695.
- Ronicke R, Mikhaylova M, Ronicke S, Meinhardt J, Schroder UH, Fandrich M, Reiser G, Kreutz MR, Reymann KG (2011) Early neuronal dysfunction by amyloid

- beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol Aging* **32**: 2219-2228.
- Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, et al. (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* **373**: 151-155.
- Sanz-Clemente A, Matta JA, Isaac JT, Roche KW (2010) Casein kinase 2 regulates the NR2 subunit composition of synaptic NMDA receptors. *Neuron* **67**: 984-996.
- Selkoe DJ (1989) Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* **12**: 463-490.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* **8**: 1051-1058.
- Springer TA (1998) An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J Mol Biol* **283**: 837-862.
- Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS (1990) Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem* **265**: 17401-17404.
- Strickland DK, Ranganathan S (2003) Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling. *J Thromb Haemost* **17**: 1663-1670.
- Suzuki T, Okumura-Noji K (1995) NMDA receptor subunits epsilon 1 (NR2A) and epsilon 2 (NR2B) are substrates for Fyn in the postsynaptic density fraction isolated from the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **216**: 582-588.
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* **14**: 311-317.
- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**: 530-535.

- Tang TT, Yang F, Chen BS, Lu Y, Ji Y, Roche KW, Lu B (2009) Dysbindin regulates hippocampal LTP by controlling NMDA receptor surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**50: 21395-21400.
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**6748: 63-69.
- Tissir F, Goffinet AM (2003) Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* **46**: 496-505.
- Ulery PG, Strickland DK (2000) LRP in Alzheimer's disease: friend or foe? *J Clin Invest* **106**9: 1077-1079.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**6880: 535-539.
- Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, Selkoe DJ, Anwyl R (2004) Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci* **24**13: 3370-3378.
- Willnow TE (1999) The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med (Berl)* **77**3: 306-315.
- Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK, Herz J (1996) Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**16: 8460-8464.
- Willnow TE, Rohlmann A, Horton J, Otani H, Braun JR, Hammer RE, Herz J (1996) RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *EMBO J* **15**11: 2632-2639.
- Yashiro K, Philpot BD (2008) Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* **55**7: 1081-1094.

Zhang XH, Wu LJ, Gong B, Ren M, Li BM, Zhuo M (2008) Induction- and conditioning-protocol dependent involvement of NR2B-containing NMDA receptors in synaptic potentiation and contextual fear memory in the hippocampal CA1 region of rats. *Mol Brain* 1: 9.

9 Anhang

9.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbständig verfasst und nur unter Verwendung der Angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz, den 7.06.2013

Wladislaw Maier