

**Einfluss des Aktin-Zytoskeletts und
intrazellulärer Signalkaskaden
auf die postsynaptische Lokalisation
von Gephyrin**

Dissertation zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von
Melanie Bausen
geb. in Simmern

Mainz (2005)

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus schriftlichen Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Mainz, den 12.10.05

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive script that appears to be the initials 'AQ'.

Für meinen Großvater

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1 Chemische Synapsen	11
1.2 Exzitatorische Synapsen	12
1.3 Inhibitorische Synapsen	13
1.3.1 Gephyrin	14
1.3.2 Interaktionen von Gephyrin mit dem neuronalen Zytoskelett	17
1.3.3 Intrazelluläre Signalübertragung an inhibitorischen Synapsen	20
1.4 Zielsetzung des Projektes	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	25
2.1.2 Zelllinien und Primärzellen	25
2.1.3 Lösungen und Medien	25
2.1.3.1 Molekularbiologische Lösungen	26
2.1.3.2 Proteinbiochemische Lösungen	26
2.1.3.3 Zellbiologische Lösungen	28
2.1.3.4 Histologische Lösungen	28
2.1.4 DNA-Molekulargewichtsstandards	29
2.1.5 Protein-Molekulargewichtsstandards	29
2.1.6 Vektoren und Plasmide	29
2.1.7 Pharmakologie	30
2.1.8 Antikörper	32
2.2 Methoden	34
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	34
2.2.1.1 Schnelle Plasmid-DNA-Präparation	34
2.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
2.2.1.3 Sequenzierung der verwendeten DNA-Konstrukte	35
2.2.1.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	35
2.2.1.5 Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	36
2.2.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	36
2.2.1.7 Ligation von DNA-Molekülen	36

2.2.1.8 Transformation elektrisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	37
2.2.1.9 Anlegen bakterieller Über-Nacht-Kulturen auf Agarplatten	37
2.2.1.10 Anlegen bakterieller Über-Nacht-Suspensionskulturen	37
2.2.2. Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	38
2.2.2.1 Herstellung von Proteinhomogenat aus Hirngewebe	38
2.2.2.2 Herstellung von Proteinlysaten aus HEK293T-Zellen	38
2.2.2.3 Proteinexpression in Bakterien	39
2.2.2.4 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	39
2.2.2.5 Aufreinigung von His ₆ -gekoppelten Proteinen	39
2.2.2.6 Metabolische Markierung von HEK293T-Zellen mit (³² P)-ortho-Phosphat	40
2.2.2.7 Immunpräzipitation	40
2.2.2.8 GST-Pulldown-Assay	41
2.2.2.9 Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen	41
2.2.2.10 Aktin-Sedimentations-Experiment	41
2.2.2.11 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.2.2.12 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brilliant-Blau	42
2.2.2.13 Western Blot	43
2.2.2.14 ECL-Nachweisreaktion	43
2.2.2.15 Antikörper-Elution	44
2.2.3 Zellbiologische Arbeitsmethoden	44
2.2.3.1 Gefrierkonservierung und Auftauen von Eukaryontenzellen	44
2.2.3.2 Kultivierung von HEK293T-Zellen	45
2.2.3.3 Fibronectinbeschichtung von Deckgläsern (HEK293T)	45
2.2.3.4 Poly-L-Ornithin Beschichtung (Primärkulturen)	45
2.2.3.5 Kalziumphosphat-Transfektion eukaryontischer Zellen	46
2.2.3.6 Lipofektamin-Transfektion eukaryontischer Zellen	46
2.2.3.7 Präparation von hippokampalen Primärkulturen	47
2.2.3.8 Toxinbehandlungen der hippokampalen Primärkulturen	47
2.2.4 Histologische Arbeitsmethoden	48
2.2.4.1 Schneiden am Gefriermikrotom	48
2.2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	48
2.2.4.3 DAPI-Kernfärbung	49
2.2.4.4 Mikroskopiertechniken	50

2.2.4.5 Statistische Auswertung	50
3. Ergebnisse	51
3.1 Pharmakologische Beeinflussung von Signaltransduktionskaskaden	51
3.1.1 cAMP/PKA-Signalkaskaden	52
3.1.2 IP ₃ /PKC-Signalkaskaden	54
3.1.3 Kalzium-abhängige Signalkaskaden	55
3.1.4 TrK-Rezeptor-Signalkaskaden	56
3.1.5 PI3-Kinase-Signalkaskaden	56
3.1.6 Phosphatase-Inhibitoren	58
3.1.6.1 Die Inhibition von PP2B hat keinen Einfluss auf die Anzahl und Verteilung der Gephyrincluster	58
3.1.6.2 Inhibition von PP1/PP2A führt zur Destabilisierung von synaptisch-lokalisierten Gephyrinclustern	60
3.1.6.3 PP1 kolokalisiert in hippokampalen Neuronen partiell mit Gephyrin	62
3.1.6.4 PP1 wird in GFP-Gephyrin Aggregaten angereichert	64
3.1.6.5 PP1 und PP2A kopräzipitieren mit Gephyrin <i>in vitro</i>	66
3.1.7 Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts	66
3.1.7.1 Gephyrin-Mikroaggregate werden in Alkaloid-induzierte F-Aktin-Patches rekrutiert	67
3.1.7.2 GFP- γ -Aktin kolokalisiert mit Gephyrin-Aggregaten in HEK293T-Zellen	71
3.1.7.3 Die Linker-Region 181-243 in der Gephyrin-Sequenz wird für die Interaktion mit ena/VASP benötigt	71
3.1.7.4 ena/VASP agiert als Adapter zwischen Gephyrin und dem Aktin-Zytoskelett	76
3.1.7.5 Mena ist an inhibitorischen Synapsen lokalisiert und wird in Alkaloid-induzierte F-Aktin-Patches rekrutiert	77
3.1.7.6 Die Abhängigkeit synaptisch-lokalisierter Gephyrincluster vom Aktin-Zytoskelett nimmt mit steigender neuronaler Differenzierung ab	79

4. Diskussion	82
4.1 Signalkaskaden ohne Effekt auf die Gephyrincluster-Verteilung	82
4.1.1 cAMP/PKA-Signalkaskaden	82
4.1.2 IP ₃ /PKC-Signalkaskaden	83
4.1.3 Kalzium-abhängige Signalkaskaden	83
4.1.4 TrK-Rezeptor-Signalkaskaden	84
4.2 Signalkaskaden, welche an der Stabilisierung postsynaptischer Gephyrincluster beteiligt sind	85
4.2.1 MAP-Kinase-Signalkaskade	85
4.2.2 Protein-Phosphatasen 1 und 2A	86
4.3 Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die Stabilisierung synaptischer Gephyrincluster	89
4.4 Model	93
5. Zusammenfassung	94
6. Literatur	95
7. Anhang	107
7.1 Abkürzungsverzeichnis	107
7.2 Abbildungsverzeichnis	108

1. Einleitung

Das Gehirn gilt als Quelle unseres Bewusstseins und gleichzeitig als eine der letzten großen Grenzen der Biologie. Es gibt nur ganz allmählich seine Strukturen und Funktionen preis. Nervenzellen (Neuronen) können auf unterschiedliche Arten klassifiziert werden, abhängig z.B. von ihrer Funktion (sensorische, motorische oder Interneurone), ihrer Position im neuronalen Netzwerk (z.B. kortikal oder spinal), der eingesetzten Neurotransmitter (z.B. Glutamat, Acetylcholin) und deren Wirkung (exzitatorisch oder inhibitorisch), oder der speziellen Morphologie der Zellen (pyramidal, granulär, mitral). Betrachtet man ein Neuron unter dem Mikroskop, so besitzt es ein Axon zur Signalübertragung an nachgeschaltete Nachbarzellen und eine Vielzahl von Fortsätzen, die vom Zellkörper abgehen und als Dendriten bezeichnet werden. Diese dienen der Aufnahme von spezialisierten Kontakten mit anderen Neuronen und können Verzweigungen in sehr komplexen Mustern ausbilden.

Für die enorme Leistungsfähigkeit des menschlichen Gehirns scheint weniger die Gesamtzahl der Nervenzellen entscheidend, als vielmehr die Art und Anzahl ihrer Verknüpfungen. Zu diesem Zweck haben Neuronen zur Informationsübertragung untereinander spezielle Strukturen entwickelt, welche als Synapsen bezeichnet werden (Jessell und Kandel, 1993). Man geht von etwa 100 Milliarden Nervenzellen (Neuronen) aus, aber jede dieser Zellen ihrerseits hat durchschnittlich etwa 10.000 Synapsen zu anderen Nervenzellen. Aufgrund des Übertragungsmechanismus wird zwischen elektrischen (ca. 5%) oder chemischen Synapsen unterschieden. Als elektrische Synapsen bezeichnet man Spaltverknüpfungen (*gap junctions*). Dabei handelt es sich um spezielle Poren in der Plasmamembran, die eine direkte Verbindung zu benachbarten Zellen herstellen können. Dadurch wird ein bidirektionaler Austausch von Flüssigkeit, kleineren Molekülen oder auch von elektrischen Impulsen ermöglicht. Die überwiegende Mehrheit der Synapsen im Gehirn sind jedoch Verknüpfungen, die eine chemische Kommunikation von Nervenzellen ermöglichen, welche nicht in direktem Kontakt stehen.

1.1 Chemische Synapsen

Im Fall der chemischen Synapse setzt die präsynaptische Nervenendigung aus Vesikeln spezielle Botenstoffe (Neurotransmitter) frei, die durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Zelle diffundieren und dort an spezifische Rezeptormoleküle binden. Dies bedarf einer ausgewählten Steuerung und Kontrolle. Das im Bereich der Präsynapse ankommende Aktionspotential hat einen verstärkten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen zur Folge. Die resultierende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist Voraussetzung für die Fusion der mit Neurotransmitter beladenen Vesikel mit der Zellmembran an der aktiven Zone und für die resultierende Exozytose, durch welche der Transmitter freigegeben wird. Das Verschmelzen der Vesikel mit der Zellmembran wird von einer speziellen Kombination von Proteinen gesteuert, welche sowohl in der Vesikelmembran als auch in der präsynaptischen Membran lokalisiert sind. Bei den Neurotransmittern handelt es sich in der Regel um einfache Aminosäuren (Glutamat, Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Glyzin), Derivate von Aminosäuren (Serotonin, Dopamin) oder Peptide. Die Menge des freigesetzten Transmitters ist dabei abhängig von der Amplitude des ankommenden Membranpotentials. Der in den synaptischen Spalt freigesetzte Neurotransmitter diffundiert nun zur postsynaptischen Zelle, wo das Signal mit Hilfe spezifischer Rezeptoren detektiert werden kann. Stärke und Dauer der Aktivierung der postsynaptischen Rezeptoren können durch raschen enzymatischen Abbau des Neurotransmitters und durch die Aufnahme der Transmitter-Abbauprodukte in Gliazellen oder präsynaptische Zellen reguliert werden.

Die Wirkungsweise eines Neurotransmitters kann sowohl erregend (exzitatorisch) als auch hemmend (inhibitorisch) sein und hängt hauptsächlich vom Rezeptortyp in der postsynaptischen Membran ab. In der Regel wirkt dabei Glutamat exzitatorisch, während Glyzin oder GABA von einer exzitatorischen Wirkung in der Embryonalentwicklung zu inhibitorischen wirkenden Neurotransmittern in reifen Neuronen wechseln (Cherubini et al., 1991). Exzitatorische Synapsen definieren sich durch eine Depolarisation der postsynaptischen Membran. Im Gegensatz dazu kommt es an inhibitorischen Synapsen nicht zu einer Depolarisation, sondern zu einer Stabilisierung des postsynaptischen Membranpotentials und somit zu einer Blockierung des Aktionspotentials.

1.2 Exzitatorische Synapsen

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Transmitter des Zentralnervensystems. Mehr als 90% aller exzitatorischen glutamatergen Synapsen im Gehirn befinden sich auf seitlichen Fortsätzen von Dendriten, die aufgrund ihrer Form Dornen oder englisch „*spines*“ genannt werden (Harris und Kater, 1994). Diese Spines sind spezielle Ausstülpungen der dendritischen Membran, die aufgrund ihrer einzigartigen Form eine Art biochemische Kompartimentalisierung des Dendriten darstellen (Koch und Zador, 1993). Ein charakteristisches Merkmal von exzitatorischen Synapsen ist die ausgeprägte postsynaptische Dichte (PSD). Hierbei handelt es sich um eine äußerst elektronendichte Struktur, bestehend aus Glutamatrezeptoren und spezifischen Strukturproteinen, welche die Transmembranproteine mit intrazellulären Signalmolekülen wie Kinasen und Phosphatasen verbinden (Peters et al., 1990; Kennedy et al., 1997; Sheng, 2001). Mittlerweile sind über 70 Komponenten der postsynaptischen Dichte für exzitatorische Synapsen analysiert und beschrieben worden (Husi et al., 2000; Walikonis et al., 2000).

In der exzitatorischen postsynaptischen Dichte akkumulieren drei Klassen von ionotropen (Ionenkanal-gekoppelten) Glutamatrezeptoren (GluR), die nach ihren spezifischen synthetischen Agonisten AMPA- (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure), NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) und Kainat-Rezeptoren benannt wurden (Ozawa et al., 1998). AMPA-Rezeptoren sind aus vier Untereinheiten (GluR1-4, oder GluRA-D) aufgebaut. Die Sequenzhomologie zwischen den Untereinheiten beträgt etwa 70%. Die Ionenspezifität der AMPA-Rezeptoren hängt von der Kombination der Untereinheiten ab. Der NMDA-Rezeptor ist ein hetero-oligomeres Komplex aus NR1- und NR2(A-D)-Untereinheiten, die durch ihre Anordnung einen zentralen Kationen-selektiven Ionenkanal in der postsynaptischen Membran ausbilden. Der N-Terminus der Rezeptoruntereinheiten ist extrazellulär angeordnet und an der Ligandenbindung beteiligt (Hirai et al., 1996), während ein ähnlich großer Teil der Polypeptidkette am C-Terminus intrazellulär lokalisiert ist und sowohl für die synaptische Verankerung des Rezeptors als auch für zelluläre Signaltransduktionsprozesse von besonderer Bedeutung ist. AMPA- und NMDA-Rezeptoren kommen hauptsächlich postsynaptisch vor und sind oft an der gleichen Synapse zu finden. Sie unterscheiden sich jedoch in ihren Wirkungsmechanismen. Die Bindung von Glutamat an AMPA- oder Kainat-Rezeptoren führt durch Öffnung der zugehörigen Ionenkanäle zu einem starken Na^+ -Einstrom und einem schwachen K^+ -

Ausstrom. Es kommt daher zur Depolarisation der postsynaptischen Membran. NMDA-Rezeptoren sind dagegen am Ruhemembranpotential durch extrazelluläre Mg^{2+} -Ionen blockiert, und nur eine Depolarisation der Plasmamembran kann diese Inhibition beseitigen. NMDA-Rezeptoren werden also nur bei starker Depolarisation der postsynaptischen Zelle geöffnet. Es strömen neben Na^+ - auch Ca^{2+} -Ionen ein. Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration durch NMDA-Rezeptoraktivierung dient unter anderem als intrazelluläres Signal zur Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionskaskaden (Ghosh und Greenberg, 1995).

Zur effektiven Signalweiterleitung ist eine Konzentration der entsprechenden Rezeptoren in der postsynaptischen Dichte von essentieller Bedeutung. Die Verankerung von Glutamaterezeptoren erfolgt über C-terminale Abschnitte, welche mit zytosolischen und zytoskeletalen Proteinen, die so genannte PDZ-Domänen enthalten, interagieren. PDZ-Domänen sind 90 Aminosäuren lange Proteinabschnitte (O'Brien et al., 1998), welche unterschiedliche Klassen von Konsensussequenzen binden (z.B. S/T-X-V). Im Fall der NMDA-Rezeptoren erfolgt die Interaktion über die NR2-Untereinheiten mit PSD95, einem Hauptbestandteil der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen (Kornau et al., 1995). Die AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR2/3 binden dagegen an drei verschiedene PDZ-Domänen-Proteine: GRIP1 (*glutamate receptor interacting protein*), GRIP2/ABP (*AMPA-receptor binding protein*) und PICK (*Protein interacting with activated C kinase*) (Carroll et al., 2001).

1.3 Inhibitorische Synapsen

Die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im Nervensystem von Säugetieren sind Glyzin und GABA (Gamma-Aminobuttersäure). Glyzin ist vor allem im Rückenmark und Hirnstamm verbreitet, wo es partiell mit GABA kolokalisiert ist, während GABA der dominierende inhibitorische Neurotransmitter in höheren Hirnregionen ist. Sowohl Glyzin- als auch $GABA_{A/C}$ -Rezeptoren gehören zur Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle. Ihre Aktivierung führt zu einem Anstieg der Membranleitfähigkeit für Chloridionen. Untersuchungen an nativen oder rekombinant exprimierten Rezeptoren ergaben, dass Glyzin-Rezeptoren im Zentralnervensystem aus α - und β -Untereinheiten (Abb. 1) aufgebaut sind (Betz et al., 1999; Harvey und Betz, 2000). Der synaptische Glyzinrezeptor (Abb. 1) ist ein pentamerer Proteinkomplex, der aus zwei α -Untereinheiten (vier bekannte Isoformen) und drei β -Untereinheiten (eine

bekannte Isoformen) besteht (Grudzinska et al., 2005). Die Expression erfolgt sowohl räumlich als auch zeitlich reguliert. Nach dem Anbinden des Neurotransmitters Glyzin (Agonisten sind Taurin und β -Alanin) öffnen sich die Kanäle. Dadurch kommt es zur Hyperpolarisation der Plasmamembran (Hemmung) und zu einer Unterdrückung der neuronalen Aktivität.

Man unterscheidet zur Zeit zwischen drei GABA-Rezeptortypen (ionotrope GABA_{A/C}, und metabotrope GABA_B). Durch spezifische Antagonisten ist eine Unterscheidung der verschiedenen Rezeptorarten möglich. Bicucullin hemmt selektiv die Funktion von GABA_A-Rezeptoren (Bormann et al., 1995) hat aber keinen Einfluss auf die anderen Subtypen. GABA_B und GABA_C werden selektiv durch Baclofen aktiviert oder durch Phaclofen inaktiviert. GABA_A-Rezeptoren sind ebenfalls pentamere Proteinkomplexe (Abb. 1) und können insgesamt sieben Untereinheiten-Familien enthalten: α (sechs Isoformen), β (drei Isoformen), γ (drei Isoformen) und δ , ϵ , θ , π (je eine Isoform) (Abb. 1). Wie im Fall des Glyzin-Rezeptors wurde auch hier eine räumliche und zeitliche Heterogenität der Untereinheitenexpression nachgewiesen (Laurie et al., 1992; Fritschy et al., 1995). Die meisten Untereinheiten werden bei Einzelexpression im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten (Connolly et al., 1996). Die β 1-, β 2- und γ 2-Untereinheiten sind für den Transport und die Insertion in die Plasmamembran verantwortlich; die γ -Untereinheiten sind entscheidend für die synaptische Lokalisation der Rezeptoren (Connolly et al., 1999). *In vivo* sind funktionelle Rezeptoren überwiegend aus einer Kombination von 2 α -, 2 β - und 1 γ -Untereinheiten zusammengesetzt (Chang et al., 1996; Tretter et al., 1997; Farrar et al., 1999).

1.3.1 Gephyrin

Die Verankerung inhibitorischer Rezeptoren in der Plasmamembran wird ähnlich wie bei den exzitatorischen Synapsen durch spezielle intrazelluläre Proteine vermittelt. Das Protein Gephyrin (griech. γέφυρα „Brücke“ oder der „Brückenbildner“), ein 93 kDa peripheres Membranprotein, ist in der Lage, ein gerüstartiges Netzwerk unterhalb der Membran zu bilden, und spielt eine essentielle Rolle in der synaptischen Lokalisation von Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren (Prior et al., 1992). Gephyrin wurde ursprünglich über die Aufreinigung des Glyzin-Rezeptors aus Rückenmarkpräparationen identifiziert

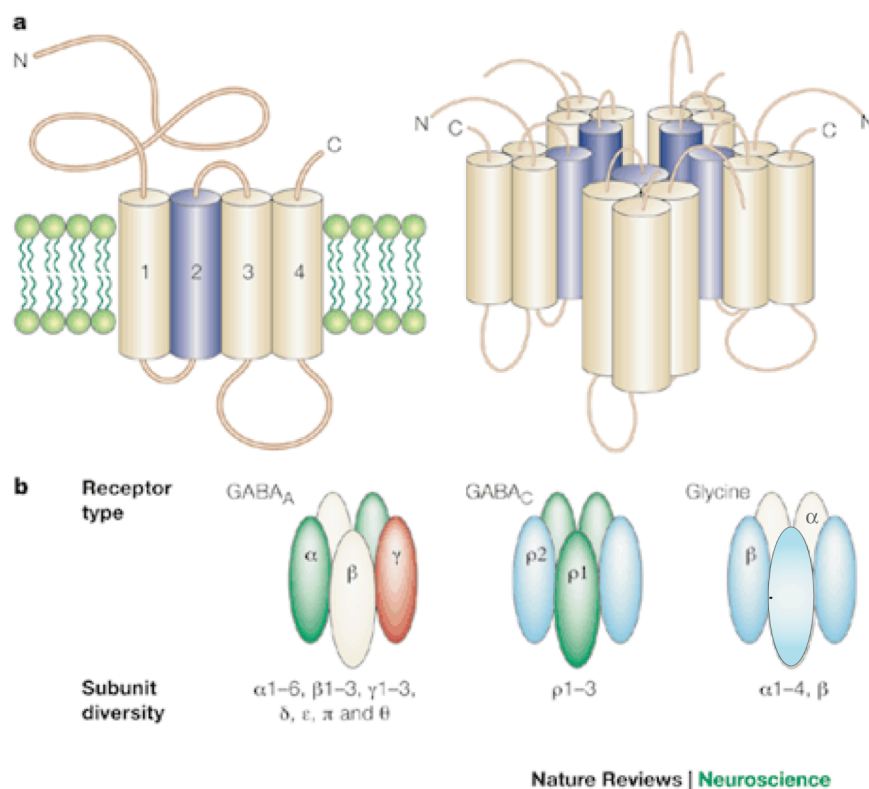


Abbildung 1: Struktur und Diversität von inhibitorischen Neurotransmitter-Rezeptoren a) Allgemeiner Aufbau eines Liganden-gesteuerten Ionenkanals: Vier hydrophobe Transmembrandomänen (TM). Der große N-terminale Abschnitt liegt extrazellulär und beinhaltet sowohl die Neurotransmitter- als auch zusätzliche modulatorische Bindungsstellen. Die intrazelluläre Domäne zwischen TM3 und TM4 ist der am wenigsten konservierte Abschnitt und enthält mehrere Konsensusmotive für Ser/Thr- und Tyr-Phosphatasen. **b)** Pentamerer Aufbau von GABA_A-, GABA_C- und Glyzin-Rezeptor-Subtypen. Die Mehrheit der GABA_A Rezeptoren besteht aus α, β and γ-Untereinheiten im Verhältnis 2:2:1. Die δ, ε and θ Untereinheiten können in einigen Subtypen die γ Untereinheit ersetzen. GABA_C Rezeptoren bestehen aus ρ1-3 Untereinheiten. Glyzin-Rezeptoren sind ebenfalls pentamer aufgebaut und setzen sich aus den Untereinheiten α und β zusammen im Verhältnis 2:3 (Abbildung modifiziert aus Moss und Smart, 2001).

(Pfeiffer et al., 1982; Schmitt et al., 1987). Es besteht aus drei unterschiedlichen Sequenzabschnitten: einer N-terminalen G-Domäne einer Prolin-reichen zentralen Domäne (Linker) und einer C-terminalen E-Domäne. Sowohl der amino- als auch der carboxyterminale Abschnitt von Gephyrin weisen eine ausgeprägte Homologie zu bakteriellen (*mogA* und *moeA*), Invertebraten (*cinnamon*) und pflanzlichen (*cnx-1*) Proteinen auf, welche an der Synthese des Molybdän-Kofaktors (MoCo), der prosthetische Gruppe der meisten Molybdoenzyme, beteiligt sind (Prior et al., 1992; Feng et al., 1998). Durch alternatives Spleissen der Exons C1-C7 werden Gephyrin-Isoformen generiert mit potentiell unterschiedlichen Funktionen, die zwar weitläufig im Gehirn und dem Rückenmark, aber auch in unterschiedlichen peripheren Geweben

exprimiert werden (Prior et al., 1992; Ramming et al., 2000; Kirsch und Betz, 1993). Die am besten charakterisierte Isoform P1 tritt im Zentralnervensystem am häufigsten auf und bindet an die Glyzin β -Untereinheit. Die besondere Eigenschaft von Gephyrin, höhermolekulare Assoziate zu bilden, ermöglicht die Verankerung der Rezeptoren an der Synapse (Sola et al., 2000, 2004). Die N-terminale G-Domäne von Gephyrin bildet als bakteriell exprimiertes Protein Trimere (Xiang et al., 2001; Sola et al., 2001), während für die C-terminale E-Domäne aus der Kristallstruktur eine dimere Struktur ermittelt wurde (Sola et al., 2004). Man geht mittlerweile davon aus, dass Gephyrin über Interaktionen an beiden Domänen eine hexagonale oligomere Struktur ausbildet (Kneussel und Betz, 2000; Xiang et al., 2001; Sola et al., 2001; Sola et al., 2004). Ein solcher Mechanismus könnte erklären, wie Gephyrin eine Verankerungs-Matrix für Rezeptoren unterhalb der Plasmamembran schafft. Mittels Deletionsanalysen konnte das entsprechende Bindungsepitop des Glyzinrezeptors auf eine etwa 18 Aminosäuren lange Sequenz im intrazellulären Abschnitt der β -Untereinheit eingegrenzt werden (Meyer et al., 1995). Dieses kurze Motiv allein ist bereits ausreichend, um eine Interaktion von Proteinen mit Gephyrin zu ermöglichen, wie in HEK 293-Zellexpressionsstudien mit modifizierten NMDA-Rezeptor-Konstrukten nachgewiesen wurde (Kins et al., 1999; Kneussel et al., 1999). Die Expression von Gephyrin mit unterschiedlichen Glyzinrezeptor-Untereinheiten in nicht neuronalen Zelllinien hat eine spezifische Anreicherung der β -Untereinheit in intrazellulären Gephyrin-Aggregaten zur Folge (Kirsch et al., 1995).

Es bisher nicht gelungen, eine direkte Bindung von Gephyrin an eine GABA_A-Rezeptor-Untereinheit nachzuweisen. Es konnte eine Kollokalisierung von Gephyrin an gemischt glyzinerger und GABAergen Synapsen im Rückenmark (Todd et al., 1996), und an rein GABAergen Synapsen der Retina (Sassoé-Pognetto et al., 1995) und des Hippokampus (Craig et al., 1996) aufgezeigt werden. Ebenso wurde eine partielle Rekrutierung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit $\beta 3$ in intrazelluläre Gephyrin-Aggregate im heterologen HEK293 System beobachtet (Kirsch et al., 1995). Die Interaktion konnte jedoch biochemisch nicht bestätigt werden (Meyer et al., 1995). Eine Bindung von Gephyrin an die GABA_A-Rezeptor γ -Untereinheit könnte über das Protein GABARAP (GABA_A-receptor associated protein) vermittelt werden. Biochemische Analysen konnten eine Bindung von GABARAP an Gephyrin nachweisen (Kneussel et al., 2000). Mittlerweile ist anzunehmen, dass GABARAP wohl keine Rolle an der

postsynaptischen Spezialisierung spielt, sondern vielmehr im Zytoplasma und in der Nähe diverser vesikulärer Strukturen in Neuronen vorkommt (Kneussel et al., 2000; Kittler et al., 2001). Möglicherweise interagiert Gephyrin über ein noch nicht identifiziertes Protein mit GABA_A-Rezeptoren, oder eine bisher nicht identifizierte Spleißvariante von Gephyrin ist für die Assoziation verantwortlich.

1.3.2 Interaktion von Gephyrin mit dem neuronalen Zytoskelett

Die Effizienz von Synapsen ist abhängig von der Konzentration der entsprechenden Rezeptoren an der postsynaptischen Membran. Die Verankerung der Rezeptoren am subsynaptischen Zytoskelett spielt somit eine wichtige Rolle für die Effizienz der synaptischen Transmission. Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen setzt sich aus drei unterschiedlichen Klassen von zytoplasmatischen Strukturproteinen zusammen: Tubulin, Aktin und Intermediärfilamentproteine.

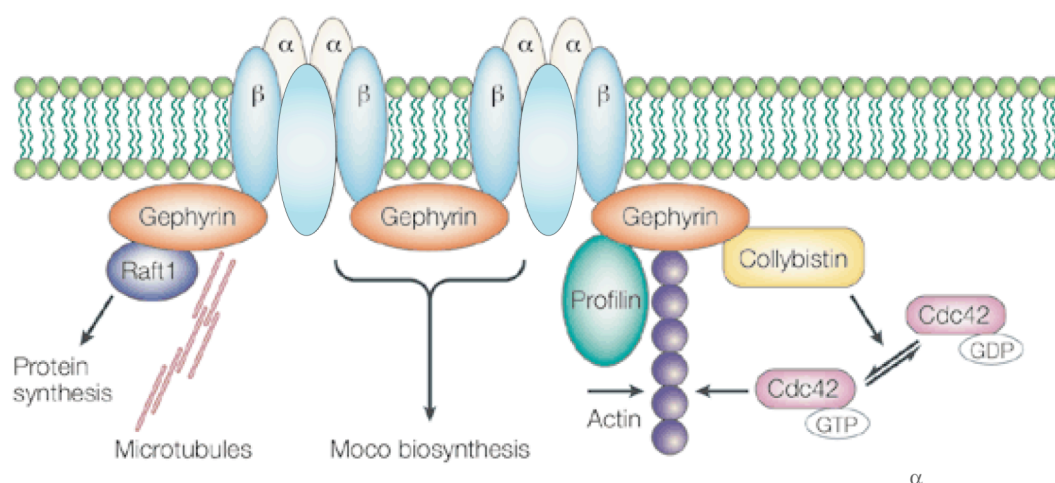
Mittels biochemischer Analysen und Transfektionsstudien wurde nachgewiesen, dass Gephyrin mit hoher Affinität kooperativ an polymerisiertes Tubulin bindet (Kirsch et al., 1991) (Abb.2) und eine Depolymerisation des Mikrotubuli-Netzwerks durch Demecolcin die synaptische Lokalisation Gephyrins und des Glyzinrezeptors in Rückenmarkskulturen zerstört (Kirsch et al., 1995; Kirsch et al., 1991). Zusätzlich konnte eine Komplexbildung zwischen Gephyrin und dem Mikrotubuli-Motorprotein Dynein (Dlc-1/-2) nachgewiesen werden (Fuhrmann et al., 2002). Dlc-1/-2 bindet in der Gephyrinsequenz im Bereich der Aminosäuren 181-243. Eine entsprechende Deletionsmutante ohne dieses Bindemotiv wies keine Affinität zu Dlc-1/-2 auf. Die Interaktion von Gephyrin mit Dlc-1/-2 legt nahe, dass der Transport und die subzelluläre Lokalisation des Proteins möglicherweise von Dlc enthaltenden Motorproteinkomplexen reguliert wird.

Auf welche Art Gephyrin mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert, ist noch nicht abschließend geklärt. Inkubationen von kultivierten Rückenmarksneuronen mit dem Alkaloid Cytochalasin D (Kirsch und Betz, 1995), welches das Aktin-Zytoskelett depolymerisiert, hatten eine Reduktion der Anzahl und Größe postsynaptischer Gephyrincluster zur Folge. Die verbleibenden Cluster wiesen jedoch eine deutlich höhere Dichte auf (Kirsch et al., 1995). Möglicherweise handelt es sich um eine antagonistische Wirkung von Mikrofilamenten und Mikrotubuli auf die Packungsdichte

von Gephyrin in der postsynaptischen Membran. Eine zweite Studie in hippokampalen Primärkulturen ergab keinen Hinweis auf die Abhängigkeit der Gephyrincluster von F-Aktin oder Mikrotubulstrukturen (Allison et al., 2000), was möglicherweise auf eine unterschiedliche synaptische Zusammensetzung oder unterschiedliche Differenzierungsstadien der verwendeten Kulturen zurückzuführen ist. Eine direkte Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett konnte bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden; es ist also anzunehmen, dass der beobachtete Effekt über ein verbindendes Protein zwischen Gephyrin und Aktin vermittelt wird.

Profilin I, ein weiteres Zytoskelett-organisierendes Protein, interagiert ebenfalls mit Gephyrin (Mammoto et al., 1998), (Abb. 2). Profilin stimuliert die ADP-ATP Austauschreaktion des Aktin-Monomers und fördert somit die Inkooperation von G-Aktin in F-Aktin Filamente. Es bindet an Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) (Lambrecht et al., 1995) und an „*enabled Vasodilator stimulated phosphoprotein*“ (ena/VASP) (Reinhard et al., 1995) und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Endozytose und beim Vesikelrecycling (Witke et al., 1998). In Säugetieren wurden bisher vier Isoformen nachgewiesen. Profilin I wird in vielen Geweben exprimiert, während Profilin II ausschließlich im Gehirn und im Skelettmuskel auftritt (Witke et al., 1998).

Giesemann et al. (2002) gelang es, einen weiteren Gephyrin-Liganden zu identifizieren, der die Organisation des Mikrofilamentsystems zu beeinflussen vermag. Das Protein *enabled Vasodilator stimulated phosphoprotein* (ena/VASP) gehört zu einer Proteinfamilie, die sich aus dem Drosophila Protein *enabled* (Ena), dem entsprechenden Säugetier-Homolog Mena (*mammalien enabled*) und VASP zusammensetzt. Ein Charakteristikum aller Familienmitglieder ist die dreigliedrige Domänenstruktur, die eine N-terminale ena/VASP homologen Domäne 1 (EVH1), einen Prolin-reichen zentralen Bereich (ähnlich wie bei Gephyrin) und die EVH2-Domäne im C-terminalen Bereich umfasst. Die Hauptfunktion von ena/VASP als Mikrofilament-Adaptor besteht in der Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen an Plasmamembranen mit aktiver Mikrofilamentsynthese (Hüttelmaier et al., 1998). ena/VASP bindet bevorzugt an Proteine, die Prolin-reiche Abschnitte in ihrer Sequenz aufweisen. Ein derartiges Epitop findet sich in der Linkerregion von Gephyrin (Krause et al., 2003). Es bindet über seine Prolin-reiche Region ähnlich wie L-Poly-Prolin an Profilin, ein bekannter Interaktionspartner von Gephyrin (Mammoto et al. 1998). Gephyrin, Profilin und Mena kolokalisieren sowohl an inhibitorischen Synapsen als auch in rekombinanten



Nature Reviews | Neuroscience

Abbildung 2: Die Konzentration von Glyzin-Rezeptoren in der postsynaptischen Plasmamembran erfolgt durch die intrazelluläre Bindung an Gephyrin. Das Gephyrin-Netzwerk verankert die Rezeptoren direkt mit dem Mikrotubulenskelett. Die Aktin regulierenden Proteine Profilin und Collybistin sind zusätzliche Interaktionspartner von Gephyrin und ermöglichen eine lokale Regulation des Aktin-Zytoskelettes an der Synapse. Die Bindung von Gephyrin an RAFT1 könnte in der lokalen synapsenspezifischen Proteinsynthese eine Rolle spielen (Moss und Smart, 2001)

Expressionssystemen. Gephyrin und G-Aktin konkurrieren demnach um die gleiche Bindungsstelle an Profilin, während die Interaktion mit VASP laut Giesemann et al. (2002) an der C-terminalen E-Domäne von Gephyrin stattfindet. Durch Zwei-Hybrid-Analysen in Hefen wurde eine Interaktion von Gephyrin (Abb. 2) mit Collybistin nachgewiesen (Kins et al., 2000), einem GDP-GTP Austauschfaktor (GEF), der spezifisch die Aktivität von Cdc42, einer Rac-/Rho-artigen GTPase, zu verstärken vermag. Cdc42 wirkt dabei regulatorisch auf die Morphologie des Aktin-Zytoskeletts ein. Collybistin wird ausschließlich im Nervensystem exprimiert und existiert in drei unterschiedlichen Spleissvarianten, Collybistin I, II und III (Kins et al., 2000; Harvey et al., 2004). Sowohl für Collybistin I als auch Collybistin II wurde eine Bindung an Gephyrin nachgewiesen (Grosskreutz et al., 2001). Collybistin II kopräzipitiert mit der P1 Isoform aus transfizierten HEK293-Lysaten, und die Koexpression von Collybistin II und P1-Gephyrin führt zur Translokation der intrazellulären Gephyrin-Aggregate an die Plasmamembran. (Kins et al., 2000). Dieser Membranrekrutierungs-Effekt ist jedoch auf die Collybistin II-Isoform begrenzt; Collybistin I ist nicht in der Lage, eine Translokation zur Zelloberfläche zu bewirken. Die Rekrutierung von Cdc42-

spezifischen GEFs wie Collybistin an die Synapse könnte möglicherweise eine regulatorische Rolle bei der Entstehung von Gephyrinclustern an der neuronalen Plasmamembran spielen (Kneussel und Betz, 2000).

1.3.3 Intrazelluläre Signalübertragung an inhibitorischen Synapsen

Das postsynaptische Netzwerk unterhalb der Plasmamembran verankert nicht nur die für eine effektive synaptische Transmission benötigten Rezeptoren, sondern ebenfalls spezialisierte intrazelluläre Botensysteme (*Second-Messenger-Systeme*), welche die funktionellen Eigenschaften der Rezeptoren und nachgeschalteter Effektorproteine zu modulieren vermögen. Der Einfluss von unterschiedlichen Signalkaskaden auf die Lokalisation und Funktionalität von GABA_A- oder Glyzin-Rezeptoren wurde bereits intensiv untersucht, doch über die Auswirkung einer Inhibition auf Rezeptor-assoziierte Proteine wie Gephyrin, welches für die Verankerung der Rezeptoren in der postsynaptischen Plasmamembran essentiell ist, existieren nur wenige relevante Daten. Da Gephyrin ebenfalls mit Proteinen zur intrazellulären Signalübermittlung interagiert (Abb.2+3), könnte es möglicherweise selbst eine Funktion in der Signalübertragung an der Synapse ausüben.

In embryonalen Rückenmarkskulturen ist die Glyzinrezeptor-Aktivierung und der resultierende Ca²⁺-Einstrom ausschlaggebend für die Konzentration des Rezeptors an Synapsen (Kirsch und Betz, 1998; Levi et al., 1998). Der Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt als intrazelluläres Signal unter anderem zur Aktivierung von Adenylatcyclasen, Protein-Phosphatase 2B (Calcineurin) oder Phosphodiesterasen. Die Behandlung der Kulturen mit Tetrodotoxin (TTX) verhindert eine postsynaptische Lokalisation sowohl des Rezeptors als auch von Gephyrin. Die Induktion der postsynaptischen Matrix könnte demnach von einer Glyzin-Ausschüttung aus den präsynaptischen Terminal abhängen. Eine anhaltende Inhibition des Glyzin-Rezeptors mit dem Antagonisten Strychnin hat eine intrazelluläre Anreicherung des Rezeptors und einen kompletten Verlust der synaptischen Lokalisation zur Folge (Levi et al., 1998). Untersuchungen an hippocampalen Neuronen dagegen ergaben, dass TTX Inkubation keine Auswirkung auf die PSD-95, GluR1 oder Gephyrinverteilung zeigte (Harms und Craig, 2005). Diese gegensätzlichen Effekte könnten auf unterschiedliche Spleissvarianten von Gephyrin in spinalen vs. hippocampalen Neuronen

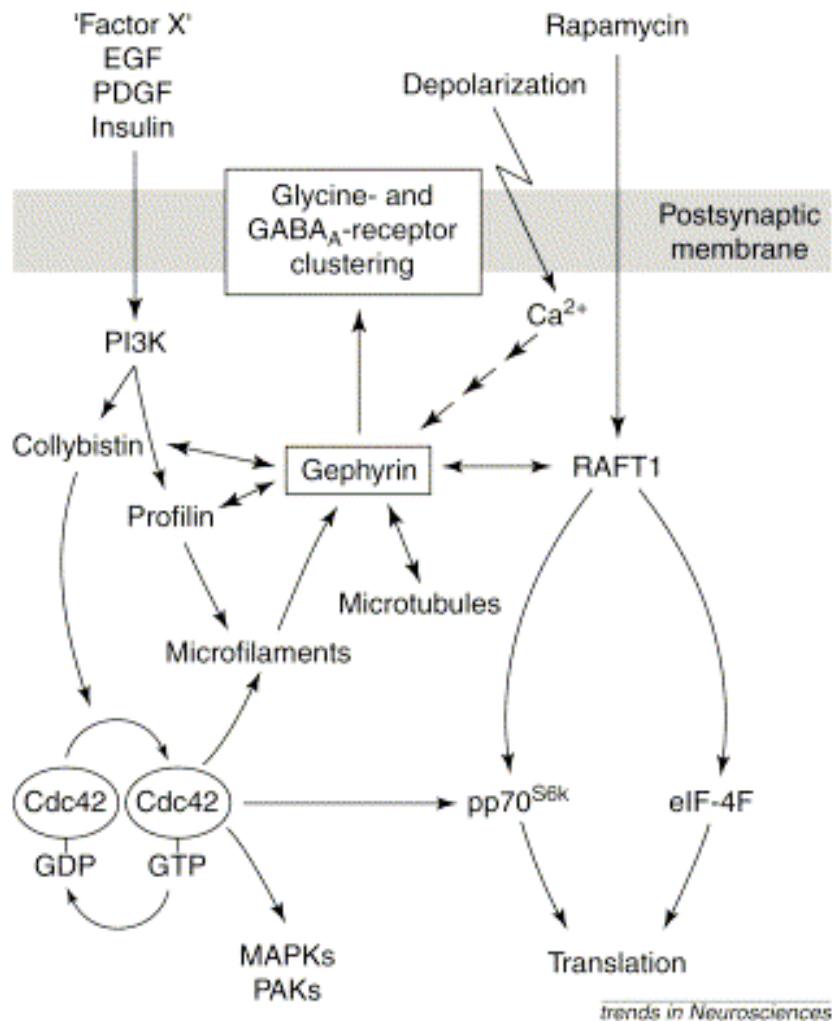


Abbildung 3: Einfluss von Gephyrin auf a) aktivitäts-abhängige oder b) durch tropische Faktoren regulierte Signalwege an der inhibitorischen Synapsen. Ca^{2+} -Einstrom und die lokale Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) sind möglicherweise ausschlaggebend für den Aufbau des postsynaptischen Gephyrin-Netzwerkes an sich entwickelnden inhibitorischen Synapsen. Die genaue Wirkung des lokal erhöhten Ca^{2+} -Einstroms ist noch unbekannt, beeinflussen aber sehr wahrscheinlich das Aktin- und Tubulin-Zytoskelett. Die Aktivierung der PI3K könnte über entsprechende G-Proteingekoppelte Rezeptoren erfolgen, die entweder auf noch unbekannte „Induktions-Faktoren“ oder Hormone als Liganden reagieren. Der resultierende Anstieg von $PtdIns(3,4,5)P_3$ könnte seinerseits zur Rekrutierung von Collybistin und Profilin an die Membran führen und dadurch lokale Änderungen des Aktin-Zytoskelettes auslösen. Durch Bindung an membran-assoziiertes Collybistin und Profilin könnte Gephyrin an die Synapse rekrutiert werden. Die erhöhte lokale Konzentration von Gephyrin wiederum stimuliert die Kinaseaktivität von RAFT1 und beeinflusst die synaptische Proteinsynthese. (Model nach Kneussel und Betz., 2000)

zurückzuführen sein (Lüscher und Keller, 2004). Signale, die über G-Proteingekoppelte Rezeptoren vermittelt werden, könnten aktiv Einfluss auf inhibitorische Synapsen ausüben. Nach der Bindung des Liganden kommt es zu einer Aktivierung der

1. Einleitung

Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) über Tyrosin-Kinase oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren. PI3K ist verantwortlich für die Synthese von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-P₃, welches eine Rekrutierung von Collybistin und Profilin zu aktivierten Membrandomänen initiieren könnte. Somit könnten lokal Veränderungen des Zytoskeletts induziert und Gephyrin über seine Bindungspartner an potentielle Synapsen rekrutiert werden (Kneussel und Betz, 2000). Die Rekrutierung von Gephyrin durch Collybistin und Profilin zur postsynaptischen Plasmamembran könnte zusätzlich die Kinaseaktivität eines weiteren Gephyrin-Bindungspartners und somit eine lokale synaptische Proteinsynthese stimulieren. Die Interaktion mit RAFT1, einem mRNA-Translations-Mediator, deutet auf eine regulatorische Funktion z.B. für eine lokale dendritische Proteinsynthese hin (Steward et al., 1999). Das Vorhandensein hoher Konzentrationen von subsynaptischer Glyzinrezeptor- α -Untereinheit-mRNA (Racca et al., 1997) unterstützt die Hypothese, dass bestimmte, an der synaptischen Transmission beteiligte Proteine lokal in der Nähe der Synapse hergestellt werden. Die duale Interaktion von Gephyrin mit Collybistin und RAFT1 könnte somit eine Verknüpfung der Translationskontrolle und des subsynaptischen Zytoskeletts ermöglichen (Kneussel und Betz., 2000).

Es ist seit längerem bekannt, dass die spezifische Aktivierung von Tyrosin-Kinase-gekoppelten Rezeptoren (TrK) ebenfalls die GABA_A-Rezeptorverteilung zu modulieren vermag. Die Bindung des Liganden, z.B. Neurotrophin-3 (NT-3) oder Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), an den Rezeptor führt zur Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden, wie z.B. der MAP-Kinase-Kaskade (Mitogen-aktiviert Protein-Kinase). Die Aktivierung des TrKB-Rezeptors durch BDNF kann sowohl die Aktivität als auch die Oberflächenexpression des GABA_A-Rezeptors modulieren (Brüning et al., 2001; Mizoguchi et al., 2003; Jovanovic et al., 2004). Der Effekt wird durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung der β 1-3 und γ 2 Untereinheiten des GABA_A Rezeptors vermittelt. Sie können durch eine Reihe von Kinasen/Phosphatasen moduliert werden, die zum Teil direkt binden oder über Untereinheiten-spezifische Adapterproteine an den Rezeptor rekrutiert werden. Dazu zählen unter anderem die Protein-Kinase A (PKA), Protein-Kinase C (PKC), Protein-Phosphatase 2A (PP2A) als auch der Rezeptor der aktivierte C-Kinase (RACK-1) und das PKA verankernde Protein (AKAP)79/150 ((Moss et al., 1992a; McDonald et al., 1998; Brandon et al., 1999, 2000; Jovanovic et al., 2004). Die Aktivität von Glyzin-Rezeptoren kann ebenfalls durch PKA

und PKC Phosphorylierung moduliert werden (Vaello et al., 1994; Caraiscos et al., 2002). Langosch et al. konnten bereits 1992 zeigen, dass auch Gephyrin an Serin/Threonin Positionen phosphoryliert wird; allerdings gelang es zu diesem Zeitpunkt nicht, die entsprechende Kinase zu identifizieren. Es besteht somit die Möglichkeit, dass die postsynaptische Lokalisation des Glyzin- und GABA_A-Rezeptors nicht nur durch die direkte Phosphorylierung von Rezeptoruntereinheiten reguliert wird, sondern dass zusätzlich eine Phosphorylierung von Gephyrin einen wichtigen Einfluss auf die Rezeptor-Lokalisation oder die Stabilisierung des postsynaptischen Netzwerkes ausüben könnte.

1.4 Zielsetzung des Projektes

Die Voraussetzung für eine schnelle und präzise synaptische Transmission ist eine hohe Konzentration von Neurotransmitter-regulierten Ionenkanälen in der postsynaptischen Plasmamembran. Das Protein Gephyrin (Prior et al., 1992) spielt eine essentielle Rolle in der synaptischen Lokalisation sowohl von Glyzin- als auch GABA_A-Rezeptoren (Feng et al., 1998; Kneussel et al., 2000). Der Einfluss von unterschiedlichen Signalkaskaden auf die Lokalisation und Funktionalität von GABA_A- oder Glyzinrezeptoren wurde bereits intensiv untersucht, doch für Rezeptor-assoziierte Proteine wie Gephyrin existieren nur wenige relevante Daten. Es ist nicht bekannt, welche Signalwege am Transport von Gephyrin zur Synapse, seiner Anreicherung und Stabilisierung unterhalb der Plasmamembran oder an seinem Abbau beteiligt sind. Um das postsynaptische Netzwerk zu stabilisieren, ist eine Interaktion von Gephyrin mit Proteinen der Mikrofilamente und der Mikrotubuli nötig. Frühere Experimente belegten bereits eine direkte Interaktion von Gephyrin mit Tubulin, doch ist bisher nicht geklärt, wie Gephyrin an das Aktin-Zytoskelett gekoppelt ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch pharmakologische Beeinflussung von Schlüsselenzymen jene Signalwege identifizieren, die am Transport von Gephyrin, seiner Stabilisierung im postsynaptischen Netzwerk und an seinem Abbau beteiligt sind. Des Weiteren soll analysiert werden, ob Gephyrin eine Funktion in der Verankerung von Signaltransduktionskomponenten, wie es für Glutamatrezeptor-assoziierte Proteine gezeigt werden konnte, ausübt. Zu diesem Zweck sollen hippocampale Primärkulturen unterschiedlicher Differenzierungsstadien mit Inhibitoren und Aktivatoren der ausgewählten Signalkaskaden inkubiert und das Verteilungsmuster der Gephyrincluster

1. Einleitung

mittels Immunfluoreszenzfärbung ausgewertet werden. Im Zuge der Untersuchungen soll ausserdem die Interaktion von Gephyrin mit dem Aktin-Zytoskelett genauer analysiert werden. Handelt es sich um eine direkte Bindung, oder wird die Interaktion über ein Adapterprotein vermittelt? Dies soll mittels Expression von GFP-Gephyrin-Konstrukten in HEK293T-Zellen analysiert werden. Durch Alkaloidbehandlung von hippokampalen Primärkulturzellen soll untersucht werden, inwiefern die Größe und Stabilität neuronaler Gephyrinclustern durch das Aktin-Zytoskelett reguliert wird.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Salze, Säuren, Basen und Lösungsmittel (auch hier nicht explizit aufgeführte Substanzen) besaßen p.a. Qualität oder wurden in ihrer konzentriertesten oder reinsten Form von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt). Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten von Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt), T4-DNA-Ligase, T4-Polynukleotidkinase und T4-DNA-Polymerase von Roche (Mannheim), Pfu Turbo Polymerase und Desoxyribonukleotide von Invitrogen (Karlsruhe).

2.1.2 Zelllinien und Primärzellen

Bezeichnung	Beschreibung
hippokampale Primärkultur aus Wistar Ratten Embryonen (E18)	Fuhrmann et al., 2002
HEK 293 T	Human Embryonic Kidney Cells (ATCC CRL-1573) Stansfeld <i>et al.</i> , 1996

Die ATCC-Nummern beziehen sich auf den „Catalogue of Cell Lines & Hybridomas“, (1998).

2.1.3 Lösungen und Medien

Die Standardlösungen für die molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien sind im folgenden aufgelistet .

2. Material und Methoden

2.1.3.1 Molekularbiologische Lösungen

1 x TAE Elektrophoresepuffer:

40 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA, pH 8, 0

6 x DNA Probenpuffer:

40% (w/v) Saccharose

0,25% (w/v) Bromphenolblau

LB Medium:

1% (w/v) Peptone 140

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) Natriumchlorid, pH 7, 4

LB-Agar:

LB Medium mit 1,5% (w/v)

Agar Bacteriological

Selektionierung:

1 mM IPTG, 0,02% (w/v) X-Gal

2.1.3.2 Proteinbiochemische Lösungen

HBS (HEPES-gepufferte Saline):

50 mM HEPES, pH8.0, 100 mM NaCl,

1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂

Proteaseinhibitor-Cocktail

Roche (Mannheim)

LP1 (HEK293T-Extrakte):

PBS, 0,2% (v/v) Triton-X-100,

Proteaseinhibitor-Cocktail

LP2 (GST-Aufreinigung) :

10 mM Tris/HCl pH8.0, 150 mM NaCl,

1 mM EDTA

Glutathione Elutions Puffer :

50 mM Tris/HCl/HCl, pH8.0

10 mM Glutathione (reduziert)

LP3 (His-Aufreinigung) :

50 mM Tris/HCl pH8.0, 300 mM NaCl,

10 mM Imidazol

Waschpuffer (His-Aufreinigung):

50 mM Tris/HCl, pH8.0, 300 mM NaCl, 20

mM Imidazol

Elutionspuffer (His-Aufreinigung):

50 mM Tris/HCl, pH8.0, 300 mM NaCl,

250 mM Imidazol

LP4 (ATP³²-Assay):

PBS/0,2% (v/v) Triton-X-100

Protease und Phosphatase Inhibitoren

(Sigma-Aldrich ,Taufkirchen)

BP1 (Immunpräzipitation):

PBS, 5% (w/v) Rinderserumalbumin

(BSA), 0,2% (v/v) Triton-X-100

Waschlösung (Immunpräzipitation):

PBS/0,2% (v/v) Triton-X-100

2. Material und Methoden

Waschlösung (³²P-Assay):

PBS, 0,2% (v/v) Triton-X-100

2 x Kinase Puffer (³²P-Assay):

50 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH7,5

10 mM MgCl₂, Protease Inhibitoren
(ohne EDTA), Phosphatase Inhibitoren

Aktinpuffer (BSA01) :

5 mM Tris/HCl pH8.0, 0,2 mM CaCl,
0,2 mM ATP, 0,5 mM DTT

10 x Polymerisationspuffer :

500 mM KCl, 20 mM MgCl₂,
10 mM ATP

5 x SDS Probenpuffer:

500 mM DTT; 10% (w/v) SDS;
50% (v/v) Glycerin;
250 mM Tris/HCl, pH 6,8;
0,5% (w/v) Bromphenolblau;

Trenngel (SDS-PAGE):

10% Acrylamid mit 0,1% (w/v) SDS und
375 mM Tris/HCl, pH 8,8

Sammelgel: (SDS-PAGE):

6% Acrylamid, 0,1% (w/v) SDS,
125 mM Tris/HCl pH 6,8

Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE):

192 mM Glyzin; 0,1% (w/v) SDS;
25 mM Tris/HCl; pH 8,3

Coomassie-Färbelösung:

2,5% (w/v) Coomassie-Brillant-Blau,
45% (v/v) Methanol, 45% (v/v) H₂O,
10% (v/v) Essigsäure

Coomassie- Entfärbelösung:

20% (v/v) Methanol; 70% (v/v) H₂O;
10% (v/v) Essigsäure

Transfer-Puffer::

25 mM Tris/HCl pH8,3
192 mM Glyzin; 20% (v/v) Methanol;

BP2 (Western Blot):

3% (w/v) Magermilchpulver (Frema
Reform, Lüneburg), 0,2% (v/v) Tween-20
in TBST

1 x TBS:

150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl;
pH 7,5

1 x TBST:

1x TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20

Elutionspuffer (Western Blot):

500 mM NaCl; 200 mM Glyzin; HCl,
pH 2,3

2.1.3.3 Zellbiologische Lösungen

Kulturmedium (HEK293T):

10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS), 50 U/ml Penicillin; 50 µg/ml Streptomycin, 2 mM/l L-Glutamin in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Karlsruhe)

Einfriermedium(HEK293T):

10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) in HEK293T-Kulturmedium

Trypsinlösung:

Trypsin- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Invitrogen, Karlsruhe)

Fibronectinbeschichtung:

500 µl Fibronectin (1mg/ml) (Sigma, Taufkirchen) in 20 ml PBS

Poly-L-Ornithinbeschichtung:

Poly-L-Ornithin (Sigma, Taufkirchen) 1,5µg/ml inPBS

2 x BBS:

50 mM BES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-Amino Ethansulfonsäure) (AppliChem), 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 6,95

DAPI-Lösung:

500 µg/ml Stock 1:1000 in PBS

Ca²⁺/Phosphat-Transfektionsmedium

10% (w/v) fötales Kälberserum (FCS) 1 mM L-Glutamin in DMEM

Ausplattiermedium (Primärkultur) :

10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS) 25 µg/ml Pyruvat; 50 U/ml Penicillin; 50 µg/ml Streptomycin

2 mMol/l L-Glutamin in DMEM

Kulturmedium (Primärkultur) :

2% (v/v) BL-27 25 µg/ml Pyruvat, 50 U/ml Penicillin; 50 µg/ml Streptomycin 1 mM L-Glutamin in Neurobasalmedium (Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.3.4 Histologische Lösungen

PBS (Phosphat-gepuffert)

137mM NaCl, 2,7 mM KCl 18,6mM Na₂HPO₄, 7,3mM KH₂PO

Fixierungslösung (Immunfärbung):

4g Para-Formaldehyd (PFA) in 100 ml PBS

BP3 (Immunfärbung):

PBS, 5% (v/v) Ziegen Serum 0,2% Triton-X-100

2.1.4 DNA-Molekulargewichtsstandards

Als DNA-Marker wurde der SmartLadder (Eurogentec, Köln) verwendet. Dieser enthält folgende DNA-Fragmente: 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.8, 0.6, 0.4 und 0.2 kbp. Der Marker wurde 1:6 mit DNA-Probenpuffer verdünnt.

2.1.5 Protein-Molekulargewichtsstandards

Verwendet wurden der SeeBlue[®] Pre-Stained Standard der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Der Prestained-Marker besaß die Protein-Leiter 250, 148, 98, 64, 50, 36, 22, 16, 6 und 4 kDa. 5 µl dieses Markers konnten direkt auf das SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)-Gel aufgetragen werden.

2.1.6 Vektoren und Plasmide

Name	Herkunft	Referenz
pEGFP-N3-Gephyrin (Volllänge)	Fusionsprotein aus pcDNA-p1 eGFP C-terminal	Prior et al, 1992
pEGFP-N3-Gephyrin d181-243	Fusionsprotein aus pcDNA-p1 Deletion der Basen 181-243	Prior et al, 1992
pVSV-Gephyrin (p1)	p1-Insertion in pcDNA3.1 über <i>NotI/XbaI</i> Verdau und VSV DNA über <i>HindIII/EcoRI</i>	Doktorarbeit J.Fuhrmann
pGFP- γ -Aktin	zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. A. Matus, FMI Basel, Schweiz	Fischer et al, 1998
pET28a- His-VASP	zur Verfügung gestellt von Dr. T. Renne, Würzburg	Haffner et al., 1995
pGEX5X1-GST-Gephyrin	p1-Insertion in pGEX5X1	Sola et al, 2004
pGEX5X1-GST-GE45	Insertion des C-Terminus von Gephyrin in pGEX5X1	Sola et al, 2004

2.1.7 Pharmakologie

Substanz	Wirkung	Referenz	Firma
BDNF	(Brain Derived Neurotrophic Factor) – fördert das Überleben und Wachstum von Neuronen. Effekt wird über den TrkB Rezeptor ausgeübt	Yamada et al., 2002 Brünig et al., 2001	Peprotech (London UK)
NT-3	(Neurotrophin-3) neurotrophisch wirksamer Effektor, der das Überleben von CNS Neuronen erhöht.	Paul et al., 2001	Peprotech (London UK)
U0126	Inhibitor von MEK1 (IC ₅₀ = 72 nM) und MEK2 (IC ₅₀ = 58nM).	Gerling et al., 2004	Merck Bioscience (Bad Soden)
U0124	negative Kontrolle für MEK Inhibitor U0126. Hat keinen Einfluss auf die MEK Aktivität	Evans et al., 2002	Merck Bioscience (Bad Soden)
Okadaic acid	Inhibitor von PP1 (IC ₅₀ = 10 - 15 nM) und PP2A (IC ₅₀ = 0.1 nM).	Norris et al., 2002 Kim et al., 2002	Merck Bioscience (Bad Soden)
Calyculin A	Inhibitor von PP2A (IC ₅₀ = 0.5 - 1.0 nM) und PP1 (IC ₅₀ = 2 nM).	Fukunaga et al., 2000 Oliver et al., 2002	Merck Bioscience (Bad Soden)
Cantharidin	Inhibitor von PP2A (IC ₅₀ = 40 nM) und PP1 (IC ₅₀ = 473nM).	da Cruz e Silva et al., 1995	Merck Bioscience (Bad Soden)
8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP	potenter Zell-permeable, metabolisch-stabile cAMP Derivate	Horgan et al., 1998	Sigma Aldrich, (Taufkirchen)

2. Material und Methoden

Pertussis-toxin	Endotoxin, welches die ADP-Ribosylierung von Proteinen wie Gi, Go, und Gt. katalysiert	Cowen et al., 2005	Sigma Aldrich, (Taufkirchen)
Calphostin C	Zellpermeabler Inhibitor von Proteinkinase C (IC ₅₀ =50 nM)	Wang et al., 2000	Sigma Aldrich, (Taufkirchen)
FK506	Inhibiert Ca ²⁺ abhängige Phosphatase (Calcineurin)	Kumashiro et al., 2005	Merck Bioscience (Bad Soden)
Ly294002	Zellpermeabler Inhibitor von PI3-Kinase (IC ₅₀ = 1.4 mM).	Yagyu et al., 2001 Harms et al., 2001	Merck Bioscience (Bad Soden)
Wortmannin	Zellpermeabler irreversibler Inhibitor von PI3-Kinase (IC ₅₀ = 5 nM).	Gary et al., 2001	Merck Bioscience (Bad Soden)
Thapsigargin	Inhibition der endoplasmischen retikulären Ca ²⁺ -ATPase (IC ₅₀ = 4-13 nM).	Kelly et al., 2005	Sigma Aldrich, (Taufkirchen)
Latrunkulin	Zellpermeables Toxin, welches Mikrofilamente zerstört	Allison et al., 2000	Sigma Aldrich, (Taufkirchen)
Jaspilakinolid	Induziert Aktin-Polymerisation und Stabilisation in vitro.	Jones et al., 2004	MoBiTec (Göttingen)
Cytochalasin D	Zellpermeables Toxin, welches die Formation von kontraktile Mikrofilamenten verhindert.	Allison et al., 1998	Merck Bioscience (Bad Soden)
Nocodazol	Depolymerisiert Tubulin	Kirsch und Betz, 1995 Hanus et al., 2004	Merck Bioscience (Bad Soden)
BAPTA	Kalziumkomplexbildner Inaktiviert Protein Kinase C.	Taketo et al., 2004	Sigma Aldrich, (Taufkirchen)
TTX	Reversibler und selektiver Blocker von Na ⁺ -Kanälen.	Aihara et al., Kirsch et al.,	Sigma Aldrich, (Taufkirchen)

2.1.8 Antikörper

Die für immunhistochemische Färbungen, Western Blot und Immunpräzipitationen eingesetzten Antikörper-Verdünnungen sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt. Immunfärbung (IF), Immunpräzipitation (IP) und Western-Blot (WB)

Antigen	Spezies	Verdünnung	Referenz
Gephyrin	Maus	1:400 (IF) 1:50 (IP)	Pfeiffer et al. (1984)
Gephyrin	Kaninchen	1:500 (WB) 1:50 (IP)	Santa Cruz Biotech (Heidelberg)
Gephyrin	Maus	1:1000 (WB)	BDBioscience (Heidelberg)
PP2aC katalytische Untereinheit	Kaninchen	1:50 (IP+IF) 1:500 (WB)	Merck Bioscience GmbH (Bad Soden)
PP2aC katalytische Untereinheit	Maus	1:50 (IP+IF) 1:500 (WB)	BDBioscience (Heidelberg)
PP1	Kaninchen	1:100 (IP+IF) 1:500 (WB)	Santa Cruz Biotech (Heidelberg)
ena/VASP	Maus	1:100 (IP+IF) 1:500 (WB)	J.Weiland (GBF, Braunschweig)
ena/VASP	Kaninchen	1:100 (IP+IF) 1:500 (WB)	Santa Cruz Biotech (Heidelberg)
GFP	Kaninchen	1:50 (CoIP) 1:2000 (WB)	BDBioscience (Heidelberg)
α -Aktin	Maus	1:1000 (WB)	Dianova (Hamburg)
α -Aktin	Kaninchen	1:1000 (WB)	Dianova (Hamburg)
α -Aktin	Ziege	1:1000 (WB)	Dianova (Hamburg)
GABA _A R α 1	Kaninchen	1:2000 (IF)	Upstate (Hamburg)
Synaptophysin	Maus	1:400 (IF)	Sigma Aldrich, (Taufkirchen)

2. Material und Methoden

α -Tubulin	Maus	1:400 (IF) 1:1000 (WB)	Sigma Aldrich, (Taufkirchen)
VIAAT (Vesikular GABA Transporter)	Kaninchen	1:1000 (IF)	Synaptic Systems (Göttingen)
VSV	Maus	1:100 (IF)	Santa Cruz (Heidelberg)
Phalloidin-Rhodamine		1:1000 (IF)	Invitrogen, Karlsruhe
Phalloidin (gekoppelt an 633)		1:50 (IF)	Invitrogen, Karlsruhe
Fluoreszenz-gekoppelte Zweitantikörper:			
α -Maus-546	Ziege	1:1000 (IF)	MoBiTec (Göttingen)
α -Maus-488	Ziege	1:1000 (IF)	MoBiTec (Göttingen)
α -Kaninchen-546	Ziege	1:1000 (IF)	MoBiTec (Göttingen)
α -Kaninchen-488	Ziege	1:1000 (IF)	MoBiTec (Göttingen)
Enzym-gekoppelte Zweitantikörper:			
α -Ziege-HRP	Ziege	1:4000 (WB)	Dianova (Hamburg)
α -Maus-HRP	Ziege	1:4000 (WB)	Dianova (Hamburg)
α -Kaninchen-HRP	Ziege	1:4000 (WB)	Dianova (Hamburg)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.1.1 Schnelle Plasmid-DNA-Präparation

Diese Plasmid DNA-Isolierung wurde mittels des Qiagen (Hilden) Plasmid-Mini-Kits durchgeführt, mit dem sich ca. 5-10 µg DNA gewinnen ließen. Alle aufgeführten Puffer sind bereits im Kit enthalten. Mini-DNA wurde zum schnellen Überprüfen von Klonierungen oder zur Transformation eingesetzt. Von einer bakteriellen Übernachtskultur (ÜNK) wurden 2 ml entnommen und für 30 Sekunden bei 18.000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 250 µl A1 resuspendiert und mit 250 µl A2 5 min bei RT alkalisch lysiert. Mit der Zugabe von 350 µl A3 wurde die Lösung neutralisiert, die Bakterienlyse gestoppt und die für die Affinitätsmatrix notwendige Salzkonzentration eingestellt. Die Fällung von denaturierten Proteinen, genomischer DNA, Zelltrümmern und SDS war vollständig. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 18.000g. Nachfolgend wurde der Überstand auf die Qiaprep-Spin-Säulen gegeben und letztere mit 18.000g für 1 min abzentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an der Silicat-Matrix band. Es folgten zwei Waschschritte durch Zentrifugation mit jeweils 18.000g für 1 min und ein zusätzlicher Trocknungsschritt bei 18.000g für 2 min. Schließlich erfolgte die Elution der DNA mit 50 µl H₂O.

2.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Hierbei wurde in einem 50 µl-Reaktionsgemisch eine DNA-Vorlage (1 ng Plasmid-DNA oder 500 ng genomische DNA) mit zwei flankierenden Oligonukleotiden mit entgegengesetzter Orientierung (je 5 pmol) durch die hitzestabile Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq) (1 Einheit = 1U) unter Zusatz der vier verschiedenen dNTPs (je 0,1 mM) in einem Thermocycler amplifiziert. Dies geschah nach einer initialen Denaturierung (Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge) bei 95°C für 2 min in 25 Zyklen durch Denaturierung für je 30 sec bei 95°C, durch Anlagerung der Oligonukleotide für je 1 min bei 55°C und durch Neusynthese des komplementären DNA-Stranges (Elongation) durch die Pfu Turbo Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe).

für je 9 min bei 72°C und schließlich durch terminale Elongation für 30 min bei 72°C. Zuletzt erfolgte eine Abkühlung auf 4°C.

2.2.1.3 Sequenzierung der verwendeten DNA-Konstrukte

Es wurde die DNA-Sequenzierung nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode angewandt. Nach Angaben des Herstellers unter Verwendung eines DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kits (Perkin Elmer, Applera, Weiterstadt) auf einem automatischen Sequenziergerät (Perkin Elmer 373A DNA Sequencer, Applera, Weiterstadt) Die Elektropherogramme wurden mit der EditView-Software Version 1.0.1 (ABI Prism, Perkin Elmer, Applera, Weiterstadt) ausgewertet.

2.2.1.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu, Nukleinsäuren nach ihrer Größe und Konformation zu trennen und durch Anfärben sichtbar zu machen. Nukleinsäuren, besitzen bei physiologischem pH-Wert eine negative Gesamtladung und bewegen sich daher im elektrischen Feld zur Anode hin. Die Wanderungsrate linearer Nukleinsäuren in einem Agarosegel verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres MW (Sambrook et al., 1989). Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Konzentration der Agarose im Gel ab. Mit einer Agarosekonzentration von 1% (w/v) kann ein Auftrennungsbereich linearer Nukleinsäuren zwischen 10 und 0,5 kb erreicht werden. Der Probenkamm wurde am oberen Rand der Platte in die Form eingesetzt. 1 bis 2% (w/v) Agarose wurde mit 1x TAE-Elektrophoresepuffer und Ethidiumbromid, eine in DNA interkalierende, ultraviolett-fluoreszierende Substanz versetzt, aufgeköcht, bis die Lösung klar erschien und in die vorgefertigte Form gegossen. Dabei sollte die Höhe des Gels ca. 0,5 cm betragen. Das erstarrte Gel wurde schließlich in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TAE-Elektrophoresepuffer bedeckt. Die zu analysierende DNA-Lösung wurde mit 6x DNA-Probenpuffer 1:6 vermischt. Der Puffer enthielt Saccharose, die das spezifische Gewicht der Probe erhöhte und so ihr Absinken in die Probenflasche bewirkte. Auf das Gel wurde ein DNA-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 3-5 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Anhand der Wanderung des im DNA-Probenpuffer enthaltenen anionischen Farbstoffes Bromphenolblau konnte der Verlauf der Elektrophorese verfolgt werden.

Die Farbfront bewegte sich auf der Höhe von DNA mit einer Größe von ca. 500 bp. Die Nachweisgrenze lag bei doppelsträngigen DNA-Fragmenten je nach Länge und Dicke des verwendeten Agarosegel-Typs zwischen 1 und 10 ng/Bande. Die einzelnen Banden wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Ein Video-Gel-Dokumentationssystem ermöglichte das Photographieren der Gele, das Ausdrucken der Bilder auf Thermopapier und das Digitalisieren der Bilder.

2.2.1.5 Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgte mit dem QiaQuick Gel-Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in Puffer gelöst. Das in diesem Puffer enthaltene Natriumthiosulfat setzte die DNA durch Auflösen der Agarose frei. Diese wurde mittels Anionenaustauschersäulen aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 µl H₂O.

2.2.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zum Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurden 0,5-1,5 µg DNA (1µg/µl) in einem Gesamtvolumen von 10 µl bei 37°C für 3-4 h geschnitten. Die Enzyme wurden in einer Konzentration von 1 U/µg Plasmid-DNA unter Verwendung der entsprechenden Puffer eingesetzt. Bei allen Restriktionsverdaus entsprach das Enzymvolumen maximal 10% des Gesamtvolumens, da das den Enzymen zur Stabilisierung zugesetzte Glycerin die Enzymreaktion stört. Nach der Inkubation wurde die Reaktion bei den meisten Enzymen durch Hitzeinaktivierung bei 60-65°C für 20 min abgestoppt.

2.2.1.7 Ligation von DNA-Molekülen

Der Ligations-Kit:(Roche, Mannheim) enthielt T4 DNA Ligase (1 U/µl) (aus T4 Phage) und 10x Ligationspuffer. Der Ligations-Reaktionsansatz von 10 µl enthielt 50 ng linearisierte Vektor-DNA und Insert-DNA im Verhältnis von 2:1 bis 10:1, 1 U T4-DNA-Ligase und 1 µl 10x Ligationspuffer. Die Inkubation erfolgte für 4-16 h bei 16°C.

2.2.1.8 Transformation elektrisch kompetenter E. coli-Bakterien

Zur Transformation wurde der Bakterienstamm XL1-Blue in einem Puffer mit geringem Salzgehalt verwendet. Je 1 µl des Ligationsansatzes oder 0,01 µg Plasmid-DNA wurden zu 50 µl elektrokompenten Zellen auf Eis in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die DNA wurde durch einen Stromstoß (25 µF, 2,5 V) in die Zellen eingebracht. Danach wurde der Transformationsansatz in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika gegeben und bei 210 rpm für 1 h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit konnte sich die Antibiotikumsresistenz ausbilden, welche die transformierten Bakterien durch die Aufnahme eines Plasmids erhalten. Anschließend wurden jeweils 100 µl Bakteriensuspension auf 37°C warme Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotikazugaben mit einem Drigalsky-Spatel auf der Agar-Oberfläche ausplattiert. Erste Kolonien konnte nach einer über Nacht Inkubation bei 37°C gepickt werden. Die Agarplatten konnten, mit Parafilm versiegelt, für ca. 3-4 Tage bei 4°C aufbewahrt werden. Von zufällig ausgewählten Kolonien wurden Übernachtkulturen angelegt.

2.2.1.9 Anlegen bakterieller Über-Nacht-Kulturen auf Agarplatten

Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurde LB-Agar durch 30 min Autoklavieren verflüssigt und im Wasserbad auf 50°C abgekühlt. Der Lösung wurde Antibiotikum zugefügt. Je 20 ml des LB-Agar wurden in Petrischalen (Ø 8,5 cm) gegossen. Nachdem der Agar ausgeharrt war, konnten die Platten bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert werden. Jeweils 100 µl Bakteriensuspension wurde mit einem Drigalsky-Spatel auf der Agar-Oberfläche ausplattiert und die Platten bei 37°C inkubiert. Auf dem festen Nährboden waren die Bakterien unbeweglich, vermehrten sich und bildeten sichtbare Kolonien.

2.2.1.10 Anlegen bakterieller Über-Nacht-Suspensionskulturen

Suspensionskulturen wurden zur Plasmid-Präparation und Herstellung kompetenter Bakterien angelegt. Jeweils 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer Glycerin-Kultur, einer anderen Suspensionskultur oder mit von einer Agarplatte gepickten Bakterienkolonie angeimpft. Die Übernachtkultur wurde im Inkubator bei 37°C bei 210 rpm für 12-16 h kultiviert. Für die längerfristige

Aufbewahrung wurde die ÜNK mit 18% (v/v) Glycerin gemischt. Glycerin schützt die Bakterien, indem es die Kristallbildung beim Einfrieren und Auftauen verhindert. Die glyzinhaltige Bakteriensuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt (Sambrook et al., 1989).

2.2.2 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

2.2.2.1 Proteinhomogenat aus Hirngewebe

Die Zell-Homogenate für die Koimmunpräzitations- und Glutathion-S-Transferase (GST)-Pull-down-Analysen wurden aus Ratten- oder Mäusehirn hergestellt. Sie wurden zunächst mit Halothan (Rebopharm, Bocholt) betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Das entnommene Gesamtgehirn wurde gewogen und in 5 Volumenanteilen HBS aufgenommen. Das Gewebe wurde unter Verwendung eines elektrischen Potters für 2 min auf Eis bei 1000 rpm homogenisiert und im Anschluss die Zellkerne bei 320g fuer 5 min abzentrifugiert. Dem Überstand wurde mit einer Endkonzentration von 0,5% (v/v) Triton-X-100 und 1 mM DTT zugefügt, die Probe für 30 min bei 4 °C inkubiert und im Anschluss erneut für 15 min bei 18.000 g zentrifugiert. Das Detergenzextrakt wurde anschließend sofort verwendet.

2.2.2.2 Herstellung von Proteinextrakten aus HEK-Zellen

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Proteinextrakte aus Eukaryontenzellen hergestellt. 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion wurden das Transfektionsmedium von den auf 10cm Schalen ausplatierten Zellen abgenommen, einmal mit kaltem PBS (+Ca²⁺, +Mg²⁺) gewaschen und jede Schale mit 1 ml Triton-X-100-haltigem Lysispuffer (LP1) abgelöst. Die anschließende 20-minütige Inkubation auf Eis diente der Solubilisierung der Plasmamembran, anschlie die Proben wurden zunächst für 5 min bei 320g zentrifugiert. Der Detergenzextrakt wurde erneut bei 18.000g für 15 min zentrifugiert und anschließend sofort verwendet.

2.2.2.3 Proteinexpression in Bakterien

Fusionsproteine aus Glutathion-S-Transferase (GST) und beliebigen Zielproteinen wurden mit Hilfe von pGEX-Vektoren (Amersham, Freiburg) in *E.coli* BL-21 exprimiert. Die verwendeten Vektoren erlauben eine Induktion der Proteinexpression mittels Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG). BL-21-Bakterien wurden mit dem gewünschten Expressionsplasmid transfiziert und eine Übernachtskultivierung in LB-Ampicillin-Medium wurde angeimpft. Hieraus wurde eine Kultur von 200 ml Volumen angeimpft. Nach Anwachsen der Kultur auf eine optische Dichte (OD) von 0,7 wurde die Proteinexpression mit 40 μ l 1M IPTG induziert. Die Expressionsdauer betrug 4-8 h bei 37°C; für die GST-oder His-gekoppelten Gephyrkonstrukte wurde die Expression auf 18-24 h bei 25°C verlängert. Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert und bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.4 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Alle Schritte der Proteinaufreinigung erfolgten bei 4°C oder auf Eis, Lösungen wurden vorgekühlt. Die Pellets der induzierten BL-21-Bakterien wurden in kaltem Lysispuffer (LP2) (50 μ l/ml Kultur) suspendiert und die Zellmembran durch Ultraschall aufgebrochen. Der Überstand wurde anschließend mit 1% (v/v) Triton-X-100 versetzt, für weitere 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 10.000g zentrifugiert. Pro 100 ml Kulturvolumen wurden 2 ml 50% Glutathion-Sepharose (Amersham Bioscience, Freiburg) zugegeben und für weitere 2 h bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden 5 min bei 500g abzentrifugiert und das verbleibende Glutathion-Pellet dreimal mit PBS gewaschen. Zur Elution der gebundenen GST-gekoppelten Proteine wurde die Glutathion-Matrix mit 1 μ l Glutathion-Elutionspuffer pro ml eingesetzten Kulturvolumens für 20 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2000g / 5 min) wurde der Überstand abgenommen und die Elution weitere zweimal wiederholt.

2.2.2.5 Aufreinigung von His₆-gekoppelten Proteinen

Alle Schritte der Proteinaufreinigung erfolgten bei 4°C oder auf Eis. Die Lösungen wurden vorgekühlt. Die BL-21-Bakterienkultur wurde nach der Induktion mit IPTG in 50 ml-Aliquots abzentrifugiert und die Pellets mit kaltem Lysispuffer (1 ml/50 ml

Kultur) gelöst. Anschließend wurde die Zellmembran der Bakterien durch Ultraschall aufgebrochen. Der Überstand wurde für 30 min bei 10.000g zentrifugiert. Pro 50 ml Ausgangskulturvolumen wurden 125 µl Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) zugegeben, die zuvor mit Lysispuffer gewaschen wurde. Die Ansätze wurden 2 h bei 4°C inkubiert, für 1 min bei 13.000g zentrifugiert und das verbleibende Pellet dreimal mit Waschpuffer gereinigt. Die gebundenen His₆-gekoppelten Proteine wurden mit 33 µl Elutionspuffer eluiert und der Schritt weitere zweimal wiederholt. Die Effizienz der Aufreinigung wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung des Gel evaluiert bevor die gereinigten Proteine für weiterführende Experimente eingesetzt wurden.

2.2.2.6 Metabolische Markierung von HEK293T-Zellen mit (³²P)-ortho-Phosphat

HEK293T Zellen wurden in normalem Kulturmedium bis zu einer Konfluenz von 80% angezogen, zweimal mit warmen phosphatfreiem Medium gewaschen und anschließend mit 0,5 mCi (³²P)-Orthophosphat pro 5 ml phosphatfreiem Medium für 4 h bei 37°C weiterkultiviert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde jede Schale mit 1 ml Lysispuffer (LP1) abgelöst. Anschließend 20 min Inkubation auf Eis diente der Lyse der Plasmamembran; die Proben wurden zunächst für 5 min bei 320g zentrifugiert, und der verbleibende Überstand danach erneut bei 18.000g für 15 min zentrifugiert. Das Detergenzextrakt wurde für die Immunpräzipitation eingesetzt.

2.2.2.7 Immunpräzipitation

Lysate transfizierter HEK293T-Zellen oder adultes Rattenhirnextrakt wurden zunächst für 1 h bei 4°C mit 50 µl Protein G-Sepharose-Suspension (Amersham, Freiburg) präadsorbiert und anschließend für 4 h oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit den Primärantikörpern (Tabelle 2.1.8) inkubiert. Die Protein G-Sepharose wurde zuvor für 2 h in Blockierungslösung inkubiert, um eventuelle unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Antigen-Antikörperkomplexe wurden anschließend an 40 µl Protein G-Sepharose immobilisiert und viermal gewaschen. Spezifisch gebundene Proteine wurden 5 min bei 95°C in 1x SDS-Probenpuffer eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und zur Detektion auf Nitrozellulosemembran transferiert.

2.2.2.8 GST-Pulldown-Assay

Die Immunpräzipitation dient hauptsächlich dazu in vivo Bindungen nachzuweisen. Mittels einer sogenannten GST-Pulldown-Analyse ist es möglich Protein-Interaktionen in vitro nachzuweisen. Zunächst wird ein Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST)-Anhang hergestellt und in BL-21 Bakterien exprimiert. Anschließend wird das aufgereinigte Protein an einer Glutathion-Sepharose-Matrix immobilisiert. GST bindet mit hoher Affinität an Glutathion. Pro Ansatz wurden 30 µl Glutathion-Sepharose-Suspension (Amersham, Freiburg) einmal mit PBS gewaschen. Die Sepharose wurde mit 100 µl GST-Fusionsprotein für 2 h min bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden 200 µl des zu untersuchenden Zell-Homogenats zugegeben. Nach erneuter Inkubation für 2h, viermaligem Waschen mit PBS, wurde das Eppendorf-Gefäß gewechselt, um eventuell präzipitiertes Protein zurückzulassen. Die Sepharose wurde mit 20-40 µl 1x SDS-Probenpuffer 5 min bei 95°C eluiert. Der Nachweis erfolgt mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse.

2.2.2.9 Phosphorylierungsuntersuchung an GST-Fusionsproteine

Jeweils 100 µl aufgereinigtes GST-Gephyrin und GST-GE45 wurden mit je 60 µl Glutathion-Sepharose-Perlen versetzt und für 2 h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden jeweils 100 µl 2x Kinasepuffer und 100 µl Zellextrakt (HEK293T- oder Hirnhomogenat von adulten Ratten) zupipettiert und der Reaktionsansatz 30 min bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden im Abstand von 10 min durchmischt. Die Matrix wurde nach dreimaligem Waschen in 50 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

2.2.2.10 Aktin-Sedimentations-Experiment

Um die Interaktion zwischen Aktin und Aktin-bindenden Proteinen zu untersuchen wurde ein spezialisierter Aktin-Binding-Kit der Firma Cytoskeleton (Denver, USA) verwendet. Das Experiment wurde entsprechend den Herstellerangaben mit den im Kit enthaltenen Pufferlösungen durchgeführt. GST-Gephyrin und His-VASP wurden rekombinant in *E.coli* BL-21 Bakterien exprimiert und mittels Ni²⁺-NTA-Agarose

(Qiagen, Hilden) oder Gluthathion-Sepharose (Amersham Bioscience, Freiburg) aufgereinigt. G-Aktin wurde nach Protokoll in BSA01-Aktinpuffer gelöst. Alle verwendeten Proben, sowohl His-Gephyrin, GST-VASP als auch das bereits im Kit enthaltene G-Aktin wurden vor Beginn des Experimentes für 1 h bei 30.000g zentrifugiert um alle präzipitierbaren Anteile auszufällen. Die Fusionsproteine wurden anschließend mit dem aufgereinigten G-Aktin aus dem Kit sowohl unter polymerisierenden als auch unter nicht-polymerisierenden Bedingungen für 30 min bei 37°C inkubiert und erneut für 1 h bei 30.000g zentrifugiert. Ein Nachweis des Fusionsproteins im resultierenden Pellet gilt laut Hersteller als Nachweis einer positiven Bindung an Aktin. Sowohl die Pelletfraktionen als auch die verbleibenden Überstände wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot analysiert.

2.2.2.11 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Methode von Laemmli (1970) angewendet. Es wurde eine Gelelektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRad, München) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel für 1-2 h in Tris/HCl-Glyzin-Elektrophoresepuffer. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 4:1 mit 5x SDS-Probenpuffer gemischt, für 5 min bei 95°C erhitzt und aufgetragen. 10 µl eines Protein-Standardmarkers wurden zusätzlich aufgetragen. Wenn die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Anschließend wurden die Proteine entweder mit Coomassie-Lösung gefärbt oder für den Western Blot auf Nitrozellulosemembranen transferiert.

2.2.2.12 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brillant-Blau

Die Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau beruht auf elektrostatischen Bindungen und apolaren Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und dem Protein. Coomassie detektiert einzelne Proteinbanden ab 0,1 µg Proteingehalt (Harlow und Lane, 1988). Hier wurden die Gele 30 min mit Coomassie-Brillant-Blau-Lösung unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit Coomassie-Brillant-Blau-Entfärbelösung solange entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden und dokumentiert werden konnten.

2.2.2.13 Western-Blott

Zur Immundetektion spezifischer Proteine wurden die SDS-Gele nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Bei kleinen Proteinen (>20kDa) kam dabei eine Porengröße von 0,1 µm, ansonsten eine Membran mit 0,45 µm Porengröße zum Einsatz. Für den Transfer wurde eine Nassblot-Apparatur (Amersham, Freiburg) verwendet. Die Membran und jeweils 5 Lagen Whatmann-Papier pro Membranseite wurden zunächst in Transferpuffer präinkubiert und anschließend das Gel auf die angefeuchtete Membran aufgelegt. Der Transfer erfolgte entweder bei konstanter Stromstärke von 400 mA für 2 h bei 4°C oder bei konstanter Spannungsstärke von 10V bei RT über Nacht. Der Nachweis von reaktiven Proteinbanden erfolgte mittels indirekter Immundetektion. Hierbei werden primären Antikörper über Enzym-gekoppelte sekundäre Antikörper spezifisch gebunden und visualisiert. Die Nitrocellulosemembran wurde zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Alle weiteren Inkubations- und Waschschriffe fanden auf dem Wippschüttler bei RT statt. Nach dem Abnehmen der Blockierungslösung wurde der Blot kurz mit 1x TBS gewaschen. Dann folgte eine 2 h Inkubation mit dem primären Antikörper (Tabelle 2.1.8). Anschließend wurde dreimal je 5 min mit 1x TBST gewaschen, bevor sich die 45 minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper anschloss. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit 1x TBST erfolgte die Nachweisreaktion mittels ECL-System nach Herstellerangaben.

2.2.2.14 ECL-Nachweisreaktion

Verwendet wurde das Dura ECL-Detektions-Reagenz der Firma Pierce. Die Nachweisgrenze der verstärkten Chemolumineszenz (ECL) lag bei 1 pg Protein. Der sekundäre AK ist mit HRP (horse radish peroxidase) gekoppelt, das als Substrat H₂O₂ benötigt. Bei der Reaktion entsteht ein Sauerstoffion, das unter Einfluss des Reduktionsmittels Luminol (Diazylhydrazid = 5-Amino-2, 3-dihydrophthalazin-1, 4-dion) oxidierte. Luminol wurde dabei zu 3-Aminophthalat umgewandelt, das bei Rückkehr in den Grundzustand Photonen der Wellenlänge 425 nm emittiert. Diese Lichtemissionen wurden durch 4-Jodophenol verstärkt. Der Blot wurde in der Dunkelkammer für drei Minuten mit der Detektionslösung überschichtet, die Membran auf Filterpapier angetrocknet, in eine Plastikfolie eingeschlagen, in die

Expositionskammer gelegt und Röntgenfilme aufgelegt. Die Expositionszeit betrug zwischen 30 sec und 10 min.

2.2.2.15 Antikörper-Elution

Nach der Detektion mit dem ECL-System konnten Antikörper wieder von der Membran eluiert werden. Dadurch war es möglich, die Membran mit einem anderen primären und sekundären Antikörper zu inkubieren. Für die Elution wurde die Membran dreimal 5 min mit 1x TBST gewaschen, anschließend für 10 min mit Elutionspuffer überschichtet, wieder dreimal 5 min mit 1x TBST gewaschen und nochmals für 10 min mit Elutionspuffer inkubiert. Die pH-Sprünge führten dabei zum Lösen der Antigen-Antikörper-Bindungen. Zuletzt erfolgte ein Waschschrift mit 1x TBS. Im Anschluss wurde die erneute Inkubation mit den Primär- und Sekundär-Antikörpern und die erneute Detektion mittels ECL-System durchgeführt.

2.2.3 Zellbiologische Arbeitsmethoden

2.2.3.1 Gefrierkonservierung und Auftauen von Eukaryontenzellen

Die mittels Trypsinierung abgelösten Zellen wurden für 10 min bei 400 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Einfriermedium resuspendiert. Dieses enthielt 10% (v/v) DMSO, das als Gefrierschutzmittel Kristallbildungen während des Einfriervorgangs verhinderte. Je 1 ml der suspendierten Zellen wurden in Kryoröhrchen umgefüllt und für 2 h bei -20°C im Gefrierschrank vorgekühlt, bevor sie für maximal zwei Wochen bei -70°C im Gefrierschrank gelagert wurden. Die Endlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Diese stufenweise Adaptation an die Temperatur von -196°C ermöglicht den Zellen die osmotische Abgabe von Wasser. Zum Auftauen wurde ein Kryoröhrchen mit eingefrorenen Zellen in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Es wurden 5 ml frisches Kulturmedium tropfenweise zugesetzt, um die bei RT schädliche DMSO-Konzentration zu verdünnen, und die Zellsuspension für 10 min bei 400g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und in Kulturflaschen ausgesät.

2.2.3.2 Kultivierung von HEK 293T-Zellen

Die adhären wachsenden HEK293T-Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Das Kulturmedium wurde vor Gebrauch auf 37°C erwärmt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Verwendung einer Sterilbank durchgeführt. Sobald die Zellen zu einem 70% konfluenten Rasen herangewachsen waren, wurde das Kulturmedium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen durch Trypsinierung mit Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) von der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in einer Verdünnung von 1:3 bzw. 1:5 mit 10 ml frischem Kulturmedium ausgesät.

2.2.3.3 Fibronektionbeschichtung von Deckgläschen (HEK293T Zellen)

Damit sich die Kulturzellen im Verlauf einer Transfektionen oder Immunfärbungen nicht von der Kulturunterlage ablösen, wurden die Zellen zunächst auf Deckgläschen ausgesät, die vorher mit Fibronektin (Sigma) beschichtet worden waren. Pro Vertiefung der Kulturplatten wurde ein Glasdeckgläschen (14 mm Durchmesser in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen) eingefügt und mit 500 µl Beschichtungslösung (25 µg/ml) für 2h bei 37°C oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Beschichtungslösung wurde abgenommen und konnte mehrfach weiterverwendet werden. Die Deckgläschen wurden im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen und konnten in je 500 µl PBS pro Well bei 4°C bis zu einer Woche lang aufbewahrt werden.

2.2.3.4 Poly-L-Ornithin Beschichtung (hippokampale Primärkulturzellen)

Pro Vertiefung der Zellkulturplatte wurde ein Glasdeckgläschen (14 mm Durchmesser in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen) eingefügt und mit 500 µl Beschichtungslösung über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Beschichtungslösung kann jeweils nur einmal verwendet werden und ist nach dem Ansetzen in PBS nicht stabil. Die Deckgläschen wurden im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen und mit 500 µl DMEM-Kulturmedium mit Zusätzen überschichtet. Die beschichteten Platten müssen direkt verwendet werden und können im Gegensatz zu den Fibronektin beschichteten Deckgläschen nicht aufbewahrt werden.

2.2.3.5 Kalziumphosphat-Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Transfektion wurden zunächst HEK293T Zellen entweder auf Fibronectin beschichtete Deckgläschen oder in 10 cm Kulturschalen ausgesät. Im Falle der Kalziumphosphat Methode nach Chen und Okayama (1987) wurden die Kulturen ab einer 40-60% Konfluenz transfiziert. Für die Transfektion einer 10 cm-Schale wurde die DNA (10 µg Plasmid-DNA) mit 300 µl 250 mM CaCl₂, 300 µl 2x BBS und jeweils 5,4 ml DMEM Kulturmedium gemischt. Für die Transfektion der 24 Well Platten wurden 1 µg Plasmid-DNA pro Well in 25 µl 250 mM CaCl₂, 25 µl 2x BBS und 450 µl Kulturmedium angesetzt. Die Zellen wurden für 7 h (24 Well Platte) oder für 24 h bis 48 h (10 cm Schalen) bei 37°C und 3% (v/v) CO₂ weiterkultiviert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die transfizierten Deckgläschen wurden mit 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) bei RT oder durch Methanol bei -20°C fixiert. Aus den 10 cm Kulturschalen wurden Proteinhomogenate hergestellt.

2.2.3.6 Lipofektamin-Transfektion eukaryotischer Zellen

Für diese Transfektion wurden ebenfalls HEK293T Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden bis zu 80-90% Konfluenz angezogen, und das Kulturmedium wurde nach Herstellerangaben gegen ein Transfektionsmedium ohne Antibiotika ausgetauscht. Für Transfektionen von 24er Well-Platte wurden DNA und Lipofektamin (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Herstellerangaben im Verhältnis 1:3 (2 µg DNA zu 6 µl Lipofektamine) zunächst separat mit je 50 µl Transfektionsmedium angesetzt und nach 5 min Inkubation bei RT miteinander vermischt. Im Verlauf der anschließenden 20 minütigen Inkubation bildeten sich die für die Transfektion benötigten Lipofektamin-DNA-Komplexe. Das normale Kulturmedium der Zellen wurde nun abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 450µl pro Well des antibiotikafreien Transfektionsmedium überschichtet. Pro Well wurden 50 µl des Transfektionsansatzes eingesetzt und die Zellen erneut bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ für weitere 7 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Fixierung in 4% Paraformaldehyd (PFA) bei RT oder mittels Methanol bei -20°C für die Immunfärbung. Die Transfektion von 10 cm Kulturschalen erfolgte mit einem DNA zu Lipofektamine Verhältnis von 1:2 (20 µl DNA zu 40ul Lipofektamin) nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden nach der Transfektion zunächst für 24 h oder 48 h weiterkultiviert, bevor sie lysiert wurden.

2.2.3.7 Präparation von hippokampalen Primärkulturen

Zur Isolation von hippokampalen Neuronen (Fuhrmann et al., 2002) wurden schwangere Wistar Ratten am Embryonaltag E18 unter Verwendung von Halothan (Rebopharm, Bocholt) betäubt und mittels Genickbruch getötet. Nach Entnahme der Embryonen wurde zunächst deren Kopf abgetrennt, die Schädelknochenanlage und die unterliegenden Hirnhäute entfernt und nach sorgfältiger Separierung der beiden Hirnhälften der Hippokampus herauspräpariert. Das Gewebe wurde zunächst in PBS/10 mM Glukose gesammelt und anschließend in PBS/10 mM Glukose mit 10µg/ml DNase I und 0,5mg/ml Papain (Sigma, Taufkirchen) für 20-25 min bei 37°C inkubiert. Dadurch wurden die Zellen aus dem Gewebeverband vereinzelt. Dem anschließenden Waschen mit 10 ml DMEM-Kulturmedium folgte die Trituierung der Zellen in 1 ml des gleichen Mediums. Dazu wurden die Zellen mittels einer blauen Eppendorfspitze mehrfach pipettiert und so der Zellverband vereinzelt. Nach Bestimmung der Zellzahl/ml mittels einer Neubauer-Zählkammer wurden sie in einer Dichte von 40.000 Zellen pro Well (für Toxinbehandlungen) oder 60.000 Zellen pro Well (für Transfektionsexperimente) in Ausplattiermedium ausgesät, welches nach drei Stunden durch das Neuronenkulturmedium ausgetauscht wurde. Drei Tage nach Präparation der Kultur wurden pro Well 3 µM 1-[β-D-Arabinofuranosyl]cytosin (Sigma, Taufkirchen) zu den Kulturen gegeben. Diese Substanz dient dazu, die Zellproliferation zu stoppen. Die Kulturen wurden für 3, 6, 14 oder 21 Tage in Kultur (DIV) gehalten.

2.2.3.8 Toxinbehandlungen der hippokampalen Primärkulturen

Alle Toxine wurden entsprechend der Herstellerangaben gelöst (DMSO, Ethanol oder H₂O) und aus konzentrierten Stock-Lösungen dem jeweiligen Kulturmedium zugefügt. Die jeweilige Endkonzentration der Lösungsmittel DMSO oder Ethanol betrug maximal 0,2%. Nach 3, 6, 10, 14 oder 21 Tagen der Kultur in Vitro (DIV) wurden die Zellen mit Konzentrationsreihen (abhängig von den IC₅₀ Werten) der jeweiligen Wirkstoffen (Tabelle 2.1.7) für 1 h, 3 h, 6 h, 24 h oder 4 Tagen behandelt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen für nachfolgende Immunfärbungen fixiert. Kontrollzellen wurden mit einer vergleichbaren Menge an DMSO oder Ethanol kultiviert.

2.2.4 Histologische Arbeitsmethoden

2.2.4.1 Schneiden am Gefriermikrotom

Das Schneiden der präparierten Gehirne erfolgte mittels eines Gefriermikrotoms. Vorbereitend wurde das Gerät etwa eine halbe Stunde vor Beginn auf 25°C gekühlt. Auf den ebenfalls vorgekühlten Stahlzylinder wurde zunächst ein Tropfen Einbettmedium (Polysciences Europe, Eppelheim) gegeben, und nach leichtem Anfrieren der Masse wurde die sagittal geschnittene Gehirnhälfte aufgelegt. Die eingestellte Schnittdicke betrug durchschnittlich 9 µm. Die angefertigten Schnitte wurden einzeln auf durchnummerierte Objektträger aufgezogen. Nach 30 min Lufttrocknen wurde die Schnitte bis zum weiteren Gebrauch in einer Kunststoffbox bei -70°C gelagert. Bevor die Schnitte für die Färbungen eingesetzt wurden, mußten sie zuerst für 1 h bei RT aufgetaut werden.

2.2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Im Fall der indirekten Immunfluoreszenz sind sekundäre Antikörper, die spezifisch gegen einen der primären Antikörper gerichtet waren, mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, die durch Licht der entsprechenden Wellenlänge zur Emission von Photonen angeregt werden konnten.

- **Gefrierschnitte**

Nach dem Auftauen wurden die Schnitte zunächst für 5 min bei 4°C mit 4% PFA fixiert und anschließend 1 h bei RT in einer feuchten Kammer mit Blockierungslösung inkubiert, um alle unspezifischen Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss folgte die Inkubation für 2 h mit den monoklonalen bzw. polyklonalen Primärantikörper (Tabelle 2.1.8) in den angegebenen Verdünnungen bei RT, nach dreimaligem Waschen in PBS folgte die Inkubation mit den Sekundärantikörper (Tabelle 2.1.8) für 30-60 min bei RT im Dunkeln. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde zusätzlich eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit PolyAquaMount (Polysciences Europe, Eppelheim) eingebettet und unter dem Mikroskop ausgewertet.

- **hippokampale Primärkulturzellen oder HEK293T Zellen**

Die auf den zuvor beschichteten Deckgläschen kultivierten Zellen wurden vor dem Einsatz für die Färbung aus dem Kulturmedium entnommen und kurz mit PBS gespült. Die Zellen wurden je nach Spezifität des Antikörpers entweder mit kaltem Methanol, Aceton, oder 4% PFA fixiert. Der Fixierungsprozess erfolgte im Falle der organischen Fixierungslösungen bei -20°C für 10 min, die PFA-Fixierung bei 4°C für 5 min. In organischen Fixierungslösungen werden Proteine dehydratisiert und immobilisiert. Es entstehen Lücken in der Plasmamembran, durch welche die Antikörper in die Zellen eindringen konnten. Im Falle der PFA-Fixierung ist zum Permeabilisieren der Zellen ein zusätzlicher Inkubationsschritt nötig. Daher wurden die Zellen für 20 min zunächst in der Permeabilisierungslösung inkubiert und anschließend für weitere 2 h in der feuchten Kammer mit den monoklonalen bzw. polyklonalen Primärantikörpern (Tabelle 2.1.8) inkubiert. Die Deckgläschen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper (Tabelle 2.1.8) für 30 min bei RT im Dunkeln in PBS inkubiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt (Invitrogen, Karlsruhe). Es wurde zusätzlich eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Es folgten weitere drei Waschschrte mit PBS, bevor die Deckgläschen auf einen Objektträger mit PolyAquaMount (Polysciences Europe, Eppelheim) eingebettet und unter dem Mikroskop ausgewertet wurden.

2.2.4.3 DAPI-Kernfärbung

Um den Zustand der Zellen nach den Toxinbehandlungen zu bewerten, wurde im Verlauf der Auswertung eine zusätzliche DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Apoptose ist unter anderem charakterisiert durch eine Größenabnahme des Zellkerns (Chromatinkondensation). Diese apoptotischen Effekte lassen sich durch DAPI-Färbung nachweisen (Kim et al., 2004). Die Deckgläschen mit Kulturzellen wurden direkt im Anschluss an die Inkubation mit dem Sekundärantikörper zweimal in PBS gewaschen und für 10 min bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln mit der DAPI-Lösung inkubiert. Im Anschluss an drei nachfolgende Waschrte (je 3 min in PBS) konnten die Präparate versiegelt und ausgewertet werden.

2.2.4.4 Mikroskopiertechniken

Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte durch konfokale Lasermikroskopie mit einem Leica TCS-SP Laser Scanning-Mikroskop (Leica Mikrosystems, Bensheim,). Der große Vorteil der konfokalen Lichtmikroskopie ist die Möglichkeit, das von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene zu sammeln. Eine Lochblende, die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnet ist, sorgt dafür, daß sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, auch nicht vom Detektor erfaßt werden kann. Beim Laser Scanning Mikroskop wird die Probe Punkt für Punkt und Zeile für Zeile sequentiell abgetastet. Der so erzeugte optische Schnitt ist ein kontrastreiches in x, y und z hochaufgelöstes Abbild der Probe. Zur Aufnahme von Fluoreszenzbildern wurde die Software Leica-TCS-NT (Version 1.6.551) verwendet. Alle Bilder wurden im Format 1023x1023 Pixel in den Vergrößerungen 40x, 63x und 100x aufgenommen. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte durch Adobe Photoshop CS und Adobe Illustrator.

2.2.4.5 Statistische Auswertung

Von jedem Deckglas (Kontrolle und Behandlung) wurden fünf Aufnahmen (63x) von zufällig ausgewählten Bereichen eines gegen Gephyrin und VIAAT gefärbten Deckgläschens mittels konfokaler Mikroskopie angefertigt. Die Dendriten (ca. 5-10 pro Neuron je nach Entwicklungsstadium) der auf dem Bild sichtbaren Neuronen (ca. 1-2 Neuronen pro Bild) wurden zunächst vermessen (μM -Gesamtlänge) und anschliessend die Gesamtzahl der Gephyrin- und VIAAT-positiven Kontakte der Neuronen ermittelt. Gephyrin-positiven Cluster wurden zusätzlich in zwei Untergruppen entsprechend ihres Durchmessers eingeteilt: a) grosse ($>1 \mu\text{M}$) und kleine ($\sim 0.5 \mu\text{M}$) Cluster und erneut ausgezählt. In einem Experiment wurde für jede Alkaloid-Konzentration (0 nM-200 nM) somit die Anzahl der Gephyrincluster von ca. 50-70 Dendriten ausgezählt. Für jeden ausgezählten Dendriten wurde die Anzahl der Cluster pro 50 μM -Dendritenlänge errechnet (Mittelwert \pm SEM). Die statistische Auswertung beruht auf mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

3. Ergebnisse

3.1 Pharmakologische Beeinflussung der Signaltransduktionskaskaden

Intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden sind von fundamentaler Bedeutung für Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse von Zellen. Die Bindung von Liganden an Rezeptoren löst dabei zytoplasmatische Enzymkaskaden aus, in deren Verlauf das empfangene Signal in Form von posttranslationalen Modifizierungen von Proteinen weitergeleitet und letztendlich auf ein Effektormolekül übertragen wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch gezielte pharmakologische Aktivierung oder Inhibition von Schlüsselenzymen jene Signalwege zu identifizieren, die am Transport, der Stabilisierung oder der Degradation von Gephyrin an inhibitorischen Synapsen beteiligt sind. Die Untersuchungen wurden an hippokampalen Primärkulturen (Fuhrmann et al., 2002) unterschiedlicher Differenzierungsstadien durchgeführt. Die ersten Gephyrin-positiven inhibitorischen Synapsen sind bereits nach 3 Tagen in Kultur (DIV) zu erkennen. Die Primärkulturzellen wurden mit ausgewählten Aktivatoren und Inhibitoren (2.1.7) in Konzentrationen inkubiert, die auf den jeweiligen IC50-Wert des Wirkstoffs (Konzentration, bei der die halbmaximale Hemmung erreicht wird) abgestimmt waren und anschließend die Gephyrin-Verteilung mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. In Kontrollzellen liegen Gephyrin-positive Punkte (Gephyrincluster) im Soma und in den Dendriten der Neuronen vor und sind sowohl synaptisch (70-80%) als auch extrasynaptisch lokalisiert. Synaptisch-lokalisierte Gephyrincluster wurden durch parallele Färbung des präsynaptischen Markerproteins VIAAT (*Vesicular inhibitory amino acid transporter*) identifiziert. Um sicherzustellen, dass Änderungen in der Gephyrin-Verteilung nicht auf apoptotische Nebeneffekte der eingesetzten Wirkstoffe zurückzuführen sind, wurden alle Kulturen einer DAPI-Kernfärbung unterzogen. Kulturen, bei denen nach der Behandlung eine Änderung in der Kerngröße (Chromatinkondensation) oder ein Effekt auf die präsynaptische VIAAT-Verteilung zu beobachten war, wurden für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse dieser pharmakologischen Untersuchungen können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe von Wirkstoffen hatte bei kurzzeitiger Inkubation im Bereich der IC50-Konzentrationen keinen sichtbaren Effekt auf die Anzahl und Verteilung der Gephyrincluster, die präsynaptische VIAAT-Färbung oder die Kerngröße. Diese Substanzen führten jedoch in höherer Konzentration oder bei

längerer Inkubation zu unerwünschten apoptotischen Nebeneffekten und wurden nicht weiter berücksichtigt. Die zweite, weitaus interessantere Gruppe dagegen verursachte bereits bei Applikation von geringen Konzentrationen eine deutliche Änderung der Gephyrin-Immunreaktivität, ohne Auswirkung auf die VIAAT-Verteilung und die Kerngröße. Alle verwendeten Wirkstoffe und die beobachteten Effekte sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

3.1.1 cAMP/PKA-Signalkaskaden

Für den GABA_A-Rezeptor wurde ein modulatorischer Einfluss des cAMP-Signalwegs an der inhibitorischen Synapse bereits belegt. Frühere Studien zeigen, dass die β -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden (McDonald et al., 1998; Brandon et al., 2003).

Um den Einfluss der cAMP-Signalkaskade auf die Anzahl und Lokalisation von Gephyrinclustern während der Ausbildung von inhibitorischen Synapsen zu analysieren, wurden hippocampale Primärkulturen (3DIV) mit den membranpermeablen Analogen 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP (jeweils 1 μ M-1 mM) für eine Dauer von 7 Tagen inkubiert. Diese Behandlung hatte keine Auswirkung auf die Anzahl oder die synaptische Lokalisation der Gephyrincluster oder die präsynaptische VIAAT-Immunreaktivität (Daten nicht gezeigt) und entsprach den Ergebnissen der Kontrollfärbung. Die Inkubation von bereits differenzierteren Primärkulturen (14 DIV) mit Pertussistoxin (PTX) oder Cholera toxin (ChX) für 1, 6 oder 12 h ergab im Konzentrationsbereich von 0,01 μ g/ml-0,5 μ g/ml ebenfalls keine signifikante Änderung der Anzahl oder Verteilung der Gephyrincluster oder der VIAAT-Immunreaktivität (Daten nicht gezeigt). PTX, bzw. ChX sind Endotoxine, welche die ADP-Ribosylierung von Proteinen wie Gi und Go katalysieren und so den intrazellulären cAMP-Spiegel irreversibel erhöhen. Höhere Konzentrationen der Toxine (>1 μ g/ml) hatten eine Ablösung der Primärkulturzellen von den Deckgläsern zur Folge, längere Inkubationszeiten (24-48 h) resultierten in einem vollständigen Verlust der Gephyrin-Immunreaktivität (Abb.4 B, grüner Kanal). Allerdings ergab sich für die präsynaptische VIAAT-Verteilung (Abb.4 B, roter Kanal) ebenfalls ein verändertes, diffuser erscheinendes Färbemuster; der Effekt ging mit einer apoptotischen Veränderung des Zellkerns einher (Abb.4 B, blauer Kanal).

3. Ergebnisse

Signalkaskade	Wirkung	Wirkstoff	Anzahl der Gephyrincluster	Zytoplasmatischer Gephyrinanteil	VIAAT-Verteilung	Chromatin-Kondensation (Apoptose)
cAMP/PKA	Analog	8-Br-cAMP	→	→	→	-
	Analog	8-Br-cGMP	→	→	→	-
	Aktivator	Cholera Toxin	↓	→	↓	+
	Aktivator	Pertussis	↓	→	↓	+
IP3/PKC	Inhibitor	Calphostin C	↓	→	↓	+
	Aktivator	PMA	→	→	→	-
Ca²⁺-abhängig	Inhibitor	Thapsigargin	↓ (somatische)	→	→	-
	Chelator	Bapta	↓	→	→	-
	Inhibitor	TTX	↓	→	↓	+
TrK	Nativ	BDNF	→	→	→	-
	Nativ	NT-3	→	→	→	-
	Inhibitor	U0126	↓	→	↓	+
	Inaktive	U0124	→	→	→	-
PI3	Inhibitor	Ly294002	↓	→	↓	+
	Inhibitor	Wortmannin	↓	→	↓	+
Phosphatasen	Inhibitor	Okadaic acid	↓	↑	→	-
	Inhibitor	Calyculin A	↓	↑	→	-
	Inhibitor	Cantharidin	↓	↑	→	-
	Inhibitor	FK506	↓	→	↓	-
Mikrofilamente	Inhibitor	Latrunkulin	→	→	→	-
	Inhibitor	Jasplakinolide	→	→	→	-
	Inhibitor	Cytochalasin D	↓	→	→	-

Tabelle 1: Auswirkung der pharmakologischen Beeinflussung von Signalkaskaden auf die Gephyrincluster- und VIAAT-Verteilung. Primärkulturen (3, 6, 14 DIV) wurden mit den aufgeführten Wirkstoffen behandelt und auf die Anzahl und Lokalisation der Gephyrincluster und den präsynaptischen Marker VIAAT analysiert. Apoptotische Nebeneffekte der Substanzen (Chromatinkondensation) wurde mittels DAPI-Färbungen nachgewiesen.

Legende: → (kein Effekt); ↑ (Erhöhung); ↓ (Reduktion/kompletter Verlust); + (Chromatinkondensation); - (Kern wie Kontrolle)

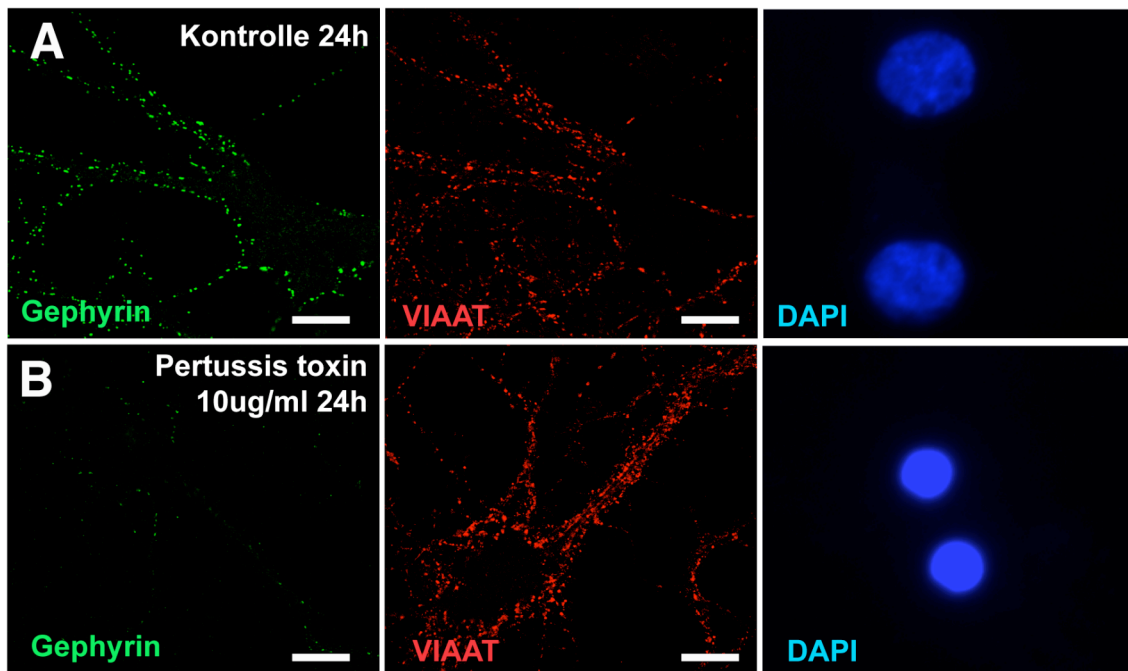


Abbildung 4: Der Verlust der Gephyrin-Immunreaktivität nach Inkubation mit Pertussistoxin (PTX) ist auf apoptotische Nebeneffekte des Toxins zurückzuführen. Hippokampale Primärkulturen (14 DIV) wurden für 24h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ PTX behandelt. A) Die Kontrollfärbung zeigt eine normale Gephyrincluster-Verteilung (grüner Kanal), den präsynaptischen Marker VIAAT (roter Kanal) und große ovale Zellkerne vitaler Neuronen (blauer Kanal). B) Nach Behandlung mit PTX war keine Gephyrinfärbung mehr detektierbar (grüner Kanal); die VIAAT-Färbung erschien diffuser im Vergleich zur Kontrolle (roter Kanal), während eine deutliche Chromatinkondensation des Kern zu verzeichnen war (blauer Kanal). Bar 10 μM

3.1.2 IP₃/PKC-Kinase Signalweg

Der Einfluss der IP₃/PKC-Signalkaskade an der inhibitorischen Synapse wurde für GABA_A-Rezeptoren bereits intensiv untersucht. Die GABA_A-Rezeptor β -Untereinheiten werden durch die Kalzium-Phospholipid-abhängige Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert. Dies führt zu einer Änderung in der Oberflächendichte der GABA_A-Rezeptorverteilung. Die Rezeptordichte wird signifikant reduziert nach PKC Aktivierung; eine Inhibition des Enzyms kann die Rezeptorendozytose allerdings nicht vollständig blockieren (Connolly et al., 1999; Song et al., 2005), hat jedoch eine erhöhte GABA_A-Rezeptoraktivität zur Folge (Brandon et al., 2000). Eine Auswirkung der PKC-Inhibition auf die in der Gephyrin-Verteilung wurde nicht analysiert. Die Behandlung der Primärkulturen (14 DIV) mit Calphostin C (500 nM-10 μM), einem spezifischen Inhibitor der Proteinkinase C, oder Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem PKC-

Aktivator (100 nM-10 μ M) für 1, 6 oder 24 h hatte keine Auswirkung auf die Anzahl und Verteilung der Gephyrincluster oder der VIAAT Immunreaktivität.

3.1.3 Kalzium-abhängige Signalkaskaden

In embryonalen Rückenmarkkulturen hat die Inhibition der Glyzinrezeptor-Aktivierung durch den Antagonisten Strychnin eine Reduktion der postsynaptischen Rezeptorcluster und eine Internalisation des Proteins zur Folge. Blockierung des extrazellulären Kalziumeinstroms durch Inkubation mit Tetrodotoxin (TTX), einem Antagonisten für Na^+ -Kanäle, oder L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker verhindert nicht nur die postsynaptische Akkumulation der Glyzin-Rezeptoren (Kirsch und Betz, 1998; Levi et al., 1998), sondern auch die korrekte Lokalisation von Gephyrin. In hippocampalen Primärkulturen dagegen hatte eine Inkubation mit dem selektiven GABA_A -Rezeptor Antagonist Bicucullin keinen Effekt auf die postsynaptische Lokalisation des Rezeptors (Referenz). Ein Aktivitäts-induzierter Ca^{2+} -Einstrom scheint nicht das primäre Signal für die Ausbildung der inhibitorischen Synapsen und die Akkumulation der GABA_A -Rezeptoren zu sein; er könnte jedoch durchaus regulatorische Funktionen für die Unterscheidung zwischen funktionellen und nicht-funktionellen synaptischen Kontakten haben.

Die Blockierung des extrazellulären Kalziumeinstroms durch TTX (100 nM-50 μ M für 1, 6, oder 24h) hatte keinen Effekt auf die Anzahl oder synaptische Lokalisation der Gephyrincluster oder der VIAAT-Immunreaktivität (Daten nicht gezeigt). Um die Auswirkung einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration aus intrazellulären Speichern zu analysieren, wurden Kulturen mit Thapsigargin (500 nM-50 μ M), einem spezifischen Inhibitor der endoplasmischen retikulären Ca^{2+} -ATPase, für 1, 6 oder 24h behandelt. Dies hatte eine selektive Reduktion der somatisch lokalisierten Gephyrincluster zur Folge. Dendritische Gephyrincluster waren weder in der Anzahl noch in der synaptischen Lokalisation betroffen (Daten nicht gezeigt). Leider ließ sich der Effekt für statistische Auswertungen nicht stabil genug reproduzieren. Um die Auswirkung eines sehr starken und schnellen Anstiegs von intrazellulärem Kalzium zu analysieren, wurden Kulturen (14DIV) mit dem Kalziumkomplexbildner BAPTA (1 μ M-100 μ M) inkubiert. Bei kürzerer Inkubation (1h, 6h) zeigte sich kein Effekt auf die Gephyrin-Verteilung, nach 24h jedoch war ein vollständiger Verlust der Gephyrin-

Immunreaktivität zu verzeichnen, ohne nennenswerten Einfluss auf die VIAAT-Verteilung oder die Kerngröße (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 TrK-Rezeptor-Signalkaskaden

Eine spezifische Aktivierung von Tyrosin-Kinase-gekoppelten Rezeptoren (TrK) moduliert die GABA_A-Rezeptorverteilung. Frühere Untersuchungen konnten bereits einen Anstieg der GABA_A-Rezeptor-Akkumulation nach Inkubation mit Insulin nachweisen (Wan et al., 1997). Die Aktivierung des TrKB-Rezeptors durch BDNF beeinflusst sowohl die Aktivität als auch die Oberflächenexpression des GABA_A-Rezeptors in hippokampalen Primärkulturen (Brüning et al., 2001; Mizoguchi et al., 2003; Jovanovic et al., 2004).

Um die Auswirkungen des TrK-Rezeptor-Signalwegs auf die Anzahl und synaptische Lokalisation der Gephyrincluster zu analysieren, wurden Kulturen (3DIV) mit BDNF (Brain derived neurotrophic factor) (20- 200 ng/ml) und NT-3 (Neurotrophin-3) (20- 200 ng/ml) für 7 Tage inkubiert. Die Behandlung ergab bei keiner der eingesetzten Konzentrationen einen signifikanten Effekt auf die Anzahl oder die Verteilung der Gephyrincluster oder der präsynaptischen VIAAT Immunreaktivität (Daten nicht gezeigt). Die Zellen entsprachen vollständig den Kontrollfärbungen. Die Behandlung der Primärkulturen (14 DIV) mit U0126 (0,5 µM-50 µM), einem Inhibitor für MEK1 und MEK2 (MAP/ERK-Kinase), für 1, 3 oder 6h ergaben zunächst eine deutliche Reduktion in der Anzahl der synaptischen und extrasynaptischen Gephyrincluster (<15 µM). Konzentrationen > 20 µM hatten einen vollständigen Verlust der Gephyrin-Immunreaktivität zur Folge (Abb.5B grüner Kanal). Die VIAAT-Färbung war nicht betroffen (Abb.5A/B roter Kanal). Zu Kontrollzwecken wurde die inaktive Isoform U0124 ebenfalls getestet, welche keinen Effekt auf die Gephyrincluster-Verteilung hatte (Abb.5C grüner Kanal).

3.1.5 PI3-Kinase-Signalweg

Signale, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt werden, könnten ebenfalls aktiv Einfluss auf inhibitorische Synapsen ausüben. Die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Synthese von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-P₃ könnte eine Rekrutierung von Collybistin und Profilin zu aktivierten

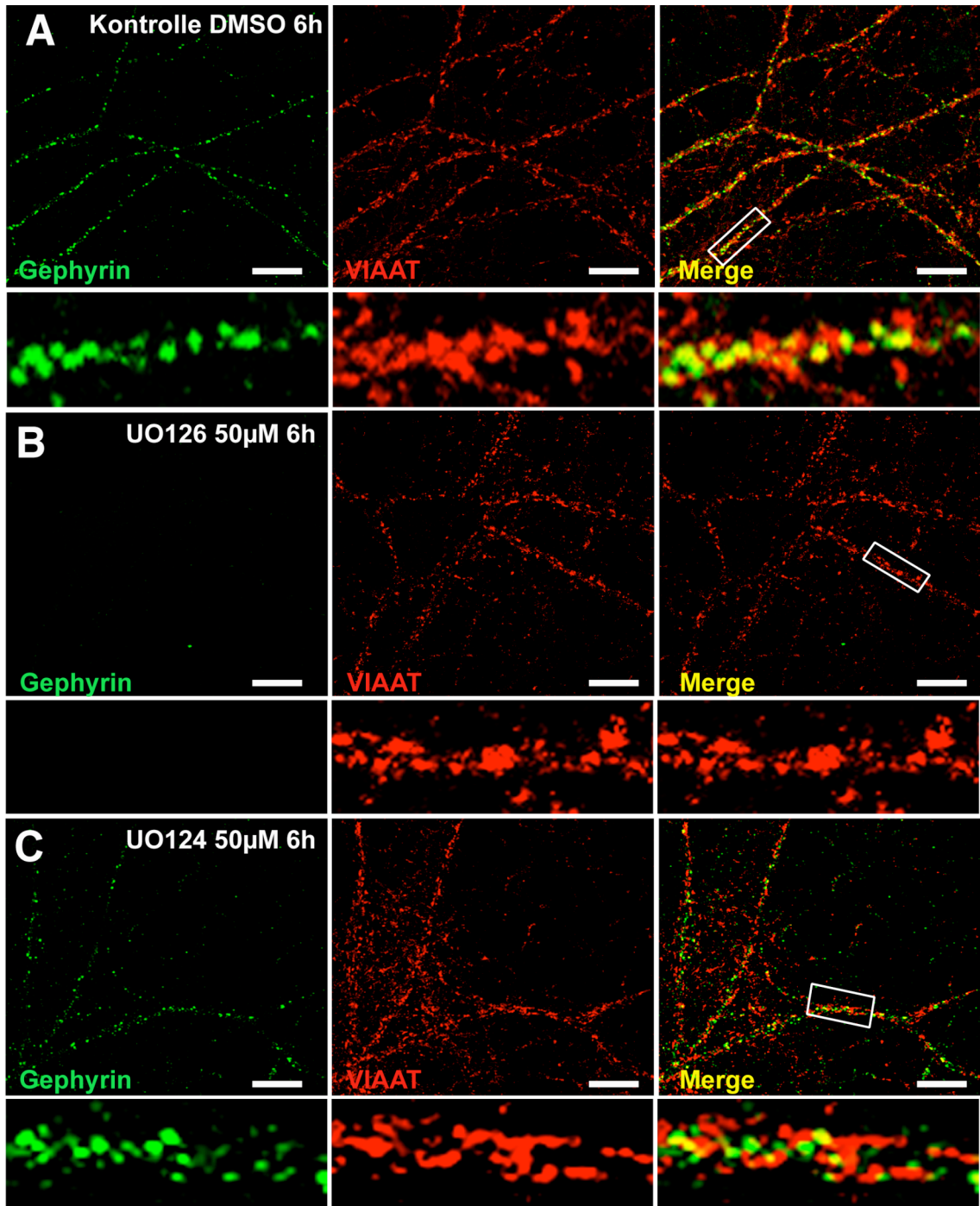


Abbildung 5: Inkubation mit dem MEK1/2 Inhibitor U0126 führt zum Verlust der Gephyrin-Immunreaktivität. Hippokampale Primärkulturen (14 DIV) wurden für 6h mit 50 µM U0126 oder U0124 behandelt. A) Die Kontrollfärbung zeigt die normale Gephyrincluster-Verteilung (grüner Kanal und Vergrößerung), den präsynaptische Marker VIAAT (roter Kanal und Vergrößerung) und die synaptische Lokalisation beider Proteine (Merge und Vergrößerung) B) Nach Behandlung mit U0126 ist keine Gephyrinfärbung mehr nachweisbar (grüner Kanal und Vergrößerung); die VIAAT-Färbung der Kontrolle entspricht (roter Kanal und Vergrößerung). C) Inkubation mit U0124 hat keinen Einfluss auf die Gephyrin- oder VIAAT-Färbung (grüner, roter Kanal, Merge und Vergrößerung). Bar 10 µM

Membrandomänen zur Folge haben und Gephyrin über seine Bindungspartner an potentielle Synapsen rekrutiert werden. (Kneussel und Betz, 2000). Die Inhibition der PI3K durch Ly294002 (5 μ M-200 μ M) und Wortmannin (1 nM-500 nM) für 1, 6 oder 24h ergaben keine deutliche Veränderung der Anzahl oder der Verteilung der Gephyrincluster oder der VIAAT Färbung in Primärkulturen (14DIV) im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Eine Beeinflussung der Gephyrincluster durch die PI3-Kinase-Kaskade konnte somit für differenzierte neuronale Kulturen nicht belegt werden.

3.1.6 Phosphatase-Inhibitoren

Die spezifische Phosphorylierung von liganden-gesteuerten Ionenkanälen ist ein wichtiger Regulationsmechanismus von Rezeptoren und assoziierten Proteinen. Wie Jovanovic et al. (2004) bereits zeigten, kann die Oberflächenexpression und die Aktivität des GABA_A-Rezeptors durch eine erhöhte PKC-abhängige Phosphorylierung der β 3-Untereinheit des Rezeptors und dauerhafte Dephosphorylierung durch Protein-Phosphatase 2A (PP2A) moduliert werden. Gephyrin wird ebenfalls an Serin/Threonin Positionen phosphoryliert; die entsprechende Kinase wurde noch nicht identifiziert (Langosch et al., 1992). Die Aktivität von nachgeschalteten Kinasen und Phosphatasen kann nicht nur den Grad der Phosphorylierung der β - und γ -Untereinheit des GABA_ARezeptors beeinflussen, sondern möglicherweise auch den Phosphorylierungsstatus von Gephyrin regulieren. Dadurch könnte unter anderem der Transport der Proteine zur Synapse oder die Rezeptorakkumulation moduliert werden. Um den Einfluss von Phosphatasen auf die Gephyrincluster-Verteilung zu untersuchen, wurden differenzierte hippokampale Primärkulturen (14 DIV) mit Inhibitoren für die Protein-Phosphatase 1 (PP1), Protein-Phosphatase 2A (PP2A) und Protein-Phosphatase 2B (Calcineurin) behandelt und anschließend die Verteilung und Anzahl der Gephyrincluster analysiert.

3.1.6.1 Die Inhibition von PP2B hat keinen Einfluss auf die Anzahl oder Lokalisation der Gephyrincluster

Hippokampale Primärkulturen (14 DIV) wurden mit FK506, einem Inhibitor der Ca²⁺-abhängigen Phosphatase 2B (Calcineurin) für 1h, 6h oder 24h inkubiert.

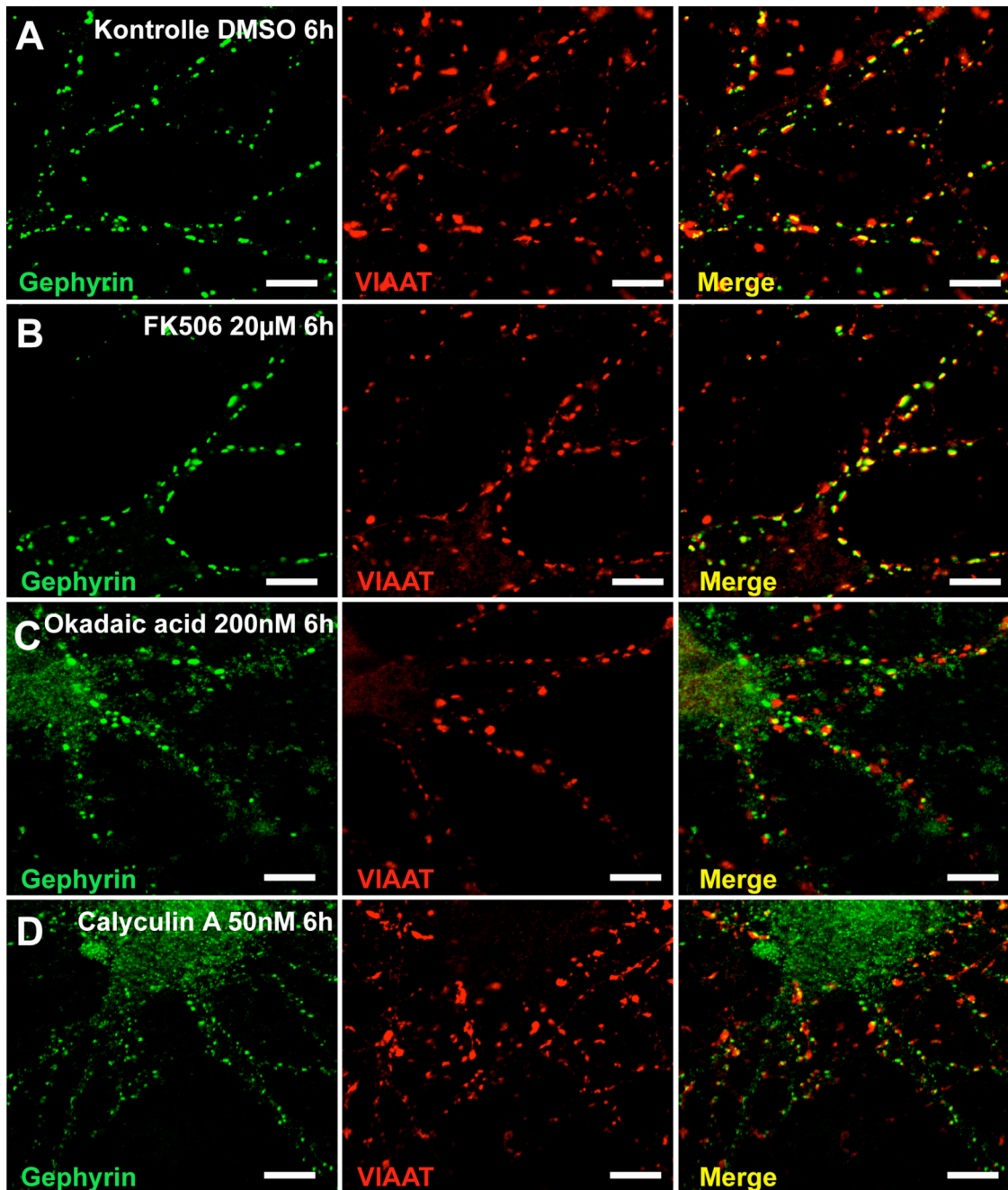


Abbildung 6: Die Inhibition von PP1 / PP2a führt zu einer Reduktion der synaptisch-lokalisierter Gephyrincluster und einem Anstieg der zytoplasmatischen Gephyrin-Immunreaktivität. Hippokampale Primärkulturen (14 DIV) wurden für 6h mit Phosphatase-Inhibitoren behandelt. A) Gephyrin-Immunreaktivität (grüner Kanal), der präsynaptische Marker VIAAT (roter Kanal) und die synaptische Kollokalisierung (Merge). B) FK506 Behandlung hatte keinen Effekt auf Gephyrin (grüner Kanal), VIAAT (roter Kanal) oder die synaptische Kollokalisierung (Merge). C) Okadaic acid Inkubation führte zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Gephyrinfärbung (grüner Kanal), die VIAAT-Verteilung wurde nicht beeinflusst (roter Kanal). Der Anteil der synaptisch-lokalisierter Gephyrincluster war reduziert (Merge). D) Calyculin A Behandlung hatte einen Anstieg der diffusen Gephyrinfärbung zur Folge (grüner Kanal), bei normaler VIAAT-Färbung (roter Kanal). Es war ebenfalls eine deutliche Reduktion in der synaptischer Lokalisation der verbleibenden Gephyrincluster zu verzeichnen (Merge).

Die Behandlung der Zellen mit FK506 hatte im Konzentrationsbereich von 100 nM bis zu 1 μ M keine Veränderungen in der Anzahl oder Verteilung der Gephyrincluster (Abb.6B grüner Kanal) oder der VIAAT Immunreaktivität (Abb.6B roter Kanal) zur Folge. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen zur Regulation von GABA_A-Rezeptoren, bei denen ebenfalls kein Effekt durch Calcineurin Inhibition durch FK506 festgestellt werden konnte (Nusser et al., 1999).

3.1.6.2 Die Inhibition von PP1 / PP2a führt zur Destabilisierung synaptisch-lokalisierter Gephyrincluster

Okadaic acid (*Dinophysi sp*) und Calyculin A (*Discoderma calyx*) inhibieren PP1 und PP2A mit unterschiedlichen IC50-Werten (2.1.7). Inkubation der Zellen für 1 h, 6 h, 12 h mit Okadaic acid (1 nM-1 μ M) und Calyculin A (0.1 nM-200 nM) hatten eine Reduktion in der Anzahl der synaptisch-lokalisierter Gephyrincluster und einen Anstieg der zytoplasmatischen Gephyrin-Immunreaktivität zur Folge (Abb.6 C+D). Die Gephyrin-Immunreaktivität in der Kontrolle zeigt keinerlei zytoplasmatischen Hintergrund (Abb.6 A, grüner Kanal) und einen hohen Anteil an synaptisch-lokalisierter Clustern (Abb.6 A, Merge). Die mit 200 nM Okadaic acid (Abb.6 C) oder 50 nM Calyculin A (Abb.6 D) für 6 h behandelten Kulturen wiesen dagegen eine deutlich erhöhte zytoplasmatische Gephyrinfärbung auf. Die größte Intensität konzentrierte sich im Soma der Zelle, reichte aber bis weit in die feinen dendritischen Strukturen hinein (Abb.6 C und D, grüner Kanal). Es konnte kein Effekt auf die präsynaptische VIAAT-Verteilung (Abb. 6 C-D, roter Kanal) festgestellt werden, aber der Anteil der synaptisch-lokalisierter Gephyrincluster war deutlich verringert (Abb. 6 C-D Merge).

Da Phosphorylierungen auch in der Modulation von Zytoskelettstrukturen eine wichtige Rolle spielen, wurden die behandelten Kulturen zusätzlich einer Phalloidin-Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts unterzogen, um eventuelle Effekte der Toxine auf die Mikrofilamentstrukturen abzuschätzen. Inkubationen mit 200 nM Okadaic acid oder 50 nM Calyculin A für 3h ergaben vergleichbare Effekte auf die Gephyrincluster-Verteilung (Abb.7 B/B1 + C/C1, grüner Kanal) ohne Beeinträchtigung der Struktur des Aktin-Zytoskeletts (Abb.7 B2, 3/C2, 3, grauer Kanal).

3. Ergebnisse

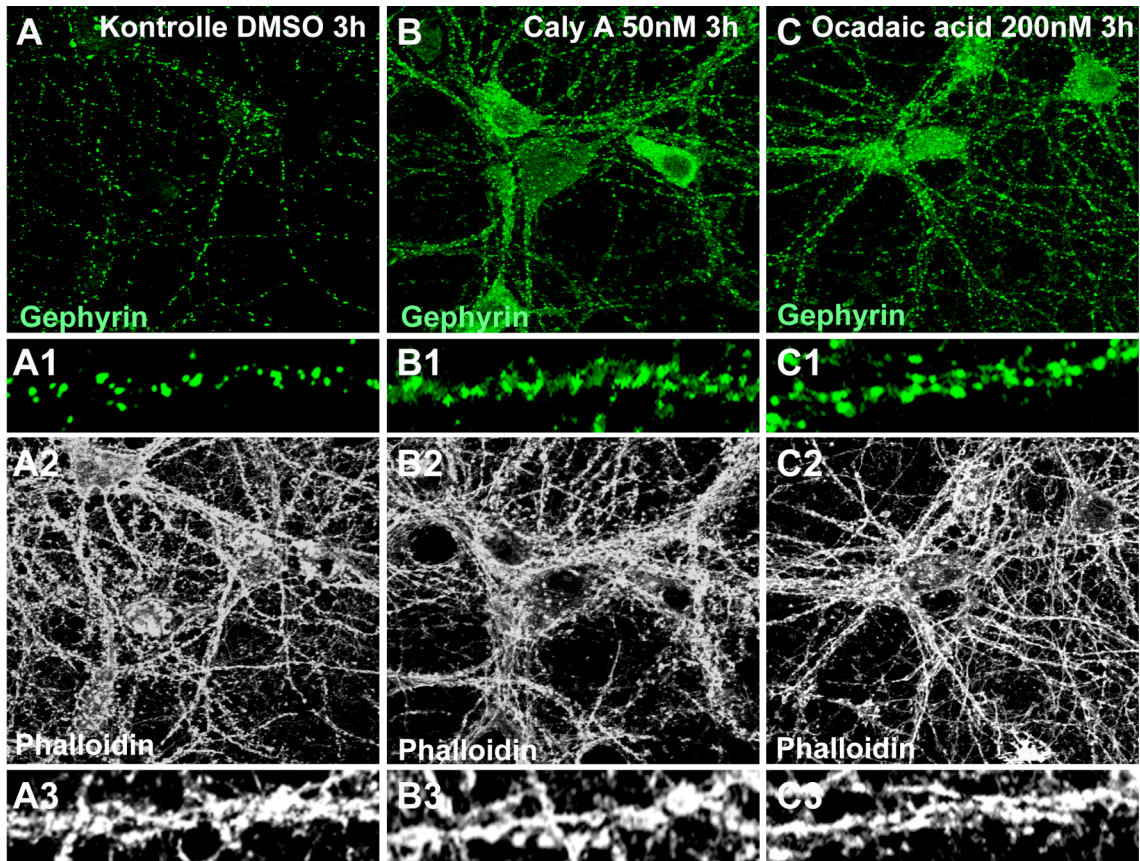


Abbildung 7: Der Anstieg der zytoplasmatischen Gephyrinfärbung ist nicht auf eine Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts zurückzuführen. Hippokampale Primärkulturen (14 DIV) wurden für 3h mit 200 nM Okadaic acid oder 50 nM Calyculin A behandelt. A+A1) In der Kontrolle erkennt man Gephyrincluster im Soma und den Dendriten, ohne zytoplasmatische Immunreaktivität (grüner Kanal) A2+A3) Anfärbung des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin zeigen die intakte Struktur der Dendriten (grauer Kanal). B+B1) 50 nM Calyculin A hat einen Anstieg der zytoplasmatischen Gephyrin-Immunreaktivität zur Folge (grüner Kanal). B2+B3) Die Struktur des Aktin-Zytoskeletts entspricht der Kontrolle (grauer Kanal). C+C1) 200 nM Okadaic acid hatten einen Anstieg der diffusen Gephyrin-Immunreaktivität zur Folge (grüner Kanal). C2+C3) die Struktur des Aktin-Zytoskeletts wird dabei nicht beeinträchtigt (grauer Kanal).

Der Anstieg des zytoplasmatischen, nicht-synaptisch-lokalisierten Gephyrin-Anteils könnte verschiedene Ursachen haben. Entweder wird neu-synthetisiertes Protein nicht korrekt zur Synapse transportiert und reichert sich im Soma und den Dendriten der Neuronen an, oder bereits synaptisch-lokalisierte Gephyrincluster werden aufgrund der Inhibition der entscheidenden Phosphatasen hyperphosphoryliert und dadurch destabilisiert. Der Effekt von Okadaic acid und Calyculin A auf die Gephyrin-Verteilung ließ sich jedoch auch nach Prä-Inkubation der Primärkulturen mit 60 μ M Cycloheximide (Inhibitor der Proteinsynthese) für 12 h stabil reproduzieren (Daten

nicht gezeigt). Somit lässt sich die zytoplasmatische Gephyrin-Immunreaktivität nicht auf neu-synthetisiertes Protein zurückführen. Die gleichzeitige Abnahme der synaptischen Kolokalisation mit VIAAT deutet auf eine Destabilisierung bereits korrekt positionierten Gephyrincluster hin.

3.1.6.3 PP1 kolokalisiert in hippokampalen Primärkulturen partiell mit Gephyrin

Da Okadaic acid und Calyculin A im Bereich der Konzentrationen, für die der Anstieg der diffusen Gephyrin-Immunreaktivität zu verzeichnen war, sowohl PP1 als auch PP2A inhibieren, konnte der Effekt keiner der beiden Phosphatasen eindeutig zugeordnet werden. Über eine direkte oder indirekte Interaktion von Gephyrin mit PP1 oder PP2A war nichts bekannt. Im Falle einer direkten Interaktion von Gephyrin mit PP1 oder PP2A *in vivo* wäre eine Kolokalisation der Phosphatasen mit synaptischen Gephyrinclustern zu erwarten. Für PP1 wurde eine Lokalisation an exzitatorischen Synapsen bereits mehrfach nachgewiesen (Mulkey et al., 1993; Terry-Lorenzo et al., 2005).

Die Färbung unbehandelter Primärkulturen (6 DIV, 14 DIV) mit spezifischen Antikörpern (Tabelle 2.1.8) gegen PP1, PP2A und den präsynaptischen Marker VIAAT oder gegen Gephyrin, GABA_Aα1 und PSD-95 als postsynaptische Marker ergab eine teilweise Überlappung der punktuellen PP1-Immunreaktivität mit synaptisch-lokalisierten Gephyrincluster (Abb.8, Merge). Die PP1-Immunreaktivität ergab eine punktförmige Färbung entlang der Dendriten zusätzlich zu einer zytoplasmatischen Verteilung des Proteins (Abb.8 A1, roter Kanal). Ein geringer Prozentsatz der punktförmigen PP1-Immunreaktivität kolokalisierte mit Gephyrinclustern (Abb.8 A+A1 Merge). Die Anzahl der Gephyrin/PP1 positiven Kontakte lag dabei jedoch nur zwischen 10%-15% und es wurden PP1-positive, aber Gephyrin-negative Punkte beobachtet (Abb.8 A+A1, Merge). Bei letzterem handelt es sich möglicherweise um eine exzitatorische Lokalisation von PP1. Deshalb wurden Färbungen mit dem postsynaptischen Marker PSD-95 durchgeführt. Sie ergaben eine partielle Überlappung der PP1-Immunreaktivität mit PSD-95 an exzitatorischen Synapsen (Abb.8 B/B1 Merge). Für PP2A wurde bereits die Kolokalisation an exzitatorischen Synapsen (Ma et al., 2004) und eine Interaktion der Phosphatase mit der β3-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors an inhibitorischen Synapsen beschrieben (Jovanovic et al., 2004). Da der verwendete PP2A-Antikörper aus der gleichen Spezies wie der Gephyrin- und der PSD-

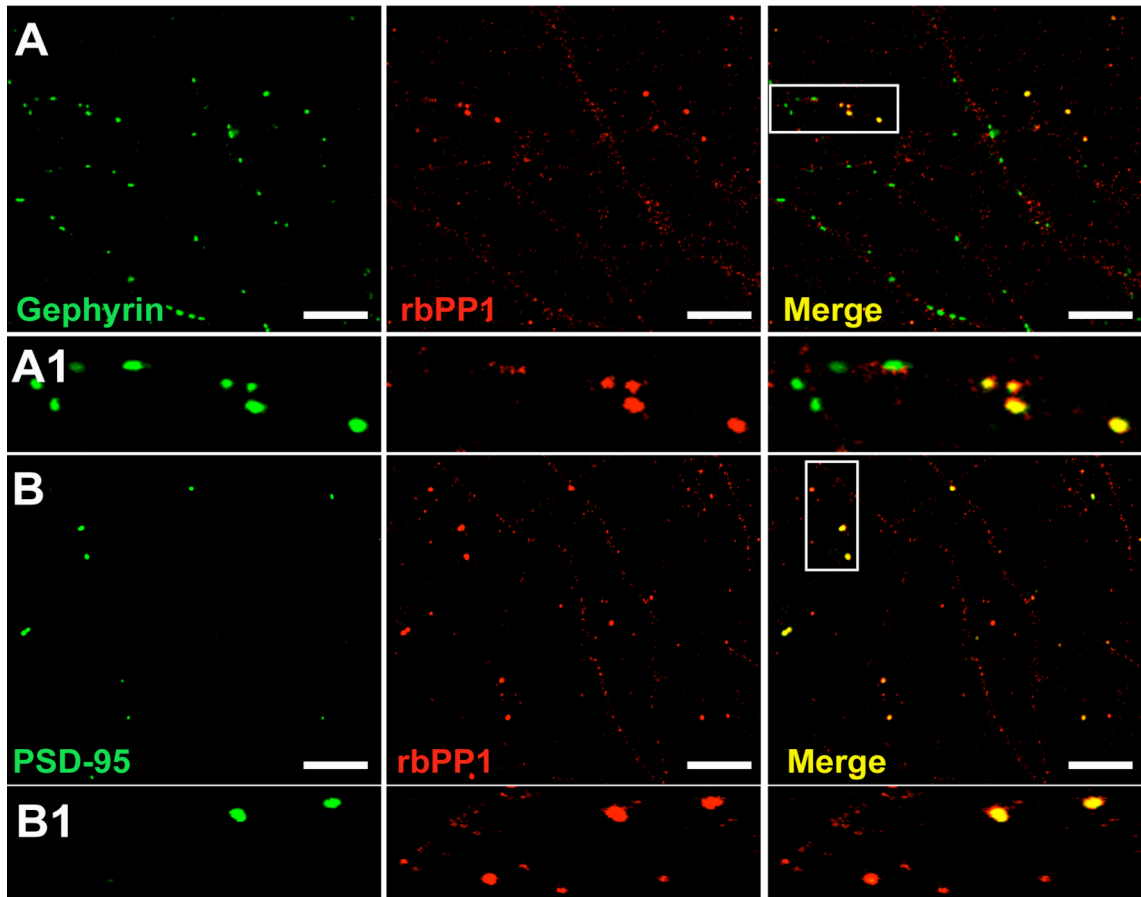


Abbildung 8: PP1 kolokalisiert partiell mit Gephyrin und PSD-95. Hippokampalen Primärkulturen (6DIV) wurden gegen PP1, PSD-95 und Gephyrin angefärbt. A) Es ist eine deutliche Anreicherung (ca. 15-20% aller Cluster) des endogenen PP1-Anteils (roter Kanal) in Gephyrinclustern (grüner Kanal) zu erkennen (Merge). A1) Vergrößerungen des Dendriten zeigen ebenfalls eine partielle Kolokalisation (Merge) von PP1 (roter Kanal) mit Gephyrin (grüner Kanal). B) Färbungen mit PSD-95 (grüner Kanal) ergaben zusätzlich eine partielle Kolokalisation (Merge) mit PP1 (roter Kanal). Bar 20 μ M

95-Antikörper stammt, war in diesem Fall keine parallele Färbung möglich. Immunfluoreszenzfärbungen der Primärkulturen (14DIV) gegen Gephyrin und die GABA α 1-Rezeptoruntereinheit (Abb.9A/A1, grüner und roter Kanal) ergaben eine fast vollständige Kolokalisation (Abb.9A/A1, Merge). Die PP2A-Immunreaktivität lag größtenteils zytoplasmatisch im Dendriten und dem Soma der Neuronen vor. Es konnte keine Kolokalisation mit GABA α 1 (Abb.9 B/B1, Roter Kanal) beobachtet werden (Abb.9B/B1, Merge). Auffällig waren jedoch einzelne punktförmige Anreicherungen, die nicht direkt auf dem Dendriten zu liegen schienen (Abb.9 B/B1, Grüner Kanal). Dies deutet erneut auf eine mögliche Lokalisation des Proteins an exzitatorischen Synapsen hin.

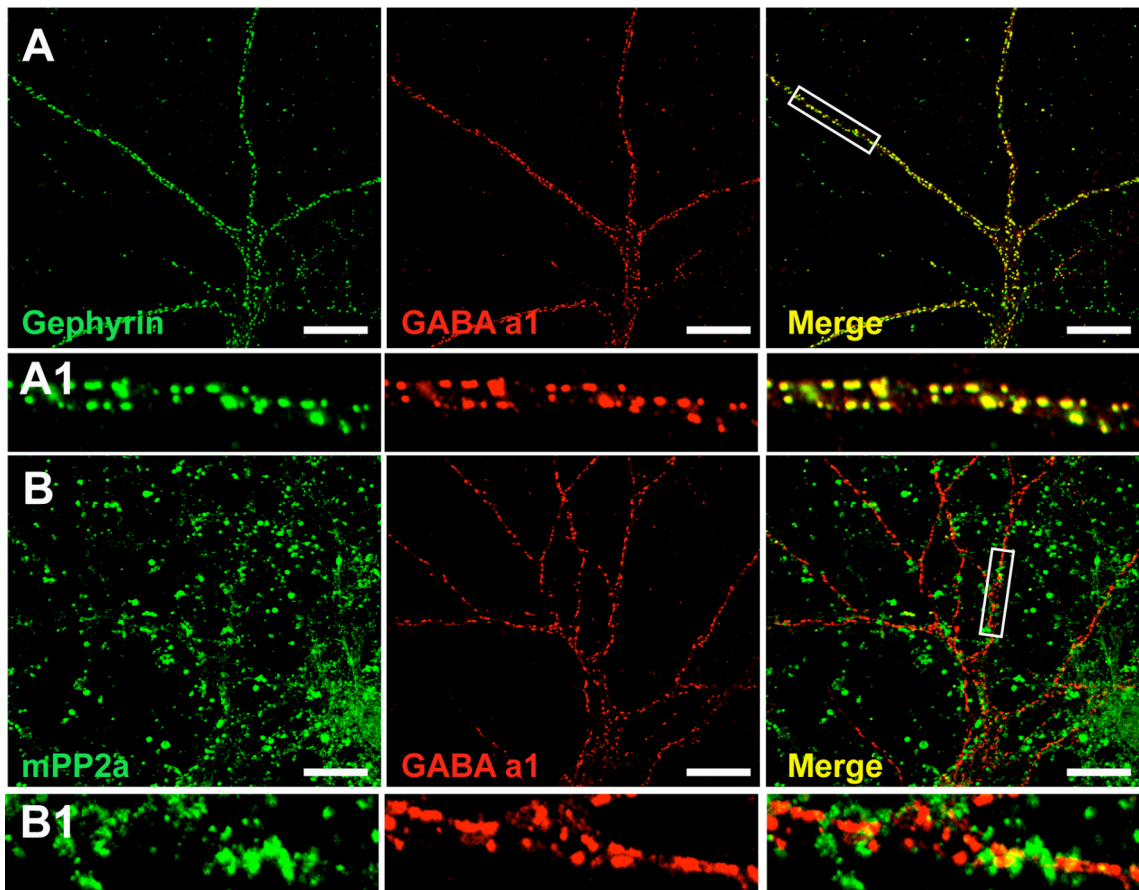


Abbildung 9: PP2A kolokalisiert nicht mit GABA α 1-positiven inhibitorischen Synapsen. Hippokampale Primärkulturen 14 DIV wurden gegen Gephyrin, GABA α 1 und PP2A gefärbt. A+A1) Gephyrin-Immunreaktivität (grüner Kanal) kolokalisiert zu etwa 90% mit GABA α 1 (roter Kanal). B+B1) Endogene PP2A-Immunreaktivität (grüner Kanal) zeigte keine Überlappung (Merge) mit GABA α 1-Färbung. Bar 20 μ M

3.1.6.4 PP1 wird in GFP-Gephyrin-Aggregaten angereichert

Um eine direkte Protein-Interaktion von Gephyrin mit PP1 oder PP2A zu analysieren, wurden HEK293T-Zellen (Human embrionic kidney cells 293T) als Expressionssystem ausgewählt. GFP-Gephyrin-Konstrukte bilden nach Überexpression in HEK293T-Zellen große runde zytoplasmatische Aggregate (Kirsch et al., 1995). Proteine, die mit Gephyrin zu interagieren vermögen, reichern sich sowohl endogen als auch nach Koexpression in diesen Makroaggregaten an. Dies konnte erstmals für die β -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors (Kirsch et al., 1995) gezeigt werden.

GFP-Gephyrin wurde in HEK293T-Zellen exprimiert und die Lokalisation des endogenen PP1- und PP2A-Anteils der Zellen mittels Immunfärbung analysiert. Dabei handelte es sich um ein Fusionsprotein von Gephyrin mit einem EGFP- tag (Enhanced

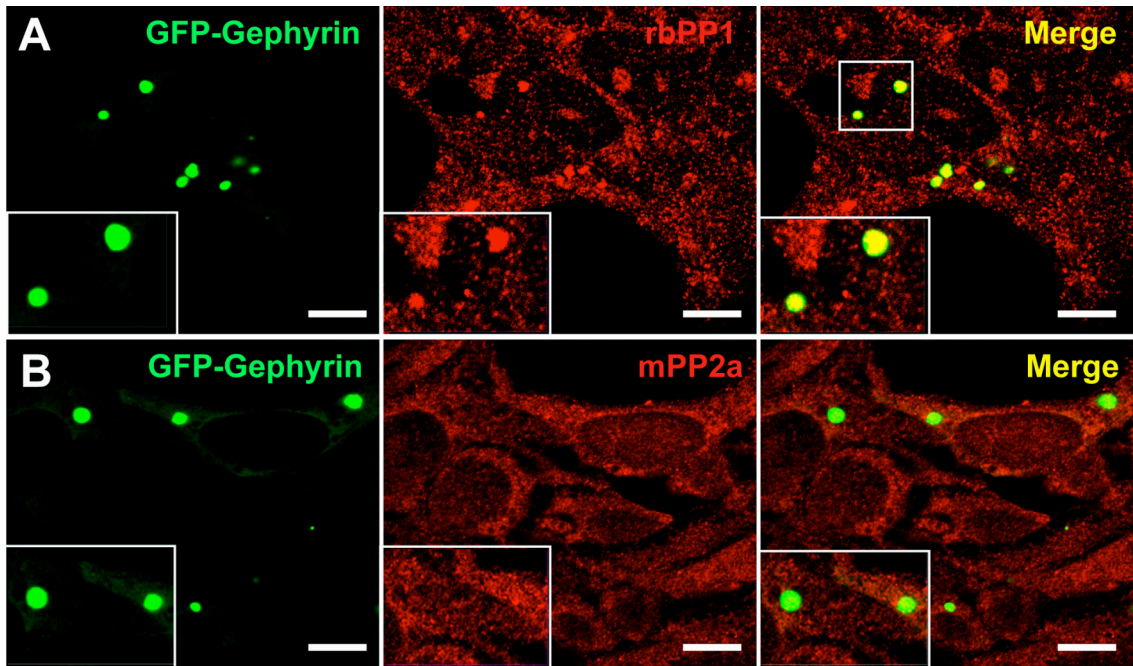


Abbildung 10: Endogenes PP1 wird in Gephyrin-Makroaggregaten angereichert. GFP-Gephyrin wurde für 7 h in HEK293T-Zellen exprimiert und die Lokalisation des endogenen PP1 und PP2A-Anteils der Zellen mittels Immunfärbung analysiert. A) Es ist eine deutliche Anreicherung des endogenen PP1-Anteils (roter Kanal) in den Gephyrin-Makroaggregaten (grüner Kanal) zu erkennen (Merge). Die PP2A-Immunreaktivität lag diffus verteilt vor (Roter Kanal) und es zeigte sich keine erhöhte Konzentration in den GFP-Gephyrin-Aggregaten (Merge). Bar 8 μ M

green fluorescent protein) am N-Terminus. Der größte Anteil der transfizierten Zellen enthielt keine Gephyrin-Aggregate, sondern zeigte eine diffuse Verteilung des Proteins im Zytoplasma (statistische Verteilung 3.1.7). Zusätzlich ergab sich eine geringe Anzahl von Zellen mit wenigen, großen zytoplasmatisch lokalisierten Gephyrin-Makroaggregaten. Eine Antikörper-Färbung gegen den endogenen PP1-Anteils in HEK293T-Zellen ergab eine deutliche Anreicherung des Proteins in den Gephyrin-Makroaggregaten (Abb.10A, roter Kanal und Merge).

Die endogene PP2A-Immunreaktivität in den untransfizierten HEK293T-Zellen lag diffus zytoplasmatisch verteilt vor (Daten nicht gezeigt) und zeigte keine Anreicherung in den Positionen der Makroaggregate nach Transfektion der Zellen mit GFP-Gephyrin (Abb.10B roter Kanal und Merge). Zumindest im HEK293-System scheint es keine Interaktion zwischen GFP-Gephyrin und PP2A zu geben aber es konnte erstmals eine direkte Interaktion von Gephyrin und PP1 nachgewiesen werden.

3.1.6.5 PP1 und PP2A kopräzipitieren mit Gephyrin *in vitro*

Um die Interaktion von PP1 und PP2A mit Gephyrin genauer zu analysieren, wurden zusätzlich Immunpräzipitationen aus transfizierten HEK293T-Lysaten und adultem Rattenhirnlysate durchgeführt (Abb.11 A). Präzipitationen mit Antikörpern, die spezifisch gegen PP1 oder PP2A gerichtet waren, ergaben eine deutliche Anreicherung von Gephyrin aus transfizierten HEK293T-Zellen und aus adultem Rattenhirnlysate (Abb.11 A). Umgekehrt waren Gephyrin-Antikörper in der Lage, PP1 und PP2A mit zu präzipitieren (Abb.11 A). Als Negativkontrolle wurden alle Experimente zusätzlich mit untransfizierten HEK293T-Zellen durchgeführt, um die Spezifität der Interaktion zu bestätigen (Abb.11). Es war ebenfalls möglich, PP1 und PP2A über eine Bindung an GST-Gephyrin-Fusionsproteine aus adultem Rattenhirnlysate anzureichern. Eine Bindung von PP1- und PP2A-Immunreaktivität konnte sowohl mit GST-Gephyrin als auch mit der C-terminalen Domäne von Gephyrin GST-GE45 (Sola et al., 2004) nachgewiesen werden (Abb.11 B).

3.1.7 Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts

Die Interaktion von Gephyrin mit Mikrotubuli ist bereits eingehend charakterisiert worden; über die Verankerung mit dem Aktin-Zytoskelett ist jedoch noch wenig bekannt. Inkubationen von kultivierten Rückenmarksneuronen mit dem Alkaloid Cytochalasin D (Kirsch und Betz, 1995), welches das Aktin-Zytoskelett depolymerisiert, hatte eine Reduktion der Anzahl und Größe der postsynaptischen Gephyrincluster zur Folge. Die verbleibenden Aggregate wiesen jedoch eine deutlich höhere Dichte auf (Kirsch et al., 1995). Eine zweite Studie in hippokampalen Primärkulturen dagegen konnte keinen Hinweis auf die Abhängigkeit der Gephyrincluster von F-Aktin oder Mikrotubulistrukturen belegen (Allison et al., 2000). Diese gegensätzlichen Resultate sind möglicherweise auf unterschiedliche Differenzierungsstadien der verwendeten Kulturen oder auf unterschiedliche Spleißvarianten von Gephyrin in Rückenmarkskulturen vs. Hippokampale Primärkulturen zurückzuführen. Eine direkte Interaktion von Gephyrin mit dem Aktin-Zytoskelett konnte nicht nachgewiesen werden; es ist also anzunehmen, dass die Interaktion über ein intermediäres Protein zwischen Gephyrin und Aktin vermittelt wird.

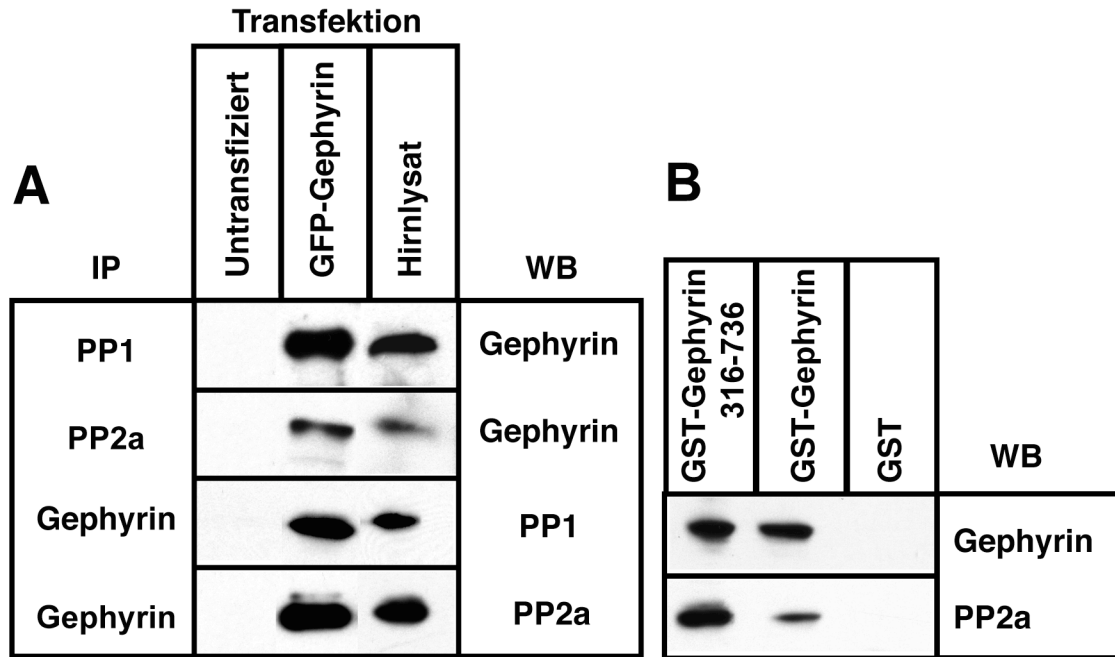


Abbildung 11: PP1 und PP2A kopräzipitieren mit Gephyrin in vitro. A) HEK 293T-Zellen wurden mit GFP-Gephyrin für 24h transfiziert. Lysate der transfizierten HEK293T-Zellen und Hirnlysat wurden für Immunpräzipitationen (IP) eingesetzt und mittels Western Blot (WB) analysiert. A) Präzipitationen gegen PP1 und PP2A hatten eine Anreicherung von Gephyrin aus transfizierten HEK293T-Zellen und aus adultem Hirnlysat zur Folge. Gephyrin-Antikörper kopräzipitierten ihrerseits PP1 und PP2A. Untransfizierte HEK293T-Zellen zeigten keine Anreicherung von PP1, PP2A oder Gephyrin. B) GST-Fusionsproteine von Gephyrin (GST-Gephyrin) und dem C-terminalen Abschnitt von Gephyrin (GST-GE45) waren in der Lage, PP2A aus adultem Rattenhirnlysat anzureichern. Die GST-Kontrolle zeigte keine Kopräzipitation.

3.1.7.1 Gephyrin-Mikroaggregate werden in alkaloid-induzierte F-Aktin-Patches rekrutiert

Um die Art der Interaktion von Gephyrin mit dem Aktinzytoskelett genauer zu analysieren, wurde erneut die HEK293T-Zelllinie als Expressionssystem verwendet. Die kultivierten Zellen wurden zunächst mit GFP-Gephyrin-Konstrukten transfiziert. Nach 7 h Transfektion zeigte die Mehrheit der transfizierten Zellen (ca. 60-70%) eine gleichmäßige zytoplasmatische GFP-Gephyrin-Verteilung ohne Aggregatbildung. In den restlichen transfizierten Zellen bildeten sich GFP-Gephyrin-Aggregate; ca. 30% enthielten dabei wenige große Gephyrin-Aggregate (Makroaggregate) und etwa 5% viele kleine Aggregate (Mikroaggregate). Für quantitative Analysen der Transfektionen wurden jeweils 100 Zellen pro Deckglas ausgewertet (Abb.1A; unbehandelt) und die transfizierten Zellen in Gruppen mit a) diffuser Verteilung des Proteins ohne Aggregate

3. Ergebnisse

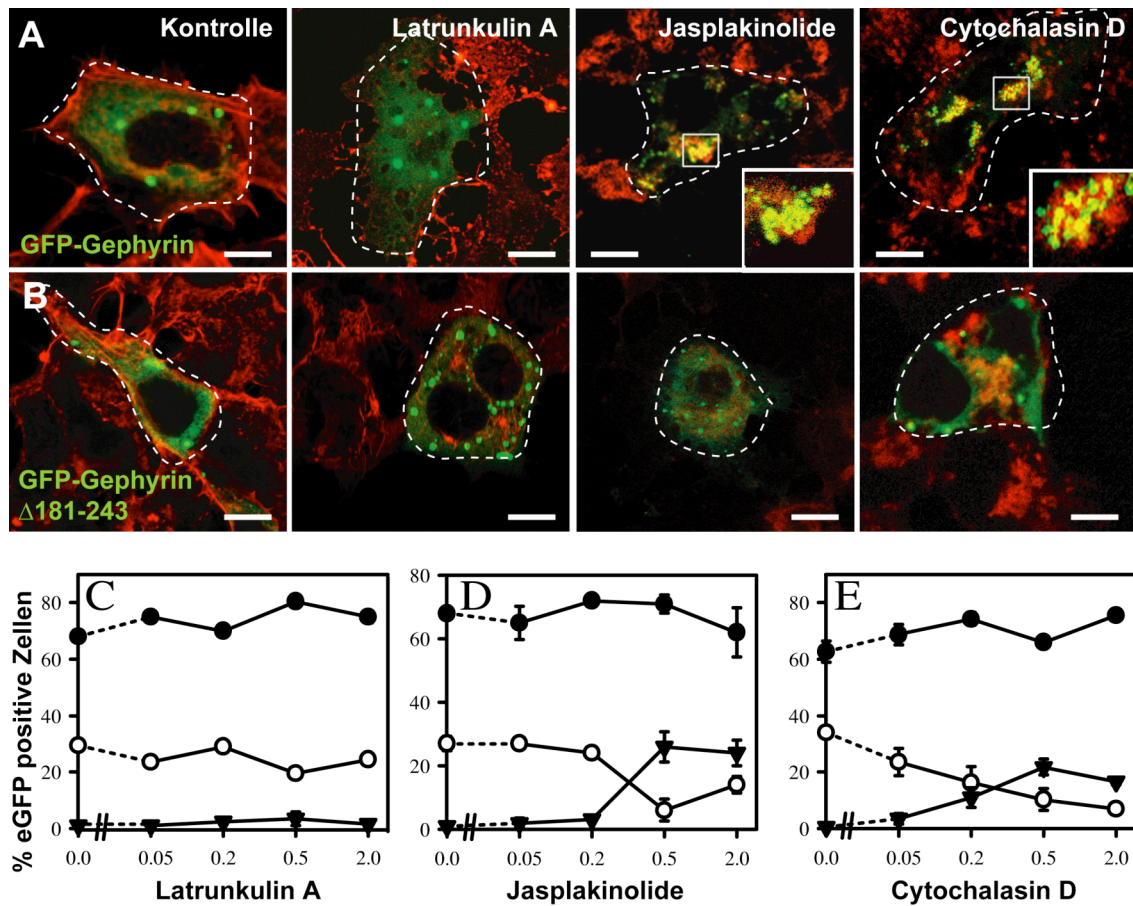


Abbildung 12: Alkaloid-induzierte Degradation des Aktin-Zytoskeletts führt zur Bildung von Gephyrin-Mikroaggregaten, die mit F-Aktin-Patches kolokalisieren. HEK293T-Zellen wurden mit A) GFP-Gephyrin oder B) GFP-Gephyrin-d181-243 für 4h transfiziert, bevor sie für weitere 3h mit 2 µM der angegebenen Alkaloide behandelt wurden. Inkubation mit Latrunkulin hatte keine Auswirkung auf die Verteilung der Gephyrin-Aggregate (A, C). Jasplakinolide und Cytochalasin D Behandlung hatte einen signifikanten Anstieg der Zellen mit Gephyrin-Mikroaggregaten zur Folge (D, E), die mit F-Aktin Patches kolokalisierten. (B) Der Effekt ist abhängig von der Gephyrin-Linkerregion, da die Deletionsmutante GFP-Gephyrin-d181-243 in allen Behandlungen der Kontrolle entspricht. Für die quantitative Analyse der Transfektionen wurden jeweils 100 Zellen pro Deckglas ausgewertet (Abb.1A; unbehandelt) und die transfizierten Zellen in Gruppen mit a) diffuser Verteilung des Proteins ohne Aggregate (ausgefüllter Kreis), b) weniger als 20 Aggregaten pro Zelle (leerer Kreis) und c) mehr als 20 Aggregaten pro Zellen (ausgefüllte Dreiecke) eingeteilt. Bar 8µM

(ausgefüllter Kreis), b) Zellen mit weniger als 20 Aggregaten (leerer Kreis) und c) Zellen mit mehr als 20 Aggregaten (ausgefüllte Dreiecke) eingeteilt (statistische Auswertung Abb. 12C).

Die Markierung des Aktin-Zytoskeletts durch Rhodamin-Phalloidin, einem Alkaloid, das spezifisch F-Aktin anzufärben vermag, ergab, dass die GFP-Gephyrin-Aggregate in unbehandelten Zellen nicht mit den Mikrofilamentstrukturen

3. Ergebnisse

kolokalisierten (Abb.12A; Kontrolle). Die Reduktion von filamentösem Aktin durch Inkubation der mit GFP-Gephyrin transfizierten HEK293T-Zellen für 3h mit 2 μ M Latrunkulin, einem Alkaloid, welches an G-Aktin Monomere bindet und deren Inkorporation in F-Aktin-Filamente verhindert (Witteck et al., 2003), hatten keinen sichtbaren Effekt auf die Anzahl und Größe der vorhandenen Gephyrin-Aggregate oder die Zellmorphologie (Abb.12A; Latrunkulin; Statistik Abb. 12C). Die Stabilisation der großen zytoplasmatischen Gephyrin-Aggregate ist nicht von intakten Mikrofilamentstrukturen abhängig. Weitere, das Aktin-Zytoskelett angreifende Toxine dagegen, wie zum Beispiel Jasplakinolide und Cytochalasin D, sind dafür bekannt, abnormal angereicherte F-Aktin-Strukturen (F-Aktin-Patches) in unterschiedlichen Zelllinien zu erzeugen (Mortensen und Larson, 2003; Witteck et al., 2003).

Die Visualisierung der F-Aktin-Patches gestaltet sich für Jasplakinolide schwieriger, da das Toxin mit Phalloidin um die gleiche Bindungsstelle an F-Aktin konkurriert (Witteck et al., 2003). Die Inkubation der GFP-Gephyrin-transfizierten HEK293T-Zellen mit Jasplakinolide (2 μ M, 3h) führte zu einem Anstieg der transfizierten Zellen mit Gephyrin-Mikroaggregaten und einer Abnahme der Zellzahl mit wenigen großen Gephyrin-Makroaggregaten abnahm (Abb.12 D). Der Anteil der transfizierten Zellen ohne Aggregate blieb unverändert. Die entstandenen Mikroaggregate zeigten eine deutliche Kolokalisation mit den induzierten F-Aktin-Patches (Abb.12A; Jasplakinolide). Der Effekt trat erst ab einer Alkaloid-Konzentration von mehr als 500 nM auf.

Cytochalasine sind Pilzmetaboliten von niedrigem Molekulargewicht, die spezifisch mit Aktin interagieren und eine Reihe von unterschiedlichen Effekten zur Folge haben, abhängig von der Zelllinie, der Kulturdichte, des eingesetzten Cytochalasin-Typs (A oder D) und der verwendeten Konzentration. Im Fall niedriger Konzentrationen (\sim 2 nM) wird die Anlagerung von monomerem G-Aktin Einheiten durch das Anbinden der Cytochalasine am Schwanz-(Plus-) Ende des F-Aktin verhindert (Bonder und Moosker, 1986; Cooper, 1987), wodurch sie die Polymerisation verlangsamen oder ganz verhindern (Verkappung) (Bear et al., 2002). Höhere Konzentrationen dagegen depolymerisieren F-Aktin, stabilisieren Oligomere, stimulieren F-Aktin ATPase-Aktivität und interagieren mit G-Aktin (Bear et al., 2002). Es wurde wiederholt beobachtet, dass eine Inkubation mit Cytochalasinen die Organisation des geordneten isotropen Aktin-Zytoskeletts auflöst und zu einer lokalen Akkumulation von F-Aktin-artigen Strukturen führt, so genannte F-Aktin-Patches. Die

Inkubation von mit GFP-Gephyrin transfizierten HEK293T-Zellen mit Cytochalasin D (2 μ M, 3h) führte, vergleichbar der Jasplakinolid-Behandlung, ebenfalls zu einem erhöhten Anteil von Gephyrin-Mikroaggregaten bei gleichzeitiger Abnahme der Zellzahl mit wenigen Makroaggregaten. Der Prozentsatz der transfizierten Zellen ohne GFP-Gephyrin-Aggregate blieb erneut unverändert (Abb. 12E). Die Mikroaggregate kolokalisierten auch in diesem Fall mit den F-Aktin Patches (Abb. 12A; Cytochalasin D). Allerdings erfolgte die Induktion der Mikroaggregate erst bei Konzentrationen über 100 nM. Die Behandlung der GFP-Gephyrin-transfizierten HEK293T-Zellen mit Cytochalasin D oder Jasplakinolide hatte in beiden Fällen die Induktion von Gephyrin-Mikroaggregaten zur Folge, welche sehr wahrscheinlich auf eine Destabilisierung der Gephyrin-Makroaggregate zurückzuführen ist. Die Assoziation der Mikroaggregate mit den alkaloid-induzierten F-Aktin-Patches deutet auf einen Effekt hin, der über eine Disaggregation „gekappter“ F-Aktin-Filamente und eine nachfolgende Akkumulation von Gephyrin in „ungekappte“ F-Aktin Patches vermittelt wird. Diese Vermutung wird von der Beobachtung unterstützt, dass erst höhere Konzentrationen von Cytochalasin D die beobachteten Mikroaggregate induzieren.

Frühere Studien in unserer Arbeitsgruppe belegen eine entscheidende Funktion der Linkerregion von Gephyrin (Aminosäuren 181-243) für den intrazellulären Transport des Proteins (Fuhrmann et al., 2002) und die Interaktion mit Mikrotubuli-assoziierten Strukturen. Wie bereits bei Fuhrmann et al. (2002) beschrieben, ergab die Transfektion der entsprechenden Deletionsmutante GFP-Gephyrin (Δ 181-243) einen mit GFP-Gephyrin vergleichbaren Anteil an transfizierten Zellen ohne Aggregate (60-70%) und einen ca. 20-30% Anteil an Zellen mit Gephyrin-Makroaggregaten, welche in unbehandelten Zellen keine sichtbare Kolokalisation mit dem endogenen Aktin-Zytoskelett aufwiesen (Abb.12B). Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für GFP-Gephyrin hatte auch für die Mutante die Inkubation mit 2 μ M Latrunkulin keinen sichtbaren Effekt auf die Anzahl der transfizierten Zellen mit großen Aggregaten (Abb.12 B, Latrunkulin). Die Inkubation mit Cytochalasin D (Abb.12 B, Cytochalasin D) oder Jasplakinolid (Abb.12 B, Jasplakinolid) dagegen ergab zwar die charakteristischen F-Aktin-Patches, aber keines der beiden Toxine war in der Lage, GFP-Gephyrin (Δ 181-243)-Mikroaggregate zu induzieren. Quantitative Analyse der transfizierten Zellen ergab gleich-bleibende Prozentzahlen für Zellen ohne Aggregate als auch solche mit wenigen, großen Gephyrin-Makroaggregaten (Daten nicht gezeigt). Es ist daher anzunehmen, dass der Aminosäureabschnitt 181-243 in der Gephyrin-

Sequenz für die Induktion und nachfolgende Kolo-kalisation der Mikrocluster mit F-Aktin-Patches entscheidend ist.

3.1.7.2 GFP- γ -Aktin kolokalisiert mit Gephyrin-Aggregaten in HEK 293 Zellen

Wie in den vorherigen Experimenten bereits nachgewiesen wurde, interagiert GFP-Gephyrin nicht direkt mit den intakten F-Aktin-Mikrofilamenten in HEK293T-Zellen, wird aber in F-Aktin-Patches lokalisiert, die „ungekapptem“ F-Aktin ähneln. Um zu untersuchen, ob durch Bindung von G-Aktin, dem monomeren Zustand von F-Aktin, an Gephyrin dieses möglicherweise in Gephyrin-Aggregate rekrutiert werden könnte, wurde GFP- γ -Aktin (Fischer et al., 1998) entweder einzeln oder unter Koexpression von VSV-Gephyrin in HEK293 Zellen transfiziert. Die Transfektion von GFP- γ -Aktin hatte eine diffuse zytoplasmatische Verteilung des Proteins zu Folge (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der kurzen Transfektionsdauer (7 h) war keine deutliche Anreicherung des GFP- γ -Aktin in Mikrofilamentstrukturen zu verzeichnen. Koexpression von GFP- γ -Aktin mit VSV-Gephyrin dagegen resultierte in einer deutlichen Anreicherung von GFP- γ -Aktin in den Gephyrin-Makroaggregaten (Abb.13 A). Die Applikation von 2 μ M Cytochalasin D für 3 h induzierte F-Aktin-Patches, die im Fall der Einzeltransfektion stark mit GFP- γ -Aktin angereichert waren (Daten nicht gezeigt). Bei einer Koexpression von VSV-Gephyrin und GFP- γ -Aktin führte die Alkaloid-Behandlung erneut zur Induktion von Gephyrin-Mikroaggregaten, die jedoch nicht nur mit den F-Aktin-Patches kolokalisierten, sondern auch mit GFP- γ -Aktin angereichert waren (Abb.13 B/B1).

3.1.7.3 Die Linker-Region 181-243 in der Gephyrin-Sequenz wird für eine Interaktion mit ena/VASP benötigt

Eine mögliche Erklärung, warum Gephyrin mit G-Aktin, nicht aber mit F-Aktin-Mikrofilamenten zu interagieren vermag, könnte in der besonderen Struktur von F-Aktin zu finden sein. F-Aktin ist wie bereits erwähnt am Ende „gekappt“. Das Aktin „entkappende“ Protein ena/VASP bindet bevorzugt an Proteine, welche Poly-Prolinreiche Abschnitte in ihrer Sequenz aufweisen. Ein derartiges Epitop findet sich in der Linkerregion von Gephyrin (Krause et al., 2000). Nach Expression von GFP-Gephyrin (7 h) in transfizierten HEK293T-Zellen ergab die Analyse des endogen vorkommenden ena/VASP-Anteils eine deutliche Anreicherung des Proteins in den Gephyrin-

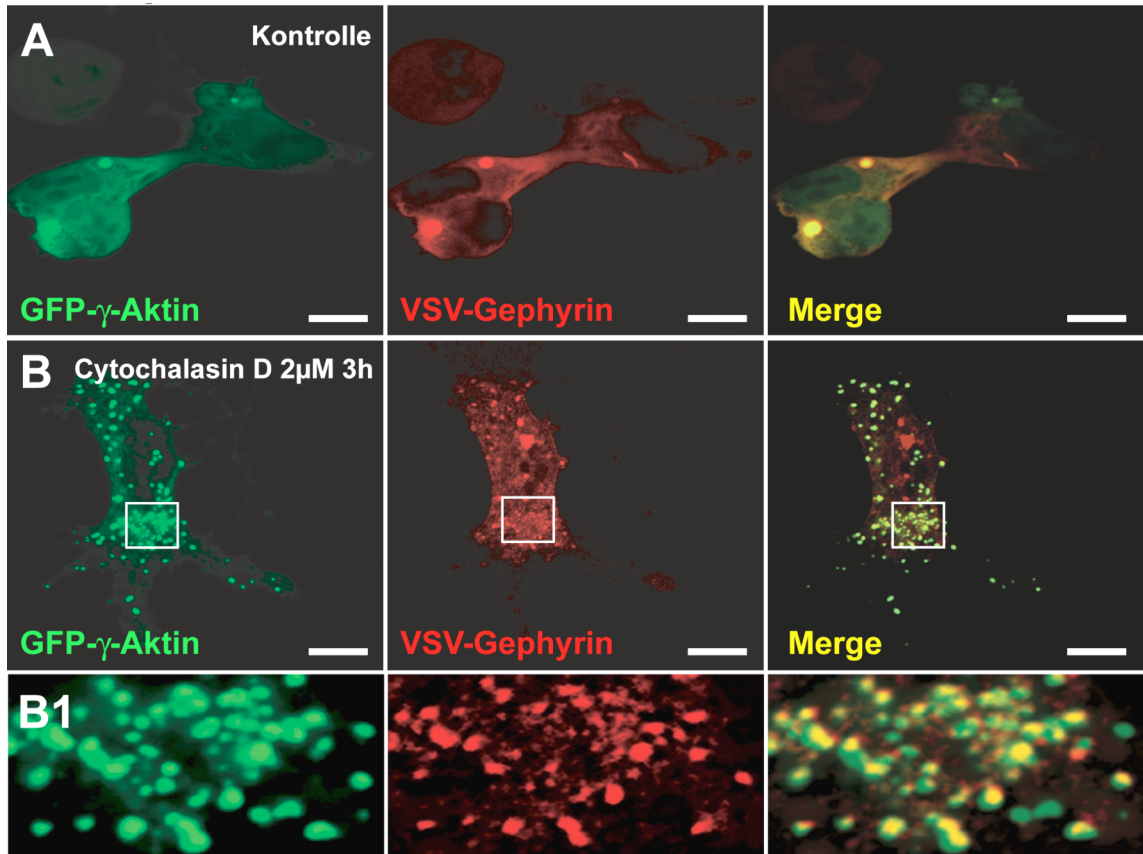


Abbildung 13: GFP- γ -Aktin wird bei Koexpression mit VSV-Gephyrin in Gephyrin-Makroaggregate und in Alkaloid-induzierte Mikroaggregate rekrutiert. A) Koexpression von GFP- γ -Aktin (grüner Kanal) mit VSV-Gephyrin (roter Kanal) zeigt eine deutliche Anreicherung in den Gephyrin-Makroaggregaten (Merge). B+B1) Behandlung für 3 h mit 2 μ M Cytochalasin D führte zu einer Anreicherung von GFP- γ -Aktin in den Alkaloid-induzierten Gephyrin-Mikroaggregaten. Bar 8 μ M

Makroaggregaten (Abb.14 A). In untransfizierten HEK293T-Zellen lag der endogene ena/VASP-Anteil diffus verteilt vor mit einigen wenigen, stärker angereicherten Strukturen (vermutlich aktive Positionen von Aktin-Polymerisation). Cytochalasin D Inkubation (2 μ M für 3 h) induzierte Gephyrin-Mikroaggregate, welche deutlich mit ena/VASP angereichert waren (Abb.14 B). Im Gegensatz zur dem Wildtyp-Konstrukt war die Deletionsmutante GFP-Gephyrin (Δ 181-243), in welcher der Poly-Prolin-reiche Abschnitt der Linkerregion fehlt (Fuhrmann et al., 2002), nicht in der Lage, ena/VASP in den Makroaggregaten anzureichern (Abb.14 C). Die Alkaloid-Behandlung induzierte für die Deletionsmutante keine Mikrocluster (Abb.14 D). Ena/VASP wurde in die Alkaloid-induzierten F-Aktin-Patches rekrutiert (Abb.14 D). Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der Abschnitt 181-243 in der Linkersequenz von Gephyrin für die Interaktion mit ena/VASP eine wichtige Rolle spielt. Dies steht allerdings im Widerspruch zu vorherigen Studien, in welchen der C-terminale Abschnitt von

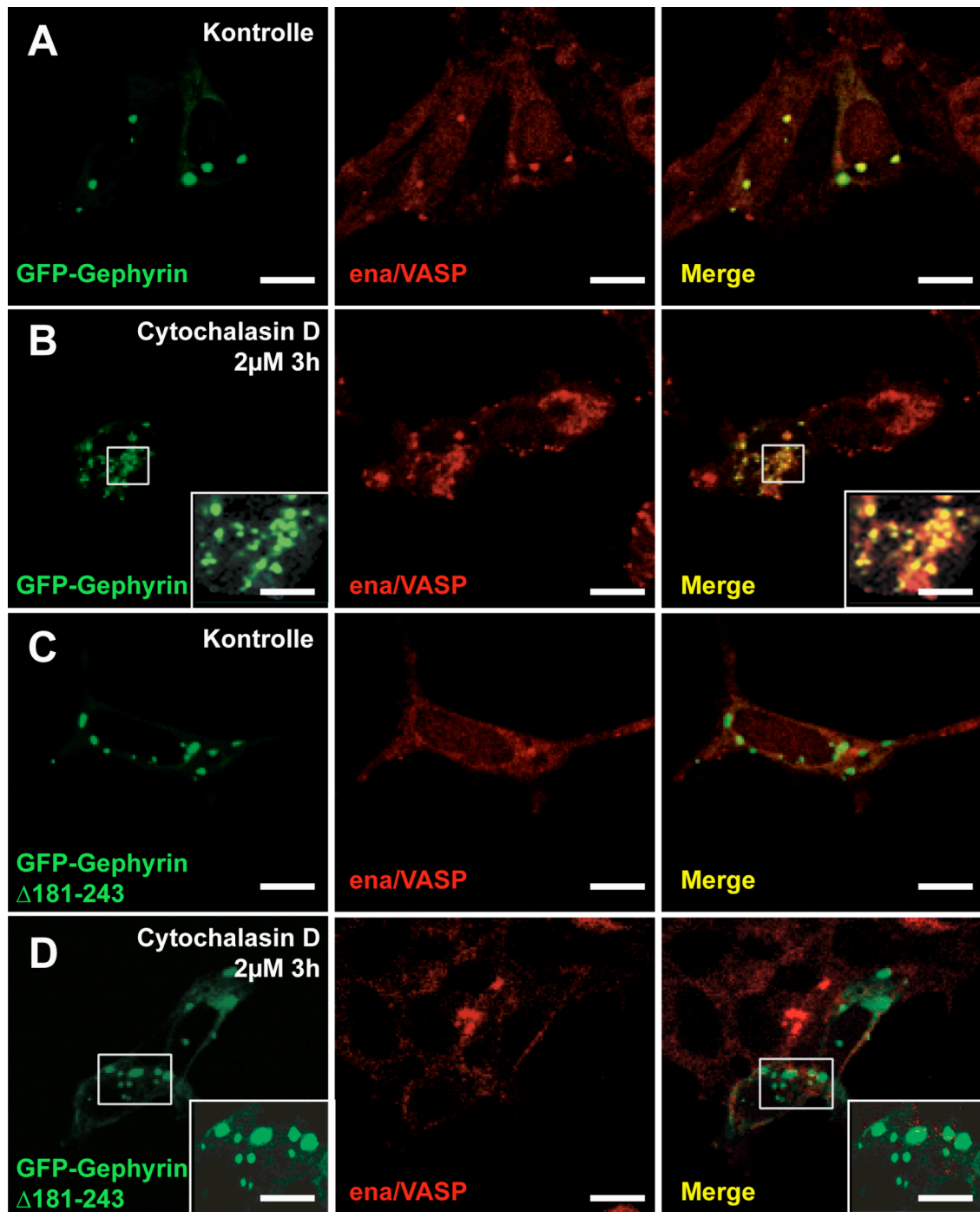


Abbildung 14: *ena/VASP* wird in Gephyrin-Aggregaten angereichert; die Rekrutierung ist abhängig von den Aminosäuren 181-243. HEK 293T-Zellen wurden für 4 h mit GFP-Gephyrin (A, B) oder GFP-Gephyrin- Δ 181-243 (C, D) transfiziert und für 3 h mit DMSO (A, C) oder 2 μ M Cytochalasin D (B, D) behandelt. (A) Die Anfärbung des endogenen *ena/VASP*-Anteils ergab eine deutliche Anreicherung in den Gephyrin-Makroaggregaten der unbehandelten Zellen und den (B) Gephyrin-Mikroaggregaten nach der Inkubation mit Cytochalasin D. (C) Die Deletionsmutante GFP-Gephyrin- Δ 181-243 zeigte keine Anreicherung von *ena/VASP* in den Makroaggregaten. (D) Die Mutante bildete keine Gephyrin-Mikroaggregate nach Cytochalasin D Behandlung, und der endogene *ena/VASP*-Anteil wurde in F-Aktin-Patches rekrutiert. Bar 8 μ M

Gephyrin als Bindungsregion von ena/VASP charakterisiert wurde (Giesemann et al., 2003). Daher wurden Koimmunpräzipitationen mit GFP-Gephyrin transfizierten HEK293T-Zellextrakten durchgeführt, um die Bindung biochemisch zu bestätigen und genauer zu analysieren. Die Zellen wurden sowohl mit GFP-Gephyrin als auch mit der bereits zuvor beschriebenen Deletionsmutante ($\Delta 181-243$) transfiziert und nach 24 h bis 48 h lysiert. Zur Immunpräzipitation wurden Antikörper aus unterschiedlichen Spezies eingesetzt, die entweder gegen Gephyrin, den GFP-tag, ena/VASP oder Aktin gerichtet waren (2.1.8). Die Präzipitationen mit ena/VASP-Antikörper hatten eine Anreicherung, sowohl von GFP-Gephyrin als auch von der Deletionsmutante GFP-Gephyrin $\Delta 181-243$ zur Folge (Abb.15 A). Der Anteil an präzipitiertem GFP-Gephyrin $\Delta 181-243$ war im Vergleich zu GFP-Gephyrin signifikant reduziert (Abb.15 A). Beide Gephyrin-Konstrukte waren ebenfalls in der Lage, ena/VASP zu präzipitieren, allerdings konnte hier keine Reduktion des ena/VASP-Anteils für die Deletionsmutante festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Präzipitation durch Gephyrin-spezifische Antikörper ergab sowohl für das Wildtyp-Konstrukt als auch für die Deletionsmutante einen vergleichbaren Anteil an kopräzipitiertem Aktin. Diese Ergebnisse konnte mittels Aktin-spezifischer Antikörper bestätigt werden. Die Menge an angereichertem Gephyrin fiel für Mutante und Wildtyp vergleichbar aus (Daten nicht gezeigt). Um die Bindungsstelle von ena/VASP an Gephyrin näher eingrenzen zu können, wurden GST-Fusionsproteine der N-terminalen (1-181) und C-terminalen (316-736) Abschnitte von Gephyrin, der Linkerregion (169-323) und von Gephyrin-Wildtyp hergestellt und mit bakteriell-exprimiertem und aufgereinigtem His-VASP inkubiert. Nur GST-Gephyrin und das GST-Linker (169-323) Fusionsprotein waren in der Lage rekombinantes His-VASP zu binden (Abb.15 B). Das Bindungsepitop für ena/VASP liegt somit eindeutig im Poly-Prolin-reichen Abschnitt der Linkerregion und nicht wie von Giesemann et al. (2003) angegeben in der C-terminalen Domäne.

Frühere Studien belegen eine Interaktion von Mena, dem neuronalen ena/VASP Homolog, mit Gephyrin in Immunpräzipitationen aus Hirnlysaten (Giesemann et al., 2003). Um diese Interaktion zu bestätigen, wurden GST-Fusionsproteine mit Lysaten aus adultem Rattenhirn inkubiert und anschließend im Western Blot auf ihre Mena- und Gephyrin-Anreicherung untersucht. Da die Glyzin-Rezeptor β -Untereinheit mit hoher Affinität an Gephyrin bindet (Meyer et al., 1995), wurde ein GST-Fusionsprotein der β -Untereinheit für die Untersuchungen eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde aufgereinigtes GST verwendet. Neben der zu erwartenden Gephyrin-Bande (Abb.15 D)

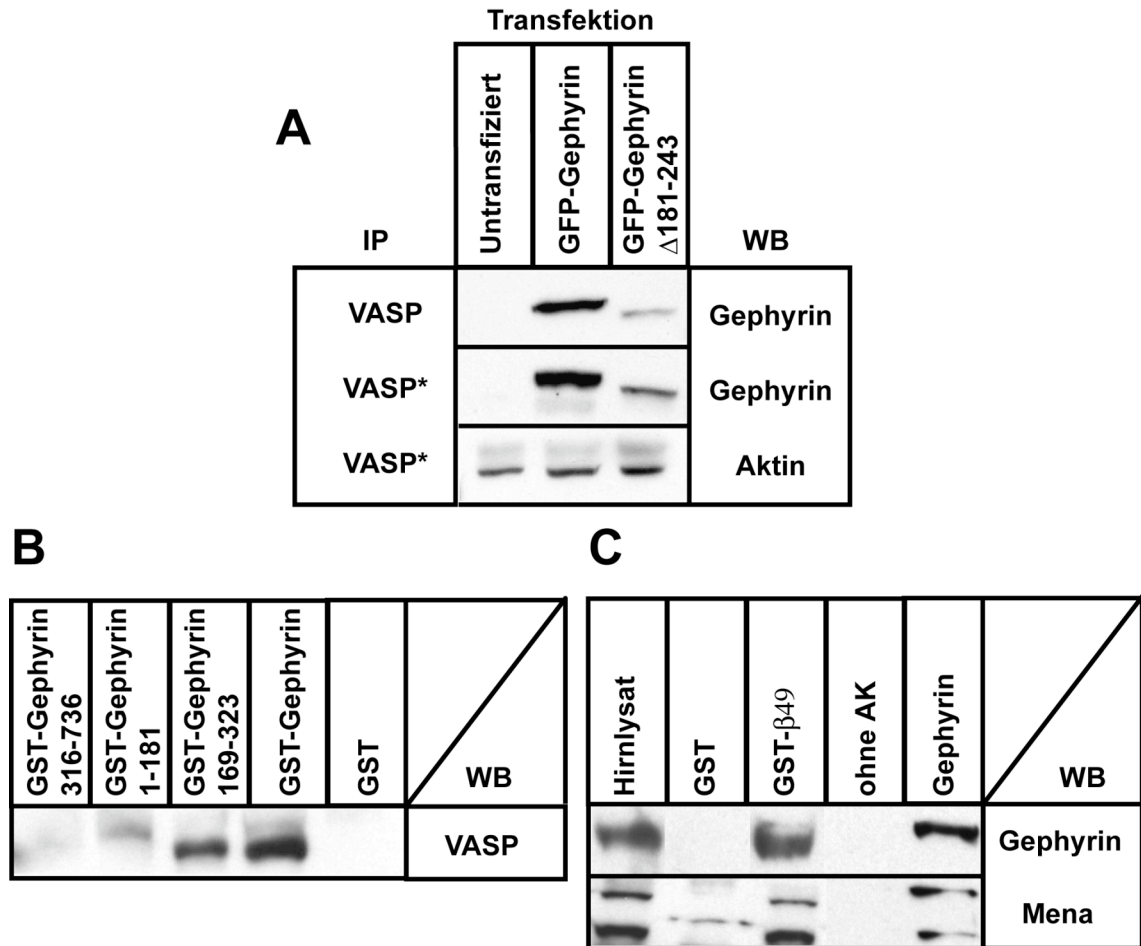


Abbildung 15: *ena/VASP* interagiert mit Gephyrin und Aktin unter anderem über die Aminosäuren 181-243. A) HEK 293T Zellen wurden transfiziert mit GFP-Gephyrin oder GFP-Gephyrin-Δ181-243 für 24h, lysiert und mittels Immunpräzipitation (IP) und Western Blot (WB) analysiert. (A) Präzipitationen mit VASP-spezifischen Antikörper ergaben eine Kopräzipitation von GFP-Gephyrin und GFP-Gephyrin Δ181-243. Es war eine deutliche Reduktion in der Anreicherung der Deletionsmutante zu verzeichnen (B) GST-Fusionsproteine des N-terminalen (1-181) und C-terminalen (316-736) Abschnitts von Gephyrin, der Linkerregion (169-323) und Gephyrin-Wildtyp wurden mit His-VASP inkubiert. Nur Gephyrin-Wildtyp und die Linkerregion waren in der Lage, VASP zu binden. (C) Aufreinigung von Gephyrin aus Hirnextrakten durch Bindung an ein GST-Fusionsprotein des intrazellulären Abschnittes der Glyzin-Rezeptor β-Untereinheit hatte ebenfalls die Anreicherung von Mena zur Folge. Auch Gephyrin-spezifische Antikörper kopräzipitierten Mena.

war es möglich, zwei der drei bekannten Mena Banden von 140kDa und 88kDa (Giesemann et al., 2003) im Hirnllysate nach dem GST-Pulldown nachzuweisen (Abb.15 D). Die Negativkontrolle zeigte keine Gephyrin- oder Mena-Bande und bestätigte damit die Spezifität der Bindung. Die Immunpräzipitation aus den gleichen Hirnllysaten mit einem gegen Gephyrin gerichteten Antikörper hatte ebenfalls eine Anreicherung von Mena zur Folge (Abb.15 C). Somit konnten die Interaktion von Gephyrin mit *ena/VASP*

im eukaryontischen Modellsystem, und die Kollokalisierung von Gephyrin mit Mena an inhibitorischen Synapsen eindeutig belegt werden.

3.1.7.4 Ena/VASP agiert als Adapter zwischen Gephyrin und dem Aktin-Zytoskelett

In den bisherigen Untersuchungen zur Interaktion von Gephyrin mit ena/VASP und dem Aktin-Zytoskelett wurden transfizierte HEK293T-Zellen oder deren Lysate eingesetzt. HEK293T-Zellen enthalten jedoch eine große Anzahl weiterer endogener F-Aktin oder G-Aktin-bindender Proteine, welche neben ena/VASP als potentielle Linker zwischen Gephyrin und Aktin in Frage kommen. Um die Interaktion von Gephyrin, ena/VASP und Aktin erneut in einem zellfreien System zu überprüfen, wurde aufgereinigtes G-Aktin unter polymerisierenden (Zugabe von ATP) oder nicht-polymerisierenden Bedingungen (ohne ATP) mit aufgereinigtem His-Gephyrin und GST-ena/VASP nach Herstellerangaben inkubiert, abzentrifugiert (2.2.2.10) und die einzelnen Pellet- und Überstandfraktionen anschließend analysiert. Die Inkubationen, in denen kein F-Aktin zugegeben wurde, zeigten keine Anreicherung von Gephyrin oder ena/VASP im Pellet, unabhängig davon, ob Gephyrin einzeln oder aber in Kombination mit ena/VASP im Ansatz vorlag (Abb.16 Reihe 1,2,3). Beide Proteine konnten weiterhin im Überstand nachgewiesen werden. Die Bindung von ena/VASP an Gephyrin reicht offensichtlich nicht aus, um die Proteine zu präzipitieren. Auch die Inkubation von Gephyrin mit F-Aktin (mit ATP) oder G-Aktin (ohne ATP) führte zu keiner Gephyrin-Präzipitation (Abb.16 Reihe 6,7). Das Protein konnte weiterhin mit G-Aktin im Überstand nachgewiesen werden, während F-Aktin im Pellet detektiert wurde. Dabei handelt es sich um eine erneute Bestätigung, dass keine direkte Bindung zwischen Gephyrin und F-Aktin erfolgt, und dass zur Vernetzung der Proteine ein Linkerprotein benötigt wird. Ausschließlich die Prä-Inkubation von Gephyrin mit ena/VASP hatte eine signifikante Kopräzipitation der beiden Proteine mit polymerisiertem F-Aktin zur Folge (Abb.16 Reihe 4). Sowohl Gephyrin als auch ena/VASP konnten in der Pelletfraktion nachgewiesen werden, was eine Bindung an F-Aktin bestätigt. Ein geringer Anteil von Gephyrin wurde zusätzlich unter nicht polymerisierten Bedingungen im Pellet nachgewiesen (Abb.16 Reihe 5). Normalerweise sollte ohne ATP keine Transition von G-Aktin zu F-Aktin erfolgen. Das aufgereinigte G-Aktin könnte jedoch einen geringen

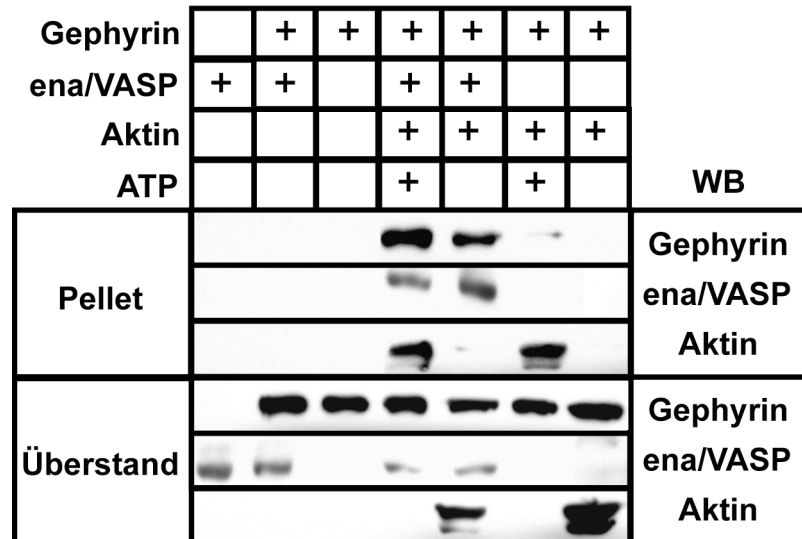


Abbildung 16: ena/VASP agiert als Linker zwischen Gephyrin und F-Aktin. Aufgereinigtes G-Aktin wurde mit GST-ena/VASP und/oder His6-Gephyrin mit/ohne ATP für 30 min inkubiert, zentrifugiert und Präzipitat und Überstand auf Gephyrin-, ena/VASP- und Aktin mittels Western-Blot (WB) analysiert. Es konnte keine Präzipitation von Gephyrin (Spur 3), ena/VASP (Spur 1) oder beiden Proteinen zusammen (Spur 2) nachgewiesen werden. Eine Kosedimentation von Gephyrin erfolgte nur in den Ansätzen, die neben ena/VASP auch F-Aktin enthielten (Spur 4). Ohne ena/VASP konnte Gephyrin nicht im F-Aktin-Pellet angereichert werden (Spur 6). Eine schwache Gephyrin-Bande war ebenfalls im Präzipitat des G-Aktin-Ansatzes nachweisbar (Spur 5).

Anteil an F-Aktin-Kontamination enthalten haben, welcher für die Vernetzung und somit für die Sedimentierung von Gephyrin ausreichend war. Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass ena/VASP als Linkerprotein die Interaktion von Gephyrin mit F-Aktin vermittelt und dass diese Bindung ausreicht um Gephyrin an das Aktin-Zytoskelett zu rekrutieren und zu binden.

3.1.7.5 Mena ist an inhibitorischen Synapsen lokalisiert und wird in Alkaloid-induzierten F-Aktin-Patches rekrutiert

Giesemann et al. (2003) konnten bereits nachweisen, dass Mena in kultivierten Neuronen partiell mit Gephyrin kolokalisiert. Um zu analysieren, ob sich diese Gephyrin/Mena-positiven Kontakte an inhibitorischen Synapsen befinden, wurden Primärkulturen hippokampaler Neuronen (Fuhrmann et al., 2002) für 3, 6 oder 10 DIV kultiviert, um die Ausbildung von funktionellen Synapsen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu ermöglichen. Als exemplarisches Beispiel für die nachfolgenden Untersuchungen wurden Kulturen des Entwicklungsstadiums 6 DIV

Behandlung nicht betroffen (Abb.17 B, B1). Mena ist somit an inhibitorischen Synapsen lokalisiert und wird in Alkaloid-induzierte F-Aktin-Patches rekrutiert.

3.1.7.6 Die Abhängigkeit synaptisch-lokalisierter Gephyrinclustern vom Aktin-Zytoskelett nimmt mit steigender neuronaler Differenzierung ab.

Es ist für Mena seit längerem bekannt, dass es bei dynamischen Veränderungen von F-Aktin-haltigen Strukturen eine wichtige Rolle spielt. Solche dynamischen Veränderungen erfolgen hauptsächlich in frühen Stadien der Primärkultur. Wenn Mena in Neuronen als Adapterprotein zwischen Gephyrin und dem Aktin-Zytoskelett fungiert, wäre zu erwarten, dass Cytochalasin D-Inkubationen der hippocampalen Primärkulturen einen stärkeren Effekt auf die Anzahl und Verteilung der Gephyrincluster in jüngeren Stadien aufweisen im Vergleich zu differenzierten Kulturen (Kirsch und Betz, 1995; Allison et al., 2000). Zu diesem Zweck wurden hippocampale Primärkulturen der Differenzierungsstadien 3 DIV, 6 DIV und 10 DIV für 1h, 6h, und 3 Tage mit Cytochalasin D inkubiert und die Anzahl und Größe der Gephyrincluster pro 50 μ M Dendritenlänge statistisch ermittelt. Die Alkaloid-Behandlung hatte abhängig vom jeweiligen Differenzierungsstadium der Kulturen unterschiedliche Effekte (Abb.18 A-D). 6 DIV alte Neuronen zeigten bei ansteigender Cytochalasin D-Konzentration etwa 33% Reduktion in der Anzahl der Gephyrincluster pro 50 μ M Dendrit (Abb.18 C grauer Balken), während in differenzierten Kulturen (10 DIV) bei gleicher Behandlung keine Abnahme der Gephyrincluster-Anzahl festgestellt werden konnte (Abb.18 D grauer Balken). Für die Anzahl und Verteilung der VIAAT-positiven präsynaptischen Kontakte konnte in allen untersuchten Entwicklungsstadien nur geringen Einfluss festgestellt werden (Abb.18 A, A1, B, B2).

Die Variationen in der Größe einzelnen Gephyrincluster könnte Unterschiede in ihrer synaptischen Apposition widerspiegeln, wobei größere Gephyrincluster synaptisch und kleiner Cluster eher extrasynaptisch lokalisiert sind (Allison et al., 2000). Daher wurden die Cytochalasin D behandelten Neuronen zusätzlich nach den Größenunterschieden in den verbleibenden Gephyrincluster quantifiziert (groß $>1\mu$ M; klein $>0,5\mu$ M.). Die statistische Analyse ergab, dass die Anzahl kleinerer Gephyrincluster in den 6 DIV alten Neuronen um bis zu 75% durch die Behandlung reduziert wurde (Abb.18 C schwarzer Balken), während die Zahl der größeren Cluster schwächer betroffen war (Abb.18 C weißer Balken). In 10 DIV alten Kulturen dagegen

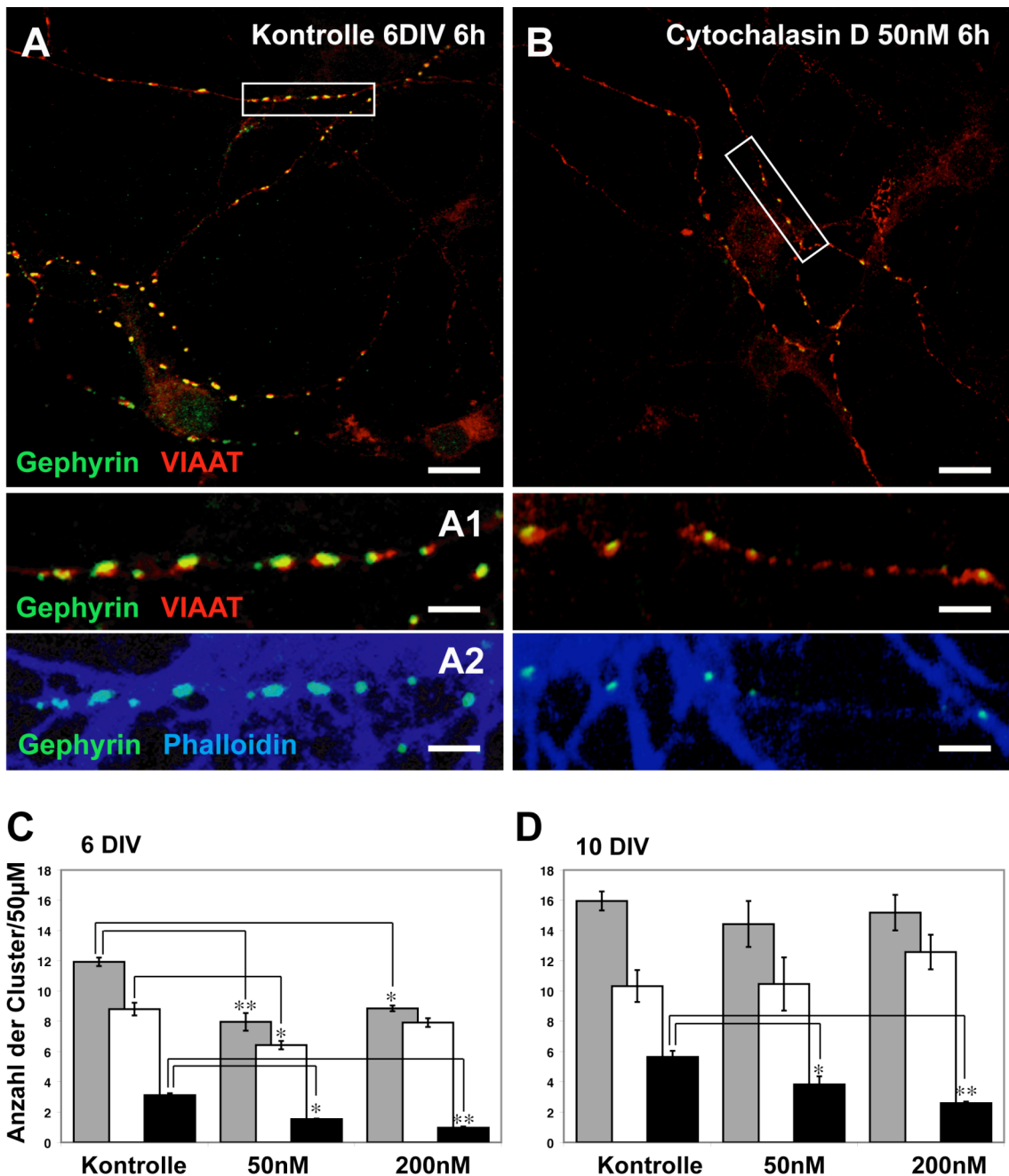


Abbildung 18: Die Abhängigkeit synaptisch-lokalisierter Gephyrinclustern vom Aktin-Zytoskelett nimmt mit steigender neuronaler Differenzierung ab. Hippokampale Neuronen (6DIV und 10DIV) wurden für 6h mit DMSO (A) oder 50 nM Cytochalasin D (B) behandelt. Nach der Fixierung erfolgte eine Anfärbung von Gephyrin, VIAAT und des Aktin-Zytoskeletts mittels Alexa-633 Phalloidin (A, A1) Die Gephyrin-und VIAAT-Färbung (B, B1) deutliche Größenreduktion der synaptischen Gephyrincluster (C, D) Kontrolle und Behandlung wurden statistisch ausgewertet. Jeweils (5 Aufnahmen (63x) pro Toxinkonzentration)/pro Experiment. In jedem Bild wurden die Dendriten (ca.10-15) der Neuronen vermessen (μM -Länge) und die Anzahl und Größe der Gephyrin-cluster ermittelt C+D) Gesamt (grauer Balken) Große ($>1 \mu\text{M}$) Cluster (weiser Balken) und kleine ($\sim 0.5 \mu\text{M}$) Cluster (schwarzer Balken). Die Werte wurden auf die Anzahl der Cluster pro $50 \mu\text{M}$ Dendritenlänge umgerechnet (Mittelwert \pm SEM).

3. Ergebnisse

war keine signifikante Veränderung in der Zahl der großen Gephyrincluster nach der Behandlung mit 50 nM oder 200 nM Cytochalasin D zu verzeichnen (Abb.18 D weißer Balken). Allerdings war auch hier eine Reduktion der kleineren Kontakte zu beobachten (Abb.18 D schwarzer Balken). Die Ergebnisse stimmen mit vorherigen Untersuchungen zur Anzahl und Verteilung von Gephyrincluster in frühen Stadien der synaptischen Entwicklung überein.

4. Diskussion

Intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden sind von fundamentaler Bedeutung für Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse von Zellen. Der Einfluss von Signalkaskaden auf die Lokalisation und Funktionalität von GABA_A- oder Glyzin-Rezeptoren wurde bereits intensiv untersucht, doch für Rezeptor-assoziierte Proteine wie Gephyrin existieren nur wenige relevante Daten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch pharmakologische Beeinflussung von Schlüsselenzymen jene Signalwege zu identifizieren, welche am Transport von Gephyrin an die Synapse, der Stabilisierung des Proteins im postsynaptischen Netzwerk oder an seiner Degradierung beteiligt sind. Die Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden:

4.1 Signalkaskaden ohne Effekt auf die Gephyrincluster-Verteilung

Die Aktivierung oder Inhibition der ersten Gruppe von Signalkaskaden hatte keinen Effekt auf die Anzahl und Lokalisation der Gephyrincluster in hippokampalen Primärkulturen. Die Ergebnisse sind nachfolgend für die einzelnen Signalkaskaden separat diskutiert. Meine Befunde lassen vermuten, dass diese Signalwege in hippokampalen Neuronen entweder während der analysierten Entwicklungsstadien nicht an der Regulation der synaptischen Gephyrincluster beteiligt sind, oder aber generell keinen Einfluss auf die Lokalisation oder Stabilisierung von Gephyrin an der inhibitorischen Synapse ausüben.

4.1.1. cAMP/PKA-Signalkaskaden

Vorherige Untersuchungen zur cAMP/PKA-abhängigen Regulation des GABA_A-Rezeptors ergaben, dass eine Phosphorylierung der β -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors durch Proteinkinase A (PKA) einen Anstieg oder Reduktion der GABA_A-Rezeptoraktivität zur Folge hat. Der Effekt ist abhängig von der jeweiligen Position der Phosphorylierung (McDonald et al., 1998). Da es sich um eine rein funktionelle Modifikation des Rezeptors handelt und keine Änderung der Oberflächendichte bewirkt

wird, ist eine Regulation von verankernden Proteinen wie Gephyrin über cAMP/PKA-Signale offensichtlich nicht notwendig.

4.1.2 IP₃/PKC-Kinase Signalweg

Die PKC-vermittelte Phosphorylierung von GABA_A-Rezeptor β -Untereinheiten spielt eine entscheidende Rolle nicht nur bei der Regulation der Rezeptoraktivität (Moss et al. 1992; Machu et al. 1993; Krishek et al. 1994; Brandon et al., 2000; Wang et al. 2003), sondern auch bei der postsynaptischen Verankerung der Rezeptoren (Meier et al. 2003). Die PKC-Aktivierung führte zu einer signifikanten Reduktion der Oberflächendichte des GABA_A-Rezeptors (Connolly et al., 1999; Song et al., 2005). Die Inhibition der PKC durch Calphostin C ergab in den vorliegenden Untersuchungen jedoch keinen Effekt auf die Gephyrincluster-Verteilung. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Reduktion in der GABA_A-Rezeptordichte in hippocampalen Neuronen nicht über einen Abbau der postsynaptischen Matrix, sondern über eine Änderung der Rezeptor-Recyclingraten erfolgt. Weitere Untersuchungen der γ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors in Rückenmarkkulturen belegen ein potientielles PKC-Phosphorylierungsmotiv im zytoplasmatischen Abschnitt zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4 in einzelnen Spleissvarianten der Untereinheit. Die PKC-Aktivierung erhöhte den Anteil an synaptisch-lokalisierter γ -Untereinheit und die Kolokalisation mit Gephyrin (Meier und Grantyn, 2004). Geht man somit von der Hypothese aus, dass die Phosphorylierung bestimmter Spleissvarianten der γ -Untereinheit durch PKC für die korrekte synaptische Lokalisation des Rezeptors verantwortlich ist, so wäre bei einer Inhibition der Kinase zwar eine Reduktion der GABA_A-Rezeptor-Oberflächendichte zu erwarten; der Effekt wäre aber Gephyrin-unabhängig und sollte keine Änderung in der Clusterverteilung zur Folge haben. Meine Ergebnisse bestätigen diese Hypothese.

4.1.3 Kalzium-abhängige Signalkaskaden

Die Behandlung der Kulturen mit Tetrodotoxin (TTX), einem Nervengift, das spannungsaktivierte Natrium-Kanäle in Neuronen blockiert und somit die Auslösung von Aktionspotentialen verhindert, hatte keine Änderung der Gephyrincluster-Verteilung zur Folge. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen an

hippokampalen Neuronen, bei denen TTX-Inkubation keine Auswirkung auf PSD-95, GluR1 oder Gephyrin ergab (Harms und Craig, 2005). In embryonalen Rückenmarkkulturen verhinderte die Blockierung des extrazellulären Ca^{2+} -Kalziumeinstroms durch die Inkubation mit TTX nicht nur die postsynaptische Konzentration der Glyzin-Rezeptoren (Kirsch und Betz, 1998; Levi et al., 1998) sondern ebenfalls die korrekte Lokalisation von Gephyrin. Dieser Gegensatz könnte möglicherweise auf unterschiedliche Spleissvarianten von Gephyrin zurückzuführen sein (Lüscher und Keller, 2004). Im Vergleich zu Rückenmarkskulturen scheint in hippocampalen Primärkulturen somit der Ca^{2+} -Einstrom nicht das primäre Signal für die Ausbildung der inhibitorischen Synapse und die Konzentration der GABA_A -Rezeptoren zu sein. Es könnte jedoch durchaus regulatorische Funktionen für die Unterscheidung zwischen funktionellen und nicht-funktionellen Kontakten haben.

Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration aus intrazellulären Speichern durch Stimulation der Zellen mit Thapsigargin führte zu einer selektiven Reduktion der somatischen Gephyrincluster ohne sichtbaren Effekt auf die dendritische Gephyrin-Verteilung. Die selektive Reduktion von somatischen Cluster könnte auf eine verstärkte Proteindegradation nach der lokalen Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels hindeuten. Eine weitere Erklärung wäre eine Verringerung in der Proteinsynthese durch den Ca^{2+} -Anstieg bei gleich bleibender Degradation der Gephyrincluster. In beiden Fällen wären Kontakte in der Nähe des Somas primär betroffen, während weiter entfernte dendritische Cluster später beeinflusst würden.

4.1.4 TrK-Rezeptor-Signalkaskaden

Interessanterweise hatten auch die Inkubationen mit den Neurotrophen BDNF oder NT-3 keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl oder die Verteilung der postsynaptischen Gephyrincluster. Untersuchungen zur Wirkung von BDNF auf die GABA_A -Rezeptordichte hätten einen Anstieg in der Anzahl der postsynaptischen Gephyrincluster erwarten lassen. Die spezifische Aktivierung von Tyrosin-Kinasegekoppelten Rezeptoren (TrK) moduliert die GABA_A -Oberflächendichte (Tanaka et al., 1997; Brunig et al., 2001; Rico et al., 2002). Die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich. BDNF-Behandlung ergab sowohl einem Anstieg in der Rezeptordichte, der Aktivität und der postsynaptischen Lokalisation des GABA_A -Rezeptors (Elmariah et al., 2004; Jovanovic et al., 2004), als auch eine Reduktion in der

Oberflächenexpression und Aktivität des Rezeptors (Brunig et al., 2001). Applikation von NT-3 hatte vergleichbar den vorliegenden Ergebnissen keinen Effekt auf die GABA_A-Rezeptorverteilung. Die Inhibition des TrK-Signalwegs führte zu einer Abnahme in der Anzahl und der postsynaptischen Lokalisation des Rezeptors (Elmariah et al., 2004). BDNF-Applikation hatte in den vorliegenden Untersuchungen keinen Einfluss auf die Lokalisation oder Anzahl der neuronalen Gephyrincluster. Dies könnte möglicherweise durch das endogen im Kulturmedium enthaltene BDNF erklärt werden. Sollte die endogene BDNF-Konzentration bereits zu einer vollständigen Rezeptor-Sättigung geführt haben, so würde eine erneute Zugabe von BDNF keinen signifikanten Effekt verursachen.

4.2 Signalkaskaden, die an der Stabilisierung postsynaptischer Gephyrincluster beteiligt sind

Eine Beeinflussung der zweiten Gruppe von Signalkaskaden hatte eine deutliche Änderung in der Lokalisation und Anzahl der Gephyrincluster zur Folge. Offensichtlich sind einzelne Signalkaskaden spezifisch an der Lokalisation und Stabilisierung von Gephyrin in der postsynaptischen Membran inhibitorischer Synapsen beteiligt, wobei besonders der Phosphorylierungsgrad von Gephyrin entscheidend für die Stabilisierung der postsynaptischen Cluster zu sein scheint.

4.2.1 MAP-Kinase-Signalweg

Inhibition der MAP-Kinase-Kinase (MEK1/2) führte zu einer deutlichen Reduktion der Gephyrincluster, bis zum vollständigen Verlust jeglicher Gephyrin-Immunreaktivität. MEK1/2 agieren in der Signalkette unterhalb des Tyrosin-Kinase Rezeptors. Der Verlust der synaptischen Gephyrincluster deutet auf eine Beteiligung der MAPK-Signalkaskade an der Stabilisierung der postsynaptischen Kontakte hin und bestätigt bereits publizierte Effekte von U0126 auf die Oberflächendichte von GABA_A-Rezeptoren. Die Aktivierung der TrK-Signalkaskade durch Applikation von Insulin hatte zunächst einen Anstieg der GABA_A-Rezeptordichte zur Folge (Wan et al., 1997; Wang et al., 2003b). Der Anstieg konnte durch Applikation von UO126 selektiv blockiert werden, nicht jedoch durch PI3-Kinase-Inhibitoren wie Wortmannin oder Ly294002 (O'Malley et al., 2003). Bulleit et al. (2000) konnten nachweisen, dass nach

UO126-Inkubation auch die durch BDNF-induzierte Insertion einzelner GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten in die Plasmamembran blockiert wurde.

In den vorliegenden Ergebnissen konnte somit nachgewiesen werden, eine Inhibition der MAPK-Kaskade durch UO126 nicht nur die GABA_A-Rezeptordichte verringert, sondern ebenfalls die Anzahl der postsynaptischen Gephyrincluster reduziert.

4.2.2 Protein Phosphatasen 1 und 2A

Die Inhibition von PP1 und PP2A hatte einen signifikanten Anstieg der zytoplasmatischen Gephyrinfärbung und eine deutliche Reduktion in der Anzahl der Gephyrincluster zur Folge (3.1.6.2 Abb.6). Der Effekt ist spezifisch für PP1 und PP2A; PP2B-Inhibitoren verursachten keine Änderung der Gephyrin-Verteilung (3.1.6.1 Abb.6). Die erhöhte diffuse Gephyrin-Immunreaktivität war nicht auf eine Akkumulation von neu-synthetisiertem Protein oder auf die Zerstörung von Mikrofilamentstrukturen zurückzuführen. Die Ergebnisse deuten auf eine Destabilisierung bereits synaptisch-lokalisierter Gephyrincluster hin, die möglicherweise auf eine Hyperphosphorylierung des Proteins zurückzuführen ist.

Bislang ging man davon aus, dass Regulationen an der Synapse nur über eine direkte Phosphorylierung von GABA_A- oder Glyzin-Rezeptor-Untereinheiten erfolgen. Meine Ergebnisse belegen erstmals, dass auch der Phosphorylierungsgrad von verankernden Proteinen für die Regulation synaptischer Kontakte von Bedeutung sein kann. Okadaic acid und Calyculin A binden jeweils an die katalytische Untereinheit der Serin/Threonin Protein-Phosphatasen PP1 und PP2A und inhibieren dadurch die Enzymaktivität (Bialojan und Takai, 1988), wenngleich mit unterschiedlichen IC₅₀-Werten (Schönthal et al., 1998; Chatfield et al., 2004). Auch bei Inkubation der Kulturen mit hohen Konzentrationen der PP1/PP2A-Inhibitoren wurde keine Apoptose in den Primärkulturen induziert. Dieser Befund bestätigt die publizierte anti-apoptotische Effekte von Okadaic acid und Calyculin A (Morana et al., 1991; Chatfield et al., 2004). Interessanterweise ähneln die Destabilisierung der postsynaptischen Gephyrincluster und der Anstieg der zytoplasmatischen Gephyrin-Immunreaktivität im Zellsoma und den Dendriten bereits publizierten Effekten zur Hyperphosphorylierung von Tau oder dem Mikrotubuli-assoziierten Protein 2 (MAP2). Tau und MAP2 werden

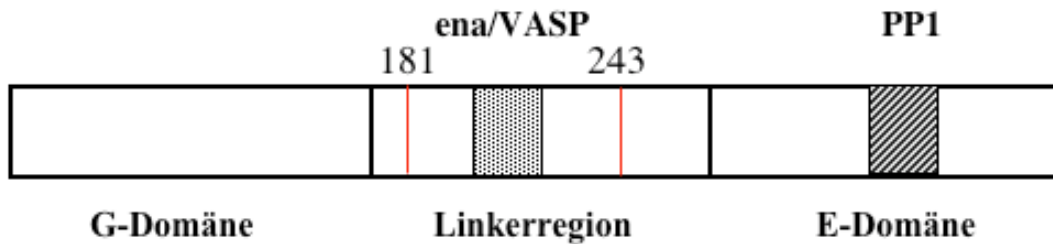


Abbildung 19: Potentielle PP1-Bindungsstelle im C-Terminus von Gephyrin. Gephyrin besteht aus drei unterschiedlichen Sequenzabschnitten: einer N-terminalen G-Domäne, einer Poly-Prolin-reichen Zentralen Domäne (Linkerregion) und einer C-terminalen E-Domäne. Die Linkerregion enthält eine potentielle ena/VASP-Bindungsstelle und der C-Terminus ein potentielles PP1-Motiv.

durch PP2A und teilweise auch PP1 dephosphoryliert (Sanchez et al., 1996). Die Inhibition der Phosphatasen ergab unter anderem eine Redistribution der Proteine aus axonalen oder dendritischen Kompartimenten ins Zellsoma (Arendt et al., 1994). Gephyrin wird ebenfalls an Serin/Threonin Positionen phosphoryliert (Langosch et al., 1992). In der Sequenz des Proteins befinden sich mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen, einige davon jedoch in Strukturbereichen, welche *in vivo* nicht zugänglich sein dürften. Die Linkerregion von Gephyrin dagegen beinhaltet nebeneiner 14 Aminosäuren langen Sequenz, die eine hohe Homologie MAP-2 und Tau aufweist und als Bindungsmotiv für Interaktion mit dem Zytoskelett gehandelt wird, auch spezifische Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen. Hyperphosphorylierungen in diesem Bereich könnten somit die Bindung von Gephyrin vom Zytoskelett lösen und eine Destabilisierung der postsynaptischen Cluster zur Folge haben. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass eine Hyperphosphorylierung des GABA_A-Rezeptors die Interaktion der γ 2-Untereinheit des Rezeptors mit Gephyrin beeinträchtigt und dadurch eine Destabilisierung der postsynaptischen Matrix auslöst. Allerdings hatte die Inhibition von PP1 und PP2A durch Okadaic acid keinen Effekt auf die GABA_A-Rezeptorverteilung (Minier et al., 2000; Palma et al., 2004).

Immunfärbungen an hippokampalen Neuronen konnten eindeutig bestätigen, dass PP1-positive Kontakte sowohl in Kolokalisation mit PSD-95 an exzitatorischen Synapsen als auch in einer kleinen Subpopulation von inhibitorischen, Gephyrin-positiven Synapsen vorliegen (3.1.6.3 Abb.9). Dies bestätigt vorherige Befunde für das PP1-verankernde Protein Spinophilin, das ebenfalls in einer Subpopulation von inhibitorischen Synapsen nachgewiesen wurde (Ouimet et al., 2004). Die Lokalisation

von PP1 in einer Subpopulation von inhibitorischen Synapsen unterstützt die Theorie, dass Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen Zelltyp-spezifisch reguliert wird (Poisbeau et al., 1999; Nusser et al., 1999). Für PP2A wurde sowohl eine Lokalisation an exzitatorischen als auch inhibitorischen Synapsen publiziert, was in den vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden konnte. PP2A assoziiert mit dem C-terminalen Abschnitt der NR3A-Untereinheit des NMDA-Rezeptors und mit der β 3-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Ma et al., 2001; Jovanovic et al., 2004). Die Kopräzipitationsstudien aus transfizierten HEK293T-Extrakten und nativem Hirnextrakt (3.1.6.5 Abb.11) ergaben, dass Gephyrin, PP1 und PP2A nicht nur gemeinsam an inhibitorischen Synapsen vorliegen, sondern eine direkte Interaktion von Gephyrin mit PP1 und PP2A besteht. Dabei handelt es sich um den ersten Nachweis einer direkten Bindung von Gephyrin an Ser/Thr-Phosphatasen. Die Interaktion wird zusätzlich durch Sequenzanalysen von Gephyrin gestützt, welche das Vorhandensein einer potentiellen PP1-Bindungsstelle im C-terminalen Abschnitt des Proteins (Abb. 19) belegen. Obwohl bisher über 300 Serin/Threonin-Kinasen identifiziert wurden, sind weniger als 40 entsprechende Ser/Thr-Phosphatasen bekannt (Sim et al., 2003). Trotz dieser geringen Diversität verfügen sie über ausgereifte Kontrollmechanismen, um ihre Spezifität zu gewährleisten. Spezifische Phosphatasen werden an festgelegten subzellulären Lokalisationen positioniert und die Substratspezifität durch dynamische Anbindung an spezielle regulatorische Partner erreicht. Zur Zeit sind etwa 50 unterschiedliche regulatorische Proteine für PP1 bekannt, die meisten davon weisen entweder ein (RVxF) oder (R/K)X1(V/I)X2(F/W) Bindungsmotiv auf, bei dem X1 abwesend oder jede Aminosäure ohne große hydrophobe Seitenketten sein kann, während X2 X1 entspricht (außer Phosphoserin) (Sim et al., 2003). Dieses Bindungsmotiv scheint aber oftmals von zusätzlichen Sequenzen in der Interaktion verstärkt zu werden. Eine Deletion des entsprechenden Motivs in Gephyrin wird in Kürze abgeschlossen sein. Handelt es sich um eine direkt vermittelte Interaktion zwischen Gephyrin und PP1, so sollte die Bindung in der Deletionsmutante aufgehoben sein.

PP1 liegt als Teil eines Multiproteinkomplexes an der Synapse vor, der aus der Phosphatase, der für die Lokalisation verantwortlichen regulatorischen Untereinheit und dem Substratprotein (Bsp. PKA, NMDA-Rezeptor, GABA_A-Rezeptor) besteht (Sim et al., 2003). Es ist anzunehmen, dass PP1 und/oder PP2A gleichfalls als Teil eines Multiprotein-Komplexes mit Gephyrin in einer Subpopulation von inhibitorischen Synapsen vorliegt. Die direkte Bindung von PP1 und/oder PP2A an Gephyrin könnten der

Regulation des Phosphorylierungsgrades dienen. Eine Hyperphosphorylierung wichtiger Sequenzabschnitten wie z.B. der Linkerregion könnte unter anderem die Assoziation des Proteins mit dem Zytoskelett behindern oder sogar lösen, während eine Dephosphorylierung der Bereiche möglicherweise die Stabilität der Vernetzung erhöht. Da die Degradation des Tubulin-Netzwerks keinen sichtbaren Effekt auf die postsynaptische Lokalisation von Gephyrin und GABA_A-Rezeptoren hat (Allison et al., 2000), scheint eher das Aktin-Zytoskelett eine wichtige Rolle in der Stabilisierung synaptischer Gephyrincluster auszuüben.

4.3 Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die Stabilisierung postsynaptischer Gephyrincluster

Die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts durch die Alkaloide Cytochalasin D und Jasplakinolide hatte die Destabilisierung der großen GFP-Gephyrin-Aggregate und die Induktion von Gephyrin-Mikroaggregaten zur Folge. Die Mikroaggregate entstanden durch Destabilisierung der großen Gephyrin-Aggregate und kolokalisierten mit Alkaloid-induzierten F-Aktin-Patches. Die Applikation von Latrunkulin dagegen hatte keinen Effekt und bestätigt frühere Befunde aus hippokampalen Primärkulturen (Allison et al., 2000). Die gegensätzlichen Effekte sind wahrscheinlich auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen der Alkaloide zurückzuführen. Cytochalasine sind Pilzmetabolite von geringem Molekulargewicht, die spezifisch mit Aktin interagieren und eine Reihe von unterschiedlichen Effekten zur Folge haben. Im Fall niedriger Konzentrationen (~2nM) wird die Anlagerung von monomeren G-Aktin Einheiten durch das Anbinden der Cytochalasine am Schwanz-(Plus-) Ende von F-Aktin verhindert (Bonder und Moosker, 1986; Cooper, 1987; Bear et al., 2002). Höhere Konzentrationen dagegen depolymerisieren F-Aktin und erzeugen für Cytochalasin D und Jasplakinolide stark angereicherte F-Aktin-Patches (Bear et al., 2002). Da die Dissoziation in Mikroaggregate erst bei den Konzentrationen der Alkaloide auftrat, welche ebenfalls zur Induktion der F-Aktin-Patches führte, kann man davon ausgehen, dass die entstehenden F-Aktin-Patches die Umverteilung von Gephyrin initiieren. Die Ergebnisse belegen, dass eine Interaktion von Gephyrin mit dem Aktin-Zytoskelett für die Stabilisierung der Gephyrincluster in HEK293T-Zellen von entscheidender Bedeutung ist.

Da in diesen Experimenten keine direkte Bindung von Gephyrin an F-Aktin nachgewiesen werden konnte (3.1.7.4 Abb.15), erfolgt die Assoziation wahrscheinlich

über ein Adapterprotein. Als Vermittler zwischen Gephyrin und dem Aktin-Zytoskelett könnten unter anderem Mitglieder der ena/VASP Familie fungieren (Bear et al., 2002). Diese Vermutung konnte mittels der durchgeführten biochemischen Analysen bestätigt werden (3.1.7.3 Abb.14). Sie belegen die Bindung von ena/VASP an Gephyrin im Bereich der Linkerregion (Abb. 19) und nicht wie von Giesemann et al. (2003) angegeben in der C-terminalen Domäne. Ihre Proteinsequenz enthält eine Abfolge von vier aufeinander folgenden Prolinen (188-192) und korrespondiert somit mit der aktuell publizierten Kernsequenz des ena/VASP Konsensusmotivs (D/EFPPPPXD/E) (Bear et al., 2002). Dieser Abschnitt der ena/VASP Sequenz vermittelt die Adapterbindung an polymerisiertes Aktin. Allerdings können zusätzliche G-Aktin und/oder ena/VASP Bindungsstellen in Gephyrin nicht ausgeschlossen werden (Giesemann et al., 2003). Zur Interaktion könnten außerdem andere Aktin- oder Gephyrin-bindende Proteine wie Profilin (Mammoto et al., 1998; Giesemann et al., 2003; Neuhoff et al., 2005) beitragen.

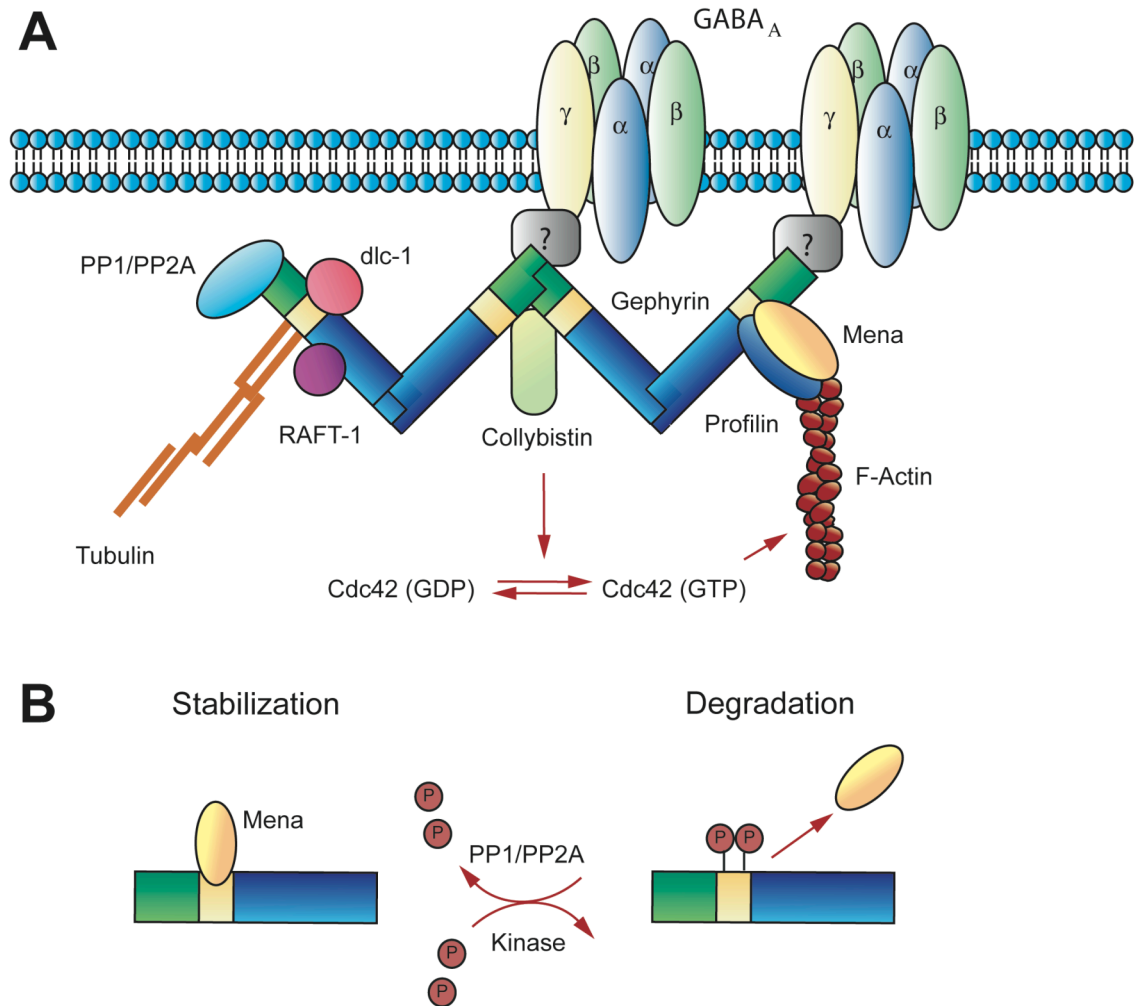
Die Rolle der ena/VASP Familie an inhibitorischen Synapsen ist nicht aufgeklärt. Das neuronale ena/VASP-Homolog Mena kolokalisiert mit Gephyrin-positiven synaptischen Kontakten in hippokampalen Primärkulturen (vorliegende Arbeit; Giesemann et al., 2003). Nach Alkaloidbehandlung konnte eine Rekrutierung von Mena aus der synaptischen Lokalisation in F-Aktin-Patches nachgewiesen werden. Interessanterweise war für junge Differenzierungsstadien (6 DIV) ebenfalls eine Reduktion in der Anzahl und Größe der endogenen postsynaptischen Gephyrincluster zu verzeichnen. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen an Rückenmarkkulturen, in denen nach Alkaloidbehandlungen ähnliche Auswirkungen auf die Organisation der postsynaptischen Gephyrincluster beobachtet wurden (Kirsch und Betz, 1995). Welcher Mechanismus dem Alkaloid-induzierten Verlust der Gephyrincluster in jungen Kulturen zugrunde liegt, ist jedoch nicht bekannt. Die Alkaloid-Behandlungen der differenzierteren Kulturen (10-14DIV) dagegen hatte keine signifikante Auswirkung auf die Größe oder Anzahl der Gephyrincluster. Dies stimmt mit bisherigen Befunden überein, in denen postsynaptische Gephyrincluster (ebenso wie Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren) in differenzierten Kulturen von einer Alkaloid-induzierten Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts nicht beeinflusst werden (Kirsch and Betz, 1995; Allison et al., 2000). In hippokampalen Primärkulturen war eindeutig eine stärkere Sensitivität der frühen postsynaptischen Gephyrincluster in undifferenzierten Stadien zu verzeichnen. Dies könnte auf einen regulatorischen Einfluss des Aktin-Zytoskeletts bei der Initiierung

von inhibitorischen Synapsen deuten. Die Mena-vermittelte Interaktion zwischen Gephyrin und F-Aktin könnte dazu beitragen, in hippocampalen Neuronen frühe inhibitorische postsynaptische Kontakte zu stabilisieren. Eine Zerstörung der Mikrofilamentstrukturen würde so zur Dissoziation von Mena und Gephyrin führen und somit zur Aufhebung der Mikrofilament-Stabilisierung der Cluster. Die daraus resultierende Destabilisierung des postsynaptischen Netzwerkes sollte eine Reduktion in der Größe der synaptisch-lokalisierten Gephyrincluster zur Folge haben, welche möglicherweise auf eine erhöhte Degradation von Gephyrin zurückzuführen ist. Eine mögliche Erklärung, warum Gephyrin im Gegensatz zu Mena nicht in die F-Aktin-Patches rekrutiert wird, könnte in einer „Maskierung“ der Bindungsstelle in der Linkerregion an der Synapse liegen.

4.4 Model

Berücksichtigt man die im Zuge der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten und frühere Veröffentlichungen, so ergibt sich eine neue Hypothese für die Art der Interaktion von Gephyrin mit dem Aktin-Zytoskelett (Model 1A):

1) Die Positionierung von Gephyrin an inhibitorischen Kontakten scheint von einem intakten Mikrofilamentsystem abhängig zu sein. Gephyrin könnte dabei transient über Bindung an Mena mit dem schnell wachsenden Plus-Ende von F-Aktin interagieren und auf diesem Weg an GABA_A-Rezeptor positiven Membrandomänen abgelegt werden. Ein derartiger Prozess könnte durch Interaktion mit Profilin (Mammoto et al., 1998; Neuhoff et al., 2005) oder anderen Aktin-bindenden und Gephyrin-assoziierten Proteinen wie Collybistin (Kins et al., 2000; Harvey et al., 2004) unterstützt werden. Da aber das GFP-Gephyrin-d181-243 Deletionskonstrukt ebenfalls korrekt zu inhibitorischen Kontakten transportiert wird (Fuhrmann et al., 2002), existiert offensichtlich ein weiterer unabhängiger Mechanismus für eine Aktin-abhängige Rekrutierung zur postsynaptischen Membran. Ob es sich um einen Transport von an membranständige Rezeptoren gebundene Gephyrinclustern handelt, ist nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise auf einen aktiven Transport von wahrscheinlich Vesikel-assoziierten Gephyrinclustern in Dendriten (Hanus et al., 2004).



Model 1: Regulation von Gephyrin in der postsynaptischen Plasmamembran **A)** Gephyrin bindet direkt an Tubulin und dlc1. Die Bindung von Gephyrin an RAFT1 spielt wahrscheinlich bei der Kontrolle der lokalen Proteinsynthese an der Synapse eine Rolle. Die Aktin-regulierenden Proteine ena/VASP, Profilin und Collybistin ermöglichen eine lokale Regulation des Aktin-Zytoskeletts an der Synapse. Assoziation von PP1 und/oder PP2A ermöglicht die Regulation des Phosphorylierungsstatus von Gephyrin. **B)** Mena agiert als Adapter zwischen Gephyrin und dem Aktin-Zytoskelett. Die Bindung erfolgt im Poly-Proline-reichen Abschnitt der Linkerregion. Hyperphosphorylierung der Linkerregion durch eine noch nicht identifizierte Kinase hat die Dissoziation von Mena zur Folge und beeinträchtigt die Verankerung der Gephyrincluster am Zytoskelett. Gezielte Dephosphorylierung durch PP1 oder PP2A ermöglicht die Assoziation von Mena und somit die Stabilisierung der postsynaptischen Cluster.

2) In bereits gebildeten inhibitorischen Kontakten dient die Bindung von Gephyrin an Mena und das Aktin-Zytoskelett der Stabilisierung des postsynaptischen Netzwerkes. Die Assoziation wird möglicherweise durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der Linkerregion reguliert (Model 1B). Da die Bindung von Mena im Bereich der Linkerregion erfolgt, könnte eine Ser/Thr-Hyperphosphorylierung des entsprechenden Abschnitts mit dem dortigen Bindungsepitop für Mena interferieren und

zur Dissoziation des Proteins führen. Dadurch würde die Verankerung der Gephyrincluster am Zytoskelett beeinträchtigt oder gelöst und die Degradation erhöht. Eine Regulation der Bindung von Gephyrin an Mena über den Grad der Phosphorylierung könnte somit dynamische Änderungen des postsynaptischen Netzwerkes vermitteln, welche Voraussetzung für eine konstante synaptische Plastizität sind. Das Aktin-Zytoskelett würde somit eine transiente Rolle für die Ausbildung und Stabilisierung des Gephyrin-Netzwerkes in der frühen Entwicklung von inhibitorischen GABAergen Synapsen ausüben.

5. Zusammenfassung

Neuronen haben für die Informationsübertragung untereinander spezielle Strukturen entwickelt, welche als Synapsen bezeichnet werden. Um eine schnelle und präzise synaptische Signalübertragung zu gewährleisten, ist eine hohe Konzentration von Neurotransmitter-regulierten Ionenkanälen in der postsynaptischen Plasmamembran notwendig. Die spezifische Verankerung der Rezeptoren wird durch intrazelluläre Proteine der Postsynapse vermittelt. Das periphere Membranprotein Gephyrin spielt eine essentielle Rolle in der synaptischen Lokalisation von Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren an inhibitorischen Synapsen. Um das postsynaptische Netzwerk zu stabilisieren, ist eine Interaktion von Gephyrin mit Proteinen der Mikrofilamente und der Mikrotubuli nötig.

In der vorliegenden Arbeit sollte analysiert werden, wie Gephyrin mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert, und ob die Größe und Stabilität neuronaler Gephyrincluster durch das Aktin-Zytoskelett reguliert wird. Dies wurde mittels Expression von GFP-Gephyrin-Konstrukten in HEK293T-Zellen und Aktin-depolymerisierende Alkaloidbehandlung von hippokampalen Primärkulturzellen untersucht. Der Einfluss unterschiedlicher Signalkaskaden auf die Lokalisation und Funktionalität von GABA_A- oder Glyzin-Rezeptoren wurde bereits intensiv untersucht, jedoch für Rezeptor-assoziierte Proteine wie Gephyrin existierten nur wenig relevante Daten. Ein weiteres Ziel war daher, durch pharmakologische Beeinflussung von Schlüsselenzymen in hippokampalen Primärkulturen jene Signalwege zu identifizieren, die am Transport von Gephyrin, seiner Stabilisierung im postsynaptischen Netzwerk und seinem Abbau beteiligt sind.

Im Verlauf der Arbeit konnte belegt werden, dass das Aktin-regulierende Phosphoprotein ena/VASP als Adapter die Interaktion von Gephyrin mit F-Aktin vermittelt, und dass diese Bindung ausreicht, um Gephyrin an das Aktin-Zytoskelett zu rekrutieren. Entgegen früheren Veröffentlichungen konnte die Bindung von ena/VASP im Bereich der sog. Linkerregion von Gephyrin nachgewiesen werden. Aktin-depolymerisierende Alkaloidbehandlungen von hippokampalen Neuronen bestätigten, dass die Lokalisation von Gephyrin an sich entwickelnden inhibitorischen Kontakten von einem intakten Mikrofilamentsystem abhängig zu sein scheint. Das Aktin-Zytoskelett könnte somit eine transiente Rolle in der Ausbildung und Stabilisierung des Gephyrin-Netzwerkes in der frühen Entwicklung von inhibitorischen GABAergen Synapsen haben, während die Abhängigkeit der synaptisch-lokalisierten Gephyrincluster vom Aktin-Zytoskelett mit steigender neuronaler Differenzierung abnimmt.

Zusätzlich konnte erstmals der Einfluss einzelner Signaltransduktionskaskaden auf die synaptische Lokalisation von Gephyrin nachgewiesen werden. Dabei hatte die Inhibition der Protein-Phosphatasen 1 und 2A eine Destabilisierung synaptisch-lokalisierter Gephyrincluster bei gleichzeitigem Anstieg der zytoplasmatischen Immunreaktivität zur Folge. Dies ist möglicherweise auf eine Hyperphosphorylierung wichtiger Sequenzabschnitten von Gephyrin zurückzuführen, wobei Änderungen im Phosphorylierungsstatus der Linkerregion von Gephyrin unter anderem die Assoziation mit dem Zytoskelett beeinträchtigen oder lösen könnten. Umgekehrt könnte eine Dephosphorylierung möglicherweise die Stabilität der Vernetzung erhöht. Kopräzitationsstudien konnten zusätzlich nachweisen, dass Gephyrin, PP1 und PP2A nicht nur gemeinsam an inhibitorischen Synapsen vorliegen, sondern dass eine direkte Interaktion besteht. Dabei handelt es sich um den ersten Nachweis einer direkten Bindung von Gephyrin an Ser/Thr-Phosphatasen. Die Komplexbildung von PP1 und PP2A mit Gephyrin könnten der Regulation des Phosphorylierungsgrades dienen. Der genaue Mechanismus wird jedoch in weiteren Experimenten zu untersuchen sein

6. Literatur

Allison DW, Gelfand VI, Spector I, Craig AM (1998) Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J Neurosci.* 18(7):2423-36.

Allison DW., Chervin AS, Gelfand VI, Craig AM (2000) Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: Maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *J Neurosci* 20:4545-4554.

Arendt T, Hanisch F, Holzer M, Bruckner MK (1994) In vivo phosphorylation in the rat basal nucleus induces PHF-like and APP immunoreactivity. *Neuroreport.* 5(11):1397-400.

Bavro VN, Sola M, Bracher A, Kneussel M, Betz H, Weissenhorn W (2002) Crystal structure of the GABA_A-receptor-associated protein, GABARAP. *EMBO Rep* 3:183-189.

Bear JE, Svitkina TM, Krause M, Schafer DA, Loureiro JJ, Strasser GA, Maly IV, Chaga OY, Cooper JA, Borisy GG, Gertler FB (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell.* 2002 May 17;109(4):509-21.

Betz H, Kuhse J, Schmieden V, Laube B, Kirsch J, Harvey RJ (1999) Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 868:667-76.

Bialojan C, Takai A (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J.* 256(1):283-90.

Bohlhalter S, Möhler H, Fritschy JM (1994) Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: co-localization of Glycine- and GABA_A-receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. *Brain Res* 642:59-69.

Bonder EM, Mooseker MS (1986) Cytochalasin B slows but does not prevent monomer addition at the barbed end of the actin filament. *J Cell Biol.* 102(1):282-8.

Bormann J, Feigenspan A (1995) GABAC receptors. *Trends Neurosci.* 12:515-9

Brandon NJ, Bedford FK, Connolly CN, Couve A, Kittler JT, Hanley JG, Jovanovic JN, Uren J, Taylor P, Thomas P, Smart TG, Moss SJ (1999) Synaptic targeting and regulation of GABA(A) receptors. *Biochem Soc Trans.* (4):527-30.

Brandon NJ, Uren JM, Kittler JT, Wang H, Olsen R, Parker PJ, Moss SJ (1999) Subunit-specific association of protein kinase C and the receptor for activated C kinase with GABA type A receptors. *J Neurosci.* 19(21):9228-34.

Brandon NJ, Delmas P, Kittler JT, McDonald BJ, Sieghart W, Brown DA, Smart TG, Moss SJ (2000) GABA_A receptor phosphorylation and functional modulation in cortical neurons by a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem.* 275(49):38856-62.

Brandon NJ, Jovanovic JN, Smart TG, Moss SJ (2002) Receptor for activated C kinase-1 facilitates protein kinase C-dependent phosphorylation and functional modulation of GABA(A) receptors with the activation of G-protein-coupled receptors. *J Neurosci.* 22(15):6353-61.

Brünig I, Penschuck S, Berninger B, Benson J, Fritschy JM (2001) BDNF reduces miniature inhibitory postsynaptic currents by rapid downregulation of GABA(A) receptor surface expression. *Eur J Neurosci.* 13(7):1320-8.

Brünig I, Scotti E, Sidler C, Fritschy JM (2002) Intact sorting, targeting and clustering of g-Aminobutyric Acid A Receptor subtypes in hippocampal neurons in vitro. *J Comp Neurol* 443:43-55.

Bulleit RF, Hsieh T (2000) MEK inhibitors block BDNF-dependent and -independent expression of GABA(A) receptor subunit mRNAs in cultured mouse cerebellar granule neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* 119(1):1-10.

Caraiscos VB, Mihic SJ, MacDonald JF, Orser BA (2002) Tyrosine kinases enhance the function of glycine receptors in rat hippocampal neurons and human alpha(1)beta glycine receptors. *J Physiol.* 539(Pt 2):495-502.

Carroll RC, Beattie EC, von Zastrow M, Malenka RC (2001) Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2:315-324.

Chang Y, Wang R, Barot S, Weiss DS (1996) Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor. *J Neurosci.* 16(17):5415-24.

Chatfield K, Eastman A (2004) Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A differentially prevent intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 323(4):1313-20.

Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 14:515-519.

Colin I, Rostaing P, Triller A (1996) Gephyrin accumulates at specific plasmalemma loci during neuronal maturation in vitro. *J Comp Neurol* 374:467-479.

Connolly CN, Wooltorton JR, Smart TG, Moss SJ (1996) Subcellular localization of g-aminobutyric acid type A receptors is determined by receptor b-subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9899-9904.

Cooper JA (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol.* 105(4):1473-8.

Cowen DS, Johnson-Farley NN, Travkina T (2005) 5-HT receptors couple to activation of Akt, but not extracellular-regulated kinase (ERK), in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem.* 93(4):910-7.

- Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR, Nikolov DB (2002) Structure of GABARAP in two conformations. Implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron* 33:63-74.
- Craig AM, Banker G, Chang W, McGrath ME, Serpinskaya AS (1996) Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 16:3166-3177.
- da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OA, Zaia CT, Greengard P (1995) Inhibition of protein phosphatase 1 stimulates secretion of Alzheimer amyloid precursor protein. *Mol Med.* 1(5):535-41.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Lüscher B (1998) Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the $\alpha 2$ subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 7:563-571.
- Elmariah SB, Crumling MA, Parsons TD, Balice-Gordon RJ (2004) Postsynaptic TrkB-mediated signaling modulates excitatory and inhibitory neurotransmitter receptor clustering at hippocampal synapses. *J Neurosci.* 24(10):2380-93.
- Evans DJ, Maltseva IA, Wu J, Fleiszig SM (2002) *Pseudomonas aeruginosa* internalization by corneal epithelial cells involves MEK and ERK signal transduction proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 213(1):73-9.
- Farrar SJ, Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM (1999) Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem.* 274(15):10100-4.
- Feng G, Tintrup H, Kirsch J, Nichol MC, Kuhse J, Betz H, Sanes JR (1998) Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science* 282:1321-1324.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron.* 20(5):847-54.
- Fischer M, Kaech S, Wagner U, Brinkhaus H, Matus A (2000b) Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:887-894.
- Fritschy JM, Möhler H (1995) GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* 359:154-194.
- Fuhrmann JC, Kins S, Rostaing P, El Far O, Kirsch J, Sheng M, Triller A, Betz H, Kneussel M (2002) Gephyrin Interacts with Dynein Light Chains 1 and 2, Components of Motor Protein Complexes. *J Neurosci*
- Fukunaga K, Muller D, Ohmitsu M, Bako E, DePaoli-Roach AA, Miyamoto E (2000) Decreased protein phosphatase 2A activity in hippocampal long-term potentiation. *J Neurochem.* 74(2):807-17.

- Gary DS, Mattson MP (2001) Integrin signaling via the PI3-kinase-Akt pathway increases neuronal resistance to glutamate-induced apoptosis. *J Neurochem.* 76(5):1485-96.
- Gerling N, Culmsee C, Klumpp S, Krieglstein J (2004) The tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate mimics NGF-induced neuroprotective signaling in rat hippocampal neurons. *Neurochem Int.* 44(7):505-20.
- Ghosh A, Greenberg ME (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:239-247.
- Giesemann T, Schwarz G, Nawrotzki R, Berhorster K, Rothkegel M, Schluter K, Schrader N, Schindelin H, Mendel RR, Kirsch J, Jockusch BM (2003) Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J Neurosci.* 23(23):8330-9.
- Grosskreutz Y, Hermann A, Kins S, Fuhrmann JC, Betz H, Kneussel M (2001) Identification of a gephyrin-binding motif in the GDP/GTP exchange factor collybistin. *Biol Chem* 382:1455-1462.
- Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B (2005) The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron.* 45(5):727-39.
- Haffner C, Jarchau T, Reinhard M, Hoppe J, Lohmann SM, Walter U (1995) Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *EMBO J.* 14(1):19-27.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Hanus C, Vannier C, Triller A (2004) Intracellular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate. *J Neurosci.* 24(5):1119-28.
- Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Katchanov J, Freyer D, Kapinya K, Herwig U, Megow D, Dirnagl U, Weber JR, Hortnagl H (2001) Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J Neurosci.* 21(8):2600-9.
- Harms KJ, Craig AM (2005) Synapse composition and organization following chronic activity blockade in cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol.* 490(1):72-84.
- Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci.* 17:341-71.
- Harvey RJ, Schmieden V, Von Holst A, Laube B, Rohrer H, Betz H (2000) Glycine receptors containing the alpha4 subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *Eur J Neurosci.* 3:994-1001.

- Harvey K, Duguid IC, Alldred MJ, Beatty SE, Ward H, Keep NH, Lingenfelter SE, Pearce BR, Lundgren J, Owen MJ, Smart TG, Luscher B, Rees MI, Harvey RJ (2004) The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J Neurosci.* 24(25):5816-26.
- 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(12):6031-6.
- Horgan AM, Copenhaver PF (1998) G protein-mediated inhibition of neuronal migration requires calcium influx. *J Neurosci.* 18(11):4189-200.
- Hüttelmaier S, Mayboroda O, Harbeck B, Jarchau T, Jockusch BM, Rudiger M (1998) The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol.* 8(9):479-88.
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3:661-669.
- Jessell TM, Kandel ER (1993) Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 72/Neuron 10 (Supplement): 1-30.
- Jones SB, Lu HY, Lu Q (2004) Abl tyrosine kinase promotes dendrogenesis by inducing actin cytoskeletal rearrangements in cooperation with Rho family small GTPases in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 24(39):8510-21.
- Jovanovic JN, Thomas P, Kittler JT, Smart TG, Moss SJ (2004) Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *J Neurosci.* 24(2):522-30.
- Kelly PT, Mackinnon RL 2nd, Dietz RV, Maher BJ, Wang J (2005) Postsynaptic IP3 receptor-mediated Ca²⁺ release modulates synaptic transmission in hippocampal neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 135(1-2):232-48.
- Kennedy MB (1997) The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci.* 20(6):264-8.
- Kim E, Naisbitt S, Hsueh YP, Rao A, Rothschild A, Craig AM, Sheng M (1997) GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol* 136:669-678.
- Kim CH, Chung HJ, Lee HK, Huganir RL (2001) Interaction of the AMPA receptor subunit GluR2/3 with PDZ domains regulates hippocampal long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(20):11725-30.
- Kins S, Betz H, Kirsch A (2000) Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat Neurosci* 3:22-29.

- Kirsch GE, Alam M, Hartmann HA (1994) Differential effects of sulfhydryl reagents on saxitoxin and tetrodotoxin block of voltage-dependent Na channels. *Biophys J* 67(6):2305-15.
- Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H (1991) The 93-kDa glycine receptor associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem* 266:22242-22245.
- Kirsch J, Malosio ML, Wolters I, Betz H (1993a) Distribution of gephyrin transcripts in the adult and developing rat brain. *Eur J Neurosci* 5:1109-1117.
- Kirsch J, Wolters I, Triller A, Betz H (1993b) Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366:745-748.
- Kirsch J, Betz H (1995) The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci* 15:4148-4156.
- Kirsch J, Kuhse J, Betz H (1995) Targeting of glycine receptor subunits to gephyrin-rich domains in transfected human embryonic kidney cells. *Mol Cell Neurosci* 6:450-461.
- Kirsch J, Betz H (1998) Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 392:717-720.
- Kittler JT, Rostaing P, Schiavo G, Fritschy JM, Olsen R, Triller A, Moss SJ (2001) The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Mol Cell Neurosci* 18:13-25.
- Kneussel M, Brandstätter JH, Laube B, Stahl S, Müller U, Betz H (1999) Loss of postsynaptic GABA_A receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* 19:9289-9297.
- Kneussel M, Betz H (2000) Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci* 23:429-435.
- Kneussel M, Haverkamp S, Fuhrmann JC, Wang H, Wassle H, Olsen RW, Betz H (2000) The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABA_AR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8594-8599.
- Kneussel M, Brandstätter JH, Gasnier B, Feng G, Sanes JR, Betz H (2001a) Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABA(A) receptor subtypes. *Mol Cell Neurosci* 17:973-982.
- Kneussel M, Engelkamp D, Betz H (2001b) Distribution of transcripts for the brain-specific GDP/GTP exchange factor collybistin in the developing mouse brain. *Eur J Neurosci* 13:487-492.
- Knuesel I, Mastrocola M, Zuellig RA, Bornhauser B, Schaub MC, Fritschy JM (1999) Altered synaptic clustering of GABA_A receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *Eur J Neurosci* 11:4457-4462.

- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
- Krause M, Sechi AS, Konradt M, Monner D, Gertler FB, Wehland J (2000) Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 149(1):181-94.
- Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB (2003) Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 541-64.
- Krishek BJ, Xie X, Blackstone C, Haganir RL, Moss SJ, Smart TG (1994) Regulation of GABAA receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron.* 12(5):1081-95.
- Kuhse J, Betz H, Kirsch J (1995) The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 5:318-323.
- Kumashiro S, Lu YF, Tomizawa K, Matsushita M, Wei FY, Matsui H (2005) Regulation of synaptic vesicle recycling by calcineurin in different vesicle pools. *Neurosci Res.* 51(4):435-43. Epub 2005 Jan 24.
- Laurie DJ, Wisden W, Seeburg PH (1992) The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci.* 11:4151-72.
- Levi S, Chesnoy-Marchais D, Sieghart W, Triller A (1998) Synaptic control of glycine and GABA(A) receptors and gephyrin expression in cultured motoneurons. *J Neurosci* 19:7434-7449.
- Lüscher B, Keller CA (2004) Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* 2(3):195-221.
- Ma OK, Sucher NJ (2004) Molecular interaction of NMDA receptor subunit NR3A with protein phosphatase 2A. *Neuroreport.* 15(9):1447-50.
- Machu TK, Firestone JA, Browning MD (1993) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C phosphorylate a synthetic peptide corresponding to a sequence that is specific for the gamma 2L subunit of the GABAA receptor. *J Neurochem.* 61(1):375-7.
- Mammoto A, Sasaki T, Asakura T, Hotta I, Imamura H, Takahashi K, Matsuura Y, Shirao T, Takai Y (1998) Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun* 243:86-89.

- McDonald BJ, Amato A, Connolly CN, Benke D, Moss SJ, Smart TG (1998) Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat Neurosci.* 1:23-8.
- Meier J, Akyeli J, Kirischuk S, Grantyn R (2003) GABA(A) receptor activity and PKC control inhibitory synaptogenesis in CNS tissue slices. *Mol Cell Neurosci.* 23(4):600-13.
- Meier J, Grantyn R (2004) Preferential accumulation of GABAA receptor gamma 2L, not gamma 2S, cytoplasmic loops at rat spinal cord inhibitory synapses. *J Physiol.* 559 (Pt 2):355-65.
- Meier J, de Chaldée M, Triller A, Vannier C (2000) Functional heterogeneity of gephyrins. *Mol Cell Neurosci* 16:566-577.
- Meier J, Vannier C, Serge A, Triller A, Choquet D (2001) Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat Neurosci* 4:253-260.
- Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch, D (1995) Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor β subunit. *Neuron* 15:563-572.
- Minier F, Laschet JJ, Evrard B, Bureau MH (2000) Endogenous phosphorylation of the GABA(A) receptor protein is counteracted by a membrane-associated phosphatase. *Neurochem Int.* 36(6):499-506.
- Mizoguchi Y, Kanematsu T, Hirata M, Nabekura J (2003) A rapid increase in the total number of cell surface functional GABAA receptors induced by brain-derived neurotrophic factor in rat visual cortex. *J Biol Chem.* 278(45):44097-102.
- Mizoguchi Y, Ishibashi H, Nabekura J (2003) The action of BDNF on GABA(A) currents changes from potentiating to suppressing during maturation of rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol.* 548(Pt 3):703-9.
- Mortensen K, Larsson LI (2003) Effects of cytochalasin D on the actin cytoskeleton: association of neoformed actin aggregates with proteins involved in signaling and endocytosis. *Cell Mol Life Sci.* 60(5):1007-12.
- Moss S, Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* 2:240-250.
- Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC (1994) Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature.* 369(6480):486-8.
- Neuhoff H, Sassoe-Pognetto M, Panzanelli P, Maas C, Witke W, Kneussel M (2005) The actin-binding protein profilin I is localized at synaptic sites in an activity-regulated manner. *Eur J Neurosci.* 21(1):15-25.
- Norris CM, Blalock EM, Chen KC, Porter NM, Landfield PW (2002) Calcineurin enhances L-type Ca(2+) channel activity in hippocampal neurons: increased effect with age in culture. *Neuroscience.* 110(2):213-25.

- Nusser Z, Sieghart W, Mody I (1999) Differential regulation of synaptic GABA_A receptors by cAMP-dependent protein kinase in mouse cerebellar and olfactory bulb neurones. *J Physiol.* 521 Pt 2:421-35.
- Nusser Z, Ahmad Z, Tretter V, Fuchs K, Wisden W, Sieghart W, Somogyi P (1999) Alterations in the expression of GABA_A receptor subunits in cerebellar granule cells after the disruption of the alpha6 subunit gene. *Eur J Neurosci.* 11(5):1685-97.
- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P (1998) Segregation of different GABA_A receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18:1693-1703.
- O'Brien RJ, Lau LF, Huganir RL (1998) Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol* 8:364-369.
- O'Malley D, Harvey J (2004) Insulin activates native and recombinant large conductance Ca(2+)-activated potassium channels via a mitogen-activated protein kinase-dependent process. *Mol Pharmacol.* 65(6):1352-63.
- Oliver CJ, Terry-Lorenzo RT, Elliott E, Bloomer WA, Li S, Brautigam DL, Colbran RJ, Shenolikar S (2002) Targeting protein phosphatase 1 (PP1) to the actin cytoskeleton: the neurabin I/PP1 complex regulates cell morphology. *Mol Cell Biol.* (13):4690-701.
- Ouimet CC, Katona I, Allen P, Freund TF, Greengard P (2004) Cellular and subcellular distribution of spinophilin, a PP1 regulatory protein that bundles F-actin in dendritic spines. *J Comp Neurol.* 479(4):374-88.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618.
- Palma E, Ragozzino DA, Di Angelantonio S, Spinelli G, Trettel F, Martinez-Torres A, Torchia G, Arcella A, Di Gennaro G, Quarato PP, Esposito V, Cantore G, Miledi R, Eusebi F (2004) Phosphatase inhibitors remove the run-down of gamma-aminobutyric acid type A receptors in the human epileptic brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(27):10183-8
- Paul J, Gottmann K, Lessmann V (2001) NT-3 regulates BDNF-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *Neuroreport.* 12(12):2635-9.
- Peters A, Sethares C, Harriman KM (1990) Different kinds of axon terminals forming symmetric synapses with the cell bodies and initial axon segments of layer II/III pyramidal cells. II. Synaptic junctions. *J Neurocytol.* 19(4):584-600.
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H (1982) Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* 257:9389-9393.
- Pfeiffer F, Simler R, Grenningloh G, Betz H (1984) Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:7224-7227.

- Poisbeau P, Cheney MC, Browning MD, Mody I (1999) Modulation of synaptic GABAA receptor function by PKA and PKC in adult hippocampal neurons. *J Neurosci.* 19(2):674-83.
- Prior P, Schmitt B, Grenningloh G, Pribilla I, Multhaup G, Beyreuther K, Maulet Y, Werner P, Langosch D, Kirsch J, Betz H (1992) Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* 8:1161-1170.
- Racca C, Gardiol A, Triller A. Dendritic and postsynaptic localizations of glycine receptor alpha subunit mRNAs. *J Neurosci* 17:1691-1700.
- Ramming M, Kins S, Werner N, Hermann A, Betz H, Kirsch J (2000) Diversity and phylogeny of gephyrin: tissue-specific splice variants, gene structure, and sequence similarities to molybdenum cofactor-synthesizing and cytoskeleton-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10266-10271.
- Reinhard M, Giehl K, Abel K, Haffner C, Jarchau T, Hoppe V, Jockusch BM, Walter U (1995) The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* 14(8):1583-9.
- Rico B, Xu B, Reichardt LF (2002) TrkB receptor signaling is required for establishment of GABAergic synapses in the cerebellum. *Nat Neurosci.* 5(3):225-33.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanchez C, Tompa P, Szucs K, Friedrich P, Avila J (1996) Phosphorylation and dephosphorylation in the proline-rich C-terminal domain of microtubule-associated protein 2. *Eur J Biochem.* 241(3):765-71.
- Sassoe-Pognetto M, Kirsch J, Grunert U, Greferath U, Fritschy JM, Mohler H, Betz H, Wassle H (1995) Colocalization of gephyrin and GABAA-receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol* 357:1-14.
- Schmitt B, Knaus P, Becker CM, Betz H (1987) The Mr 93,000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor complex is a peripheral membrane protein. *Biochemistry* 26:805-811.
- Schönthal AH (1998) Role of PP2A in intracellular signal transduction pathways. *Front Biosci.* 3:D1262-73.
- Sim AT, Baldwin ML, Rostas JA, Holst J, Ludowyke RI (2003) The role of serine/threonine protein phosphatases in exocytosis. *Biochem J.* 373(Pt 3):641-59.
- Sheng M (2001) Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(13):7058-61

- Sola M, Bavro VN, Timmins J, Franz T, Ricard-Blum S, Schoehn G, Ruigrok RW, Paarmann I, Saiyed T, O'Sullivan GA, Schmitt B, Betz H, Weissenhorn W (2004) Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *EMBO J.* 23(13):2510-9.
- Sola M, Kneussel M, Heck IS, Betz H, Weissenhorn W (2001) X-ray crystal structure of the trimeric N-terminal domain of gephyrin. *J Biol Chem* 276:25294-25301.
- Song M, Messing RO (2005) Protein kinase C regulation of GABAA receptors. *Cell Mol Life Sci.* 62(2):119-27. Review.
- Stansfeld CE, Roper J, Ludwig J, Weseloh RM, Marsh SJ, Brown DA, Pongs O (1996) Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces a block of voltage-activated rat ether-a-go-go channels in a stably transfected cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(18):9910-4.
- Taketo M, Matsuda H, Yoshioka T (2004) Calcium-independent inhibition of GABA(A) current by caffeine in hippocampal slices. *Brain Res.* 1016(2):229-39.
- Tanaka T, Saito H, Matsuki N (1997) Inhibition of GABAA synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J Neurosci.* 17(9):2959-66.
- Terry-Lorenzo RT, Roadcap DW, Otsuka T, Blanpied TA, Zamorano PL, Garner CC, Shenolikar S, Ehlers MD (2005) Neurabin/protein phosphatase-1 complex regulates dendritic spine morphogenesis and maturation. *Mol Biol Cell.* 16(5):2349-62.
- Todd AJ, Watt C, Spike RC, Sieghart W (1996) Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 16:974-982.
- Tretter V, Ehya N, Fuchs K, Sieghart W (1997) Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *J Neurosci.* 17(8):2728-37.
- Triller A, Cluzeaud F, Pfeiffer F, Betz H, Korn H (1985) Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study. *J Cell Biol* 101:683-688.
- Triller A, Cluzeaud F, Korn H (1987) Gamma-aminobutyric acid-containing terminals can be apposed to glycine receptors at central synapses. *J Cell Biol* 104:947-956.
- Vaello ML, Ruiz-Gomez A, Lerma J, Mayor F Jr (1994) Modulation of inhibitory glycine receptors by phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 269(3):2002-8.
- Walikonis RS, Jensen ON, Mann M, Provance Jr DW, Mercer JA, Kennedy MB (2000) Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J Neurosci* 20:4069-4080.
- Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Braunton J, Lu WY, Becker LE, MacDonald JF, Wang YT (1997) Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature.* 388(6643):686-90.

Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW (1999) GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397:69-72.

Wang S, Cheng Q, Malik S, Yang J (2000) Interleukin-1beta inhibits gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 292(2):497-504.

Witke W, Podtelejnikov AV, Di Nardo A, Sutherland JD, Gurniak CB, Dotti C, Mann M (1998) In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytosis pathway and actin assembly. *EMBO J* 17:967-976.

Witteck A, Yao Y, Fechir M, Forstermann U, Kleinert H (2003) Rho protein-mediated changes in the structure of the actin cytoskeleton regulate human inducible NO synthase gene expression. *Exp Cell Res.* 287(1):106-15.

Xiang S, Nichols J, Rajagopalan KV, Schindelin H (2001) The crystal structure of Escherichia coli MoeA and its relationship to the multifunctional protein gephyrin. *Structure* 9:299-310.

Yagyu K, Kitagawa K, Irie T, Wu B, Zeng XT, Hattori N, Inagaki C (2001) Amyloid beta proteins inhibit Cl(-)-ATPase activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem.* 78(3):569-76.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BBS	BES-gepufferte Saline
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Cy3	Indocarbocyanin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DIV	Tag/e in Kultur
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxy-Uracil-5'-Triphosphat
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A -R	GABA _A -Rezeptor
GEF	Guaninnucleotidaustauschfaktor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GlyR	Glyzin-Rezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HBS	HEPES-gepufferte Saline
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IF	Immunfärbung
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
^ü / _N	über Nacht
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
mM	Milimolar
mRNA	boten Ribonucleinsäure
nit	Nitratreduktase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSD	postsynaptische Dichte
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat

SEM	Standard Error of the Mean
TE	Tris-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
WB	Western Blot
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
VIAAT	Vesicular inhibitory amino acid transporter
X-Gal	(5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galactosid)

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur und Diversität von inhibitorischen Neurotransmitter-Rezeptoren a) Allgemeiner Aufbau eines Liganden-gesteuerten Ionenkanals: Vier hydrophobe Transmembrandomänen (TM). Der große N-terminale Abschnitt liegt extrazellulär und beinhaltet sowohl die Neurotransmitter- als auch zusätzliche modulatorische Bindungsstellen. Die intrazelluläre Domäne zwischen TM3 und TM4 ist der am wenigsten konservierte Abschnitt und enthält mehrere Konsensusmotive für Ser/Thr- und Tyr-Phosphatasen. b) Pentamerer Aufbau von GABA_A-, GABA_C- und Glyzin-Rezeptor-Subtypen. Die Mehrheit der GABA_A Rezeptoren besteht aus α , β and γ -Untereinheiten im Verhältnis 2:2:1. Die δ , ϵ and θ Untereinheiten können in einigen Subtypen die γ Untereinheit ersetzen. GABA_C Rezeptoren bestehen aus p1-3 Untereinheiten. Glyzin-Rezeptoren sind ebenfalls pentamer aufgebaut und setzen sich aus den Untereinheiten α und β zusammen im Verhältnis 2:3 (Abbildung modifiziert aus Moss und Smart, 2001).

Abbildung 2: Die Konzentration von Glyzin-Rezeptoren in der postsynaptischen Plasmamembran erfolgt durch die intrazelluläre Bindung an Gephyrin. Das Gephyrinnetzwerk verankert die Rezeptoren direkt mit dem Mikrotubuliskelett. Die Aktin regulierenden Proteine Profilin und Collybistin sind zusätzliche Interaktionspartner von Gephyrin und ermöglichen eine lokale Regulation des Aktin-Zytoskelettes an der Synapse. Die Bindung von Gephyrin an RAFT1 könnte in der lokalen synapsenspezifischen Proteinsynthese eine Rolle spielen (Moss und Smart, 2001)

Abbildung 3: Einfluss von Gephyrin auf a) aktivitäts-abhängige oder b) durch tropische Faktoren regulierte Signalwege an der inhibitorischen Synapsen. Ca²⁺-Einstrom und die lokale Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) sind möglicherweise ausschlaggebend für den Aufbau des postsynaptischen Gephyrin-Netzwerkes an sich entwickelnden inhibitorischen Synapsen. Die genaue Wirkung des lokal erhöhten Ca²⁺-Einstroms ist noch unbekannt, beeinflussen aber sehr wahrscheinlich das Aktin- und Tubulin-Zytoskelett. Die Aktivierung der PI3K könnte über entsprechende G-Proteingekoppelte Rezeptoren erfolgen, die entweder auf noch unbekannte „Induktions-Faktoren“ oder Hormone als Liganden reagieren. Der resultierende Anstieg von PtdIns(3,4,5)P₃ könnte seinerseits zur Rekrutierung von Collybistin und Profilin an die Membran führen und dadurch lokale Änderungen des Aktin-Zytoskelettes auslösen. Durch Bindung an membran-assoziiertes Collybistin und Profilin könnte Gephyrin an die Synapse rekrutiert werden. Die erhöhte lokale Konzentration von Gephyrin wiederum stimuliert die

Kinaseaktivität von RAFT1 und beeinflusst die synaptische Proteinsynthese. (Model nach Kneussel und Betz., 2000)

Abbildung 4: Der Verlust der Gephyrin-Immunreaktivität nach Inkubation mit Pertussistoxin (PTX) ist auf apoptotische Nebeneffekte des Toxins zurückzuführen. Hippokampale Primärkulturen (14 DIV) wurden für 24h mit 10 µg/ml PTX behandelt. A) Die Kontrollfärbung zeigt eine normale Gephyrincluster-Verteilung (grüner Kanal), den präsynaptischen Marker VIAAT (roter Kanal) und große ovale Zellkerne vitaler Neuronen (blauer Kanal) B) Nach Behandlung mit PTX war keine Gephyrinfärbung mehr detektierbar (grüner Kanal); die VIAAT-Färbung erschien diffuser im Vergleich zur Kontrolle (roter Kanal), während eine deutliche Chromatinkondensation des Kern zu verzeichnen war (blauer Kanal).

Abbildung 5: Inkubation mit dem MEK1/2 Inhibitor U0126 führt zum Verlust der Gephyrin-Immunreaktivität. Hippokampale Primärkulturen (14 DIV) wurden für 6h mit 50 µM U0126 oder U0124 behandelt. A) Die Kontrollfärbung zeigt die normale Gephyrincluster-Verteilung (grüner Kanal und Vergrößerung), den präsynaptische Marker VIAAT (roter Kanal und Vergrößerung) und die synaptische Lokalisation beider Proteine (Merge und Vergrößerung) B) Nach Behandlung mit U0126 ist keine Gephyrinfärbung mehr nachweisbar (grüner Kanal und Vergrößerung); während die VIAAT-Färbung der Kontrolle entspricht (roter Kanal und Vergrößerung). C) Inkubation mit U0124 hat keinen Einfluss auf die Gephyrin- oder VIAAT-Färbung (grüner, roter Kanal, Merge und Vergrößerung)

Abbildung 6: Die Inhibition von PP1 / PP2a führt zu einer Reduktion der synaptisch-lokalisierten Gephyrincluster und einem Anstieg der zytoplasmatischen Gephyrin-Immunreaktivität. Hippokampale Primärkulturen (14 DIV) wurden für 6h mit Phosphatase-Inhibitoren behandelt. A) Gephyrin-Immunreaktivität der Kontrolle (grüner Kanal), der präsynaptische Marker VIAAT (roter Kanal) und die synaptische Kolokalisation (Merge). B) FK506 Behandlung hatte keinen Effekt auf Gephyrin (grüner Kanal), VIAAT (roter Kanal) oder den Anteil der synaptischen Kolokalisation (Merge). C) Okadaic acid Inkubation führte zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Gephyrinfärbung (grüner Kanal), die VIAAT-Verteilung wurde nicht beeinflusst (roter Kanal). Der Anteil der synaptisch-lokalisierten Gephyrincluster war reduziert (Merge). D) Calyculin A Behandlung hatte einen Anstieg der diffusen Gephyrinfärbung zur Folge (grüner Kanal), bei normaler VIAAT-Färbung (roter Kanal). Es war ebenfalls eine deutliche Reduktion in der synaptischer Lokalisation der verbleibenden Gephyrincluster zu verzeichnen (Merge).

Abbildung 7: Der Anstieg der zytoplasmatischen Gephyrinfärbung ist nicht auf eine Zerstörung des Aktin-Zytoskelettes zurückzuführen. Hippokampale Primärkulturen (14 DIV) wurden für 3h mit 200 nM Okadaic acid oder 50 nM Calyculin A behandelt. A+A1) In der Kontrolle erkennt man Gephyrincluster im Soma und den Dendriten, ohne zytoplasmatische Immunreaktivität (grüner Kanal) A2+A3) Anfärbung des Aktinzytoskelett mit Phalloidin zeigen die intakte Struktur der Dendriten (grauer Kanal). B+B1) 50 nM Calyculin A hat einen Anstieg der zytoplasmatischen Gephyrin-Immunreaktivität zur Folge (grüner Kanal). B2+B3) Die Struktur des Aktin-Zytoskelett entspricht der Kontrolle (grauer

Kanal). C+C1) 200 nM Okadaic acid hatten einen Anstieg der diffusen Gephyrin-Immunreaktivität zur Folge (grüner Kanal). C2+C3) die Struktur des Aktin-Zytoskelett wird dabei nicht beeinträchtigt (grauer Kanal).

Abbildung 8: PP1 kolokalisiert partiell mit Gephyrin und PSD-95. Hippokampalen Primärkulturen (6DIV) wurden gegen PP1, PSD-95 und Gephyrin angefärbt. A) Es ist eine deutliche Anreicherung (ca. 15-20% aller Cluster) des endogenen PP1-Anteils (roter Kanal) in Gephyrinclustern (grüner Kanal) zu erkennen (Merge). A1) Vergrößerungen des Dendriten zeigen ebenfalls eine partielle Kolokalisation (Merge) von PP1 (roter Kanal) mit Gephyrin (grüner Kanal). B) Färbungen mit PSD-95 (grüner Kanal) ergaben zusätzlich eine partielle Kolokalisation (Merge) mit PP1 (roter Kanal).

Abbildung 9: PP2A kolokalisiert nicht mit GABA_Aα1-positiven inhibitorischen Synapsen. Hippokampale Primärkulturen 14 DIV wurden gegen Gephyrin, GABA_Aα1 und PP2A gefärbt. A+A1) Gephyrin-Immunreaktivität (grüner Kanal) kolokalisiert zu etwa 90% mit GABA_Aα1 (roter Kanal). B+B1) Endogene PP2A-Immunreaktivität (grüner Kanal) zeigte keine Überlappung (Merge) mit GABA_Aα1-Färbung.

Abbildung 10: Endogenes PP1 wird in Gephyrin-Makroaggregaten angereichert. GFP-Gephyrin wurde für 7 h in HEK293T-Zellen exprimiert und die Lokalisation des endogenen PP1 und PP2A-Anteils der Zellen mittels Immunfärbung analysiert. A) Es ist eine deutliche Anreicherung des endogenen PP1-Anteils (roter Kanal) in den Gephyrin-Makroaggregaten (grüner Kanal) zu erkennen (Merge). Die PP2A-Immunreaktivität lag diffus verteilt vor (Roter Kanal) und es zeigte sich keine erhöhte Konzentration in den GFP-Gephyrin-Aggregaten (Merge).

Abbildung 11: PP1 und PP2A kopräzipitieren mit Gephyrin in vitro. A) HEK 293T-Zellen wurden mit GFP-Gephyrin für 24h transfiziert. Lysate der transfizierten HEK293T-Zellen und Hirnlysat wurden für Immunpräzipitationen (IP) eingesetzt und mittels Western Blot (WB) analysiert. A) Präzipitationen gegen PP1 und PP2A hatten eine Anreicherung von Gephyrin aus transfizierten HEK293T-Zellen und aus adultem Hirnlysat zur Folge. Gephyrin-Antikörper kopräzipitierten ihrerseits PP1 und PP2A. Untransfizierte HEK293T-Zellen zeigten keine Anreicherung von PP1, PP2A oder Gephyrin. B) GST-Fusionsproteine von Gephyrin (GST-Gephyrin) und dem C-terminalen Abschnitt von Gephyrin (GST-GE45) waren in der Lage, PP2A aus adultem Rattenhirnlysat anzureichern. Die GST-Kontrolle zeigte keine Kopräzipitation.

Abbildung 12: Alkaloid-induzierte Degradation des Aktin-Zytoskeletts führt zur Bildung von Gephyrin-Mikroaggregaten, die mit F-Aktin-Patches kolokalisieren. HEK293T-Zellen wurden mit A) GFP-Gephyrin oder B) GFP-Gephyrin-d181-243 für 4h transfiziert, bevor sie für weitere 3h mit 2 μM der angegebenen Alkaloide behandelt wurden. Inkubation mit Latrunkulin hatte keine Auswirkung auf die Verteilung der Gephyrin-Aggregate (A, C). Jasplakinolide und Cytochalasin D Behandlung hatte einen signifikanten Anstieg der Zellen mit Gephyrin-Mikroaggregaten zur Folge (D,E), die mit F-Aktin Patches kolokalisierten. (B) Der Effekt ist abhängig von der Gephyrin-Linkerregion, da die Deletionsmutante

GFP-Gephyrin-d181-243 in allen Behandlungen der Kontrolle entspricht. Für die quantitative Analyse der Transfektionen wurden jeweils 100 Zellen pro Deckglas ausgewertet (Abb.1A; unbehandelt) und die transfizierten Zellen in Gruppen mit a) diffuser Verteilung des Proteins ohne Aggregate (ausgefüllter Kreis), b) weniger als 20 Aggregaten pro Zelle (leerer Kreis) und c) mehr als 20 Aggregaten pro Zellen (ausgefüllte Dreiecke) eingeteilt

Abbildung 13: GFP- γ -Aktin wird bei Koexpression mit VSV-Gephyrin in Gephyrin-Makroaggregate und in Alkaloid-induzierte Mikroaggregate rekrutiert. A) Koexpression von GFP- γ -Aktin (grüner Kanal) mit VSV-Gephyrin (roter Kanal) zeigt eine deutliche Anreicherung in den Gephyrin-Makroaggregaten (Merge). B+B1) Behandlung der Zellen für 3 h mit 2 μ M Cytochalasin D führte zu einer Anreicherung von GFP- γ -Aktin in den Alkaloid-induzierten Gephyrin-Mikroaggregaten.

Abbildung 14: ena/VASP wird in Gephyrin-Aggregaten angereichert; die Rekrutierung ist abhängig von den Aminosäuren 181-243. HEK 293T-Zellen wurden für 4 h mit GFP-Gephyrin (A, B) oder GFP-Gephyrin- Δ 181-243 (C, D) transfiziert und für 3 h mit DMSO (A, C) oder 2 μ M Cytochalasin D (B, D) behandelt. (A) Die Anfärbung des endogenen ena/VASP-Anteils ergab eine deutliche Anreicherung in den Gephyrin-Makroaggregaten der unbehandelten Zellen und den (B) Gephyrin-Mikroaggregaten nach der Inkubation mit Cytochalasin D. (C) Die Deletionsmutante GFP-Gephyrin- Δ 181-243 zeigte keine Anreicherung von ena/VASP in den Makroaggregaten. (D) Die Mutante bildete keine Gephyrin-Mikroaggregate nach Cytochalasin D Behandlung, und der endogene ena/VASP-Anteil wurde in F-Aktin-Patches rekrutiert.

Abbildung 15: ena/VASP interagiert mit Gephyrin und Aktin unter anderem über die Aminosäuren 181-243. A) HEK 293T Zellen wurden transfiziert mit GFP-Gephyrin oder GFP-Gephyrin- Δ 181-243 für 24h, lysiert und mittels Immunpräzipitation (IP) und Western Blot (WB) analysiert. (A) Präzipitationen mit VASP-spezifischen Antikörper ergaben eine Kopräzipitation von GFP-Gephyrin und GFP-Gephyrin Δ 181-243. Es war eine deutliche Reduktion in der Anreicherung der Deletionsmutante zu verzeichnen (B) GST-Fusionsproteine des N-terminalen (1-181) und C-terminalen (316-736) Abschnitts von Gephyrin, der Linkerregion (169-323) und Gephyrin-Volllänge wurden mit His-VASP inkubiert. Nur Gephyrin-Volllänge und die Linkerregion waren in der Lage, VASP zu binden. (C) Aufreinigung von Gephyrin aus Hirnextrakten durch Bindung an ein GST-Fusionsprotein des intrazellulären Abschnittes der Glyzinrezeptor β -Untereinheit hatte ebenfalls die Anreicherung von Mena zur Folge. Auch Gephyrin-spezifische Antikörper kopräzipitierten Mena.

Abbildung 16: ena/VASP agiert als Linker zwischen Gephyrin und F-Aktin. Aufgereinigtes G-Aktin wurde mit GST-ena/VASP und/oder His6-Gephyrin mit/ohne ATP für 30 min inkubiert, zentrifugiert und Präzipitat und Überstand auf Gephyrin-, ena/VASP- und Aktin mittels Western-Blot (WB) analysiert. Es konnte keine Präzipitation von Gephyrin (Spur 3), ena/VASP (Spur 1) oder beiden Proteinen zusammen (Spur 2) nachgewiesen werden. Eine Kosedimentation von Gephyrin erfolgte nur in den Ansätzen, die neben ena/VASP auch F-Aktin enthielten (Spur 4). Ohne ena/VASP konnte Gephyrin nicht im F-Aktin-

Pellet angereichert werden (Spur 6). Eine schwache Gephyrin-Bande war ebenfalls im Präzipitat des G-Aktin-Ansatz nachweisbar (Spur 5).

Abbildung 17: Mena ist an inhibitorischen Synapsen lokalisiert und wird in alkaloid-induzierte F-Aktin-haltige Strukturen rekrutiert. Hippokampale Neuronen (6DIV) wurden für 6h entweder mit DMSO (A) oder 50 nM Cytochalasin D (B) behandelt. A, A1) Mena kolokalisiert partiell mit VIAAT. A2) Mena-positive Punkte liegen auf dem intakten Dendriten. B, B1) Nach Cytochalasin D-Inkubation nimmt der Anteil der Mena/VIAAT-positiven Punkte deutlich ab und Mena wird in F-Aktin-Patches rekrutiert (B2).

Abbildung 18: Die Abhängigkeit synaptisch-lokalisierter Gephyrinclustern vom Aktin-Zytoskelett nimmt mit steigender neuronaler Differenzierung ab. Hippokampale Neuronen (6DIV und 10DIV) wurden für 6h mit DMSO (A) oder 50 nM Cytochalasin D (B) behandelt. Nach der Fixierung erfolgte eine Anfärbung von Gephyrin, VIAAT und des Aktin-Zytoskelettes mittels Alexa-633 Phalloidin (A, A1) Die Gephyrin- und VIAAT-Färbung (B, B1) deutliche Größenreduktion der synaptischen Gephyrincluster (C, D) Kontrolle und Behandlung wurden statistisch ausgewertet. Jeweils (5 Aufnahmen (63x) pro Toxinkonzentration)/pro Experiment. In jedem Bild wurden die Dendriten (ca.10-15) der Neuronen vermessen (μM -Länge) und die Anzahl und Größe der Gephyrin-cluster ermittelt C+D) Gesamt (grauer Balken) Große ($>1 \mu\text{M}$) Cluster (weiser Balken) und kleine ($\sim 0.5 \mu\text{M}$) Cluster (schwarzer Balken). Die Werte wurden auf die Anzahl der Cluster pro $50 \mu\text{M}$ Dendritenlänge umgerechnet (Mittelwert \pm SEM).

Abbildung 19: Potentielle PP1-Bindungsstelle im C-Terminus von Gephyrin. Gephyrin besteht aus drei unterschiedlichen Sequenzabschnitten: einer N-terminalen G-Domäne, einer Poly-Proline-reichen Zentralen Domäne (Linkerregion) und einer C-terminalen E-Domäne. Die Linkerregion enthält eine potentielle ena/VASP-Bindungsstelle und der C-Terminus ein potentielles PP1-Motiv.

Model 1: Regulation von Gephyrin in der postsynaptischen Plasmamembran A) Gephyrin bindet direkt an Tubulin und dlc1. Die Bindung von Gephyrin an RAFT1 spielt wahrscheinlich bei der Kontrolle der lokalen Proteinsynthese an der Synapse eine Rolle. Die Aktin-regulierenden Proteine ena/VASP, Profilin und Collybistin ermöglichen eine lokale Regulation des Aktin-Zytoskeletts an der Synapse. Assoziation von PP1 und/oder PP2A ermöglicht die Regulation des Phosphorylierungsstatus von Gephyrin. B) Mena agiert als Adapter zwischen Gephyrin und dem Aktin-Zytoskelett. Die Bindung erfolgt im Poly-Proline-reichen Abschnitt der Linkerregion. Hyperphosphorylierung der Linkerregion durch eine noch nicht identifizierte Kinase hat die Dissoziation von Mena zur Folge und beeinträchtigt die Verankerung der Gephyrincluster am Zytoskelett. Gezielte Dephosphorylierung durch PP1 oder PP2A ermöglicht die Assoziation von Mena und somit die Stabilisierung der postsynaptischen Cluster.