

**Rezeptortyrosinkinasen regulieren die
Oberflächenaggregation des neuronalen
Gerüstproteins Gephyrin**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Jennifer Wuchter geb. Metzger
aus Tübingen

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Qualifikation: 20.09.2012

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hansjürgen Volkmer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Alfred Nordheim

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen,

Unterschrift

The eye sees only what the mind is prepared to comprehend.

Robertson Davies (1913-1995)

Danksagung

Zunächst möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Hansjürgen Volkmer recht herzlich für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe und unter seiner Leitung durchzuführen. Ich möchte mich außerdem für die ständige Unterstützung durch zahlreiche Diskussionen, Hilfestellungen aber auch die Möglichkeit zum Besuch verschiedener Kongresse bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Nordheim, für die Begutachtung dieser Doktorarbeit, sowie den Besuch des NMI's zu meinem Vortrag im Rahmen des Doktorandenseminars.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. Martin Kriebel. Ich konnte immer mit all meinen Fragen, sowie Vorschlägen aber auch Problemen bei Dir auftauchen, und erhielt stets Hilfe und Unterstützung. Vielen Dank dafür!

Weiterhin waren meine Kollegen und Freunde, allen voran Sabine Trinks, aber nicht minder Simone Beuter, Björn Tränkle, Alice Hettler, Beate Scholz und Dr. Jana Müller von großer Bedeutung für mich und meine Arbeit. Auch bei euch möchte ich mich sehr herzlich bedanken, für die schöne Zeit, die vielen Diskussionen, aber auch den Spaß, den wir miteinander hatten!

Außerdem gilt natürlich großer Dank, meinen anderen Kollegen, die mich immer unterstützt haben, und mir vor allem auch mit reichlich guten Tipps zur Seite standen. Großer Dank hierfür an Christine Dürr, Julia Ebel, Ursula Härle, Roswitha Fischer, Jenny Klostermann, Anja Apel, Simon Frank, Christian Schmees, Sibylle Glock, Thomas Hees und Dr. Frank Weise.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben, und immer mit großer Geduld meine Vorhaben und meine Arbeit unterstützten. Auch bei meinen Freunden möchte ich mich für die Unterstützung und Motivation bedanken. Besonders erwähnt seien hier Anja Hirschburger, Stefanie Vollmer, Bernd Vollmer, Oliver Zürn, Michael Wuchter, Katrin Wuchter, Manu und Kase Roth sowie Tobias und Tabea Lutz. Größter Dank, vor allem für die Geduld mit mir, gilt natürlich meinem Ehemann Marco Wuchter!

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	1
INHALTSVERZEICHNIS	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	2
2.1 DIE SYNAPSEN.....	2
2.2 DIE CHEMISCHE SYNAPSE	2
2.2.1 Die exzitatorische Gray Typ I Synapse	3
2.2.2 Die inhibitorische Gray Typ II Synapse	4
2.2.3 Bildung Regulation und Stabilität inhibitorischer synaptischer Verbindungen	7
2.3 REZEPTORTYROSINKINASEN.....	8
2.3.1 Neurotrophinrezeptoren – TrkB.....	8
2.3.2 Eph Rezeptoren – EphA7	10
2.4 TYPISCHE NACHGESCHALTETE INTRAZELLULÄRE SIGNALWEGE VON REZEPTORTYROSINKINASEN.....	11
2.4.1 Der Ras/Erk/MAPK Signalweg.....	11
2.4.2 PI3K – mTOR Signalweg	12
3 ZIELSETZUNG	14
4 MATERIAL UND METHODEN	15
4.1 MATERIAL	15
4.1.1 Verbrauchsmaterial	15
4.1.2 Kits	16

4.1.3	Geräte	16
4.1.4	Antikörper, rekombinante Proteine & Inhibitoren	17
4.1.5	Chemikalien	19
4.1.6	Puffer und Lösungen.....	21
4.1.7	Medien	24
4.1.8	Zelllinien	26
4.2	METHODEN.....	26
4.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	26
4.2.2	Zellkultur.....	42
4.2.3	Plasmidkarten	47
4.2.4	Immunzytochemie	50
4.2.5	Mikroskopie und auswertende Bildanalyse	50
4.2.6	Statistik.....	52
5	ERGEBNISSE.....	53
5.1	SIRNA BASIERTER SCREEN, ZUR IDENTIFIZIERUNG VON PROTEINKINASEN, WELCHE FÜR DIE REGULATION VON GEPHYRINCLUSTERN WICHTIG SIND	53
5.1.1	Neurofascin induziert FGFR1 abhängig eine Steigerung der EGFP- Gephyrinclustergröße in HeLa Zellen	53
5.1.2	Entwicklung des siRNA basierten Screens in HeLa – Zellen.....	58
5.1.3	siRNAs gegen 39 Kinasen oder kinase-assoziierte Proteine wiesen destabilisierende Effekte auf Gephyrincluster in HeLa Zellen auf.....	60
5.2	SOWOHL DER TRKB ALS AUCH DER EPHA7 REZEPTOR REGULIEREN DIE GEPHYRINAGGREGATION IN PRIMÄREN NEURONEN	67
5.2.1	Die siRNAs gegen NTRK2 und EPHA7 sind funktionell	67
5.2.2	Die siRNAs gegen NTRK2 und EPHA7 führen zu einer Reduktion von Gephyrin- und GABA _A Rezeptorclustern.....	68
5.2.3	Die Effekte der siRNA Behandlung sind spezifisch für inhibitorisch postsynaptische Systeme	70
5.2.4	Ein unabhängiger Ansatz konnte die Ergebnisse der siRNA gegen EPHA7 bestätigen.....	72
5.2.5	Präsynaptische Strukturen bleiben unbeeinflusst vom EPHA7 bzw. NTRK2 <i>knockdown</i>	73

5.2.6	Die Stimulation von TrkB und EphA7 Rezeptoren bewirkt eine Zunahme der Gephyrinclusteranzahl	74
5.3	DIE BETEILIGUNG DES PI3K-AKT-MTOR, SOWIE MAPK SIGNALWEGS AN DER REGULATION DER GEPHYRINAGGREGATION.....	77
5.3.1	Beteiligung des MAPK Signalwegs an der Gephyrinclusterung.....	77
5.3.2	Beteiligung des PI3K – Akt – mTOR Signalwegs an der Gephyrinclusterung ...	79
5.3.3	EphrinA5-Fc aktiviert den PI3K – Akt – mTOR Signalweg, nicht aber den MAPK Signalweg	82
5.3.4	Interaktion zwischen mTOR und Gephyrin als möglicher Regulationsmechanismus der Gephyrinclusterung.....	85
6	DISKUSSION.....	88
6.1	NEUARTIGE SCREENINGMETHODE ZUR FUNKTIONELLEN ANALYSE NEURONALER PROTEINE	88
6.1.1	Vergleich mit schon bestehenden Screeningmethoden.....	88
6.1.2	Etablierung und Bewertung der Screeningmethode	90
6.2	BEWERTUNG DER ERGEBNISSE DES siRNA BASIERTEN SCREENS IN HELA ZELLEN	92
6.3	VERGLEICH DER REZEPTORTYROSINKINASEN TRKB UND EPHA7.....	93
6.4	BDNF-TRKB REZEPTOR ABHÄNGIGE REGULATIONSMECHANISMEN AN EXZITATORISCHEN UND INHIBITORISCHEN SYNAPSEN.....	94
6.5	EPHRINA5-EPHA REZEPTOR ABHÄNGIGE REGULATIONSMECHANISMEN AN EXZITATORISCHEN UND INHIBITORISCHEN SYNAPSEN.....	96
6.6	PRÄSYNAPTISCHE SYSTEME BLEIBEN UNBEEINFLUSST	97
6.7	FUNKTIONELLE INTERAKTION ZWISCHEN MTOR UND GEPHYRIN ALS REGULATIONSMECHANISMUS	98

6.8	AUSBLICK	100
7	PUBLIKATIONEN.....	102
7.1	PUBLIKATIONEN	102
7.2	KONGRESSBEITRÄGE.....	102
8	REFERENZEN.....	103

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
AIS	Axoninitialsegment
Akt; <i>Akt</i>	Auch Proteinkinase B genannt
Amp	Ampicillin
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
A-raf	<i>Eine Isoform des Raf Protein</i>
bidest H ₂ O	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAM	<i>cell adhesion molecule</i> – Zelladhäsionsmolekül
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CD	cytoplasmatische Domäne
CMV	Cytomegalivirus
d	Tage
Da	Dalton
dn	dominant negativ
dest.	Destilliert
DIV	<i>days in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DYRK1A, <i>DYRK1A</i>	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase1A</i>
E17	Embryonaltag 17
ED	extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (Grün fluoreszierendes Protein)
EphA7, <i>EphA7</i>	Epha7 Protein
Erk1/2, <i>Mapk3</i>	Mitogen-activated protein kinase 3
Fc	Fc-Fragment von Immunglobulinen
FKS	fötale Kälberserum

FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FNIII	Fibronektindomäne III
FRS2, <i>Frs2</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
g	gramm
g	Gravitationskonstante ($g=9,81 \text{ m/s}^2$)
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A R.	γ -Aminobuttersäure Rezeptor Typ A
GAD	Glutamatdecarboxylase
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
Geph	Gephyrin
Grb2, <i>Grb2</i>	<i>Growth factor receptor-bound protein 2, Adapter protein GRB2</i>
h	Stunde(n)
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> =Meerrettichperoxidase
Hybr. Überst.	Hybridoma-Überstand
HCl	Salzsäure
K ⁺	Kalium
Kana	Kanamycin
m	milli
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK, <i>MAP2K2</i>	<i>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2</i> Protein, Genname ist MAP2k2
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minuten
mRNA	Messenger RNA
mTOR, <i>MTOR</i>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
N	Nukleotide
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NEAA	<i>non essential aminoacids</i>
NEB	<i>New England biolabs</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$
P	postnatal

PAT	Prolinreiche Domäne
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1, <i>Pdk1</i>	Pdk 1 Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase
PIK3C2G	Genname: phosphoinositide-3-kinase, class 2, gamma polypeptide
PIK3CB	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide
PIK3C3	phosphoinositide-3-kinase, class 3
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>
PLL	Poly-L-Lysin
RAF, <i>RAF1</i>	<i>Rat fibrosarcoma</i> , oder <i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras, <i>Ras</i>	<i>Rat sarcoma</i>
Rheb, <i>Rheb</i>	<i>GTP-binding protein Rheb</i>
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>rotations per minute</i>
s.c.	Sub cutan (Injektion unter die Haut)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> ; Natriumdodecylsulfat
SHC, <i>SHC3</i>	<i>SHC-transforming protein 3</i>
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
Sos1, <i>SOS1</i>	Son of sevenless homolog1
Sprouty2, <i>Spry-2</i>	Sprouty2
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	<i>tris buffered saline containing Tween-20</i>
TESK1, <i>Tesk1</i>	Dual specificity testis-specific protein kinase 1, Testicular protein kinase 1
TM	Transmembrandomäne
TrkB, <i>Ntrk2</i>	<i>BDNF/NT-3 growth factors receptor</i>
TSC1/2, <i>TSC1 bzw. 2</i>	<i>Tuberous sclerosis protein 1 bzw. 2</i>

U	Units
V	Volt
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
ü.N.	über Nacht
VGlut	vesikulärer Glutamat Transporter
v/v	Volumenprozent
v/w	Gewichtsprozent
WDT	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte
w/o	<i>without</i> (ohne)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Es ist hinlänglich beschrieben, dass die Regulation der Stabilität des Gerüstproteins Gephyrin von großer Bedeutung für die Oberflächenclusterung von Rezeptoren der inhibitorischen Postsynapse ist. Interaktionen zwischen Gephyrin und GABA_A-, sowie Glyzin Rezeptoren spezifischer Zusammensetzung sind publiziert.

Weitaus weniger ist jedoch über die Regulation der Oberflächenexpression und – lokalisation von Gephyrin selbst bekannt. Aufgrund der Interaktion mit oben beschriebenen Rezeptoren kommt der Regulation von Gephyrin daher eine große Bedeutung im Hinblick auf Bildung und Stabilität inhibitorischer Postsynapsen zu.

In dieser Arbeit wurde dabei in einem ersten Abschnitt die Etablierung und Durchführung eines RNAi basierten Screeningsystems in den Vordergrund gestellt. Dabei wurden 710 verschiedenen Kinasen oder Kinase-assoziierte Proteine auf ihre Effekte in der Gephyrin-Regulation untersucht. Dieses Screeningsystem basiert auf der Überexpression von Gephyrin und anderen Komponenten der inhibitorischen Postsynapse in HeLa Zellen.

Die 39 im Screen identifizierten, sogenannten Hits wurden dann in systematische Signalwege eingeordnet. Hierbei wurden verschiedene Rezeptortyrosinkinasen, aber auch typische den Rezeptortyrosinkinasen zugeordnete Signalwege identifiziert.

Zur weiterführenden Untersuchung in primären Neuronen wurden die Rezeptortyrosinkinasen TrkB und EphA7 ausgewählt.

Die weitere Validierung dieser Rezeptortyrosinkinasen auf Effekte in der Gephyrinclusterung, wurden im primären und hochrelevanten Zellsystem primärer Neurone mit Hilfe weiterer siRNA basierter-, aber auch unabhängiger Experimente, wie zum Beispiel der Stimulation mit rekombinanten Proteinen durchgeführt.

Im weiteren Verlauf konnten über Kopräzipitationsanalysen gezeigt werden, dass die Interaktion von Gephyrin und mTOR durch diese Rezeptortyrosinkinasen und ihre intrazellulär aktivierten Signalwege beeinflusst wird, was einen möglichen Regulationsmechanismus darstellte. Somit ergab sich insgesamt ein möglicher Regulationsmechanismus der Gephyrinaggregation über Rezeptortyrosinkinasen und ihre intrazellulär weiterführenden Signalwege.

2 Einleitung

Das menschliche Gehirn ist ein hoch komplexes Organ, welches sich in strukturelle Einheiten unterteilen lässt. Im Vertebratengehirn sind hierfür der Hippocampus, der Kortex, das Kleinhirn oder auch die strukturell klar abgegrenzte Amygdala Beispiele (Jarrard, 1993, Gallagher and Chiba, 1996). Die einzelnen Gehirnabschnitte können durch neuronale Verbindungen miteinander kommunizieren (Bear et al., 2009). Diese Verbindungen bestehen, aus von Neuronen, ausgesandten Axonen. Eine Gesamtzahl von ca. 100 Milliarden Neuronen bewerkstelligt dabei eine hochgradig vielfältige Verbindung einzelner Gehirnabschnitt miteinander, aber auch Verbindungen innerhalb eines funktionellen Gehirnabschnitts (Hyman, 2005). Neurone bestehen aus einem Zellkörper (Soma), dendritischen Ausläufern, sowie meist einem Axon. Das Axon bildet dabei die funktionelle Einheit, über welche das Neuron Erregungen auf andere Neurone weiterleiten kann. Ein einzelnes Neuron kann dabei über sein Axon und dessen Verzweigungen bis zu 1000 synaptische Kontakte mit anderen Neuronen ausbilden. So kann man im gesamten Gehirn von einer Anzahl an ca. $10^{14} - 10^{15}$ Synapsen ausgehen (Hyman, 2005). Die Synapsen werden früh in der Entwicklung gebildet, sind aber nicht statisch, sondern können durch Lernprozesse aber auch durch Erkrankungen kurzfristig oder auch dauerhaft verändert, neu ausgebildet oder eliminiert werden (Turrigiano, 1999, Harrison, 2004, Luscher and Keller, 2004, Jin et al.).

2.1 Die Synapsen

Man unterscheidet zwischen elektrischen und chemischen Synapsen. Elektrische Synapsen erlauben eine direkte Ladungsübertragung über *gap junctions*, welche aus hexameren Komplexen, den sogenannten Connexonen, aufgebaut sind. Diese hexagonalen Komplexe bilden Poren aus, welche die passive Erregungsweiterleitung erlauben (Purves D, 2001a, Flores et al., 2012). Während elektrische Synapsen zum Beispiel im Herz oder auch dem Nucleus reticularis des Thalamus vorkommen (Purves D, 2001a), sind chemische Synapsen im Vertebratengehirn weiter verbreitet (Eric R. Kandel, 2000).

2.2 Die chemische Synapse

Chemische Synapsen bestehen immer aus prä- und postsynaptischen Bereichen, die sich exakt gegenüberliegen (Craig et al., 2006). In der Präsynapse findet man

spezialisierte Strukturen (aktive Zonen), die nach Eintreffen eines Aktionspotentials, Ca^{2+} abhängig Neurotransmitter in den synaptischen Spalt ausschütten (Eric R. Kandel, 2000, Schneggenburger and Neher, 2000). Freigesetzte Neurotransmitter diffundieren durch den synaptische Spalt und binden an der postsynaptischen Membran an für sie spezifische Rezeptoren (Purves D, 2001b). Diese Art der Übertragung führt zwar zu einer Verlangsamung der Erregungsübertragung im Vergleich zu elektrischen Synapsen, jedoch kann die Übertragung moduliert werden. Über die Art der Neurotransmitter auf der präsynaptischen- und die Art der Rezeptoren auf der postsynaptischen Seite wird eine exzitatorische oder inhibitorische Wirkung ausgebildet. (Gray, 1959, Eric R. Kandel, 2000, Scheiffele, 2003, Lardi-Studler and Fritschy, 2007).

2.2.1 Die exzitatorische Gray Typ I Synapse

Gray Typ I Synapsen sind exzitatorisch, haben einen synaptischen Spalt von 30 nm, und sind durch klare runde Neurotransmittervesikel charakterisiert. Außerdem erscheint die Synapse auf Grund von ungleich verteilten Proteinen auf der prä- und postsynaptischen Membran asymmetrisch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Gray, 1959, Eric R. Kandel, 2000). Die Neurotransmitter auf der präsynaptischen Seite, sowie die Rezeptoren auf der Postsynapse definieren den Typ der exzitatorischen Synapse. So finden sich auf der präsynaptischen Seite Neurotransmittervesikel, welche vor allem exzitatorisch wirkendes Glutamat enthalten. Auf der postsynaptischen Seite befinden sich für Glutamat spezifischen Rezeptoren. Hierbei unterscheidet man ligandgesteuerte metabotrope (mGluR) und ionotrope Glutamatrezeptoren. Metabotrope Rezeptoren bestehen aus 7 Transmembrandomänen und aktivieren nach Bindung eines Liganden über verschiedene G-Proteine eine *second messenger* Kaskade, die vor allem bei modulatorischen- und Plastizitätsprozessen eine große Rolle spielt (Bortolotto et al., 1994, Nakanishi, 1994). Die schnellen ionotropen Rezeptoren wie NMDA oder auch AMPA/Kainat Rezeptoren ändern nach Ligandenbindung ihre Konformation und erlauben so den direkten Einfluss von Ionen durch einen nun offenen, selektiven Porenkanal (Eric R. Kandel, 2000). Vor allem NDMA Rezeptoren sind besonders zu erwähnen, da sie in Lernprozessen (*long term potentiation*, LTP) eine große Rolle spielen (Lu et al., 2001). Neben den verschiedenen Rezeptortypen ist diesbezüglich auch die Kalzium-Calmodulin abhängige Kinase (CaMKII) für Lernprozesse von großer Bedeutung (Malinow et al., 1989, Wu et al., 2006). Diese Kinase führt

phosphorylierungsabhängig zur vermehrten Rekrutierung von AMPA/Kainat Rezeptoren in die postsynaptische Membran. Gleichzeitig wird durch die CaMKII die Leitfähigkeit dieser Ionenkanäle gesteigert (Soderling, 1993). Des Weiteren findet man in der postsynaptischen Dichte (beinhaltet alle Proteine der Postsynapse) Proteine der MAGUK Familie (membranassoziierte Guanylatkinase-Familie), deren bekanntester Vertreter PSD95 (*postsynaptic density protein 95*) ist (Kim and Sheng, 2004, Xu). Über seine drei PDZ Domänen (PSD95/Discs large/Zona occludens-1) interagiert PSD95 mit NMDA Rezeptoren, Zelladhäsionsmolekülen sowie mit Molekülen des Zytoskeletts. So ist PSD95 an der Verankerung und Organisation der postsynaptischen Neurotransmitterrezeptoren beteiligt (Allison et al., 1998, Goda and Davis, 2003, Kim and Sheng, 2004, Lardi-Studler and Fritschy, 2007). Auch AMPA/Kainat Rezeptoren werden indirekt durch PSD95 reguliert. Diese Rezeptoren binden an Stargazin, welches seinerseits, mit PSD95 interagiert (Chen et al., 2003).

2.2.2 Die inhibitorische Gray Typ II Synapse

Die Gray Typ II Synapsen sind meist inhibitorisch, haben eher elliptische Neurotransmittervesikel und die Synapse erscheint im Elektronenmikroskop symmetrisch aufgebaut (Gray, 1959, Eric R. Kandel, 2000, Lardi-Studler and Fritschy, 2007). Auf der präsynaptischen Seite von inhibitorischen Synapsen kommen vor allem die Neurotransmitter GABA und Glyzin vor. Außerdem beinhaltet die Präsynapse, Proteine, welche zur Wiederaufnahme von zum Beispiel GABA aus dem synaptischen Spalt (GAT-1, GABA Transporter) benötigt werden (Borden, 1996, Chaudhry et al., 1998), sowie Enzyme, welche den Abbau von GABA enzymatisch katalysieren (GAD65, Glutamat Decarboxylase) (Wu et al., 2007). Diese Transporter und Enzyme sind sehr gut geeignet, um als Markerproteine für den Nachweis inhibitorischer Präsynapsen zu dienen (O'Sullivan et al., 2009). Auf der postsynaptischen Seite inhibitorischer Synapsen sind ebenfalls diverse Neurotransmitterrezeptoren zu finden. GABA Rezeptoren machen im Bereich des ZNS den größten Anteil aus, wobei zu den inhibitorischen Rezeptoren auch die Glyzin-Rezeptoren zählen. Diese sind vor allem im Hirnstamm und dem Rückenmark zu finden. Es gibt 3 Haupttypen an GABA Rezeptoren, nämlich die GABA_A, GABA_B und GABA_C Rezeptoren. Die GABA_B-Rezeptoren sind metabotrope Rezeptoren, bestehend aus 7 Transmembrandomänen, welche ihre Erregung meist an inhibitorisch wirkende G(i)-Proteine weiterleiten und so zur Ausbildung von IPSPs

(inhibitory postsynaptic potential) führen. Die GABA_B-Rezeptoren wirken so oft als Ca²⁺ abhängige Feedback Regulatoren (Klaus Aktories, 2005). GABA_A und GABA_C Rezeptoren hingegen sind ionotrope Rezeptoren. Die GABA_C-Rezeptoren unterscheiden sich von den GABA_A-Rezeptoren vor allem in ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren. GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren bestehen aus 5 Untereinheiten in unterschiedlicher Zusammensetzung. Insgesamt unterscheidet man bei den GABA_A-Rezeptoren 6 α -, 4 β - und 3 γ -Untereinheiten sowie die seltener exprimierten ρ , δ , ϵ , θ , oder π -Untereinheiten. Die am häufigsten im Gehirn vorkommenden GABA_A-Rezeptoren bestehen aus zwei α , zwei β und einer γ Untereinheit (Fritschy et al., 2003, Luscher et al.). Ionotrope Glyzinrezeptoren sind ebenfalls pentamer aufgebaut und bestehen hauptsächlich aus drei α und zwei β Untereinheiten. Ein weiteres wichtiges Protein der inhibitorischen Postsynapse ist das Gerüstprotein Gephyrin. Es ist bekannt, dass Gephyrin mit GABA_A Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ in primären Neuronen *in vitro* und *in vivo* kolokalisiert (Essrich et al., 1998).

2.2.2.1 Das Gerüstprotein Gephyrin

Gephyrin besteht aus 2 Hauptdomänen (E und G-Domäne), welche durch die prolinreiche und zentralgelegene C-Domäne verbunden sind. Im Gegensatz zu typischen Strukturproteinen der exzitatorischen Postsynapse enthält Gephyrin keine

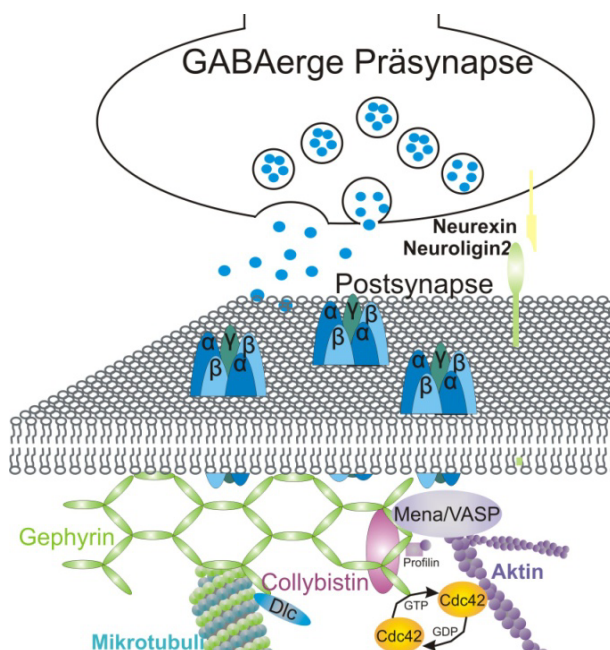


Abbildung 1 Schema einer inhibitorischen Postsynapse. Dargestellt sind mögliche Interaktionspartner des Gerüstproteins Gephyrin.

PDZ Domäne, bildet aber *in vitro*, wahrscheinlich durch Autooligomerisierung, unterhalb der Membran ein Gerüst aus (Langosch et al., 1992, Lardi-Studler and Fritschy, 2007). Dabei bildet die N-terminale G-Domäne in Lösung Trimere, während die C-terminale E-Domäne zur Dimerisierung tendiert (Lardi-Studler and Fritschy, 2007, Saiyed et al., 2007). Gephyrin bindet an eine Vielzahl von Proteinen der inhibitorisch postsynaptischen Membran. Es interagiert mit dem zyttoplasmatischen Protein Collybistin, welches für die

Translokation von Gephyrin an die Membran unerlässlich ist. Collybistin ist ein kleines GTP-Austausch Molekül (GEF, *GTP exchange factor*), welches normalerweise Cdc42 und somit dessen Wirkung auf das Aktinzytoskelett reguliert. Man unterscheidet drei Collybistin Isoformen (CollybistinI; CollybistinII und *hPEM-2 like*) sowie verschiedene Varianten, die sich durch die Präsenz einer N-terminale SH3 Domäne unterschieden werden (Bsp.: CBII_{SH3+} und CBII_{SH3-}). Die vorherrschende Variante im Gehirn der Ratte stellt das SH3 Domäne beinhaltende Collybistin (CBII_{SH3+}) dar. Die SH3 Domäne wirkt als ein Negativregulator der Translokation von Gephyrin an die Membran (Fallon, 2000, Kins et al., 2000, Harvey et al., 2004, Reddy-Alla et al.). In Neuronen wird diese inhibitorische Wirkung wahrscheinlich durch die Bindung an das Zelladhäsionsmolekül Neuroligin-2 (ebenfalls ein Interaktionspartner von Gephyrin) aufgehoben (Graf et al., 2004, Pouloupoulos et al., 2009, Thomson and Jovanovic, 2010). In artifiziellen Systemen kann die CBII_{SH3-} Variante zur Überexpression verwendet werden, wodurch eine Translokation von Gephyrin an die Zellmembran dauerhaft stattfinden kann (Fallon, 2000, Harvey et al., 2004). Die Bindung von Gephyrin an Collybistin verhindert die Interaktion von Collybistin mit Cdc42, was eine indirekte Wirkung auf das Aktinzytoskelett zur Folge hat. Gleichzeitig bindet Gephyrin selbst an verschiedene Komponenten des Zytoskeletts, wie zum Beispiel die Mena/Vasp (mammalian enabled/vasodilator stimulated phosphoprotein) Familie, sowie an Profilin (Giesemann et al., 2003, Lardi-Studler and Fritschy, 2007). Außerdem bindet Gephyrin an polymerisiertes Tubulin und an das Mikrotubuli-abhängige Motorprotein Dynein, was für Stabilität sorgt und den zytoplasmatischen Transport von Gephyrin erleichtert (Fallon, 2000, Luscher and Keller, 2004, Fritschy et al., 2008). Eine direkte Interaktion von Gephyrin konnte mittlerweile mit der β -Untereinheit von Glyzinrezeptoren, sowie mit den α_2 und α_3 Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren beschrieben werden (Kirsch et al., 1995, Fallon, 2000, Luscher and Keller, 2004, Lardi-Studler and Fritschy, 2007, Jacob et al., 2008, Tretter et al., 2008, Saiepour et al., 2010, Tretter et al., 2011). Der Komplex aus Gephyrin, CollybistinII und GABA_A Rezeptoren bedingt gegenseitig die Oberflächenlokalisation. In Collybistin-defizienten Mäusen zeigt sich ein deutlich reduziertes Niveau an Gephyrin, sowie der γ_2 -Untereinheit der GABA_A-Rezeptoren (Kneussel et al., 1999, Papadopoulos et al., 2007, Yu et al., 2007, Papadopoulos et al., 2008, Saiepour et al.). Gleichzeitig führt die Herunterregulation von Gephyrin zu einer Abnahme der γ_2 -Untereinheit

beinhaltenden GABA_A Rezeptoren, während eine Herunterregulation der γ_2 -Untereinheit im Tiermodell zu einer Reduktion von Gephyrin an der Oberfläche führt (Essrich et al., 1998, Schweizer et al., 2003, Jacob et al., 2005, Yu et al., 2007). Dies unterstreicht die wichtige Rolle von Gephyrin in der Stabilisierung von GABA_A – und Glyzin Rezeptoren.

2.2.3 Bildung Regulation und Stabilität inhibitorischer synaptischer Verbindungen

Initiale Zellkontakte von prä- und postsynaptischer Membran werden wahrscheinlich über Zelladhäsionsmoleküle wie SynCAM oder Neurexin-Neurologin stabilisiert (Biederer et al., 2002, Graf et al., 2004). Durch falsche Paarungen, von zum Beispiel exzitatorischen Prä- und inhibitorischen Postsynapsen kann keine elektrische Aktivität zustande kommen. In diesem Fall können diese fehlgepaarten Synapsen wieder eliminiert werden (Fritschy et al., 2003, Huang and Scheiffele, 2008). Eine Voraussetzung für neuronale Aktivität ist die Organisation postsynaptischer Rezeptoren. Während der Entwicklung und Bildung synaptischer Rezeptoren scheint Gephyrin hier auf glyzinergeren Rezeptoren zu wirken (Levi et al., 2004). GABAerge Rezeptorkomplexe können sich dahingegen auch ohne die Anwesenheit von Gephyrin ausbilden, während es für die Stabilisierung bestimmter GABA_A-Rezeptoren (in einer Zusammensetzung von z.B. $\alpha_2\beta_3\gamma_2$) benötigt wird (Essrich et al., 1998, Luscher and Keller, 2004).

Die Stabilisierung von GABA_A- und Glyzinrezeptoren ist also zu Teilen abhängig von Gephyrin. Wie aber die Stabilität von Gephyrin selbst reguliert wird, konnte bis heute noch nicht genau beschrieben werden. In einigen Publikationen wird dem Zytoskelett eine Beteiligung an der Gephyrinregulation zugeschrieben. Veränderungen im Zytoskelett (sowohl Mikrotubuli, als auch des Aktinzytoskeletts) führen hierbei zu Veränderungen in der Organisation von Gephyrin und Glyzin Rezeptoren (Kirsch and Betz, 1995). Hierbei ist vor allem die Rolle der GTPase Cdc42 kontrovers diskutiert. Es ist beschrieben, dass eine Inaktivierung des Cdc42 Gens im Vorderhin keinen Effekt auf Gephyrincluster hat. In der gleichen Veröffentlichung wurde gezeigt, dass die PH Domäne von CBII_{SH3}- ausreichend für die Gephyrintranslokation an synaptische Cluster ist (Reddy-Alla et al.). Auf der anderen Seite konnte durch (Tyagarajan et al.) gezeigt werden, dass nach Überexpression einer CollybistinII Variante ohne PH Domäne, Gephyrin nicht mehr in Membrancluster lokalisiert ist.

Dieser Phänotyp konnte durch eine konstitutiv aktive Variante von Cdc42 „gerettet“ werden (Tyagarajan et al., 2011a).

Auf der anderen Seite sind einige Arbeiten bekannt, die bei der Regulation von Gephyrin auf die Möglichkeit von Phosphorylierungs/Dephosphorylierungsvorgängen zurückgreifen. Es konnte schon früh gezeigt werden, dass Gephyrin an bestimmten Serin- und Threoninbereichen phosphoryliert wird (Langosch et al., 1992). Außerdem ist bekannt, dass Gephyrin durch die Glykogen Synthase Kinase3 β (GSK3 β) phosphoryliert wird und mit der Proteinphosphatase1 interagiert (Bausen et al., 2010, Tyagarajan et al., 2011b). Dies könnte einen Hinweis auf kinaseabhängige Regulationsmechanismen in der Gephyrinclusterung geben.

2.3 Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen sind Transmembranproteine, welche nach ihrer Aktivierung spezifische intrazelluläre Signalwege modulieren können (Harvey Lodish, 2004). Der Ablauf der Aktivierung und Weiterleitung der Signale ist bis auf einige wenige Ausnahmen sehr ähnlich. Nach Bindung eines für den Rezeptor spezifischen Liganden kommt es bei den Rezeptortyrosinkinasen zur Dimerisierung. Durch Transphosphorylierung kommt es zur Aktivierung der Kinasedomänen, welche anschließend die phosphorylierungsbedingte Rekrutierung von Adaptermolekülen bewirken. Weitere Signalmoleküle binden an die Adaptermoleküle und werden meist durch Phosphorylierung aktiviert. Die Art der Phosphorylierungen und der Adaptermoleküle entscheidet dabei über die Aktivierung verschiedener Signalwege (Harvey Lodish, 2004, Reichardt, 2006).

2.3.1 Neurotrophinrezeptoren – TrkB

Ein typisches Beispiel für Rezeptortyrosinkinasen sind die Neurotrophinrezeptoren. Die Gene von Neurotrophinen zeigen untereinander eine sehr hohe Homologie. Das Gleiche gilt auch für ihre Rezeptoren (Reichardt, 2006). Man unterscheidet 4 verschiedene Neurotrophin Rezeptoren: p75NTR, TrkA, TrkB und TrkC. Drei dieser Rezeptoren gehören der Trk Unterfamilie an (TrkA, TrkB und TrkC). Die extrazellulären Domänen dieser Rezeptoren bestehen alle aus einer Abfolge eines Cystein-reichen Bereichs, gefolgt von 3 Leucinreichen Einheiten, auf die wiederum ein weiterer Cystein-reicher Bereich sowie 2 zusätzliche Immunglobulinähnliche Domänen folgen. Außerdem beinhalten die Rezeptoren eine Transmembrandomäne, sowie eine im zytoplasmatischen Bereich befindliche Tyrosinkinasedomäne (Shelton

et al., 1995, Reichardt, 2006). Im Gegensatz zum p75NTR Rezeptor, welcher selbst keine Rezeptortyrosinkinase ist, folgen die Trk Rezeptoren der oben beschriebenen üblichen Aktivierung und Aktivierungsförderung von Rezeptortyrosinkinasen. Die Liganden für die Trk Rezeptoren sind Neurotrophine, welche mit unterschiedlicher Affinität ihre Rezeptoren binden und aktivieren können. Dabei bindet NGF (*nerve growth factor*) vor allem den TrkA Rezeptor, NT-4 (Neurotrophin-4) und BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) vor allem den TrkB Rezeptor, sowie NT-3 (Neurotrophin-3) den TrkC Rezeptor (Schechterson and Bothwell, 2010). Alle diese Liganden, sowie ihre Vorläuferformen binden ebenfalls den 4. Neurotrophinrezeptor p75NTR (Reichardt, 2006). Der p75NTR Rezeptor gehört zur Familie *der tumor-necrosis receptor* Unterfamilie. Diese Art Rezeptor besitzt kein katalytisches Motiv, durch die direkte Bindung an nachgeschaltete Moleküle kann aber trotzdem eine Signalweiterleitung stattfinden (He and Garcia, 2004).

In dieser Arbeit findet vor allem der TrkB Rezeptor besondere Beachtung. Der BDNF/NT-4 – TrkB Rezeptorsignalweg ist sowohl während der Entwicklung, als auch im adulten Gehirn von großer Bedeutung. So werden diesem Signalweg besondere Aufgaben während des Neuronenwachstums, dem Zellüberleben, dem Wachstum von Dornfortsätzen (Spines), der Regulation der Balance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen sowie der Stabilisierung und Bildung von Synapsen zugeschrieben (Patapoutian and Reichardt, 2001, Elmariyah et al., 2004, Fayard et al., 2005, Ji et al., 2005, Chao et al., 2006, Cunha et al., 2010, Fobian et al., 2010). Besonders wichtig für diese Arbeit ist die Rolle des TrkB Rezeptors und seiner Liganden in der Bildung und Stabilisierung von inhibitorischen Synapsen. Die Literatur ist hier allerdings sehr kontrovers. Es gibt sowohl Meinungen, welche eine Verminderung aber auch solche, die eine Zunahme der postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren nach BDNF Stimulation beschreiben (Brunig et al., 2001, Luscher and Keller, 2004). Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Herunterregulation (shRNA vermittelt) oder Blockierung (antikörpervermittelt) des TrkB Rezeptors zur Reduktion inhibitorischer synaptischer Rezeptoren führt. Des Weiteren scheint BDNF, die außerdem für die Ausbildung von synaptischen Endigungen wichtige neuronale Erregung zu unterstützen (Bao et al., 1999, Marty et al., 2000, Seil and Drake-Baumann, 2000, Elmariyah et al., 2004, Chen et al.). Als möglicher Kompromiss zwischen den entgegenstehenden Meinungen konnte mittlerweile gezeigt werden, dass bei kurzzeitiger BDNF Behandlung eine Reduktion der GABA_A

Rezeptoren zu messen ist, während nach längerer Behandlung die Anzahl an GABA_A Rezeptoren deutlich zunimmt (Elmariah et al., 2004). Gleichzeitig konnte hier gezeigt werden, dass die Zunahme an GABA_A Rezeptoren zeitlich vor der Zunahme von NMDA-Rezeptoren und PSD-95 stattfindet. Diese zeitliche Differenz deutet darauf hin, dass die Aktivität der GABA_A Rezeptoren für die Bildung neuer exzitatorischer synaptischer Rezeptoren grundlegend ist (Elmariah et al., 2004). Des Weiteren können Ca²⁺ abhängige Mechanismen zur positiven Feedback-Regulation zwischen BDNF und GABA_A-Rezeptoren beitragen (Porcher et al., 2011).

2.3.2 Eph Rezeptoren – EphA7

Die Eph Rezeptoren bilden die größte bekannte Rezeptortyrosinkinasefamilie (Pasquale, 1997). Sie besteht aus 14 Mitgliedern, wobei 9 zu den EphA Rezeptoren und 5 zu den EphB-Rezeptoren zählen (1997, Flanagan and Vanderhaeghen, 1998, Lai and Ip, 2009). Aufgebaut sind die Rezeptoren aus N-terminalen Ig-Domänen, gefolgt von einem Cystein-reichen Bereich sowie zwei Fibronectin ähnlichen Domänen. Es folgen die Transmembrandomäne sowie der zytoplasmatische Teil, welcher eine Kinasedomäne besitzt (Pasquale, 1997). Die Eph Rezeptoren können durch Dimerisierung, aber besonders effizient durch eine Multimerisierung aktiviert werden (Davis et al., 1994, Lackmann et al., 1998). Die Liganden dieser Rezeptortyrosinkinasefamilie unterteilen sich, wie die Rezeptoren selbst, in eine A und eine B Subklasse. Es gibt 5 EphrinA- und 3 EphrinB Liganden. Die Bindung der Liganden ist nicht sehr spezifisch für ihre Rezeptoren, jedoch kann bis auf die Ausnahme EphA4 beschrieben werden, dass EphrinA Liganden hauptsächlich an EphA Rezeptoren binden. Die Liganden liegen dabei untypischerweise membrangebunden vor (EphrinA-Liganden über GPI Anker, EphrinB-Liganden mit Transmembrandomäne) (Lai and Ip, 2009). Diese Besonderheit der Ephrin-Liganden ermöglicht eine beidseitige Signalübertragung. Das heißt, sowohl die Liganden, als auch die Rezeptoren können Signalweiterleitung in der Zelle auslösen („*reverse signaling*“) (Klein, 2009, Lai and Ip, 2009). Beispiele für durch EphA-Rezeptoren aktivierte Signalwege sind der PI3 Kinase- und der Ephexin-Aktinzytoskelett-Signalweg (Shamah et al., 2001, Gu and Park, 2003). Die Funktionen von Eph Rezeptoren sind sehr weitreichend. Vor allem in der Entwicklung ist die repulsive Wirkung von Eph Rezeptoren in der axonalen Wegfindung sehr gut beschrieben (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998, Yue et al., 2002). Außerdem sind vor allem für die EphB Rezeptoren auch Funktionen in der Synapsenbildung beschrieben. EphB

Rezeptorstimulation führt dabei zur Ausbildung vermehrter exzitatorischer Synapsen sowie zur Reifung und Ausbildung dendritischer Spines (Kayser et al., 2006, Klein, 2009, Lai and Ip, 2009).

2.4 Typische nachgeschaltete intrazelluläre Signalwege von Rezeptortyrosinkinasen

Es existieren verschiedene Signalwege, welche nach der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen angesprochen werden können. Auch die eigentliche Aktivierung erfolgt je nach Zelltyp und Rezeptor über verschiedene Adapterproteine. Es wird daher im Folgenden nur ein grober Überblick über zwei mögliche Signalkaskaden gegeben.

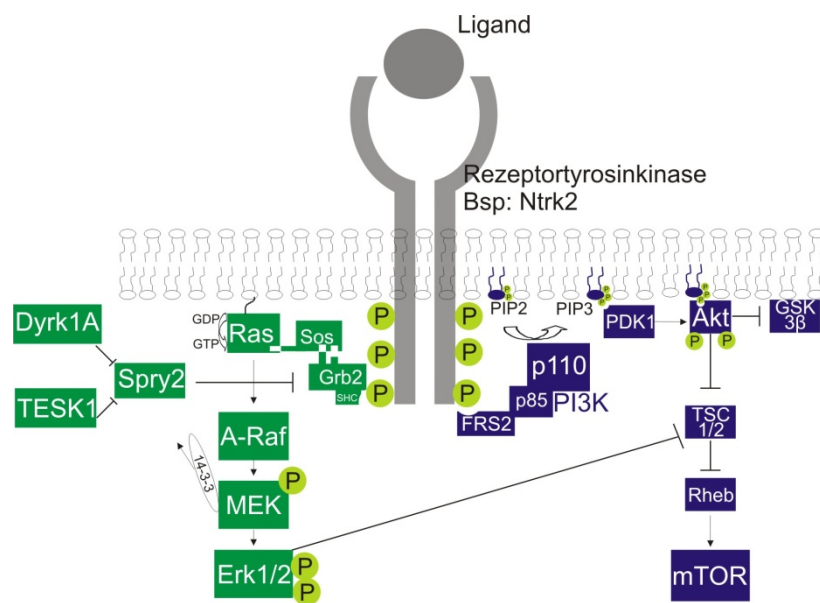


Abbildung 2 Schematische Darstellung des MAPK, sowie des PI3K Signalwegs. Es sind nicht alle beteiligten Moleküle und Interaktionswege dargestellt. Links der Rezeptortyrosinkinase ist der MAPK Signalweg, rechts der PI3K Signalweg dargestellt. Pfeile stehen für die Aktivierung. Pfeile mit Querbalken stehen für Inhibition. (Abkürzungen sind dem dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.)

2.4.1 Der Ras/Erk/MAPK Signalweg

Der *mitogen activated protein* (MAP) Kinase Signalweg ist ein sehr gut beschriebener und weit verbreiteter Signalweg, wobei er auf zahlreiche Zielproteine wirken kann. So kann es nach Aktivierung dieses Signalwegs zu zellulären Prozessen wie Differenzierungsreaktionen, neuronalen morphologischen Prozessen (Morphologie), Überleben der Zellen, Proliferation, aber auch zum programmierten Zelltod kommen (Pearson et al., 2001, Harvey Lodish, 2004, Buchser et al., 2010). Am Beispiel des TrkB Rezeptors kommt es nach dessen Autophosphorylierung zur Rekrutierung von Shc am Tyrosin515 des Rezeptors. Shc wird durch den TrkB Rezeptor phosphoryliert und rekrutiert das Adapterprotein Grb2. Dieses rekrutiert

und aktiviert das GEF (*GTP exchange factor*) SOS (*son of sevenless*). SOS hilft inaktives Ras durch Austausch von GDP gegen GTP zu aktivieren (Yoshii and Constantine-Paton, 2010). Ras selbst phosphoryliert und aktiviert Raf, welches selbst MEK aktivieren kann. MEK wiederum führt durch Phosphorylierung zur Aktivierung von Erk. Erk kann dann verschiedene Prozesse in der Zelle auslösen. Die Erk1/2 abhängige Phosphorylierung von Synapsin ist zum Beispiel wichtig für die *short-term-plasticity* (Kurzzeitplastizität) (Giachello et al., 2010). Außerdem ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB für die *long-term-plasticity* (Langzeitplastizität) wichtig (Reichardt, 2006, Yoshii and Constantine-Paton, Carriere et al., 2011).

2.4.2 PI3K – mTOR Signalweg

Der PI3 Kinase Signalweg ist wie auch der MAP Kinase Signalweg sehr gut beschrieben und wird verschiedenen zellulären Prozessen zugeordnet. In Neuronen ist zum Beispiel die Regulation der neuronalen Morphologie, die dendritische Größe und die Ausbildung komplexer dendritischer Netzwerke, aber auch die Zellmigration vom PI3 Kinase Signalweg beeinflusst (Gu and Park, 2003, Kumar et al., 2005, Buchser et al., 2010). Um beim Beispiel der TrkB Rezeptor Aktivierung zu bleiben, kann es über das phosphorylierte Tyrosin490 zur Rekrutierung von Shc oder auch FRS2 kommen (Yoshii and Constantine-Paton, 2010). Dies wiederum erlaubt die Rekrutierung von PI3 Kinasen. Die Aktivierung sowie Änderung der Lokalisierung der PI3 Kinase in die unmittelbare Nähe zu den Phospholipiden der Membran erlaubt die Phosphorylierung der Phospholipide. PIP2 (Phosphatidylinositol-2-phosphat) wird phosphoryliert, wobei PIP3 (Phosphatidylinositol-2,3bisphosphat) entsteht. PIP3 kann dann Akt (Proteinkinase B) sowie PDK1 rekrutieren, was zusammen zu einer Aktivierung von Akt führt. Es wurde beschrieben, dass Akt selbst die β_2 Untereinheit von GABA_A Rezeptoren phosphoryliert und so die Oberflächenexpression von β_2 Untereinheit-beinhaltenden GABA_A Rezeptoren steigert (Wang et al., 2003). Akt kann aber ebenfalls den TSC/1/2 Komplex inhibieren, was die Inhibierung von TSC1/2 auf Rheb verhindert. Das GEF Rheb wird daraufhin aktiviert und führt zur gleichzeitigen Aktivierung von mTOR. mTOR selbst wurde schon in Kapitel 2.4.1 mit synaptischer Plastizität in Zusammenhang gebracht (Reichardt, 2006, Yoshii and Constantine-Paton). Neben den zwei eben beschriebenen Zielproteinen wirkt Akt außerdem inhibitorisch auf die Glykogensynthase Kinase 3 beta (GSK3 β) (Baki et al., 2004, Beaulieu et al., 2009). Die GSK3 β abhängige Phosphorylierung von Gephyrin wirkt,

wie vorher schon beschrieben inhibierend auf die neue Ausbildung von Gephyrinclustern (Tyagarajan et al., 2011b).

Die eben beschriebenen Signalwege laufen unter physiologischen Bedingungen aber nicht so eindeutig voneinander getrennt ab. Es existieren durchaus Verbindungen, die zum Beispiel auch eine Einwirkung des MAPK Signalwegs auf mTOR erlauben. Diese Verknüpfung zum mTOR Signalweg wird über die Erk1/2 abhängige Inhibierung des TSC1/2 Komplexes erreicht. Außerdem ist bekannt, dass Erk1/2 auch Raptor phosphorylieren kann (Kumar et al., 2005).

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung regulatorischer Proteine und Signalwege für die Oberflächenaggregation von Gephyrin.

Mittels RNAi-Interferenz sollte der Einfluss von Kinasen und kinase-assoziierten Proteinen untersucht werden. Dazu sollte zunächst ein robustes zellbasiertes *in vitro* Screeningsystem etabliert werden, das es ermöglicht eine große Zahl verschiedener siRNAs zu transfizieren und bildbasiert zu analysieren.

Einige der bei diesem Screen identifizierten Proteine, welche nach Herunterregulation eine Auswirkung auf die Gephyrinaggregation aufweisen, sollten weitergehend untersucht werden. Diese weiterführende Analyse sollte in primären hippocampalen Neuronen der Ratte und somit in einem relevanten Zellsystem durchgeführt werden. Hierbei sollten neben, ebenfalls auf RNA Interferenz basierten Experimenten auch unabhängige Analysen zur Validierung der im Screen als wirksam beschriebenen Proteine durchgeführt werden.

Die sich hieraus ergebenden Ergebnisse sollen dazu genutzt werden, ein mögliches Modell zur Regulation der Stabilität von Gephyrinclustern an der postsynaptischen Membran von Dendriten zu entwickeln.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen CARL ROTH GmbH & Co. KG (Karlsruhe), EPPENDORF AG (Hamburg), GREINER BIO-ONE INTERNATIONAL AG (Frickenhausen), MERCK KGaA (Darmstadt), PAA Laboratories GmbH (Cölbe), ROCHE Holding GmbH (Mannheim), und SIGMA-ALDRICH Inc. (Steinheim) bezogen.

Produkt	Hersteller
Eppendorfgefäße	EPPENDORF AG, Hamburg
Fotolaborchemikalien	Tetenal AG & Co. KG, Nordstedt
Gel-Blotting Filterpapier (Whatmanpapier)	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Handschuhe	B.Braun, Melsungen
Nitrillhandschuhe	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Nitrozellulose Membran	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Parafilm	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Petrischalen Frickenhausen	Greiner bio-one International AG,
Pipettenspitzen Frickenhausen	Greiner bio-one International AG,
Röntgenfilme	GE Healthcare Europe GmbH, München
Spritzen	B.Braun Melsungen
Sterilfilter	CORNING GmbH, Kaiserslautern
Zellkulturflaschen /schalen	Greiner bio-one International AG, Frickenhausen
Präparationsbesteck	FINE SCIENCE TOOLS GMBH, Heidelberg & Aesculap AG, Tuttlingen
Skalpellschneide Nr. 10	SCHREIBER INSTRUMENTE GmbH, Fridingen
Skalpellschneide Nr. 11	SCHREIBER INSTRUMENTE GmbH, Fridingen
Skalpellschneide Nr. 15	SCHREIBER INSTRUMENTE GmbH, Fridingen

4.1.2 Kits

Produkt	Hersteller
Amaxa® Rat Nucleofector® Kit	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Amersham™ ECL+™ Kit	GE HEALTHCARE LIFE SCIENCE, München
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Bonn
PCR Master Mix	Applied Biosystems/Life technologies GmbH, Darmstadt
QuickChange®Lightning site-directed Mutagenesis Kit	AGILENT TECHNOLOGIES GMBH, Böblingen
Qiagen Plasmid Midi Kit	QIAGEN GMBH, Hilden
Qiagen RNeasy Kit	QIAGEN GMBH, Hilden

4.1.3 Geräte

Folgende Geräte wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Produkt	Hersteller
Autoklav	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Automatikpipetten	EPPENDORF AG, Hamburg
Binokular Stemi V6	ZEISS AG, Oberkochen
Blot Kammer, Semi-Dry	PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen
Brutschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen
Digitalkamera Coolpix P5100	NIKON GmbH, Düsseldorf
Elektrophoresekammer für Polyacrylamid Gele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
7500 Fast Real – Time PCR System	Life Technologies GmbH, Darmstadt
GFL Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH, Staufen
Mikroskop Axiovert 200M	ZEISS AG, Oberkochen
Mikroskop CLSM 510 Meta	ZEISS AG, Oberkochen
pH-Meter	METTLER-TOLEDO GmbH, Giessen
Photometer	EPPENDORF AG, Hamburg

PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilbank	BDK GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Thermomixer compact	EPPENDORF AG, Hamburg
Typhoon Scanner	GE Healthcare Europe GmbH, München
Vortex-Gerät	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Waage BP 3100S	SARTORIUS AG, Göttingen
Waage AE160	METTLER-TOLEDO GmbH, Giessen
Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
Zentrifuge 5424	EPPENDORF AG, Hamburg
Zentrifuge 5415R	EPPENDORF AG, Hamburg
Zentrifuge Mini Spin	EPPENDORF AG, Hamburg

4.1.4 Antikörper, rekombinante Proteine & Inhibitoren

4.1.4.1 Antikörperliste

Folgende Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Bezeichnung	Antigen	Wirts- spezies	Arbeits- konzentrat -ion	Hersteller
Primärantikörper				
anti-Akt (pan)	Akt 1, 2 und 3	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling/ NEB , Frankfurt am Main
anti-phospho- Akt	Ser474 Akt	Maus	1:1000	Cell Signaling/ NEB , Frankfurt am Main
anti-Erk1/2	Erk1/2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling/ NEB , Frankfurt am Main
anti-phospho- Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Thr202/Tyr204 Erk1/2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling/ NEB , Frankfurt am Main
anti-GABA _A R. β2/3 -UE	GABA _A R. β2/3 Untereinheit	Maus	1:200	MILLIPORE GmbH, Eschborn
anti-GABA _A R.	GABA _A R.	Kaninchen	1:200	Synaptic Systems

γ 2-UE	γ 2-Untereinheit			GmbH, Göttingen
anti-GAD6 (Hybridoma- Überstand)	Glutamat- decarboxylase	Maus	1:1000	Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, Iowa City, USA
anti-GAD65	Glutamat- decarboxylase	Kaninchen	1:1000	Chemicon, Hampshire, UK
anti-Gephyrin (Hybridoma- Überstand)	Gephyrin	Maus	1:100	Synaptic Systems GmbH, Göttingen
anti-Gephyrin	Gephyrin	Kaninchen	1:100	Synaptic Systems GmbH, Göttingen
anti-GSK3 β	GSK3 β	Maus	1:1000	Cell Signaling/ NEB , Frankfurt am Main
anti-phospho GSK3 β (Ser9)	Ser9 GSK3 β	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling/ NEB , Frankfurt am Main
anti-mTOR	mTOR	Kaninchen	1:50	Cell Signaling/ NEB , Frankfurt am Main
anti-phospho mTOR (p2448)	Ser2448 mTOR	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling/ NEB , Frankfurt am Main
anti-phospho mTOR (p2481)	Ser2481 mTOR	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling/ NEB , Frankfurt am Main
anti-NF	Neurofascin	Kaninchen	1:1000	laboreigen
Sekundärantikörper				
AlexaFluor 647- anti rabbit	Kaninchen-Fc	Esel	1:2000	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Cy3- anti- <i>mouse</i>	Maus Fc	Ziege	1:400- 1:800	DIANOVA GmbH, Hamburg
Cy3- anti- <i>rabbit</i>	Kaninchen- Fc	Ziege	1:400- 1:800	DIANOVA GmbH, Hamburg
Cy5- anti- <i>goat</i>	Ziege schwere & leichte Kette	Kaninchen	1:200- 1:400	DIANOVA GmbH, Hamburg

Cy5- anti- <i>mouse</i>	Maus Fc	Ziege	1:400- 1:800	DIANOVA GmbH, Hamburg
Cy5- anti- <i>rabbit</i>	Kaninchen-Fc	Ziege	1:400- 1:800	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
HRP-anti-rabbit	Kaninchen- Fc	Ziege	1:2000	DIANOVA GmbH, Hamburg
HRP-anti- <i>mouse</i>	Maus Fc	Ziege	1:2000	DIANOVA GmbH, Hamburg

4.1.4.2 Rekombinante Proteine & Inhibitoren

Folgende rekombinante Proteine und Inhibitoren wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Produkt	Spezies	Hersteller
BDNF	human	Sigma Aldrich, Steinheim
EphrinA5-Fc	human	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
NF166-Fc	Huhn	Laboreigen
LY294002		MERCK KGaA, Darmstadt
U0126		MERCK KGaA, Darmstadt
Rapamycin		SIGMA-ALDRICH GMBH, Steinheim

4.1.5 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden bezogen von:

Produkt	Hersteller
Acrylamidlösung, 40%	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Agarose	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	SIGMA-ALDRICH GMBH, Steinheim
Ampicillin	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe

B27 Supplement	INVITROGEN GmbH, Karlsruhe
Bacto™ Agar	BD Bioscience, Heidelberg
Bacto™ Tryptone	BD Bioscience, Heidelberg
Bacto™ Yeastextract	BD Bioscience, Heidelberg
BMB, Blocking reagent for Elisa	ROCHE HOLDING GmbH, Mannheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Calciumchlorid	SIGMA-ALDRICH GMBH, Steinheim
D(+)-Glukose-Monohydrat	SIGMA-ALDRICH GMBH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	SIGMA-ALDRICH GMBH, Steinheim
Essigsäure (konz. Eisessig)	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethanol (99,9% unvergällt; 96% vergällt)	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Glyzin	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
HBSS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
HCl	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
H ₃ BO ₃	SIGMA-ALDRICH GMBH, Steinheim
Hefeextrakt (Bacto™ Yeast Extract)	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
HEPES	SIGMA-ALDRICH GMBH, Steinheim
Kanamycin	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
L-Glutamin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
NaCl	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Na ₂ B ₄ O ₇	SIGMA-ALDRICH GMBH, Steinheim

NaHCO ₃	MERCK KGaA, Darmstadt
Na-Pyruvat	SIGMA-ALDRICH GMBH, Steinheim
Paraformaldehyd (reinst, DAC)	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin-Streptomycin (100x)	INVITROGEN GmbH, Karlsruhe
Pferdeserum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Poly-L-Lysin Hydrobromid	SIGMA-ALDRICH GMBH, Steinheim
SDS	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Tris-Base	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Triton X-100, reinst	CARL ROTH GmbH & Co.KG, Karlsruhe

4.1.6 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Blockierungsreagenz (10×)

100 g Blocking Reagent for ELISA (Roche Diagnostics, Mannheim)
in 100 ml H₂O
 autoklavieren

Boratpuffer

1,24 g H₃BO₃
1,90 g Na₂B₄O₇
ad 400 ml H₂O,
pH 8,5, sterilfiltriert

Blottingpuffer

100 ml 10x Proteinlaufpuffer
200 ml Methanol
ad 1 l H₂O

DNA-Probenpuffer (5×)

40 % (w/v) Saccharose
0.05 % (w/v) Bromphenolblau
1 mM EDTA, pH 7.5-8
0.1 % (w/v) SDS

Ethidiumbromid-Lösung

10 mg/ml Ethidiumbromid
in H₂O

Fixierlösung

4% Paraformaldehyd in PBS
pH 7,4

Hepes-Puffer (1M)

23,83 g HEPES
ad 100 ml H₂O,
pH 7,3, sterilfiltriert

Glucose (20%)

20 g D(+)-Glukose-Monohydrat
ad 100 ml H₂O, sterilfiltriert

(IP)-Lysepuffer

10 mM Tris-HCl pH 7,5
100 mM EDTA
10 mM NaCl
0,5% (v/v) Triton-X-100
0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat

NaHCO₃ (5,5 %)

5,5 g NaHCO₃
ad 100 ml H₂O, sterilfiltriert

PBS

140 mM NaCl
2,6 mM KCl
1,4 mM KH_2PO_4
8,1 mM Na_2HPO_4
pH 7,4

Permeabilisierungslösung

0,2 % Triton X-100
in 1x BMB/1xPBS

Poly-L-Lysin-(PLL)-Lösung (1mg/ml)

1 mg Poly-L-Lysin Hydrobromid
1 ml Boratpuffer, sterilfiltriert

Proteinladepuffer / LDS *Sample Buffer* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

1 ml LDS Sample Buffer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
32 μl β -Mercaptoethanol

10x Proteinlaufpuffer (Grundrezept)

250 mM Tris-HCl
1,92 M NaCl

Pyruvatlösung (100x)

1,1g Na-Pyruvat
ad 100 ml H_2O sterilfiltriert

SDS-PAGE Laufpuffer

100 ml 10x Proteinlaufpuffer
10 ml 10% (w/v) SDS
ad 1 l H_2O

TAE-Puffer (50×) (DNA-Gelpuffer)

2 M Tris
250 mM Natriumacetat
50 mM EDTA
pH 7.4 mit 96% (v/v) Essigsäure

TBS 10x

60,57 g Tris Base
80,0 g NaCl
pH 7,4

0,1% TBST

100 ml 10x TBS
1 ml Tween-20
ad 1l H₂O

4.1.7 Medien**4.1.7.1 Bakterienmedien**LB-Medium (Luria-Bertani Medium)

1 % (w/v) BD Bacto™ Tryptone
0.5 % (w/v) Bacto™ Yeastextract
0.8 % (w/v) NaCl
autoklaviert

NZY+ Medium

10 g NZ Amine
5 g Bacto™ Yeastextract
5 g NaCl
ad 1 l H₂O
pH 7,5 (NaOH), autoklaviert

Zugabe direkt vor Verwendung

12,5 ml 1 M MgCl₂
12,5 ml 1 M MgSO₄

20 ml 20% (w/v) Glukose

Agar-Platten

15 g BactoTM-Agar (Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg)

in 1000 ml LB-Medium

Autoklavieren, auf ca. 55° C abkühlen lassen und unter sterilen Bedingungen in 10 cm Schalen gießen

4.1.7.2 Zellkultur

Zellkulturmedien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Invitrogen GmbH (Karlsruhe) oder der PAA Laboratories GmbH (Cölbe) bezogen.

HeLa-Kulturmedium

500 ml MEM with Earle's Salts

50 ml FKS

5 ml L-Glutamin

5 ml NEAA (Non essential aminoacids)

4.1.7.3 Neuronenkultur

HBSS-Hepes-Puffer

1000 ml HBSS

7 ml 1M Hepes-Puffer, pH7,3

10 ml Penicillin-Streptomycin (100x)

Neuronen-Kultivierungsmedium

10 ml 10x MEM Earle's ohne Glutamin, ohne NaHCO₃

1 ml Pyruvatlösung (100x)

1 ml 200 mM Glutamin

4 ml NaHCO₃

3 ml Glucose (20%)

2 ml B27 Supplement

ad 100 ml H₂O

Trypsin-EDTA-Hepes-Puffer

100 ml	Trypsin-EDTA (1x)
1 ml	1M Hepes-Puffer, pH7,3
1 ml	Penicillin-Streptomycin (100x)

Neuronen-Waschmedium

10 ml	10x MEM Earle's ohne Glutamin ohne NaHCO ₃
1 ml	Pyruvatlösung (100x)
1 ml	200mM Glutamin
4 ml	NaHCO ₃
3 ml	Glukose (20%)
ad 100 ml	H ₂ O

4.1.8 Zelllinien

Zelllinie / Firma	Bemerkung
HeLa , American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA	Zervixkarzinzelllinie

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Transformation von Bakterien

Die Transformation beschreibt eine Methode, um Fremd-DNA in Bakterien einzuführen. Diese Methode wird für die Amplifikation von Plasmid-DNA verwendet.

Die Transformation von Bakterien kann auf unterschiedliche Arten durchgeführt werden. In diesem Fall wurde die Hitzeschockmethode verwendet.

Hierbei wurde die Plasmid-DNA vorsichtig mit auf Eis aufgetauten, chemisch kompetenten Bakterien (Stbl3) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Plasmid-DNA lagert sich hierbei an die Bakterien an. Durch einen anschließenden 30 sekundigen Hitzeschock bei 42°C wird die Plasmid-DNA von den Bakterien aufgenommen. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei

37°C inkubiert. Anschließend wurden ca. 200 µl der Bakteriensuspension auf Selektionsagar ausplattiert.

Die Agarplatten wurden ca. 12 h bei 37°C inkubiert.

4.2.1.2 Plasmid-DNA Präparation

DNA-Minipräparation

Zur schnellen Aufreinigung geringer Mengen an Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse angewendet. Für die DNA-Minipräparation wurden 2 ml Selektionsmedium mit Bakterien angeimpft und bei 37°C 6 - 12h inkubiert. Diese wurden dann bei 6000 x g für 7 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 150 µl Resuspensionspuffer (Qiagen, Hilden) aufgenommen und nach vollständiger Lösung des Pellets mit 150 µl Lysepuffer (Qiagen, Hilden) versetzt. Anschließend erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer (Qiagen, Hilden). Hierdurch fielen Proteine und andere Zellbestandteile aus, welche durch Zentrifugation bei 12000 x g für 20 min pelletiert und verworfen wurden. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt und erneut bei 12000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und in 30 µl ddH₂O aufgenommen. Die DNA Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt

DNA-Midipräparation

Für die Aufreinigung reinerer und größerer Mengen an Plasmid DNA wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit verwendet. Hierbei wurde eine 50 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C 12 h inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde am folgenden Tag, bei 6000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 4 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Durch Zugabe von 4 ml Lysepuffer und mehrmaligem invertieren wurden die Bakterien lysiert. Anschließend wurden 4 ml Neutralisationspuffer zugegeben, wodurch Zellbestandteile und Proteine in Form weißen Niederschlags ausfielen. Die Suspension wurde dann in eine mit Filter bestückte Spritze überführt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit Hilfe der Spritze gefiltert und die resultierende Lösung in einem neuen Gefäß aufgefangen. Nach Zugabe von 2 ml BB Puffer und mischen durch wiederholtes invertieren wurde die Suspension auf die Qiagen Plasmid Plus Midi Filtersäulen aufgetragen. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurde die Flüssigkeit bei ca. 300 mBar durch die Säule gesogen. Es folgten 2

Waschschritte erst mit 0,7 ml ETR- und anschließend mit 0,7 ml PE Puffer, wobei beide Male die Vakuumpumpe verwendet wurde. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Säule in ein leeres Eppendorfgefäß überführt und 1 min bei 10 000 x g zentrifugiert, um Reste des PE-Puffers zu entfernen. Anschließend wurde die DNA im Filter der Säule durch Zentrifugation bei 10 000x g mit 200 µl H₂O eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

4.2.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration doppelsträngiger DNA wurde mit Hilfe photometrischer Messung bestimmt. Hierbei wurde die DNA 1:50 (2 µl DNA und 98 µl H₂O) verdünnt und die optische Dichte der Probe mittels eines Photospektrometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD von 1 einer DNA Konzentration von 50 µg/ml.

4.2.1.4 Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzmotiven schneiden können. Diese Eigenschaft macht man sich zur Analyse von Plasmid-DNA mit bekannter DNA Sequenz zu Nutze. Der Restriktionsverdau setzt sich, wie in Tabelle 1 beschrieben, zusammen. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert.

Tabelle 1: Standardansatz eines Restriktionsverdaus

Plasmid DNA	1 µg
Restriktionsendonuklease 1	1 µl
Restriktionsendonuklease 2	1 µl
Puffer	1 µl
Bei Bedarf BSA	1 µl
ddH ₂ O	Ad 10 µl

Im Anschluss wurde der Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt (4.2.1.5).

4.2.1.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird verwendet, um DNA Fragmente der Größe nach aufzutrennen. Hierbei wurden die aufzutrennenden DNA-Suspensionen

standardmäßig mit 5x DNA-Ladepuffer versetzt und auf 1 %ige Agarosegele aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 110 V an die Gele angelegt, wodurch die negativ geladenen DNA Moleküle zur Kathode wandern und durch die Netzstruktur der Agarosegele ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Hierbei wandern die kleineren Moleküle relativ zu den Größeren schneller. Die Größe der DNA Moleküle kann durch die Verwendung von DNA-Größenstandards bestimmt werden.

4.2.1.6 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifikation von Nukleinsäuren. Hierbei werden Oligonukleotide verwendet, welche spezifisch am 5'-Ende des Sinn- bzw. Gegensinnstranges der zu amplifizierenden Nukleinsäuresequenz binden. Diese sogenannten Primer werden als Startpunkt für die Polymerase verwendet, welche komplementäre Basen einbaut und so wieder eine doppelsträngige DNA produziert. Durch Temperaturänderungen werden die Stränge wieder getrennt und die Primer können sich erneut anlagern. Dieser zyklische Vorgang wird ca. 30 Mal wiederholt was zu eine exponentiellen Amplifikation der Nukleinsäure führt.

Ein Standard PCR-Ansatz ist in Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2 : Standardansatz Polymerasekettenreaktion

H ₂ O	39,9 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
MgSO ₄	1,5 µl
dNTP (25nM)	0,4 µl
template DNA (1µg)	1 µl
Forward Primer (10µM)	1 µl
Reverse Primer (10µM)	1 µl
Taq-Polymerase	1 U
Total	50 µl

4.2.1.7 Mutagenese

Mit Hilfe des *QuickChange® Lightning site directed Mutagenesis Kit* von Agilent Technologies können spezifisch Basen in einem bestehenden Plasmidvektor mutiert werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass der komplette Plasmidvektor vervielfältigt wird und der mutierte Genabschnitt somit im gleichen Vektorsystem

vorliegt, wie der originale Genabschnitt. Die Mutagenese wurde wie in der Anleitung beschrieben durchgeführt. Dafür wurden spezifische Primer gestaltet, welche eine Länge zwischen 25 und 45 Basenpaaren aufwiesen sowie die gewünschten Basenaustausche beinhalteten. Da dieser Basenaustausch keine Paarung der Primer mit dem *template* in der PCR ausführen, musste dieser sogenannte *missmatch* Bereich von mindestens 10 richtig paarenden Basen zu beiden Seiten flankiert werden. Zusätzlich war darauf zu achten, dass die Primer eine Schmelztemperatur von $\geq 78^\circ\text{C}$ hatten. Auf diese Art und Weise konnten einzelne aber auch mehrere Basenaustausche je nach Primerdesign in einen bestehenden Plasmidvektor eingeführt werden.

Folgende Primerpaare wurden verwendet:

EphA7 Rezeptor dominant negative Isoform:

Forward Primer: 5' GAGATGTTGC AGTAGCCATA ATGACCCTGA
AAGTTGGTTA CAC 3'

Reverse Primer: 5' GTGTAACCAA CTTTCAGGGT CATTATGGCT
ACTGCAACAT CTC 3'

Für die PCR vermittelte Vervielfältigung des gesamten Plasmidvektors wurde eine spezielle DNA-Polymerase und eine längere Amplifikationszeit verwendet.

Eine typische Mutagenese-Reaktion ist in Tabelle 3, die Durchführung in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Ansatz der Polymerasekettenreaktion im *QuickChange®Lightning site directed mutagenesis Kit*

Reaction buffer	5 μl
dsDNA template (original Plasmidvektor)	10-100ng
Primer 1	125 ng
Primer 2	125 ng
dNTP mix	1 μl
QuickSolution reagent	1,5 μl
QuickChange®Lightning Enzyme	1 μl
H ₂ O	Ad 50 μl

Tabelle 4: Einstellungen der Polymerasekettenreaktion

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95°C	2 min
18	95°C	20 s
	60°C	10 s
	68°C	30 s/kb Plasmidgröße
1	68°C	5 min

Im Anschluss an die Polymerasekettenreaktion folgt durch Zugabe von 1 µl DpnI Enzym ein 5 minütiger Verdau. Das DpnI Enzym baut spezifisch das doppelsträngige DNA-template ab, welches methyliert oder nach dem 1. PCR-Zyklus hemimethyliert ist. Nachdem nur die ursprünglich verwendeten Plasmide methyliert sind, bleiben auf diese Art und Weise nur noch die mutierten vervielfältigten dsDNA Plasmidvektoren übrig, welche keine Methylierung tragen. Diese werden dann in einer Transformationsreaktion in X10-Gold Ultrakompetente Zellen eingebracht. Hierfür werden 45 µl X10-Gold Ultrakompetente Zellen 2 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 2 µl des DpnI verdauten PCR-Ansatzes zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s. Nach dem Hitzeschock werden die Zellen mit 500 µl NZY+ Medium versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran werden 200 µl dieses Ansatzes auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben. Die gewonnen Plasmid-DNA wurde dann sequenziert (4baselab GmbH, Reutlingen) um so die korrekte Sequenz mit eingefügter Mutation nachzuweisen.

4.2.1.8 RNA Isolation

Für die Isolierung von RNA aus kortikalen Neuronen in Kultur wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Zellen (aus Versuch 4.2.2.5, Nucleofection) in einer Dichte von ca. 1×10^6 wurden in 350 µl RLT Puffer durch Schaben mit der Pippettenspitze vom Zellkulturschalenboden entfernt und aufgenommen. Diese Lösung wurde dann mit 350 µl Ethanol (70 %) gemischt und anschließend in ein RNeasy Mini-Säulchen geladen. Dieses wurde dann 30 s bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Der erste Waschschrift erfolgte mit 700 µl RW1-Puffer gefolgt von 2 Waschschriften mit je 500 µl RPE-Puffer. Das Säulchen wurde dann in

ein neues Sammelröhrchen überführt um durch Zentrifugation bei 8000 x g für 1 min den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Das Säulchen wurde dann in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die RNA wurde mit 30 µl RNase freiem H₂O durch Zentrifugation bei 8000 x g für 1 min eluiert.

4.2.1.9 DNase Verdau

Um eventuelle Kontaminationen genomischer DNA zu entfernen erfolgt im Anschluss an die RNA Isolation ein Verdau mit einem DNA abbauenden Enzym (DNase). Hierfür wurde die RQ1-DNase der Firma Promega verwendet. Folgender Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert:

Tabelle 5: Ansatz DNase Verdau

16 µl	RNA-Lösung
2 µl	10 x DNasepuffer (Promega)
2 µl	RQ1 DNase (2 Units, Promega)

Nach 30 min Inkubation wurden 2 µl Stopreagenz (Promega) zugegeben und weitere 10 min bei 65°C inkubiert, um die DNase zu inaktivieren.

4.2.1.10 Reverse Transkription

Für die Methode der quantitativen *Real Time* PCR (qRT-PCR) muss die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dieser Vorgang wird als reverse Transkription bezeichnet. Für die reverse Transkription wurde die M-MuLV-Transkriptase (New England Biolabs, Ipswich, MA, GB) verwendet. Es wurde ein Mastermix bestehend aus 0,3 µl dN₆-Primern (150µg/ml), 0,5 µl dNTPs sowie 2,2 µl ddH₂O je Probe hergestellt. Die RNA (10 µl) wurde dann mit je 3 µl dieses Mastermixes gemischt und 10 min bei 70°C sowie anschließenden 5 min bei 0°C inkubiert. Erst dann wurde 1,5 µl 10 x RT-Puffer sowie 1,0 µl M-MuLV reverse Transkriptase hinzugefügt. Als Negativkontrolle für die spätere qRT-PCR wurde ein weiterer Ansatz gleich zu dem beschriebenen aber ohne Zugabe der M-MuLV hergestellt. Beide Ansätze wurden dann 10 min bei 25°C, 50 min bei 42° und anschließend 15 min bei 70°C inkubiert. Die Negativkontrolle dient der späteren Detektion von eventuellen Verunreinigungen mit genomischer DNA.

4.2.1.11 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR ist es im Gegensatz zum Standard-PCR Verfahren möglich, das entstehende PCR Produkt direkt quantitativ zu bestimmen. Die Quantifizierung erfolgt über die Detektion von Fluoreszenzsignalen. Proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produkts nimmt dabei ebenfalls das Fluoreszenzsignal zu.

Die Quantifizierung erfolgte über die $\Delta\Delta C_T$ Methode. Hierbei werden zuerst die C_T -Werte ermittelt, welche den Zyklus angeben, bei dem die Fluoreszenz den Wert der Hintergrundfluoreszenz überstiegen hat und sich im linearen Anteil des Anstiegs des Fluoreszenzsignals befindet. Um quantitative Aussagen zu treffen, wurde anschließend der ΔC_T berechnet, welcher sich durch Normierung auf eine definierte Kontrolle (zum Beispiel die Messung des Haushaltsgens GAPDH) ergibt. Hierbei wurde der C_T Wert des Haushaltsgens vom C_T Wert des Gens von Interesse abgezogen. Um einen $\Delta\Delta C_T$ Wert zu erlangen wird ein weiterer Normierungsschritt eingeführt. Hierbei wurde die Differenz der ΔC_T -Werte einer definierten Probe (Kontrollbehandlung) und der jeweiligen Behandlung von Interesse gebildet. Dieser $\Delta\Delta C_T$ -Wert wird dann in die Gleichung $2^{-\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt, was den Wert für eine n-fache relative Expression ergibt.

TaqMan® – quantitative Real-Time (qRT) – PCR

Die TaqMan® qRT – PCR beruht auf dem gleichen Prinzip wie eine einfache Standard-PCR. Bei der TaqMan qRT – PCR wird aber zur gleichzeitigen Quantifizierung der cDNA Mengen die sogenannte FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) Methode angewandt. Das Prinzip der FRET Methode beruht auf der Übertragung von Energie von einem angeregten Donor-Fluorochrom (Reporter) auf ein in der Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher). Dieser Quencher wird hierdurch ebenfalls aktiviert und emittiert dann ein bestimmtes Fluoreszenzsignal. Vergrößert sich der Abstand zwischen Reporter und Quencher nimmt das FRET Fluoreszenzsignal des Quenchers ab, während das des Reporters ansteigt. Bei der Methode der TaqMan qRT – PCR werden sogenannte Oligonukleotid-Sonden verwendet, welche am 3'-Ende einen Quencher sowie am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff als Reporter tragen. Die zu den Primerpaaren komplementären Sequenzen werden durch eine Taq-Polymerase synthetisiert, welche gleichzeitig eine 5'-Exonukleaseaktivität beinhaltet. Dies führt dazu, dass die

TaqMan Sonde bei der DNA-Polymerisierung abgebaut wird. Dadurch wird das Reporter-molekül abgetrennt, welches sich so vom Quencher entfernt. In der Folge nimmt das FRET Signal ab, aber das Fluoreszenzsignal des Reporters zu, welches detektiert und gemessen wird. Als Referenz zur Ermittlung der relativen Menge wurde wie erwähnt das Haushaltsgen GAPDH verwendet. Die Sonden für das Gen von Interesse sowie für GAPDH sind dabei mit unterschiedlichen Reporterfarbstoffen ausgestattet, sodass beide Sonden im gleichen Reaktionsansatz verwendet werden konnten, was die Genauigkeit der Methode zur Quantifizierung weiter erhöht.

Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

Tabelle 6 Pipettierschema TaqMan® qRT – PCR

1 µl	GAPDH Sonde (VIC)
1 µl	TrkB Sonde (FAM)
10 µl	TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix
1,5 µl	cDNA
Ad 20 µl	Nuklease freies Wasser

Folgendes PCR Programm wurde verwendet:

Tabelle 7 PCR Programm für die TaqMan® qRT – PCR

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95°C	20 Sekunden
40	95°C	3 Sekunden
	60°C	30 Sekunden

Folgende Sonden wurden verwendet (Applied Biosystems/Life Technologies):

GAPDH- Ratte	(VIC/MGB)	Rn01775763_g1
Ntrk2 (TrkB)-Ratte	(FAM)	Rn 01441749_m1
EphA7-Ratte	(FAM)	Rn 00592517_m1

4.2.1.12 Zellyse

Für die Western Blot Analyse wurden primäre kortikale Neurone 17 Tage in 12 well Platten kultiviert. Die Zellen wurden dann mit den Inhibitoren LY294002 (PI3K-Inhibition, Endkonzentration 10 µM), U0126 (MEK2 Inhibition, Endkonzentration 10 µM), Rapamycin (mTOR Inhibition, Endkonzentration 200nM) oder DMSO als

Lösungsmittelkontrolle 30 min vorbehandelt. Im Anschluss daran wurden die Zellen weitere 30 min mit BDNF (100ng/ml), EphrinA5-Fc (100ng/ml) oder NF166-Fc (100ng/ml) stimuliert. EphrinA5-Fc aktiviert seinen Rezeptor nur dann effektiv, wenn es als Oligomer vorliegt. Aus diesem Grund wurden EphrinA5-Fc und NF166-Fc durch eine Vorinkubation mit einem gegen den Fc-Teil gerichteten Antikörper 30 min oligomerisiert.

Für die Herstellung der Zellysate wurden das Medium komplett abgesaugt und die Zellen anschließend 1-2 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Es wurde dann eine entsprechende Menge IP-Puffer mit 1:25 Protease Inhibitor (Roche, Mannheim) auf die Zellen gegeben (12-well 40 µl - 80 µl, 10 cm Platte 600 µl - 800 µl) und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Zellschabers von der Well-Platte gelöst und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert. Das Lysat wurde dann bei 16000x g 10 min zentrifugiert und das Pellet verworfen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA Protein Assays (Thermo Scientific, Bonn) bestimmt.

4.2.1.13 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCA Protein Assay Kit von Pierce/Thermo Scientific verwendet. Die Proteinkonzentrationsbestimmung beruht darauf, dass an Proteine gebundenes Kupfer in alkalischer Umgebung von Cu^{2+} auf Cu^{1+} reduziert wird. Die Farbreaktion zur Konzentrationsmessung wird ausgelöst, indem Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid, BCA), welche zur Proteinsuspension gegeben, wird mit Cu^{1+} komplexiert. Die Komplexe aus Kupfer und Bicinchoninsäure besitzen bei steigender Proteinkonzentration eine starke lineare Absorption bei 562 nm, welche spektrometrisch gemessen werden kann. Die Konzentrationsbestimmung wurde wie in der Anleitung beschrieben durchgeführt. Dabei wurden in eine 96 well Platte je in Doppelbestimmungen 10 µl der Albumin-Standardlösung (Konzentrationen von 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml und 0 µg/ml), sowie der zu bestimmenden Proteinlösungen pipettiert. Anschließend wurden je 200 µl des *working reagent* (Mischung 50:1 Reagent A : Reagent B) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Analyse wurde die Absorption der Proben in einem Spektrophotometer (Perkin-Elmer, Rodgau) bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die unbekannte Proteinkonzentration wurde dann mit Hilfe der Eichgerade der Albumin-

Standardlösung bestimmt, welche automatisch von der Software des Spektrophotometers erstellt wurde.

4.2.1.14 Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse bietet eine Möglichkeit, Proteine der Größe nach aufzutrennen und so anhand ihrer spezifischen Molekulargewichte nachzuweisen.

Bei der Methode des Western Blot unterscheidet man zwischen der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe in der sogenannten SDS PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) sowie dem eigentlichen Blotting Vorgang, bei welchem die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden.

Bei der denaturierenden SDS PAGE werden durchschnittlich zwischen 8 und 30 µg Proteinlysate mit Proteinladepuffer versetzt und bei 85°C aufgeköcht. Dadurch werden die Proteine denaturiert und die Eigenladung der Proteine wird durch negative Ladung des im Proteinladepuffer enthaltenen SDS überlagert, was eine Größenauftrennung im elektrischen Feld ermöglicht. Bei der SDS PAGE unterscheidet man zwischen Sammel- und Trenngel. Nach anlegen der Spannung von ca. 100V laufen die Proteine zuerst in ein 3%iges Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 8), wo sie im Übergangsbereich zum Trenngel konzentriert werden. Nachdem sich die Proteine hier konzentriert haben erhöht man die Spannung auf ca. 150-180V, wodurch die Proteine in das höher konzentrierte Trenngel (Zusammensetzung für 7%ige Trenngel siehe Tabelle 9) wandern und sich der Größe nach auftrennen lassen. Hierbei entscheidet die prozentuale Zusammensetzung über die Auftrennungseffizienz in bestimmten Größenbereichen. Parallel zu den Proteinproben verwendet man einen Proteingrößenmarker, welcher später hilft, die Bande auf spezifische Proteingrößen zu beziehen.

Tabelle 8: Zusammensetzung eines 3 %igen Sammelgels

Tris-Glyzin Sammelgel	
ddH ₂ O	3,54 ml
Tris-HCl pH 6,8	860 µl
30% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	500 µl
10 % (w/v) SDS	47,5
10% (w/v) APS	40 µl

TEMED	10 µl
-------	-------

Tabelle 9: Zusammensetzung eines 7 %igen Tris-Glyzin Trenngels

Tris-Glyzin Trenngel	
ddH ₂ O	3,67 ml
Tris-HCl pH 6,8	1,95 ml
30% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	1,75 ml
10 % (w/v) SDS	90 µl
10% (w/v) APS	40 µl
TEMED	10 µl

Im Anschluss an die SDS PAGE werden die hier aufgetrennten Proteine im eigentlichen Blotting Vorgang auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu wurde die sogenannte *Semi-dry sandwich blotting* Methode verwendet.

Hierfür wurden in Blottingpuffer getränktes Whatman-Papier, die Nitrozellulosemembran sowie das Gel und anschließend wieder Whatman Papier in Form eines sogenannten Sandwiches angeordnet und in die Blotting-Apparatur mit der anodischen Platte unten, sowie der kathodischen Platte oben eingelegt. Es wurde dann ein konstanter Strom von 2 mA/cm² Membran angelegt durch welchen die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen werden.

Im Anschluss an den Blotting Vorgang wurde die Membran entnommen, kurz in 0,1 % TBST gewaschen und mit 5 % Milch/0,1 % TBST für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Membran wurde dann in Antikörperlösungen (alle in 5 % BSA/0,1 % TBST) zu Detektion spezifischer Protein über Nacht bei 4°C inkubiert. Bevor die Membran in eine Lösung mit Meerrettichperoxidase gekoppeltem Sekundärantikörper (in 5 % Milchpulver (w/v) / 0,1% TBST) zur Detektion des spezifischen Primärantikörpers überführt wurde, wurde sie 3x 5 min in 0,1 % TBST gewaschen. Die Inkubation mit Sekundärantikörper erfolgte für 1,5 h bei Raumtemperatur. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase setzt nach Zugabe ihres Substrats (Luminol), dieses in seine oxidierte Form um, welches dabei luminesziert. Diese Lumineszenz kann mit Hilfe von Röntgendetektionsfilmen detektiert werden. Vor Zugabe dieses Substrats wird die

Membran erneut 3 x 5 min mit 0,1 % TBST gewaschen und erst dann 5 min mit dem sogenannten Amersham-ECL-Detektionsreagenz (GE Healthcare Europe GmbH, München) inkubiert.

Durch Auflegen von Amersham-Hyperfilm-ECL (GE Healthcare Europe GmbH, München) kann die entstehende Lumineszenz detektiert werden. Zur Entwicklung des Films wurde dieser für max. 2 min in Entwicklerlösung (Tetenal) geschwenkt, dann kurz in H₂O gewaschen und anschließend für 1 min in Fixierlösung (Tetenal) fixiert.

Als Alternative wurde der Typhoon Scanner von GE Healthcare verwendet. Hierfür konnten sowohl Meerrettichperoxidase als auch fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper verwendet werden. Für Meerrettichperoxidase gekoppelte Antikörper wurde die Membran ebenfalls mit ECL/ECL Plus Substrat 5 min inkubiert, dann aber 20 min getrocknet und Fluoreszenzsignale bei einer Anregung von 488 nm bei einer Wellenlänge von 520 nm detektiert. Noch einfacher war die Verwendung von fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern, die ebenfalls in 5% Milchpulver (w/v) / 0,1 % TBST im dunkeln für 1,5 h inkubiert und anschließend 3 x 5 min gewaschen wurden. Es folgte die direkte Trocknung der Membran in Dunkelheit. Die Detektion mittels Typhoon Scanner erfolgte bei einer Anregung von 543 nm bzw. 633 nm und einer Detektion der Fluoreszenzsignale mit dem 580BP30 bzw. 670BP30 Filter. Die Aufnahme des Fluoreszenzsignals war im Gegensatz zu den Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpern ohne zeitliche Einschränkungen möglich.

4.2.1.15 Entfernung der Antikörper von der Nitrozellulosemembran („Strippen“)

Um auf einer Nitrozellulosemembran mehr als nur ein Zielprotein detektieren zu können, ist es nötig, den schon verwendeten primären Antikörper von seinem Zielprotein abzulösen um einen neuen Primäantikörper gegen ein anderes Zielprotein verwenden zu können.

Zur Beseitigung der Protein – Protein Interaktion zwischen Zielprotein und Detektionsantikörper auf der Nitrozellulosemembran wurde diese für 10 min bei RT in 10 % Essigsäure inkubiert. Vor einer erneuten Inkubation in Blocking-Lösung (5%-Milch/0,1% TBST) wurde die Membran 2 x mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation in Primäantikörperlösung wie in Abschnitt 4.2.1.14 beschrieben.

4.2.1.16 Koimmunpräzipitation

Die Methode der Koimmunpräzipitation wurde verwendet, um spezifische Interaktionen zwischen zwei oder mehreren Proteinen nachzuweisen.

Zelllysate wurden wie in Abschnitt 4.2.1.8 „Zellyse“ beschrieben hergestellt. Für die Koimmunpräzipitation wurden ca. 700 µg Protein eingesetzt. Dem Zelllysate wurde dann ein spezifischer gegen das Protein von Interesse gerichteter Antikörper in angegebener Verdünnung (anti-mTOR 1:100) zugegeben und für 12 -24 h konstant rotierend bei 4°C inkubiert. Hierbei sollte das Protein von Interesse in Komplex mit allen daran gebunden Proteinen durch den spezifischen Antikörper gebunden werden. Dieser Suspension wurden dann 60 µl 50 % (v/v) Protein Sepharose A Beads (Sigma Aldrich, Steinheim) zugesetzt. Die Protein Sepharose A Beads wurden dafür in 4 ml pro Gramm Sepharose-Puffer aufgeschwollen und in 60 µl Aliquots überschichtet mit 60 µl Ethanol (70%) gelagert. Vor dem Gebrauch wurden diese Beads 3x mit IP-Puffer gewaschen und bei 1000x g zentrifugiert. Für Antikörper aus der Spezies Maus, wurden Protein Sepharose G Beads (Sigma Aldrich, Steinheim) verwendet. Diese wurden aber analog zu den Protein Sepharose A Beads behandelt und verwendet.

Die Suspension nun bestehend aus Zelllysate, Antikörper und 60 µl Protein Sepharose A wurde für weitere 12 - 24 h konstant rotierend bei 4°C inkubiert. Dabei wird der Antikörper von den Protein Sepharose A Beads gebunden. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Beads, nun gebunden an Antikörper und Proteinkomplexe, 5x mit 1 ml IP-Puffer gewaschen und jeweils bei 1000 x g zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Beads in 60 µl 4x Proteinladepuffer aufgenommen und bei 85°C aufgeköcht, wodurch die Bindungen zwischen Sepharose A Beads, den Antikörpern sowie den Proteinkomplexe denaturiert und somit getrennt wurden. Der Nachweis des Proteins von Interesse bzw. seiner potentiellen Bindungspartner erfolgte dann in einem herkömmlichen Western Blot wie in Abschnitt 4.2.1.14 beschrieben.

4.2.1.17 Densitometrische Analyse von Western Blot Banden

Zur Beurteilung der Intensität der Western Blot Banden wurde eine densitometrische Messung immer bezogen auf ein Kontrollprotein durchgeführt. Hierfür wurden die entwickelten Filme immer mit gleicher Intensität und Helligkeit eingescannt (Hewlett-Packard Photosmart B110a, Böblingen). Die eingescannten Bilder wurden dann

entweder mit der Gel-Pro® Analyzer Software (Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA) oder mit Hilfe der ImageJ Software (Analyzer – Gel- Menü) (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) analysiert.

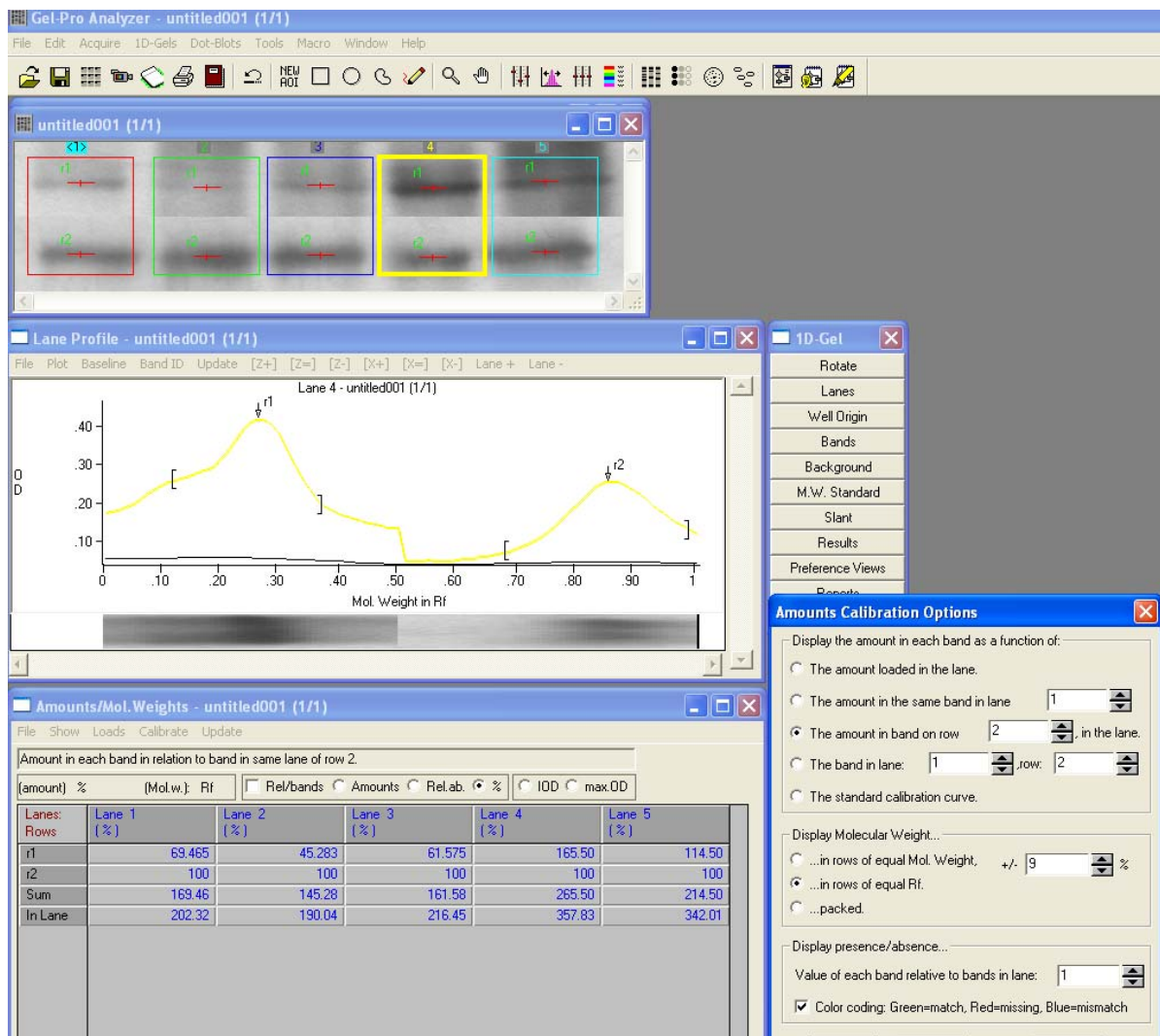


Abbildung 3 Durchführung der densitometrischen Messung der Bandenintensität mit Hilfe der Gel-Pro® Analyzer Software.

Bei der Verwendung der Gel-Pro® Analyzer Software wurden die Banden für Ziel und Kontrollprotein jeweils zueinander gehörig untereinander angeordnet und in das Programm geladen. Anschließend wurden die verschiedenen Laufspuren und daran angeschlossen die verschiedenen Banden im Programm automatisch detektiert. Hierbei wurde nur unterstützend eingegriffen um die Bandendefinition zu präzisieren. Die Software konnte dann den Hintergrund aus dem Bild bestimmen und von der Intensität der Banden abziehen. Anschließend wurde festgelegt, welches die Kontroll- und welches die Zielbande ist, sodass die Software direkt ein Verhältnis aus Ziel- und Kontrollbande bilden und prozentual ausgeben konnte (Abbildung 3).

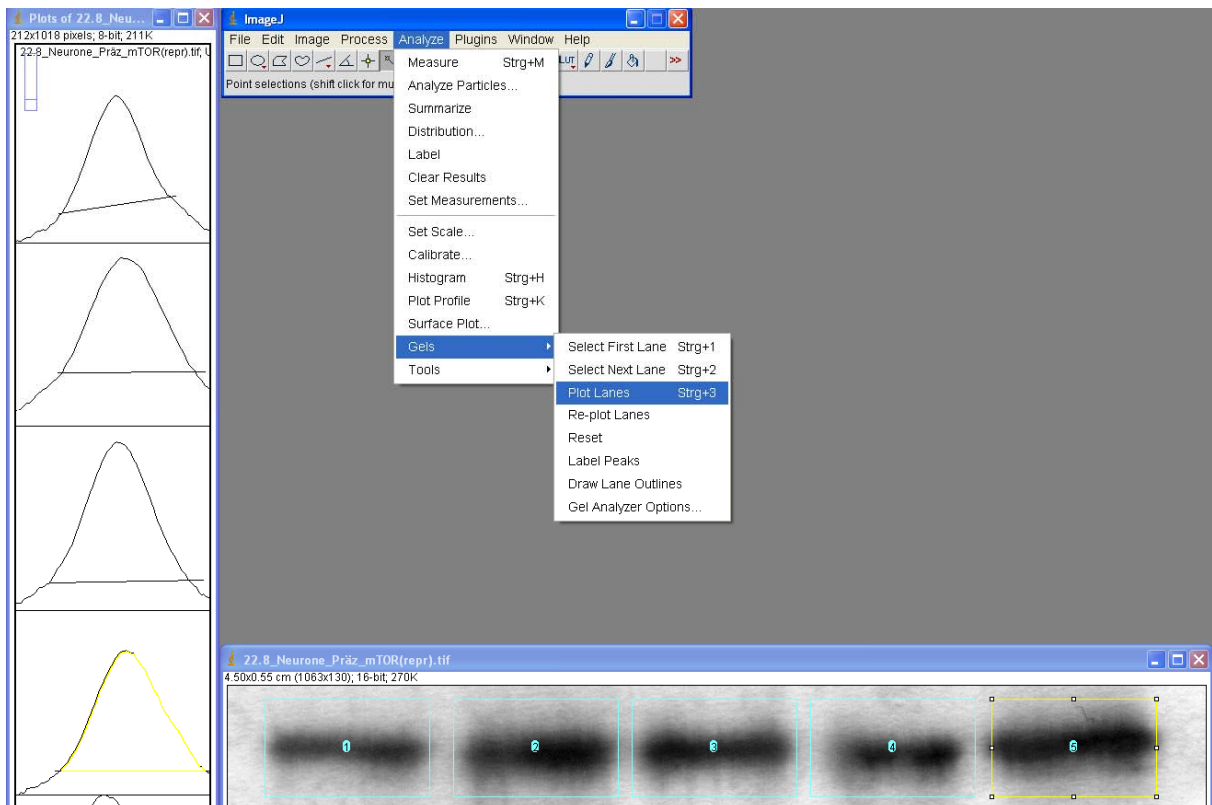


Abbildung 4 Durchführung der densitometrischen Messung der Bandenintensität mit Hilfe der ImageJ Software.

Die ImageJ Software wurde bei Auftreten von starkem Hintergrund (z.B. bei Immunpräzipitationen) verwendet. Hierbei wurden die eingescannten Bilder jeweils einzeln aber analog zueinander ausgewertet, um das Verhältnis aus Ziel und Kontrollbanden zu bilden. Dazu wurde das Bild des entwickelten, eingescannten Films in das Programm geladen und mit Hilfe der „*Rectangular selection*“ Funktion die Banden definiert. Dies erfolgte mit dem Plug-In Analyzer – Gel. ImageJ war dann in der Lage, die zu den Banden gehörigen Intensitätsplots (Kurvendiagramme) auszugeben. Die Kurvendiagramme wurden mit Hilfe der „*straight line selection*“ Funktion so bearbeitet, dass nur der Peak, welcher der eigentlichen Bande zugehörig war, nach unten hin auf Basisniveau markiert wurde. Mit Hilfe des „*Wand (tracing) module*“ konnte die Software nach anklicken des Peaks die Fläche von diesem berechnen. Diese Fläche entspricht der relativen Intensität der Bande und wurde dann mit dem analog behandelten Kontroll protein mit Hilfe von Excel ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 4).

4.2.2 Zellkultur

Kulturstart

Die Zellen wurden aus flüssigem Stickstoff entnommen und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden sie sofort in eine T-75 Kulturflasche mit 10 ml Kultivierungsmedium (T-175 Kulturflasche mit 30 ml Medium) überführt. Dort wurden sie bei 37°C und 5% CO₂ belassen. Ein Mediumwechsel wurde nach erfolgter Adhärenz der Zellen durchgeführt.

Zellpassage

HeLa Zellen sind eine sehr schnell wachsende Zelllinie, die bei einer Konfluenz von ca. 80% ca. jeden 2. – 3. Tag passagiert wurden.

Hierbei wurde das Medium komplett abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde ebenfalls abgesaugt und gegen 5 ml Trypsinlösung ausgetauscht. Die Trypsinlösung wurde ca. 5 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen anschließend durch Klopfen von der Kulturflasche zu lösen. Die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 5 ml serumhaltigen Kultivierungsmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in einer Verdünnung von 1:5 – 1:10 in das entsprechende vorgelegte Volumen Kultivierungsmedium ausgesät.

4.2.2.1 Beschichtung von Platten und Deckgläschen

Für die Kultivierung von hippocampalen sowie kortikalen Neuronen wurden Deckgläschen bzw. Well-Platten mit Polyethylenimin (PEI) beschichtet. Hierbei wurden Deckgläschen bzw. Well-Platten aus Glas mit einer 3 %igen BM-Lösung ca. 4 h vorinkubiert und anschließend 3 x mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die so vorbehandelten Glasbestandteile bzw. Well-Platten aus Plastik mit PEI benetzt und 24h bei 37°C inkubiert. Das PEI wurde dann abgesaugt und die behandelten Deckgläschen 1x mit Wasser und anschließend 2x mit Waschmedium gespült. Für die Vorbereitung der Neuronenkultur wurden dann 50 µl (96-well Platte) bzw. 500µl (24 well-Platte mit Deckgläschen) Neuronen-Kulturmedium vorgelegt und die Platten bei 37°C bis zur Aussaat der Neuronen inkubiert.

4.2.2.2 Präparation hippocampaler & kortikaler Neuronen der Ratte

Für die Gewinnung hippocampaler bzw. kortikaler Neuronen der Ratte wurden Rattenembryonen zwischen Embryonaltag 17 und 18 verwendet.

Das Muttertier wurde mit Hilfe von CO₂ tief narkotisiert und dekapitiert. Die Embryonen wurden entnommen und ebenfalls dekapitiert. Die Gehirne der Embryonen wurden freigelegt und in HBSS überführt. Nach Abtrennung des Kleinhirns wurden die Gehirnhälften getrennt und das Stammhirn vorsichtig entfernt. Im Anschluss daran wurde die Hirnhaut mit Hilfe zweier Pinzetten vorsichtig abgezogen. Der Hippocampus wurde dann mit Hilfe einer 2 mm Federschere entfernt und in HBSS überführt. Ein Teil des Kortex konnte dann ebenfalls mit Hilfe der Federschere entfernt und in HBSS überführt werden. Es wurde darauf geachtet, dass die Präparation bis zum folgenden Trypsinierungsschritt weniger als 2 h dauerte. Die Gewebe wurden anschließend 10 min bei 37°C trypsiniert und dann 2x mit HBSS gewaschen. Das HBSS wurde vorsichtig abgesaugt und die Gewebe mit 2 ml Neuronenkultivierungsmedium überschichtet. Durch vorsichtiges triturieren mit der 1000 µl Pipette (max. 20x) wurden die Zellen vereinzelt. Um große Reststücke des Kortex zu vermeiden, wurden die kortikalen Neuronen durch ein 0,45 µm Nyloonsieb filtriert. Die Neuronen wurden dann mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und in vorgelegtes und vorgewärmtes Kulturmedium ausgesät.

	Zellzahl
96 well Platte	1,8 x 10 ⁵ Zellen / cm ²
12 well Platte	2 x 10 ⁵ Zellen / cm ²
12 well Platte (mit 12mm Deckgläschen)	2 x 10 ⁵ Zellen / cm ²
6 well Platte	2 x 10 ⁵ Zellen / cm ²

4.2.2.3 Behandlung primärer Neurone mit Inhibitoren oder rekombinanten Proteinen

Die primären kortikalen oder hippocampalen Neurone wurden kultiviert, indem alle 2 Tage ein halber Mediumwechsel durchgeführt wurde. 24 h vor Fixierung und Analyse der Zellen wurde die Behandlung mit Inhibitoren oder rekombinanten Proteinen durchgeführt. Hierbei wurden der PI3K Inhibitor LY294002 (Endkonzentration 10 µM), der MEK2 Inhibitor U0126 (Endkonzentration 10 µM) oder der mTOR Inhibitor Rapamycin (Endkonzentration 200 nM) sowie die rekombinanten Proteine NF166 (Endkonzentration 100 ng/ml, vorgeclustert 30 min mit einem Ziege anti-human Cy2 gekoppeltem Antikörper), EphrinA5-Fc (Endkonzentration 100 ng/ml, vorgeclustert 30 min mit einem Ziege anti-human Cy2 gekoppeltem Antikörper) sowie BDNF

(Endkonzentration 100 ng/ml) eingesetzt. Nach 24 h erfolgte die Fixierung mit 4% PFA/PBS (pH 7,5) für 10 min bei Raumtemperatur.

4.2.2.4 Inhibierung der Genexpression mittels siRNA & Screen in HeLa Zellen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten in die Expression bzw. in die Translation spezifischer Gene einzugreifen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) durch Einsatz von siRNA (*short interfering RNA*) verwendet. siRNAs sind kurze doppelsträngige RNA Moleküle, welche durch Transfektion in eine Zelle eingebracht werden können. Die siRNAs werden einzelsträngig in einen Proteinkomplex (RISC Komplex) eingebaut. Die siRNAs sind so konstruiert, dass sie aufgrund von Sequenz-Komplementarität an bestimmte Bereiche in der mRNA eines speziellen Gens binden können. Bindet nun eine siRNA im RISC Komplex eine spezielle mRNA, wird diese abgebaut oder steht zumindest nicht mehr für die Translation zum Protein bereit. Dies führt zur Herunterregulation der Expression des adressierten Gens. Auf diese Art und Weise können einzelne Proteine in der Zelle herunterreguliert werden, um so deren Effekt zu untersuchen.

Screen in HeLa Zellen

Die siRNA basierte Methode der RNAi wurde verwendet, um ein Screening in HeLa Zellen durchzuführen. Hierfür kam eine kommerziell erhältliche siRNA Bibliothek (Life Technologies GmbH, Darmstadt) zum Einsatz, welche 710 verschiedene Kinasen und kinase-assoziierte Gene als Zielgene adressiert. Gegen jedes Zielgen waren 3 unabhängige siRNAs vorhanden. Für die Durchführung des siRNA Screens wurden Proteine des inhibitorisch postsynaptischen Gerüsts in HeLa Zellen überexprimiert. Hierfür wurden die Vektoren pEGFP-C2/gephyrin (postsynaptisches Protein zur Clusterung von GABA_A Rezeptoren, erhalten von H. Betz und G. O'Sullivan) sowie für die Translokation des Gephyrin an die Zellmembran der Vektor pRK5myc/CollybistinII_{SH3} (erhalten von R. Harvey) verwendet. Zusätzlich wurde der laboreigene Vektor pCMV_NF166 verwendet.

Die vergrößerten Gephyrinoberflächencluster dienten der Analyse im siRNA Screen. Die Plasmide und die siRNA wurden hierfür wie in Abschnitt 4.2.2.5 beschrieben transfiziert. Die Analyse des Screens erfolgte verblindet mit Hilfe des CLSM510 Meta konfokalen Mikroskops, welches zusammen mit der Imaris-Software zur Analyse der Clustergröße diente. Als Hit wurde ein Zielgen definiert, wenn min. zwei siRNAs eine signifikante Reduktion der Gephyrinclustergröße im Vergleich zur positiv Kontrolle

(pEGFP-C2/gephyrin und pRK5myc(collyistinII_{SH3}-)) auf maximal 15% größere durchschnittliche Gephyrincluster bewirkte.

4.2.2.5 Transfektion

Bei der Lipofektion wird die zu transfizierende DNA mittels kationischer Lipide in Form von Liposomen komplexiert. Diese Liposomen verschmelzen dann mit der Zellmembran und schleusen auf diese Art und Weise die DNA in die Zelle ein.

Transiente Lipofektion von HeLa-Zellen mit Lipofectamine2000

Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/well (96 Well Platte) bzw. von 2×10^5 Zellen/Deckgläschen (in einer 24 Well Platte) ausgesät. Die Lipofektion wurde wie vom Hersteller (Invitrogen) beschrieben durchgeführt. Lediglich das Volumen an verwendetem Lipofectamine sowie die Menge der eingesetzten DNA wurden optimiert.

Lipofektion im 24 well Format

Die Lipofektion auf Deckgläschen in einer 24 Well Platte wurde mit einer Gesamtmenge von 2 µg DNA und einem Volumen von 2 µl Lipofectamine2000 pro Well durchgeführt. Hierbei wurden die DNA und das Lipofectamine2000 zuerst getrennt voneinander für 5 min in je 50 µl OptiMEM inkubiert. Anschließend wurden die 2 Suspensionen vermischt und weitere 20 min inkubiert, bevor die komplette Suspension auf die Zellen in einem Volumen von 500 µl Medium gegeben wurde. 6 h nach Zugabe wurde das Medium komplett gewechselt. Nach insgesamt 24 h wurden die Zellen fixiert und analysiert.

Lipofektion im 96 well Format, Durchführung für HeLa-Zell basierten Screen

Bei der Lipofektion im 96 Well Format wurden insg. 0,3 µg DNA und 0,5 µl Lipofectamine2000 in einem Volumen von 25 µl OptiMEM verwendet. Die Kotransfektion von Plasmid-DNA und siRNA wurde ebenfalls wie vom Hersteller (Invitrogen) beschrieben durchgeführt. Es wurden 5 µl einer 800 nM siRNA Lösung (Endkonzentration 26,6 nM), eine Gesamtmenge von 0,3 µg Plasmid-DNA sowie 0,5 µl Lipofectamine2000/Well verwendet. Die siRNA wurde zusammen mit der Plasmid-DNA getrennt von dem Lipofectamine2000 in 25 µl OptiMEM für 5 min inkubiert. Nach Mischung der beiden Suspensionen erfolgte ein weiterer 20 minütiger Inkubationsschritt. Die entstandene Suspension wurde dann auf die Zellen in einem

Volumen von 100 µl Medium gegeben. Nach einer 6 stündigen Inkubation im Transfektionsmix wurde das Medium komplett ausgetauscht. Die Fixierung und Analyse erfolgte nach 72h.

Lipofektion neuronaler Zellen mit Lipofectamine2000

Die Lipofektion erfolgte bei neuronalen Zellen erst am 10. Tag *in vitro* (DIV 10). Bei einer Transfektion im 96 well Format wurde eine Gesamtmenge von 0,5 µg DNA sowie ein Volumen von 1 µl Lipofectamine2000 pro Well eingesetzt. Als Variation zu den Herstellerangaben wurde zudem kein OptiMEM oder Neuronenmedium für den Transfektionsansatz verwendet, sondern Neuronenmedium ohne B27-Zusatz. Die DNA sowie das Lipofectamine2000 wurden ebenfalls in 25 µl des Neuronenmediums ohne B27 für 5 min inkubiert und anschließend vermischt. Nach weiteren 20 min wurde dieser Ansatz auf die Neuronen in einem Volumen von 80 µl Neuronenmedium mit B27 gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurde das Medium komplett ausgetauscht.

Die Neuronen wurden weitere 7 Tage kultiviert, dann fixiert und immunzytochemisch gefärbt.

Transfektion neuronaler Zellen mittels Nucleofector/AMAXA-basierter Nucleofektion™

Bei der Methode der Nucleofektion/Elektroporation werden in der Membranen der Zellen durch Anlegen eines elektrischen Pulses kurzfristig Poren erzeugt, durch welche eine Aufnahme von Plasmid-DNA bzw. siRNA ermöglicht wird. Diese Methode gilt als wesentlich effizienter als eine einfache Lipofektion, was für eine folgende qRT-PCR basierte Analyse des siRNA vermittelten *Knockdown* äußerst wichtig ist. Allerdings ist diese Methode auch wesentlich neurotoxischer als eine Lipofektion, was den Einsatz großer Mengen an Zellmaterial voraussetzt.

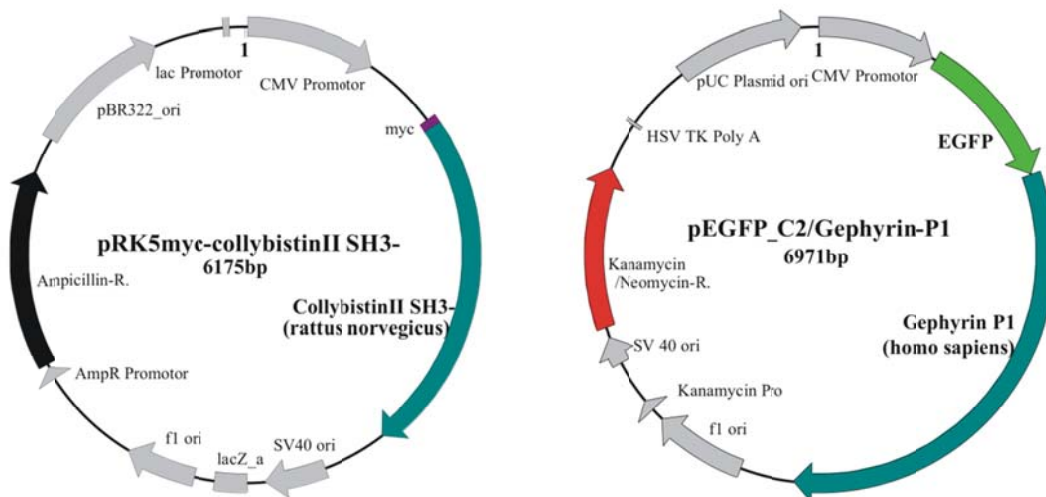
Für die Transfektion primärer hippocampaler/kortikaler Neurone bietet der Hersteller speziell dafür entwickelte Kits an. Es wurde das Amaxa® Rat Nucleofector® Kit von Lonza (Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz) verwendet.

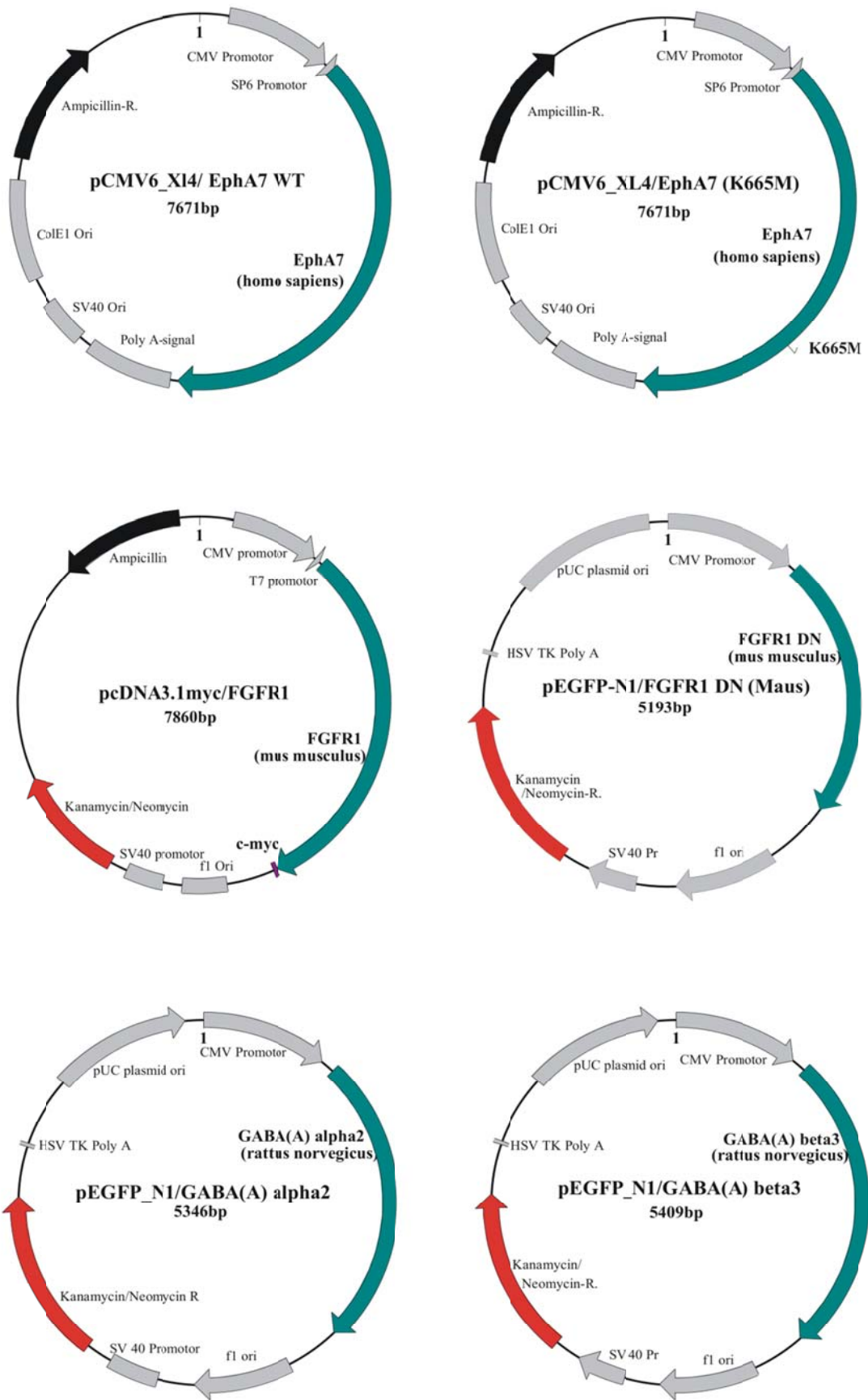
Direkt im Anschluss an die Präparation werden die, sich noch in Lösung befindlichen kortikalen Neurone, für die Nucleofektion vorbereitet. Hierfür wurden für eine Transfektion ca. 5×10^6 kortikale Neurone bei 100 – 150 x g für 5 min zentrifugiert und anschließend in 100 µl Nucleofector-Lösung (mit Supplement) resuspendiert.

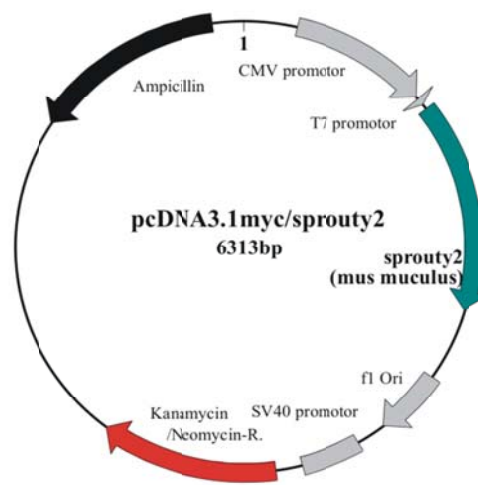
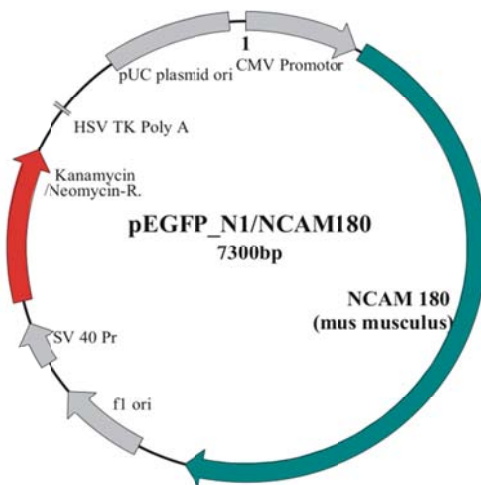
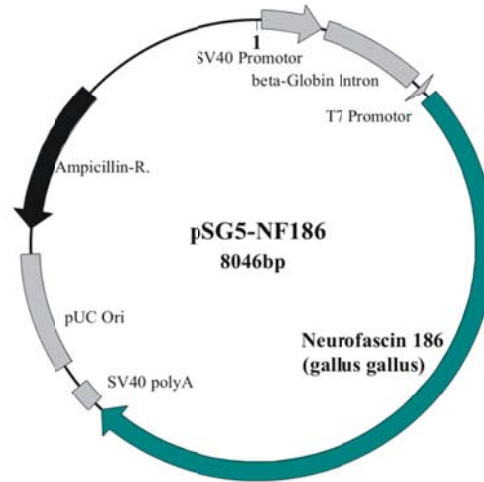
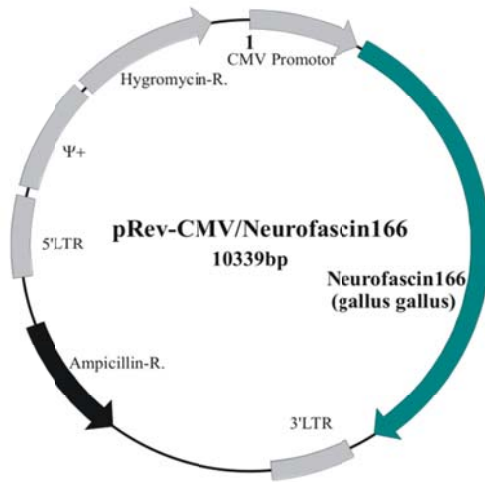
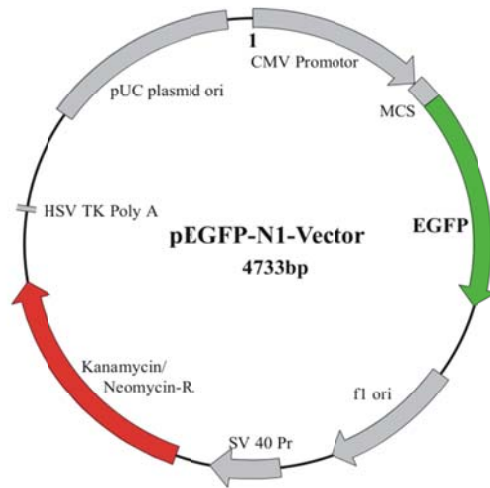
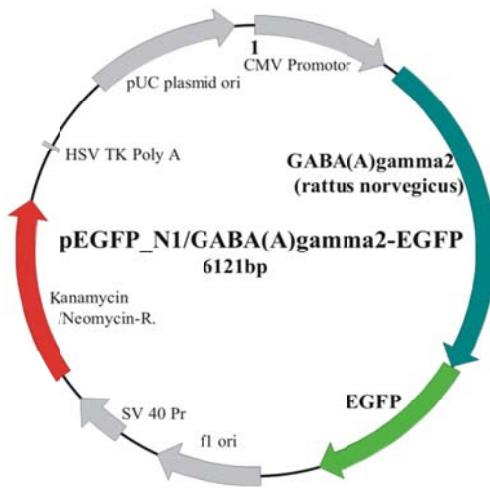
Dieser Lösung wurden dann 80 nM siRNA sowie 2 µg pmaxGFP-Vector (Kit-Bestandteil) zugegeben. Nach Überführung dieser Lösung in eine vom Hersteller bereitgestellte Küvette wurde diese in den Nucleofector II gestellt und dieser bei Programm G-013 gestartet. Im Anschluss an die Elektroporation wurden dem Ansatz 500 µl Neuronenmedium zugesetzt und die Zellsuspension mit Hilfe der vom Hersteller bereitgestellten einmal Plastikpipetten in eine 12 Well Kavität, welche vorher mit PEI beschichtet wurde, überführt. 2 - 4 h nach der Nukleofektion sowie am Folgetag wurde jeweils ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. Am dritten Tag nach der Nucleofektion wurden die Zellen in 350 µl RLT Puffer lysiert und so für die anschließende RNA-Aufreinigung vorbereitet.

4.2.3 Plasmidkarten

Folgende Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:







4.2.4 Immunzytochemie

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern können spezifische Proteine in/auf Zellen detektiert werden. Dabei bindet ein spezifischer primärer Antikörper an ein zu detektierendes Protein. Anschließend wird ein sekundärer Antikörper appliziert, der den primären Antikörper auf Grund dessen Herkunft aus einer bestimmten Wirtsspezies erkennt und bindet. Dieser sekundäre Antikörper kann an verschiedene Moleküle gekoppelt sein, welche eine Detektion möglich machen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörpern handelte es sich um an Fluorophore (Cy3, Cy5) gekoppelte Antikörper. Diese Fluorophore (Cyanine) können durch Licht bestimmter Wellenlänge (Ex_{Cy3} 550 nm, Cy5 650 nm) angeregt werden, wodurch sie ihrerseits Licht emittieren (Em_{Cy3} 570 nm; Cy5 670 nm), welches z.B. fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden kann.

Die mit 4% PFA/PBS fixierten Zellen wurden mit Hilfe von 0,2 % TritonX-100/1x BMB/1x PBS für 30 min geblockt und permeabilisiert, um intrazelluläre Antigene zugänglich zu machen. Im Anschluss daran wurden die Zellen mindestens 2 h bei RT in einer Lösung des primären Antikörpers (in 0,2 % TritonX-100/1x BMB/1x PBS) inkubiert.

Vor der Inkubation mit dem sekundären Antikörper (in 0,2 % TritonX-100/1x BMB/1x PBS, 1:500 -1:800) für mindestens 2 h bei RT wurden die Zellen 3 x für 2 min in PBS gewaschen. Direkt im Anschluss an die Inkubation des sekundären Antikörpers wurden die Zellen mit einer Hoechst-Lösung (Hoechst 33258, 1:1000 in PBS) zur Färbung der Zellkerne für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in PBS gelagert (in 96-well Platten) bzw. die Deckgläschen aus den 24 Well Platten entnommen und mit *Fluorescence Mounting Medium* (DAKO) auf Objektträgern fixiert.

4.2.5 Mikroskopie und auswertende Bildanalyse

Konfokale Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem CLSM 510 Meta (ZEISS AG, Oberkochen) unter Verwendung eines Plan Aplanochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 Objektivs durchgeführt.

Die verwendeten Exzitationswellenlängen lagen bei 488 nm (EGFP), 544 nm (Cy3) und 633 nm (Cy5). Die emittierten Wellenlängen wurden mit folgenden Filtern detektiert:

EGFP: BP 505-530 (diese Grenzen wurden manuell im Meta Kanal gewählt)

Cy3: 553-585

Cy5: 649-703 (diese Grenzen wurden manuell im Meta Kanal gewählt)

Mit Hilfe des cLSM510Meta konnten zum einen optische Schnitte durch das Objekt, als auch sogenannte Stack/Stapelaufnahmen aufgenommen werden. Bei den Stapelaufnahmen werden mehrere optische Schnitte eines Objekts in definiertem Abstand zueinander aufgenommen, wobei diese dann durch verschiedene Bildverarbeitungsprogramme wieder zu einem 3 dimensional Modell zusammengefügt werden können. HeLa Zellen wurden in dieser Arbeit nur in einschichtigen Aufnahmen bearbeitet, während für die Analyse von synaptischen Spots auf dendritischen Ausläufern hippocampaler Neurone Stapelaufnahmen verwendet wurden. Die Stapelaufnahmen der Neurone erlauben die Detektion aller synaptischen Spots, die auf jeder Seite des Dendriten vorkommen können.

Die Bildanalyse bzw. Auswertung erfolgte mit Hilfe einer speziellen Bildverarbeitungs-Software (Imaris).

Imaris – Software

Die Software Imaris 6.2.1 (Bitplane AG, Zürich) wurde verwendet, um die mikroskopischen Aufnahmen zu analysieren. Diese Software ist dazu geeignet, über die Anfertigung verschiedener Masken u.a. Anzahl, Oberflächen, Volumen sowie die Intensität bestimmter Kanäle in 2D bzw. 3D Bildern zu bestimmen.

Alle Auswertungen zur Größe/Oberfläche der Gephyrincluster im HeLa Zellsystem wurden mit der Imaris Software durchgeführt. Hierbei wurde eine „Region of interest“ um eine Zelle gebildet. Anschließend wurde eine Oberflächenmaske erstellt welche jeweils die gleichen Grundeinstellungen beinhaltet. Die Statistiken (Oberfläche, Anzahl, Volumen) zu diesen Oberflächenmasken auf einer Zelle konnten dann in eine Excel-Datei exportiert werden.

Für den siRNA Screen wurden die Parameter der vorangegangenen Auswertungen übernommen. Die Auswertung wurde dann allerdings mit einer Zelle pro Bild halb automatisch durchgeführt. Dies erfolgte über ein Programm, welches zum Imaris-Softwarepaket gehört. In diesen sogenannten „Batch-Coordinator“ konnte die Auswerteroutine aus der eigentlichen Imaris-Software als Programm/Routine übernommen werden. Ebenfalls konnten alle zu analysierenden mikroskopischen Aufnahmen in dieses Programm geladen werden, welche dann automatisch nach der gespeicherten Routine ausgewertet wurden.

Bei der Auswertung von primären hippocampalen Neuronen wurden die Stapelaufnahmen (Stack), welche mit dem CLSM510 Meta aufgenommen wurden, in die Imaris Software geladen. Hier wurde der Stack in Form einer dreidimensionalen Rekonstruktion dargestellt. Um die Anzahl oder Größe von punktförmigen Strukturen zu bestimmen, wurde zuerst eine Maske für den EGFP oder MAP2 gefärbten Kanal erstellt, um nur die Zellen mit ihren Ausläufern ohne Hintergrundfärbung darzustellen. Diese Maske konnte dann zur Erstellung eines neuen Kanals herangezogen werden, welche nur noch die punktförmigen Strukturen (z.B. Gephyrin / PSD95) enthielten, welche innerhalb der Maske für die EGFP oder MAP2 gefärbten Zellen im Bild lagen. Es wurde dann eine Maske speziell um die ersten 20 μm eines Dendriten gebildet (*region of interest*, ROI), welche die punktförmigen Strukturen des neu gebildeten Kanals umfassten. Die Imaris-Software war dann in der Lage, verschiedenste Parameter wie Anzahl, Volumen oder Oberfläche in Statistiken auszugeben.

4.2.6 Statistik

Alle Grafiken der gewonnenen Ergebnisse wurden mit Microsoft Excel 2007 bzw. Statview 5.0 (SAS Institute Inc.) erstellt.

Alle statistischen Analysen wurden mit Statview 5.0 (SAS Institute Inc.) durchgeführt. P-Werte von $< 0,05$ (*) und $p < 0.01$ (**) wurden als signifikant, p-Werte $< 0,001$ (***) als hochgradig signifikant betrachtet. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts.

5 Ergebnisse

5.1 siRNA basierter Screen, zur Identifizierung von Proteinkinasen, welche für die Regulation von Gephyrinclustern wichtig sind

Ziel dieser Doktorarbeit war es, in einem ersten Schritt ein siRNA basiertes Screening System zur Analyse der Stabilisierung inhibitorisch postsynaptischer Proteine zu entwickeln. Hierbei sollte vor allem untersucht werden, welche Proteine an der Stabilisierung bzw. Destabilisierung des Gerüstproteins Gephyrin beteiligt sind. Als Zellsystem wurde eine leicht zu transfizierende Tumorzelllinie ausgewählt. Um neuronale Proteine in Tumorzellen zu analysieren, wurden diese überexprimiert und deren morphologisches Verhalten in diesem Zellsystem charakterisiert.

5.1.1 Neurofascin induziert FGFR1 abhängig eine Steigerung der EGFP-Gephyrinclustergröße in HeLa Zellen

Gephyrin ist ein sogenanntes Gerüstprotein, welches in Neuronen unterhalb der postsynaptischen Membran inhibitorischer Synapsen zu finden ist (Langosch et al., 1992). Dieses sollte in Form eines Fusionsproteins, gekoppelt an das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), in HeLa Zellen überexprimiert und sein Verhalten charakterisiert werden.

Hierfür wurde erst Gephyrin alleine, und dann in Kombination mit CollybistinII_{SH3}-überexprimiert. Zur weiteren Charakterisierung sollte neben CollybistinII_{SH3}-, auch Neurofascin mit EGFP-Gephyrin koexprimiert werden. Neurofascin ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches mit der Stabilisierung von Gephyrin am Axoninitialsegment *in vivo* in Verbindung gebracht wurde (Kriebel et al., 2011). Diese Verbindung zu Gephyrin sollte nun auch im artifiziellen HeLa Zellsystem untersucht werden.

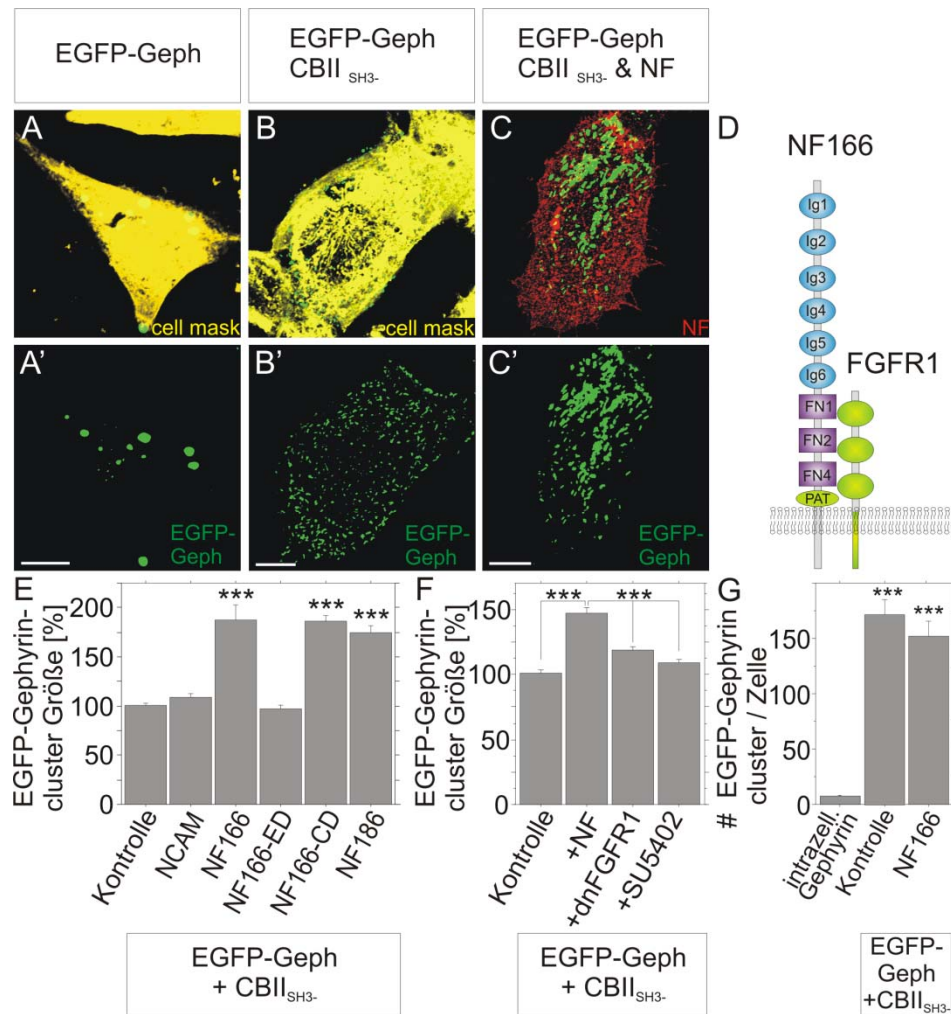


Abbildung 5 Charakterisierung von EGFP-Gephyrin sowie anderen neuronalen Proteinen in HeLa Zellen. EGFP-markiertes Gephyrin wurde alleine (A-A'), in Kombination mit CollybistinII_{SH3} (CBII_{SH3}) (B-B'), sowie mit zusätzlichem Neurofascin (C-C') in HeLa Zellen überexprimiert. (A-A') Darstellung einer HeLa Zelle mit intrazellulären EGFP-Gephyrinclustern (A', grün) sowie einer Oberflächenfärbung zur Darstellung der Zellgrenzen (A, gelb). (B-B') EGFP-Gephyrin in Clustern an der Oberfläche, nach Koexpression mit CollybistinII_{SH3}. (B', grün). Zusätzliche Oberflächenfärbung mittels *cell mask* (B, gelb). (C-C') EGFP-Gephyrin Oberflächencluster nach Koexpression mit CBII_{SH3} und Neurofascin (C', grün). Zusätzliche Färbung des kotransfizierten Neurofascin (C, rot). Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. (D) Schematische Darstellung der Interaktion zwischen NF166 und dem FGFR1 (Kirschbaum et al., 2009). (E) Quantifizierung der durchschnittlichen EGFP-Gephyrinclustergröße. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. ($p < 0,001$ ***, $n > 1150$). (F) Quantifizierung der Gephyrinclustergrößen nach Überexpression von EGFP-Gephyrin, CBII_{SH3}, Neurofascin sowie verschiedenen Molekülen, welche die Gephyrinclusterung beeinflussen. Normiert wurde auf die Kontrolle, bestehend aus einer Überexpression von EGFP-Gephyrin und CBII_{SH3}. dnFGFR1 steht für die dominant negative Isoform des FGFR1. SU5402 ist ein pharmakologischer Inhibitor von FGFR1. SU5402 (Endkonzentration 10 µM) wurde 12h inkubiert. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. (G) Quantifizierung der durchschnittlichen Clusteranzahl pro Zelle, nach Überexpression von EGFP-Gephyrin alleine (intrazell. Cluster), EGFP-Gephyrin + CBII_{SH3} (Kontrolle), sowie EGFP-Gephyrin + CBII_{SH3} + Neurofascin (NF). $n = 38$, $p < 0,0001$. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Zu Beginn wurde EGFP-Gephyrin alleine in HeLa Zellen überexprimiert. Dies führte wie in Abbildung 5 A zu sehen, zu intrazellulären runden Clustern. Bei gleichzeitiger Überexpression von EGFP-Gephyrin zusammen mit dem Rho-GEF CollybistinII_{SH3}- kam es zu einer deutlichen Veränderung in der Morphologie der EGFP-Gephyrincluster (Abbildung 5 B). Mit Hilfe der Quantifizierung der EGFP-Gephyrinclusteranzahl in Abbildung 5 G konnte ebenfalls eine starke Steigerung der durchschnittlichen Clusteranzahl pro Zelle detektiert werden.

Wurde neben EGFP-Gephyrin und CollybistinII_{SH3}- noch das Zelladhäsionsmolekül Neurofascin in HeLa Zellen überexprimiert, so konnte eine Fusion einzelner Gephyrincluster erkannt werden (Abbildung 5 C). Durch eine quantitative Analyse konnte eine deutliche Steigerung in der Gephyrinclustergröße festgestellt werden (Abbildung 5 E). Die Anzahl der durchschnittlichen Gephyrincluster pro Zelle änderte sich dabei gegenüber der Kontrolle (EGFP-Gephyrin + CBII_{SH3}-) nicht (Abbildung 5 G). Zur weiteren Charakterisierung der neurofascinabhängigen Steigerung der Gephyrinclustergröße, wurden nun Deletionsmutanten von Neurofascin eingesetzt. Es konnte so gezeigt werden, dass die intrazelluläre Domäne von Neurofascin (NF166-CD, zytoplasmatische Domäne) hinreichend ist, die Gephyrincluster zu vergrößern. Die extrazelluläre Domäne (NF166-ED, extrazellulären Domäne) hatte keinen Einfluss auf die Clustergröße (Abbildung 5 E). Zusätzlich ist auch die Neurofascin 186 Isoform in der Lage die Vergrößerung der Gephyrincluster auszulösen. Als weitere Kontrolle wurde die Größe von EGFP-Gephyrinclustern auch nach Überexpression von EGFP-Gephyrin und CBII_{SH3}- zusammen mit NCAM bestimmt. NCAM ist ebenfalls ein Zelladhäsionsmolekül, welches an exzitatorischen Synapsen zu finden ist (Sytnyk et al., 2006). Hierbei konnte allerdings keine Größenveränderung festgestellt werden (Abbildung 5 E).

Nachdem aus der Veröffentlichung von Kirschbaum et. al. bekannt war, dass Neurofascin mit dem *fibroblast growth factor receptor 1* (FGFR1) interagiert, und das Neuritenwachstum FGFR1 abhängig reguliert wurde, sollte diese Funktion auch in Hinsicht auf die Gephyrinaggregation untersucht werden (Abbildung 5 D) (Kirschbaum et al., 2009). Zu diesem Zweck, wurden eine dominant negative Variante des FGFR1, sowie ein pharmakologischer Inhibitor gegen den FGFR1 eingesetzt. Während in Abbildung 5 F die Gephyrinclustergröße durch den Einsatz von Neurofascin 166 erneut gesteigert werden konnte, wurde dieser Effekt durch die gleichzeitige Überexpression der dominant negativen Variante des FGFR1

(dnFGFR1) blockiert (Abbildung 5 F). Ein vergleichbares Ergebnis wurden durch den Einsatz des pharmakologischen Inhibitors SU5402 erzielt (Abbildung 5 F).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Neurofascin induzierte Vergrößerung der Gephyrincluster FGFR1 abhängig ist.

Nachdem nun das Verhalten des Gerüstproteins Gephyrin, in An-/ und Abwesenheit von CollybistinII_{SH3}- und Neurofascin charakterisiert wurde, sollte analysiert werden, wie sich GABA_A Rezeptoren im artifiziiellen HeLa Zellsystem verhalten.

Dazu wurde EGFP-Gephyrin zusammen mit GABA_A Rezeptoren der Zusammensetzung $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ in HeLa Zellen in An- bzw. Abwesenheit von CollybistinII_{SH3}- und später Neurofascin überexprimiert.

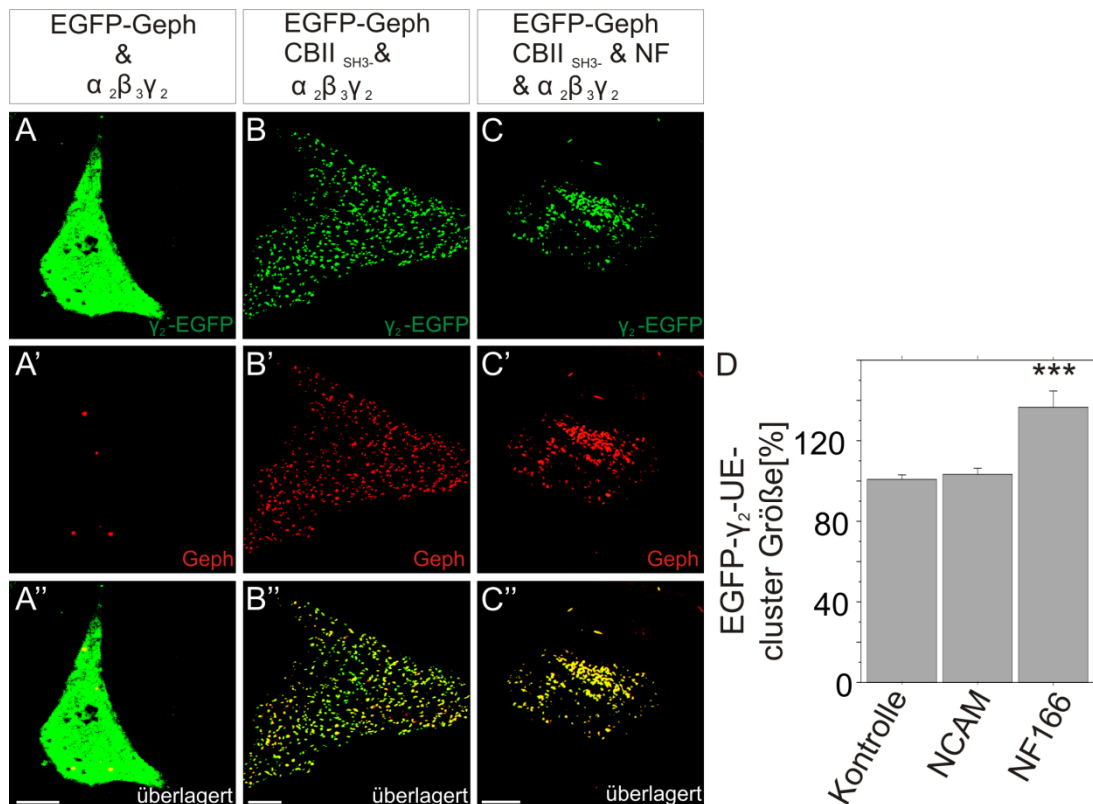


Abbildung 6 Überexpression und Charakterisierung von Gephyrin sowie GABA_A-Rezeptoren im artifiziiellen HeLa Zellsystem. (A-A'') HeLa Zellen mit überexprimiertem Gephyrin, sowie mit GABA_A-Rezeptoruntereinheiten in einer Zusammensetzung von $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ -EGFP. (B, grün) Die EGFP markierte γ_2 Untereinheit der GABA_A-Rezeptoren, sowie das Fluoreszenzsignal eines gegen Gephyrin gerichteten Antikörpers (A', rot). (A'') überlagertes Bild aus A und A'. (B-B'') HeLa Zellen mit überexprimiertem Gephyrin, CBIISH3- sowie GABA_A-Rezeptoruntereinheiten in einer Zusammensetzung von $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ -EGFP. (B, grün) Die EGFP markierte γ_2 Untereinheit der GABA_A-Rezeptoren, sowie das Fluoreszenzsignal eines gegen Gephyrin gerichteten Antikörpers (B', rot). (B'') überlagertes Bild aus B und B'. (C) HeLa Zellen mit überexprimiertem Gephyrin, CBIISH3-, GABA_A-Rezeptoruntereinheiten in einer Zusammensetzung von $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ -EGFP sowie Neurofascin. Sowohl die γ_2 -EGFP Untereinheit der GABA_A-Rezeptoren (F, grün) als auch die Gephyrin Fluoreszenzsignale

(C', rot) bilden sich überlagernde Cluster (C''). Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m. (D) Quantifizierung der Clustergröße von γ_2 -EGFP Untereinheiten. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler, $p < 0,0001$ ***, $n > 1150$.

Die Überexpression von Gephyrin zusammen mit den GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ -EGFP in HeLa Zellen führte dazu, dass Gephyrin wie in Abbildung 5 A schon beschrieben in Form runder Cluster in der Zelle vorlag (Abbildung 6 A' und A''). Die GABA_A Rezeptoren visualisiert durch die EGFP markierte γ_2 Untereinheit zeigen währenddessen eine gleichmäßige Oberflächenfärbung (Abbildung 6 A und A''). Wird nun aber CollybistinII_{SH3}- zusätzlich zu Gephyrin und den GABA_A Rezeptoruntereinheiten transfiziert, kann eine Veränderung in der Morphologie von sowohl Gephyrin, als auch der γ_2 -EGFP markierten Untereinheit, in kleine Oberflächencluster beobachtet werden. Diese kolokalisieren dabei zu einem hohen Grad (Abbildung 6 B–B''). Dies lässt also vermuten, dass Gephyrin CBII_{SH3}- abhängig an die Oberfläche transloziert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass Gephyrin in HeLa Zellen ähnliche Funktionen wie in neuronalen Zellen übernimmt, indem es mit den GABA_A Rezeptoruntereinheiten kolokalisiert.

Zusätzlich wurde dann neben Gephyrin, den GABA_A Rezeptoruntereinheiten und CBII_{SH3}- das Zelladhäsionsmolekül Neurofascin überexprimiert. Wie in Abbildung 5 C gezeigt fusionieren die Gephyrinaggregate zu größeren Clustern (Abbildung 6 C' und C''). Nachdem die EGFP markierte γ_2 Untereinheit der GABA_A Rezeptoren auch in diesem Fall mit Gephyrin kolokalisiert, kann vermutet werden, dass Gephyrin seine aus Neuronen bekannte Funktion der Regulation der Lokalisation von GABA_A Rezeptoren auch in HeLa Zellen übernimmt (Abbildung 6 C und C''). Die bestehende Kolokalisation legt nahe, dass auch die Cluster der γ_2 -EGFP Untereinheit eine Neurofascin abhängige Vergrößerung durchlaufen. Dies konnte mit Hilfe der in Abbildung 6 D dargestellten quantitativen Auswertung bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Cluster der γ_2 -EGFP Untereinheit, Neurofascin abhängig größer werden, während eine gleichzeitige Transfektion von NCAM keine Auswirkungen hatte (Abbildung 6 D). Insgesamt wurde mit diesen Ergebnissen gezeigt, dass sich Gephyrin und GABA_A Rezeptoren durch ihre Kolokalisation im HeLa Zellsystem ähnlich verhalten wie in Neuronen. Das HeLa Zellsystem erweist sich daher als geeignet für einen Screen, um Veränderungen neuronaler Proteine nachweisen zu können.

5.1.2 Entwicklung des siRNA basierten Screens in HeLa – Zellen

Als direkte Vorarbeit für den durchzuführenden siRNA abhängigen Screen sollten nun die experimentellen Randbedingungen für die Durchführung am Beispiel des FGFR1 erarbeitet werden. Es sollte eine siRNA gegen diesen Rezeptor verwendet werden, um die vorher gemessene Reduktion der Gephyrinclustergröße, siRNA abhängig zu zeigen.

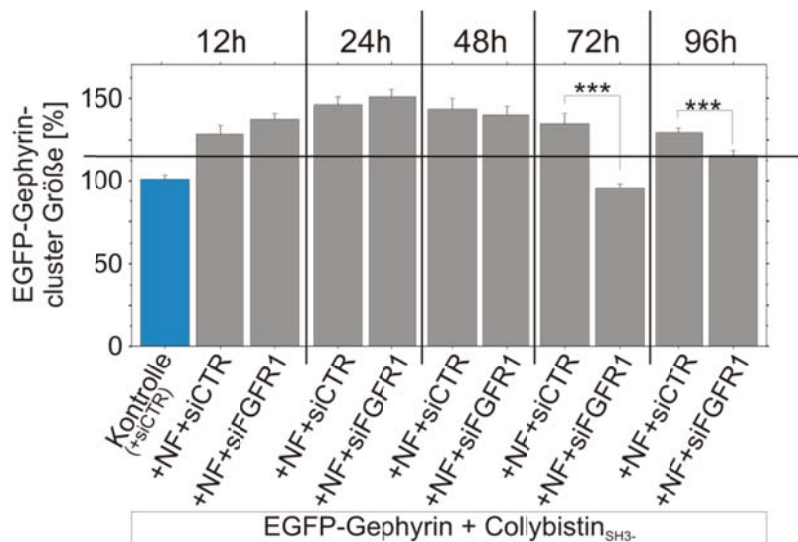


Abbildung 7 Zeitkinetik zur Quantifizierung von EGFP-Gephyrinclustergrößen nach Einsatz einer gegen den FGFR1 gerichteten siRNA. Zeitkinetik der Quantifizierung von EGFP-Gephyrinclustergröße zu den Zeitpunkten, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h sowie 96 h. Der blaue Balken stellt die Kontrollsituation dar. Diese besteht aus einer Kotransfektion von EGFP-Gephyrin, CollybistinII_{SH3}- und siCTR. Diese Kontrolle wurde zu jedem Zeitpunkt analysiert und jeweils zur Normierung verwendet, daher wurde diese nur einmalig in das Diagramm eingefügt (blau). Alle anderen Balken wurden behandelt wie angegeben. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Der Querbalken liegt bei einem Wert von 115%. $p < 0,0001^{***}$. Alle +NF+siCTR Werte entsprachen gegenüber der +siCTR Kontrolle einem p-Wert von $< 0,0001$. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Einzeichnung dieser Signifikanzen verzichtet, $n > 1150$.

Abbildung 7 zeigt das Ergebnis eines Experiments, bei dem die Wirkung der siRNA gegen den FGFR1 zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert wurde. Hierbei wurde als Kontrolle, repräsentiert durch den blauen Balken in Abbildung 7 EGFP-Gephyrin, CollybistinII_{SH3}- und eine Kontroll siRNA (siCTR) in HeLa Zellen überexprimiert. Die hierbei gemessene Clustergröße wurde auf 100% festgesetzt. Für die siRNA abhängigen Versuche wurden EGFP-Gephyrin, CollybistinII_{SH3}-, Neurofascin, sowie siCTR zur Definition der Ausgangsgröße der Gephyrincluster ohne funktionelle siRNA eingesetzt. Für die Experimente mit funktioneller siRNA gegen den FGFR1, wurde diese ebenfalls mit EGFP-Gephyrin, CollybistinII_{SH3}- und Neurofascin kotransfiziert. Die Gephyrinclustergrößen wurden dann von allen Experimenten

quantitativ ausgewertet und auf die Kontrolle normiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Neurofascin die Gephyrinclustergröße auf einen Bereich von ca. 130%-150% im Bezug auf die Clustergröße der Kontrolle steigerte (Abbildung 7). Die funktionelle siRNA gegen den FGFR1 führte zu den Zeitpunkten 12h, 24h, und 48h zu keiner Veränderung der Gephyrinclustergröße im Vergleich zu den + Neurofascin + siCTR Ergebnissen. Hierbei wurden Gephyrinclustergrößen gemessen, die sich ebenfalls in einem Bereich zwischen 135%-150% im Vergleich zur Kontrolle befanden. 72h nach der Transfektion konnte erstmals eine signifikante siRNA induzierte Abnahme in der Gephyrinclustergröße detektiert werden. Diese war im Vergleich zur zugehörigen +NF+siCTR Probe bei 72h hochgradig signifikant reduziert (Abbildung 7). Auch 96h nach der Transfektion konnte eine hochgradig signifikante siRNA abhängige Abnahme der Gephyrinclustergröße gegenüber der zugehörigen Clustergröße der +NF+siCTR Probe bei 96h gezeigt werden (Abbildung 7). Der Wert der Probe mit funktioneller siRNA bei 96h war jedoch gegenüber dem Wert bei 72h schon wieder leicht angestiegen (Abbildung 7). Diese Experimente lassen zwei für den folgenden Screen wichtige Schlussfolgerungen zu. Erstens kann die siRNA abhängige Reduktion der Gephyrinclustergröße stabil quantifiziert werden und zweitens liegt der optimale Zeitpunkt für die Analyse 72h nach der Transfektion. Außerdem konnten weitere wichtige Richtlinien für die Durchführung des Screens gewonnen werden. So wurde auf Grundlage dieses Experiments festgelegt, dass eine siRNA erst dann als wirksam auf die Gephyrinclustergröße beschrieben werden soll, wenn folgende Punkte erfüllt wurden. Erstens sollte eine hochgradig signifikante Abnahme der Gephyrincluster Größe gegenüber der Probe erreicht werden, welche die Ausgangsgröße der Gephyrincluster definierte, nämlich der Kotransfektion von EGFP-Gephyrin, CollybistinII_{SH3}, Neurofascin, sowie siCTR. Zweitens sollte aber die Clustergröße nicht mehr als 15% höher, als die der Kontrolle, bestehend aus EGFP-Gephyrin, CollybistinII_{SH3} sowie siCTR, sein. Nachdem alle Proben auf diese Kontrolle normiert wurden, heißt das, dass eine siRNA, welche als wirksam auf die Gephyrinclustergröße beschrieben werden soll, eine relative Gephyrinclustergröße von 115% oder kleiner aufweisen musste.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der siRNA gegen den FGFR1 eine Reduktion in der Gephyrinclustergröße ausgelöst wurde und diese auch stabil quantitativ bestimmt werden konnte. Weiterhin konnten Richtlinien für die Analyse solcher Effekte erarbeitet werden.

5.1.3 siRNAs gegen 39 Kinasen oder kinase-assoziierte Proteine wiesen destabilisierende Effekte auf Gephyrincluster in HeLa Zellen auf

Auf der Basis der vorangegangenen Experimente wurde im Folgenden ein siRNA basierter Screen durchgeführt. Hierbei sollten Kandidatenproteine identifiziert werden, welche an der Regulation von Gephyrinclustern beteiligt sind. Dabei wurde eine siRNA Bibliothek verwendet, welche 710 Kinasen oder kinase-assoziierte Proteine herunterreguliert. Gegen jedes dieser 710 Zielmoleküle standen 3 unabhängige siRNAs zur Verfügung. Für diesen Screen wurden jeweils EGFP-Gephyrin, CBII_{SH3}- und Neurofascin zusammen mit den einzelnen siRNAs, im 96 well Format kotransfiziert. Als Kontrolle wurde je ein Well pro Platte mit EGFP-Gephyrin, CBII_{SH3}- und siCTR (unspezifische siRNA als Kontrolle) und ein Well mit EGFP-Gephyrin, CBII_{SH3}-, Neurofascin und siCTR transfiziert. In einem ersten Durchlauf wurden dann, die jeweils ersten siRNAs der Bibliothek gegen alle 710 Zielmoleküle verwendet (Abbildung 8). Der Screen wurde durch den morphologischen Vergleich der Gephyrincluster mit Hilfe des CLSM510 Meta Laserscanning Mikroskop ausgewertet. Um valide Ergebnisse sicherzustellen, wurden alle Experimente verblindet ausgewertet. Außerdem wurden die ersten beiden Platten, welche insgesamt 116 verschiedene siRNAs umfassten sowohl optisch, als auch quantitativ ausgewertet. Hierbei wurden von jeder Behandlung 20 Zellen aufgenommen und mittels einer automatisierten Größenanalyse ausgewertet (Imaris, Batch-Coordinator, Bitplane AG, Basel Schweiz). Das Ergebnis dieser quantitativen Auswertung wurde dann mit der optischen Auswertung verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass es möglich war alleine durch die optische Analyse ohne Fehler einzuschätzen, dass die Clustergröße nicht reduziert wurde. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Experimente zuerst optisch ausgewertet. Die Experimente, bei denen eine Reduktion in der Clustergröße während der optischen Analyse angenommen wurde, wurden im Anschluss dann automatisiert quantitativ auf ihre tatsächliche Gephyrinclustergröße untersucht.

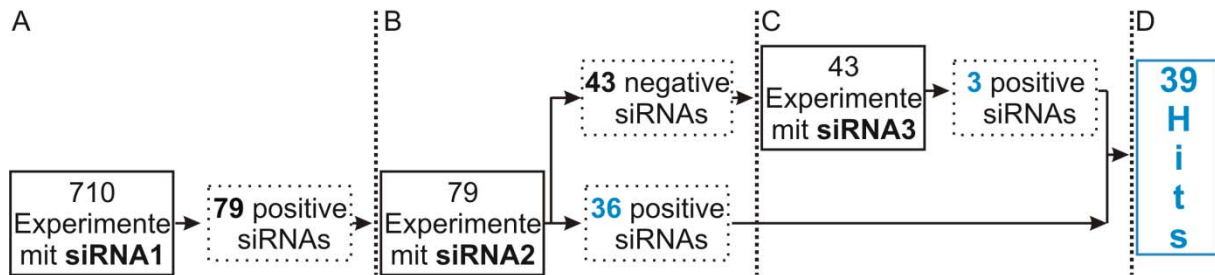
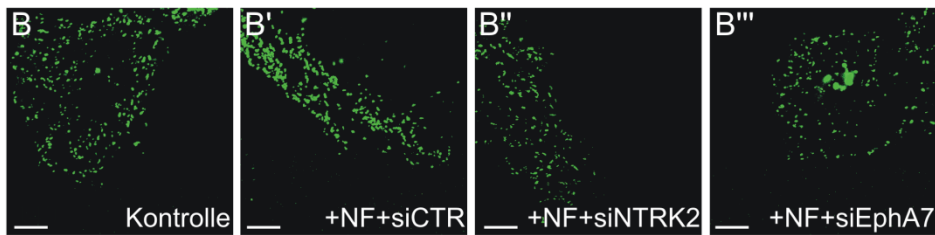
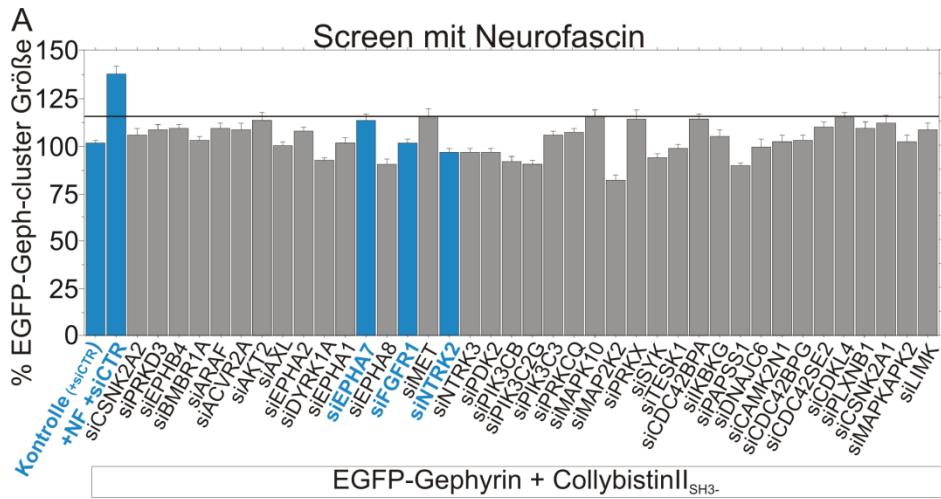


Abbildung 8 Durchführung des siRNA basierten Screens in HeLa Zellen. siRNA1, 2 und 3 entsprechen den, in der siRNA Bibliothek vorhandenen unabhängigen siRNAs, die gegen jedes einzelne Zielgen vorhanden waren. (A) Durchgang 1 mit den ersten 710 siRNAs. (B) Durchgang 2: 79 Experimente mit der 2. unabhängigen siRNA. (C) Durchgang 3: 43 Experimente mit der 3. unabhängigen siRNA. (D) Gesamtanzahl an Hits.

Aus den 710 Experimenten, welche im ersten Durchgang mit der jeweils 1. siRNA durchgeführt wurden, entsprachen 79 siRNAs den Anforderungen, um als wirksam auf die Gephyrinclusteraggregation zu gelten (Abbildung 8 A). Ein weiteres Kriterium für einen „Hit“ (Regulation der Gephyrinclustergröße), sollte aber sein, dass mindestens zwei der drei unabhängigen siRNAs gegen das gleiche Zielmolekül einen Einfluss ausüben. Aus diesem Grund wurden die 79 positiven Ereignisse aus dem ersten Durchlauf, nun mit der 2. unabhängigen siRNA untersucht (Abbildung 8 B). In 36 Fällen konnte die Reduktion der Gephyrinclustergröße mit der zweiten siRNA bestätigt werden. Es konnten also schon 36 siRNAs, bzw. ihre Zielproteine als Hit für einen Einfluss auf die Stabilität der Gephyrinclustergröße definiert werden. Allerdings wiesen 43 siRNAs keinen Effekt mehr auf. Diese 43 negativen Fälle wurden dann mit der 3. unabhängigen siRNA untersucht. Hierbei konnten weitere drei siRNAs identifiziert werden, welche die Gephyrinclustergröße reduzierten (Abbildung 8 C). Somit wurden auch diese weiteren drei Moleküle als Hit definiert, da nun ebenfalls insgesamt zwei unabhängige siRNAs den Effekt auf die Gephyrinclustergröße ausgelöst hatten.

Es konnten also insgesamt 39 siRNAs identifiziert werden, bei denen je 2 unabhängige siRNAs die Gephyrinclustergröße signifikant gegenüber der Ausgangsgröße der Gephyrincluster ohne funktionelle siRNA (EGFP-Gephyrin, CB_{SH3}-, Neurofascin und siCTR) und auf maximal 15% größere Cluster im Vergleich zur Kontrolle reduzierten (Abbildung 8 D).



C

Membranständige Rezeptoren				Sonstige			
Rezeptortyrosinkinasen (RTK)		Semaphorin Signalweg	TGFβ- BMP Rezeptor	CK2A1 CK2A2 PDK2 PRKX SYK DNAJC6 PAPSS1 CDKL4 CAMK2N1			
typische RTKs	Eph-Rezeptoren						
CMET NTRK2 (TrkB Protein) NTRK3 (TrkC Protein) AXL FGFR1	EPHA1 EPHA2 EPHA7 EPHA8 EPHB4	PLXNB1	ACVR2A BMPR1A			CDC42BPG CDC42SE2 CDC42BPA LIMK	
nachgeordnete intrazelluläre Signalwege							
MAPK			PI3K		PLCγ		
Ras	Jnk	p38	klassisch	Klasse II			
ARAF MAP2K2 DYRK1A TESK1	MAPK10	MAPKAPK2	PIK3CB PIK3C3 AKT2	PIK3C2G	PRKCQ PRKD3	IKBKG	

D

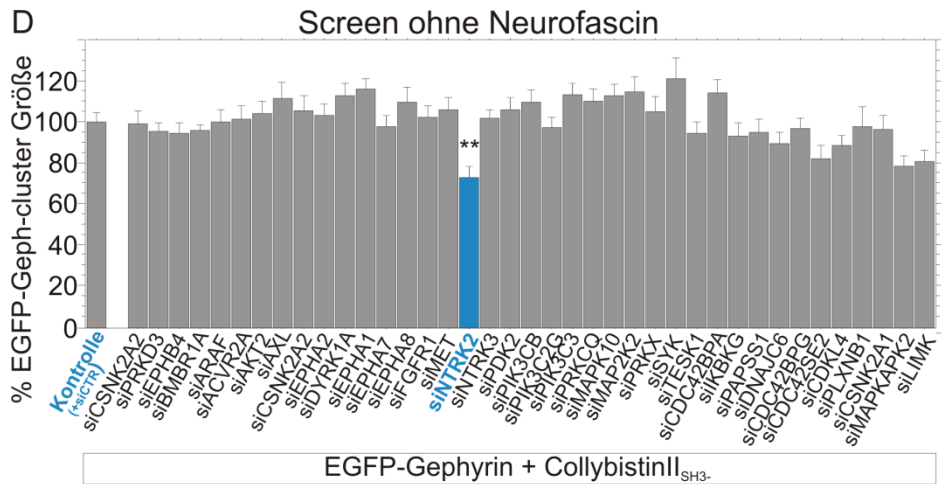


Abbildung 9 Ergebnisse des siRNA basierten Screens in HeLa Zellen. (A) Darstellung aller im Screen mit Neurofascin erhaltenen Hits (Gennamen). In blau dargestellt sind zum Einen die Kontrollen. Die Kontrolle (+siCTR) entspricht der Überexpression von EGFP-Gephyrin zusammen mit CBII_{SH3}- und siCTR, dieser Wert wurde zur Normierung verwendet und entspricht daher 100%. Die Probe +NF+siCTR ist eine zweite Kontrolle, die der Ausgangsgröße der Gephyrincluster ohne den Zusatz einer funktionellen siRNA entspricht. Hier wurden EGFP-Gephyrin, CBII_{SH3}- zusammen mit NF166 und siCTR kotransfiziert. Weiterhin in Blau dargestellt sind die Ergebnisse der mit siFGFR1 (112%), sowie mit siEPHA7 (100%) und mit siNTRK2 (95%) behandelten Zellen. Als Querbalken ist der Schwellenwert von 115% eingefügt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. $n > 1150$. (B-B'') EGFP-Gephyrincluster in HeLa Zellen nach Überexpression von EGFP-Gephyrin, CBII_{SH3}- sowie je nach Angabe, Neurofascin, siCTR (Kontroll siRNA), siNTRK2 und siEPHA7. Maßstabsbalken entsprechen 10 μm . (C) Einteilung aller Hits des Screens mit Neurofascin in funktionelle Gruppen. (D) Darstellung aller im Screen ohne den Zusatz von Neurofascin erhaltenen Hits (Gennamen). In blau dargestellt ist die Kontrolle EGFP-Gephyrin zusammen mit CB_{SH3}-, dieser Wert wurde zur Normierung verwendet und entspricht daher 100%. Weiterhin in Blau dargestellt ist das einzige positive Ergebnis von mit einer siRNA gegen Ntrk2 behandelten Zellen (73%). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. $n > 1150$, $p = 0,001$.

Alle 39 Hits sind in Abbildung 9 A aufgeführt (Gennamen). Diese quantitative Darstellung zeigt die Ergebnisse, welche jeweils mit der 1. siRNA (Durchgang1) erhalten wurden. Der eingezeichnete Querbalken zeigt den 115% Schwellenwert. Alle dargestellten Ergebnisse weisen relative Gephyrinclustergrößen unterhalb dieses Schwellenwerts auf. Die blauen Balken in Abbildung 9 A entsprechen zum Einen der Kontrolle, wobei diese jeweils zur Normierung verwendet wurde. Der zweite blaue Balken stellt die Ausgangssituation ohne die Beteiligung einer funktionellen siRNA dar. Auch diese Kontrolle wurde auf jeder analysierten Platte ausgewertet. Es ist beispielhaft ein durchschnittlicher Balken dieser 2. Kontrolle dargestellt. Die 3 weiteren blauen Balken entsprechen zum Einen der schon, in der Vorarbeit zu diesem Screen verwendeten Positivkontrolle, nämlich der siRNA gegen den FGFR1. Die anderen beiden blauen Balken entsprechen den siRNAs gegen NTRK2 (Protein TrkB Rezeptor), sowie gegen EPHA7. Die in Abbildung 9 B-B'' dargestellten, beispielhaften mikroskopischen Aufnahmen, sollen den Phänotyp, welcher durch den Einsatz der einzelnen siRNAs ausgelöst wurde, verdeutlichen. Im Vergleich zu Abbildung 9 B' welche die Neurofascin abhängig vergrößerten Gephyrincluster zeigt, kann in den Abbildung 9 B'' und B''' eine Verkleinerung der Cluster erkannt werden. Diese Cluster entsprechen damit, eher wieder der Kontrollsituation, welche in Abbildung 9 B dargestellt ist.

Die 39 Hits des siRNA basierten Screens lassen sich grob in 9 verschiedene Gruppen einteilen (Abbildung 9 C). Unter den Hits sind 13 verschiedene

Oberflächenrezeptoren. Dabei gehören 10 Oberflächenrezeptoren dem Rezeptortyrosinkinasetyp an. Diese Rezeptortyrosinkinasen können weiter in typische Rezeptortyrosinkinasen, welche weiterführend vor allem über den MAPK und den PI3K Signalweg ihre Aktivität ins Zellinnere weitergeben, eingeteilt werden (Yoshii and Constantine-Paton, 2010). Dem gegenüber stehen fünf Vertreter der Eph Rezeptorfamilie, die eher für ihre inhibierende Wirkung auf den Ras-MAPK Signalweg bekannt sind (Meier et al., 2011). Außerdem konnten vier Vertreter des PI3K Signalwegs, sowie weitere vier Vertreter des Ras-MAPK Signalwegs oder ihre Regulatoren identifiziert werden. Weitere vier Hits konnten dem Aktinzytoskelett bzw. Aktinzytoskelett-assoziierte Proteine zugeordnet werden. Ansonsten wurden drei Vertreter des PLC γ - sowie ein Vertreter des NF κ B Signalwegs identifiziert. Elf Hits konnten keiner dieser Gruppen zugeordnet werden (Abbildung 9 C).

In einem 2. Screening Durchlauf, bei welchem Neurofascin nicht mehr zur Vergrößerung der Gephyrincluster eingesetzt wurde, wurden nochmal alle Hits aus dem ersten Durchlauf untersucht. In diesem Durchlauf galten alle siRNAs, welche einen hoch signifikanten Effekt gegenüber der Kontrolle (EGFP-Gephyrin + CBII_{SH3}-+siCTR) auslösten als wirksam. Die einzige siRNA, welche in diesem Durchlauf noch einen hoch signifikanten Effekt auf die Gephyrinclustergröße aufwies, war die gegen NTRK2 gerichtete siRNA. Alle andere verwendeten siRNAs führten zu Gephyringrößen, welche zwischen 85% und 115% bezogen auf die Kontrolle schwankten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Vergrößerung der Gephyrincluster durch Neurofascin im eigentlichen Screen nötig war. Die siRNA abhängige Reduktion der Gephyrinclustergröße konnte auf diesem Weg durch eine ausreichend große Messstrecke verlässlicher detektiert werden.

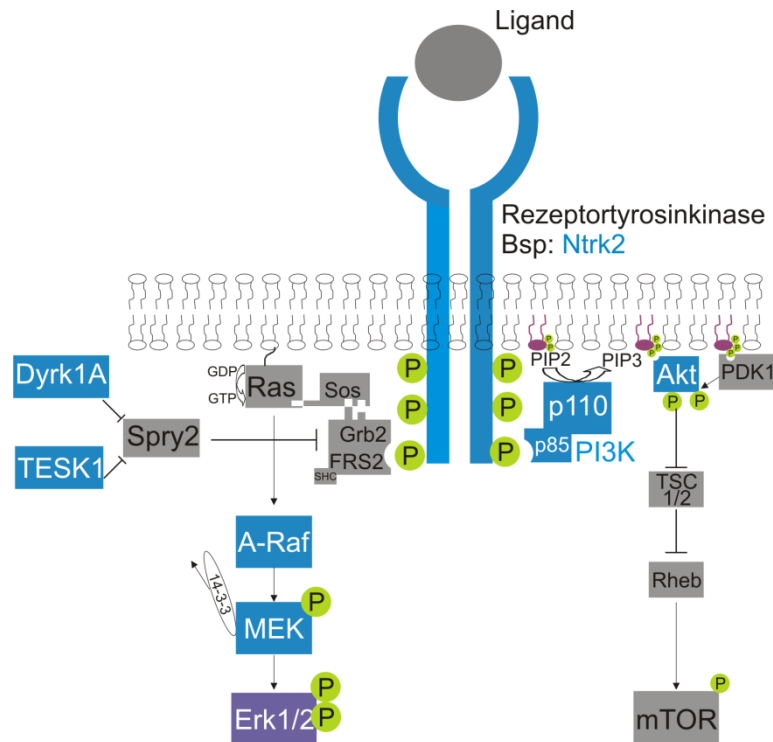


Abbildung 10 Schematische Darstellung und Einteilung einiger Hits in bestimmte Signalwege.

Es handelt sich um eine schematische Darstellung möglicher Signalkaskaden, die nach einer aktivierten Rezeptortyrosinkinase ablaufen können. Dargestellt sind nur der MAPK Signalweg (links) sowie der PI3Kinase Signalweg (rechts). Es müssen dabei aber nicht zwangsläufig alle Signalwege aktiviert werden, es kann auch zur Inhibierung einzelner Signalwege kommen. Alle blauen Symbole entsprechen Hits aus dem siRNA basierten Screen in HeLa Zellen. In lila ist außerdem ein Molekül hervorgehoben, welches im Screen nicht als Hit identifiziert wurde, jedoch eine der 3 siRNA trotzdem einen Effekt auf die Clustergröße hatte (gemeint ist Erk2). (Abkürzungen sind dem Kapitel „Abkürzungsverzeichnis“ zu entnehmen, aufgeführt sind Proteinamen).

Nach einer ausführlichen Literaturrecherche wurden einige der Hits in sinnvolle Signalwege eingeordnet. Logische Verbindungen gibt es zwischen fünf der zehn Rezeptortyrosinkinasen, welche alle sowohl über den MAPK Signalweg, als auch über den PI3K Signalweg ihre Aktivierung ins Zellinnere weiterleiten (Harvey Lodish, 2004) (Abbildung 10). Ausnahmen bei der Signalweiterleitung von Rezeptortyrosinkinasen sind die EphA und EphB Rezeptoren. Diese Rezeptortyrosinkinasegruppe wurde bis heute hauptsächlich mit inhibierenden Wirkungen auf den MAPK Signalweg, sowie aktivierender Wirkung auf den PI3K Signalweg, vor allem in Richtung der Regulation des Aktinzytoskeletts beschrieben (Bi et al., 2011, Meier et al., 2011).

In der Zelle sind die Signalwege zwar vielfach verzweigt sollen aber in Abbildung 10 eine vereinfachte Übersicht ermöglichen. Der PI3K Signalweg, auf der rechten Seite der Abbildung 10, wird durch vier Hits im Screen vertreten, wobei 3 der Hits selbst

PI3K oder Untereinheiten der PI3K sind. Aber auch AKT2 konnte im Screen als Hit definiert werden, was darauf hindeutet, dass der Signalweg über PI3K-Akt Richtung mTOR eine Rolle spielen könnte. Besonders zu beachten sind aber auch die Hits auf der linken Seite des Schemas. Nicht nur sind einige Vertreter des MAPK Signalwegs Hits im Screen, sondern auch Regulatoren dieses Signalwegs konnten im siRNA basierten Screening System in HeLa Zellen identifiziert werden. Sowohl TESK1 als DYRK1A konnten im Screen als Hits definiert werden. Beide Proteinkinasen haben inhibierende Wirkungen auf Sprouty2. Sprouty2 selbst ist keine Proteinkinase, wirkt jedoch inhibierend auf den Ras-MAPK Signalweg (Abbildung 10). Die Anzahl der Oberflächenrezeptoren, welche in diesem Screen gefunden wurde, war mit 13 Vertretern sehr hoch. Darunter waren vor allem Vertreter der Eph Rezeptoren aber auch zwei Vertreter der drei bekannten Neurotrophin Rezeptoren. Für die weitere Charakterisierung in primären Neuronen wurde sowohl der TrkB- (Genname: Ntrk2) als auch der EphA7 Rezeptor ausgewählt.

5.2 Sowohl der TrkB als auch der EphA7 Rezeptor regulieren die Gephyrinaggregation in primären Neuronen

In einem zweiten Schritt dieser Doktorarbeit sollen nun die vorher erwähnten besonders interessanten Hits im primären und damit relevanteren Zellsystem untersucht werden. Hierfür sollten verschiedene methodische Ansätze verwendet werden. Zur Reproduktion der Ergebnisse des siRNA basierten Screens in HeLa Zellen, sollten zu allererst ebenfalls siRNA basierte Experimente im primären System durchgeführt werden. Dabei wurden siRNAs gegen NTRK2 (TrkB-Rezeptor), sowie gegen EPHA7 verwendet. Um hierbei valide Ergebnisse erzielen zu können, sollte erst der siRNA vermittelte Knockdown gezeigt werden. Dies wurde auf Ebene einer quantitativen Real-time PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Erst nachdem die Funktionalität der siRNAs bestätigt werden konnte, sollte dann ein morphologischer Effekt auf Proteine der inhibitorischen Postsynapse, in Neuronen untersucht werden.

5.2.1 Die siRNAs gegen NTRK2 und EPHA7 sind funktionell

Zuerst sollte nun die Funktionalität der im primären System zu verwendenden siRNAs gegen NTRK2 und EPHA7 nachgewiesen werden.

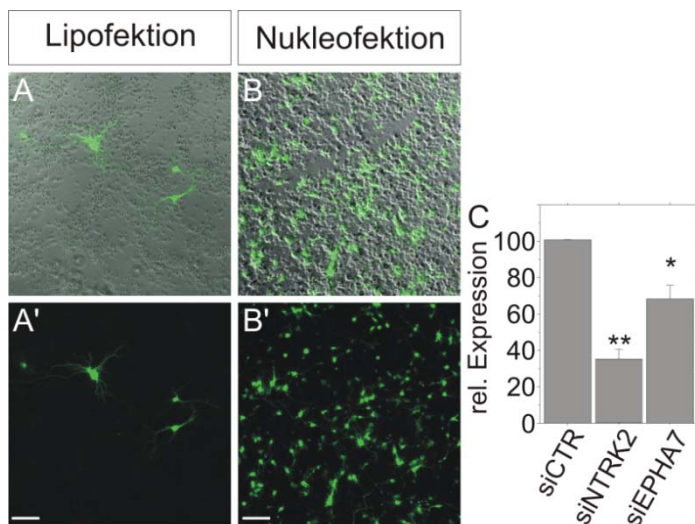


Abbildung 11 Analyse der Herunterregulation von NTRK2 und EPHA7 via siRNA. (A) Exemplarische Darstellung der Transfektionseffizienz von Plasmid-DNA via Lipofektion. (A) Überlagertes Bild aus Phase und EGFP Signal (A'). (B) Exemplarische Darstellung der Transfektionseffizienz von Plasmid-DNA via Nukleofektion (Rat Neuron NucleofectorTM Kit, Lonza), (B') EGFP Signal. Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m. (C) Quantifizierung der relativen Genexpression nach Einsatz einer Kontroll siRNA bzw. der beiden funktionellen siRNAs. Normiert wurde jeder Wert zum einen auf eine interne GAPDH Kontrolle und anschließend auf die Kontroll siRNA behandelten Neurone. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. $p = 0,0002$ ** für siNTRK2, $p = 0,049$ * für siEPHA7, $n = 3$.

Um eine Analyse auf mRNA Ebene in primären Neuronen durchführen zu können, war es notwendig das Transfektionsprotokoll von einer normalen Lipofektion, wie sie im siRNA basierten Screen durchgeführt wurde, auf eine Nukleofektion mittels dem *Rat Neuron NucleofectorTM Kit* umzustellen. Wie in Abbildung 11 A und A' zu sehen, werden bei einer Lipofektion nur einzelne wenige Neurone erfolgreich transfiziert, was für eine Analyse auf Einzelzellebene ausreichend ist. Dies gilt allerdings nicht, wenn man alle Neurone eines Wells lysiert und die gesamte RNA isoliert, um einen Knockdown nachzuweisen. Die Methode der Nukleofektion bietet hierfür eine ausreichend hohe Transfektionseffizienz (Abbildung 11 B und B'). So konnte mit Hilfe dieser Methode ein Weg gefunden werden, die Herunterregulation von NTRK2 (TrkB) sowie EPHA7 zu zeigen (Abbildung 11 C). Die geschätzte Transfektionseffizienz in Abbildung 11 B und B' lag bei ca. 60% der Neurone. Die Restaktivität für NTRK2 wurde aber auf 34,5% der Kontrolle bestimmt. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass die Transfektionseffizienz mit Hilfe eines GFP kodierenden DNA-Plasmids bestimmt wurde. Die siRNA ist wesentlich kleiner, was darauf hinweist, dass sie deutlich effizienter transfiziert wird. Es konnte also gezeigt werden, dass beide siRNAs funktionell sind, da das endogene mRNA Level von NTRK2 und EPHA7 reduziert werden konnte

5.2.2 Die siRNAs gegen NTRK2 und EPHA7 führen zu einer Reduktion von Gephyrin- und GABA_A Rezeptorclustern

Nachdem die Funktionalität der siRNAs auf mRNA Ebene gezeigt werden konnte, sollten nun morphologische Effekte auf die Markerproteine für inhibitorische Postsynapsen untersucht werden. Hierfür wurde die Methode der Lipofektion verwendet, da hier Einzelzellanalysen durchgeführt wurden. Als Markerproteine für inhibitorische Postsynapsen dienen Gephyrin, sowie die GABA_A γ_2 - Untereinheit.

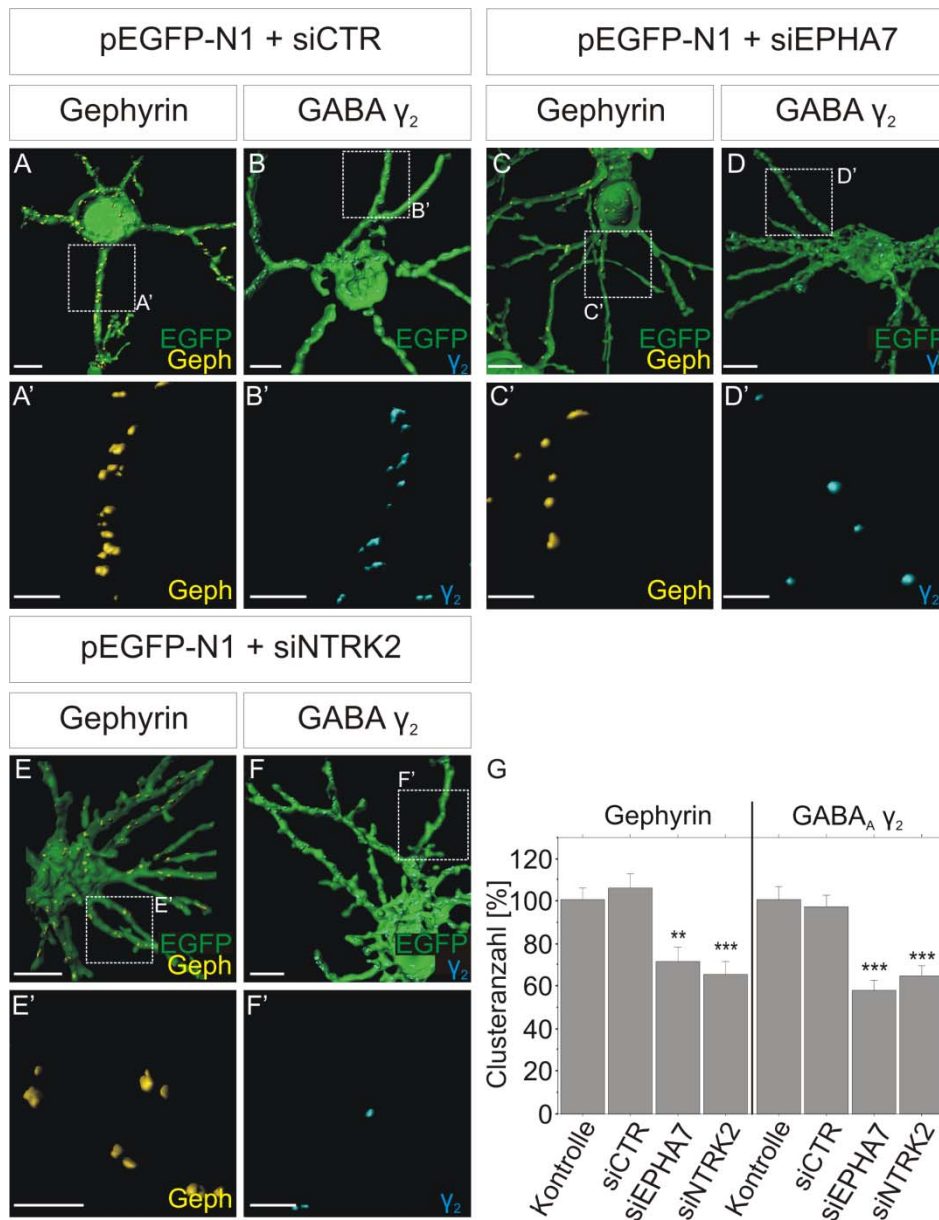


Abbildung 12 Reduktion der Gephyrin und GABA_A γ₂ Untereinheit durch siRNAs gegen EPHA7 und NTRK2. Die siRNAs wurden zur Visualisierung der transfizierten Zellen jeweils mit einem EGFP kodierenden DNA Plasmid kotransfiziert. (A und B) Exemplarische Abbildungen von EGFP positiven siCTR transfizierten Zellen (grün) mit Gephyrin (gelb) und GABA_A Rezeptor γ₂ (Türkis) positiven Signalen. (A' und B') Vergrößerte Darstellung der Färbungen gegen Gephyrin (gelb) und GABA_A Rezeptor γ₂ (Türkis). Dargestellt sind die Signale auf den ca. ersten 20 μm eines Dendriten. (C und D) EGFP positive Zellen welche gleichzeitig mit einer siRNA gegen EPHA7 transfiziert wurden (grün). In Überlagerung sind Gephyrin (gelb) und GABA_A Rezeptor γ₂ (Türkis) positive Signale zu sehen. Entsprechend der markierten Quadrate sind vergrößerte Bereiche dieser Färbungen in C' und D' dargestellt. (E und F) EGFP positive Zellen welche gleichzeitig mit einer siRNA gegen NTRK2 transfiziert wurden (grün). In Überlagerung sind Gephyrin (gelb) und GABA_A Rezeptor γ₂ (Türkis) positive Signale zu sehen. Entsprechend der markierten Quadrate sind vergrößerte Bereiche dieser Färbungen in E' und F' dargestellt. Alle Abbildungen wurden mit Hilfe der Imaris Software (Bitplane AG, Basel, Schweiz) bearbeitet. Maßstabsbalken entsprechen 10 μm. (G) Quantifizierung der Anzahl an Gephyrin- bzw. GABA_A γ₂ positiven Signalen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. p = 0,0014 ** (Gephyrin, siEpha7), p < 0,0001 ***, n > 30.

In dem, in Abbildung 12 dargestellten Experiment, wurden zwei verschiedene Kontrollen verwendet. Die Zellen wurden entweder nur mit dem pEGFP-N1 Plasmidvektor, oder mit einer Kombination des pEGFP_N1 Plasmidvektors zusammen mit einer Kontroll siRNA (siCTR) transfiziert. Es wird dabei davon ausgegangen, dass der Einsatz der Kontroll siRNA keinen Einfluss auf die Expression oder die Morphologie inhibitorisch postsynaptischer Markerproteine hat. Dies konnte sowohl für die Anzahl an Gephyrin-, als auch GABA_A-Rezeptor γ_2 Untereinheiten, wie in Abbildung 12 G zu sehen, gezeigt werden. Die mikroskopischen Aufnahmen einer dieser Kontrollen sind in Abbildung 12 A und A' für Gephyrin, sowie B und B' für die GABA_A-Rezeptor γ_2 Untereinheit beispielhaft gezeigt. Im Vergleich zu diesen beiden Kontrollen, kommt es nach der siRNA abhängigen Herunterregulation von NTRK2 (TrkB Protein) zu einer Reduktion der Anzahl der GABA_A-Rezeptor γ_2 Untereinheit (Abbildung 12 F, F' und G). Gleichzeitig konnte aber auch gezeigt werden, dass die Herunterregulation ebenfalls die Anzahl an Gephyrinclustern reduzierte (Abbildung 12 E, E' und G). Der Einsatz einer siRNA gegen EPHA7 führte im Vergleich zu den Kontrollsituationen zu einer deutlichen Reduktion in der Anzahl von sowohl Gephyrin- (Abbildung 12 C, C' und G), als auch GABA_A-Rezeptor-Clustern, gemessen auf den ersten 20 μm der Dendriten (Abbildung 12 D, D' und G). Die destabilisierende Wirkung der siRNA gegen NTRK2 und EPHA7, welche im HeLa Zell basierten Screen mit einer Reduktion der Gephyrinclustergröße korreliert wurde, konnte somit auch im primären System, repräsentiert durch eine Reduktion der Anzahl der Cluster, gezeigt werden. Die Effekte der siRNAs konnten also im primären System reproduziert werden. Um *off-target* Effekte der siRNAs auszuschließen, wurde später in dieser Arbeit erstens ein unabhängiger Ansatz mit Hilfe einer dominant negativen Isoform des EphA7 Rezeptors gewählt. Außerdem wurde die siRNA gegen TrkB von Simone Beuter in *rescue*-Experimenten mit konstitutiv aktiven Varianten von Akt und MEK2 eingesetzt (unveröffentlichte Daten).

5.2.3 Die Effekte der siRNA Behandlung sind spezifisch für inhibitorisch postsynaptische Systeme

Nachdem ein Effekt auf inhibitorische Markerproteine für die siRNAs gegen NTRK2 und EPHA7 nachgewiesen werden konnte, sollte nun analysiert werden, ob diese morphologischen Veränderungen spezifisch für inhibitorische Systeme sind. Aus

diesem Grund, sollten ebenfalls Markerproteine der exzitatorischen Synapse untersucht werden.

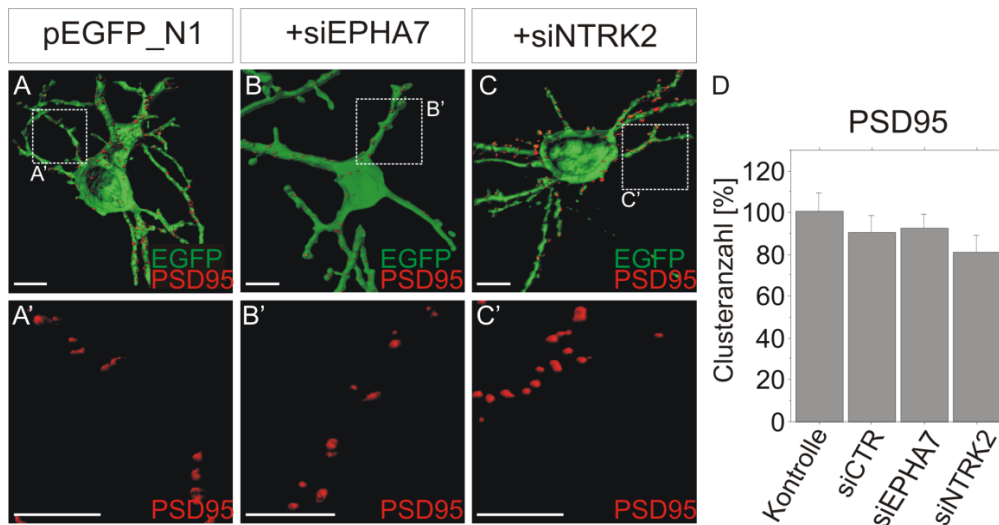


Abbildung 13 PSD95 Cluster weisen nach Einsatz von siRNAs gegen NTRK2 und EPHA7 keine Veränderungen in der Anzahl auf. (A) Exemplarische EGFP positive Zelle in Kolokalisation mit PSD95 Clustern. (A') PSD95 Aggregate aus dem in A markierten Bereich in Vergrößerung. Dieser Bereich entspricht ca. den ersten 20 µm des Dendriten. (B) EGFP positive mit siEPHA7 transfizierte Zelle in Kolokalisation mit PSD95. (B') PSD95 Aggregate aus dem in B markierten Bereich in Vergrößerung. Dieser Bereich entspricht ca. den ersten 20 µm des Dendriten. (C) EGFP positive mit siNTRK2 transfizierte Zelle in Kolokalisation mit PSD95. (C') PSD95 Aggregate aus dem in C markierten Bereich in Vergrößerung. Dieser Bereich entspricht ca. den ersten 20 µm des Dendriten. Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. Alle Bilder wurden mit Hilfe der Imaris Software (Bitplane AG, Basel, Schweiz) bearbeitet. (D) Quantitative Analyse der Anzahl an PSD95 Cluster auf den ersten 20 µm eines Dendriten. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler, $n > 30$.

Als Markerprotein für exzitatorische Synapsen diente PSD95. PSD95 ist für die Lokalisation von NMDA- aber auch AMPA/Kainat-Rezeptoren in der exzitatorischen Postsynapse wichtig (Kornau et al., 1995, Bats et al., 2007). Vergleicht man die mit der Imaris-Software nachbearbeiteten mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung A', B' und C' können ähnlich viele PSD95 positive Aggregate detektiert werden (Abbildung 13 A', B' und C'). Die Analyse der Anzahl von PSD95 Clustern ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle (pEGFP_N1), der Kontroll siRNA (pEGFP_N1 + siCTR), sowie den beiden funktionellen siRNAs gegen EPHA7 und NTRK2. Es konnte also gezeigt werden, dass die Herunterregulation der beiden Oberflächenrezeptoren keinen Einfluss auf die PSD95 positiven Cluster hatte (Abbildung 13).

5.2.4 Ein unabhängiger Ansatz konnte die Ergebnisse der siRNA gegen EPHA7 bestätigen

Neben dem Einsatz von siRNAs sollte nun, zur Validierung dieser Ergebnisse, ein unabhängiger Ansatz zur Analyse des EphA7 Rezeptors herangezogen werden. Es wurde eine dominant negative, d.h. kinasedefiziente Variante des EphA7 Rezeptors überexprimiert.

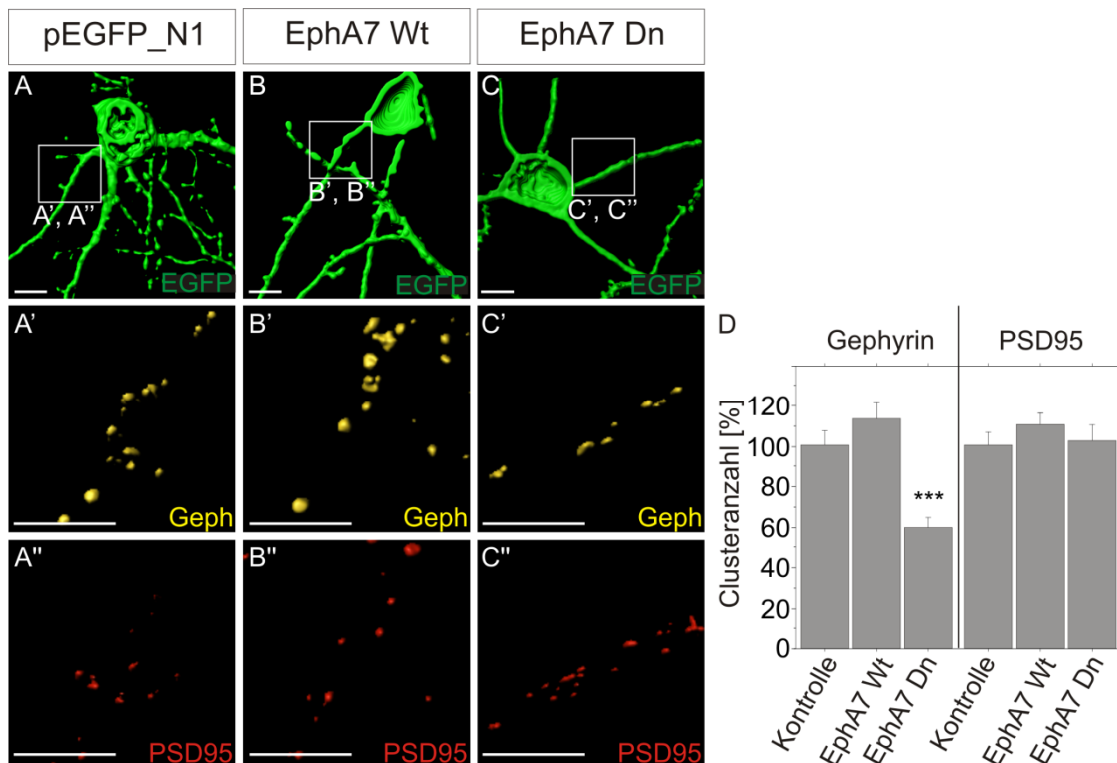


Abbildung 14 Die dominant negative Variante des EphA7 Rezeptors hat den gleichen Effekt wie schon die siRNA basierte Herunterregulation. (A) pEGFP_N1 Kontroll-transfizierte Zelle. Das exprimierte EGFP dient der Identifizierung der transfizierten Zellen. (A') Bildausschnitt aus Abbildung A, in Vergrößerung. Gezeigt sind Gephyrin Cluster auf den ersten 20 μm eines Dendriten. (A'') Bildausschnitt aus Abbildung A, in Vergrößerung. Gezeigt sind PSD95 positive Cluster aus dem in A eingezeichneten Bildausschnitt. (B) Mit pEGFP_N1, sowie EphA7Wt transfizierte Zelle. EGFP dient der Identifizierung transfizierter Zellen. (B') Bildausschnitt aus B, mit Gephyrin positiven Clustern. (B'') gleicher Ausschnitt aus B mit PSD95 positiven Clustern. (C) Mit pEGFP_N1, sowie EphA7Dn transfizierte Zelle. EGFP dient der Identifizierung transfizierter Zellen. (C') Bildausschnitt aus C, mit Gephyrin positiven Clustern. (C'') gleicher Ausschnitt aus C mit PSD95 positiven Clustern. Alle Abbildungen wurden mit Hilfe der Imaris Software (Bitplane AG, Basel, Schweiz) bearbeitet. Maßstabsbalken entsprechen 10 μm . (D) Quantitative Analyse der Anzahl der Gephyrin- und PSD95-Clusteranzahl auf den ersten 20 μm der Dendriten. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. $p < 0,0001$ ***, $n > 30$.

Die Überexpression des Plasmidvektors mit der Wildtyp cDNA des EphA7 Rezeptors hatte im Vergleich zur Kontrollsituation keinerlei Auswirkung auf die Anzahl der Gephyrincluster (Abbildung 14 B, B', C, C' und E). Die Überexpression des

Plasmidvektors mit der mutierten, dominant negativen Isoform des EphA7 Rezeptors führte hingegen zu einer deutlichen Abnahme der Anzahl der Gephyrincluster (Abbildung 14 D, D' sowie E). Wie auch schon bei dem Einsatz der siRNA gegen EPHA7 konnte nach Überexpression der dominant negativen Isoform des EphA7 Rezeptors kein Effekt auf die Anzahl an PSD95-Clustern nachgewiesen werden (Abbildung 14 D, D'' sowie E). Das Gleiche gilt für den Plasmidvektor mit dem Wildtyp EphA7 Rezeptor (Abbildung 14 C, C'' sowie E).

5.2.5 Präsynaptische Strukturen bleiben unbeeinflusst vom EPHA7 bzw. NTRK2 knockdown

Funktionelle Synapsen bestehen aus einem präsynaptischen und einem postsynaptischen Anteil. Fehlt eine dieser beiden Komponenten, so kann es nicht zur Aktivierung dieser synaptischen Kontakte kommen, was den Abbau dieser Synapse zur Folge hat (Lardi-Studler and Fritschy, 2007). Kriebel et. al. 2011 konnten zeigen, dass es nach Neurofascin knock down *in vivo* zu einem Verlust von sowohl postsynaptischen Gephyrinclustern als auch präsynaptischen GAD65-Clustern kommt, während Neurofascin selbst am Axoninitialsegment und nicht auf der präsynaptischen Seite lokalisiert ist (Kriebel et al., 2011). Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, ob es auch nach Knockdown von EPHA7 oder NTRK2 im System primärer hippocampaler Neurone *in vitro* zu einer Reduktion präsynaptischer Komponenten kommt.

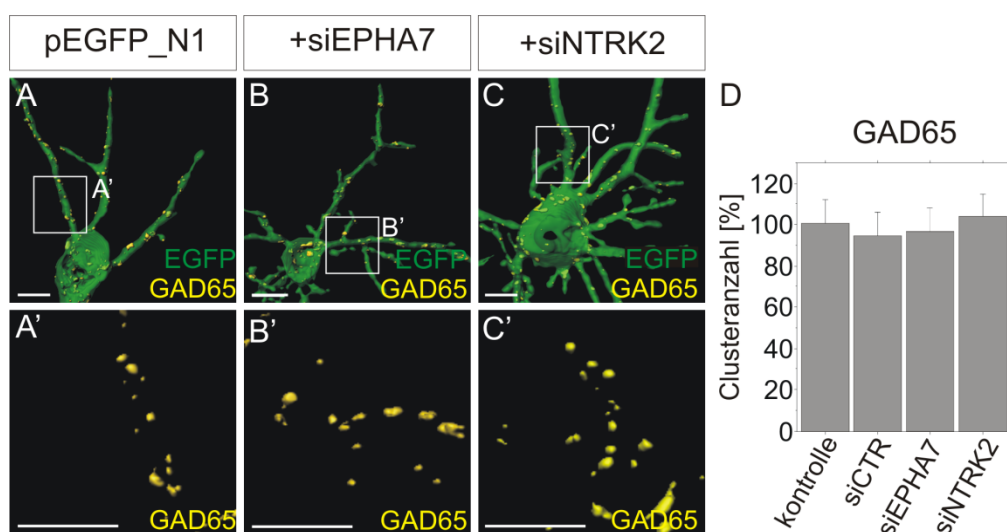


Abbildung 15 Präsynaptische Marker zeigen keinen Effekt nach Behandlung mit den siRNAs gegen NTRK2 sowie EPHA7. (A) pEGFP_N1 Überexpression als Kontrolle. Das exprimierte EGFP dient der Identifizierung der transfizierten Zellen. (A') Bildausschnitt aus Abbildung A, in Vergrößerung. Gezeigt sind GAD65 Cluster auf den ersten 20 µm eines Dendriten. (B) Mit pEGFP_N1 sowie einer

siRNA gegen EPHA7 transfizierte Zelle. EGFP dient der Identifizierung transfizierter Zellen. (B') Bildausschnitt aus B, mit GAD65 positiven Clustern. (C) Mit pEGFP_N1 sowie siRNA gegen NTRK2 transfizierte Zelle. EGFP dient der Identifizierung transfizierter Zellen. (C') Bildausschnitt aus C, mit GAD65 positiven Clustern. Alle Abbildungen wurden mit der Imaris Software (Bitplane AG, Basel, Schweiz) bearbeitet. Maßstab entspricht 10 μm . (D) Quantitative Analyse der GAD65 Clusteranzahl auf den ersten 20 μm der Dendriten. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. $n > 30$.

Zur Identifizierung inhibitorisch präsynaptischer Proteine wurde das Markerprotein GAD65 verwendet. Wie im Vergleich der Abbildung 15 A, A', B, B' sowie C und C' zu erkennen ist, scheint es keinen Unterschied in der Anzahl präsynaptischer Strukturen zu geben. Dies wird durch die quantitative Analyse, dargestellt in Abbildung 15 D, bestätigt. Allerdings ist zu bedenken, dass sich die Analyse von präsynaptischen Strukturen auf Neuronen in einem Alter von 17 Tagen *in vitro* sehr schwer gestaltete. Die Anzahl GAD65 positiver Cluster variierte von Dendrit zu Dendrit ziemlich stark, was einen erhöhten Standardfehler, wie er in Abbildung 15 D, zu sehen ist bewirkte. Es konnte trotzdem gezeigt werden, dass die präsynaptischen Komponenten durch die eingesetzten siRNAs unbeeinflusst bleiben.

5.2.6 Die Stimulation von TrkB und EphA7 Rezeptoren bewirkt eine Zunahme der Gephyrinclusteranzahl

Bis zu diesem Teil der Arbeit wurden jeweils Ansätze verfolgt, bei denen Rezeptortyrosinkinasen herunterreguliert oder dominant negative Proteine überexprimiert wurden. Das heißt, dass die nachfolgenden Signalwege durch diese Eingriffe gestört oder gar nicht erst aktiviert wurden. Nun sollte genau der gegensätzliche Ansatz verfolgt werden. Es wurden natürliche Liganden zur Stimulation der beiden Rezeptoren EphA7 und TrkB eingesetzt, um deren nachfolgende Signalwege zu aktivieren und den Effekt dieser Aktivierung zu analysieren.

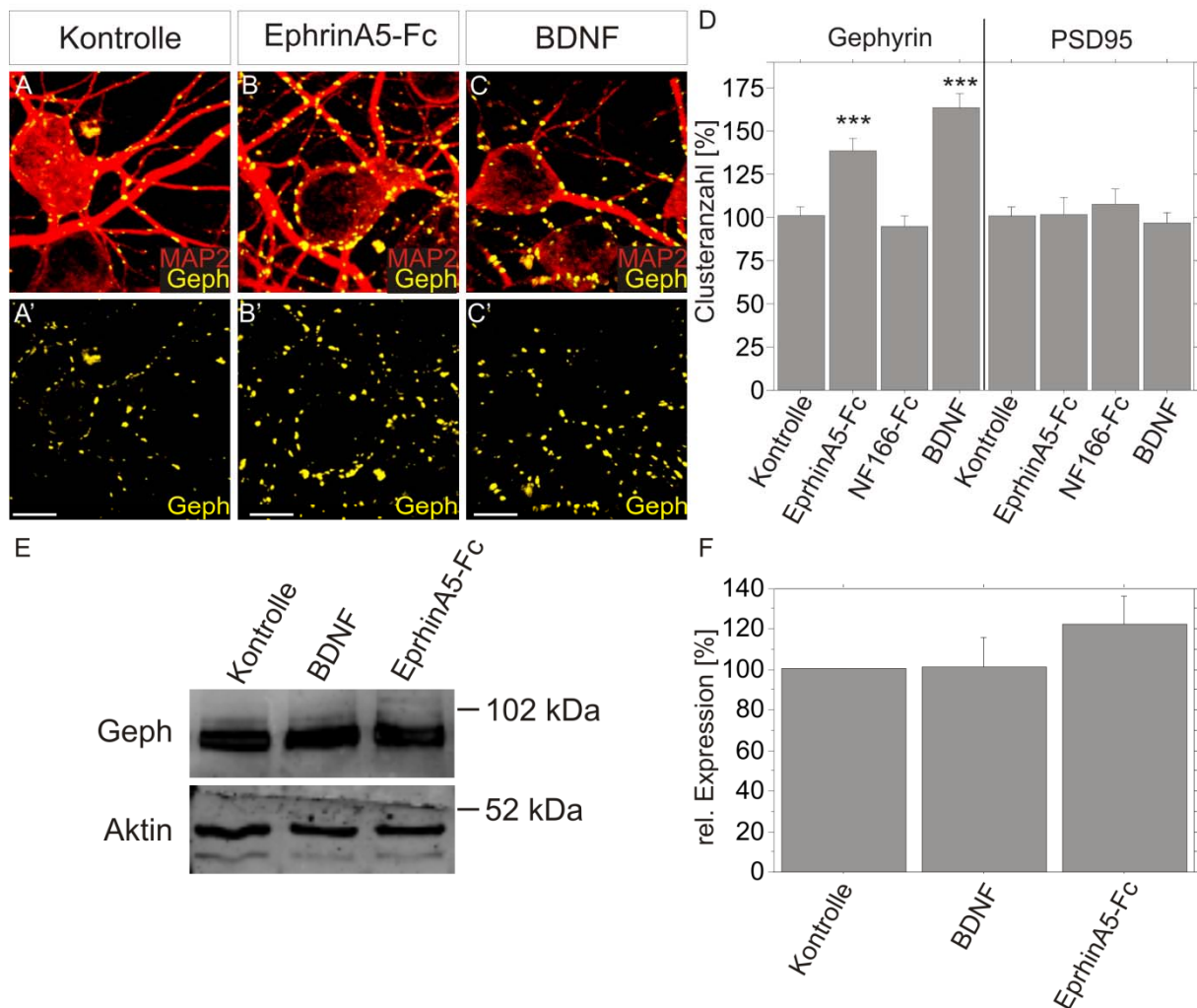


Abbildung 16 Stimulation der Oberflächenrezeptoren EphA7 und TrkB (Genname NTRK2) durch ihre natürlichen Liganden EphrinA5-Fc sowie BDNF. (A) Unbehandelte Kontrollzellen. Kofärbung von MAP2 (rot) zur Identifizierung einzelner Zellen und Dendriten, sowie Gephyrin (gelb). (A') Gleicher Bildausschnitt wie in A, jedoch mit Gephyrinclustern alleine. (B) EphrinA5-Fc behandelte Zellen. Die Behandlung erfolgte für 24 h, der Ligand wurde dabei für 30 min mit Hilfe von humanem IgG Antikörper vorgeclustert. MAP2 (rot) dient der Identifizierung der Zellen, Gephyrin (Gelb) zeigt inhibitorisch postsynaptische Cluster (B'). (C) BDNF behandelte Zellen. Die Behandlung erfolgte für 24 h. MAP2 (rot) dient der Identifizierung der Zellen, Gephyrin (Gelb) zeigt inhibitorisch postsynaptische Cluster (C'). Alle Abbildungen wurden mit Hilfe der Imaris Software (Bitplane AG, Basel, Schweiz) bearbeitet. Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m. (D) Quantifizierung der Anzahl von Gephyrin- sowie PSD95-Clustern. Als weitere Kontrolle wurde NF166-Fc eingeführt. $p < 0,0001$ ***, $n > 30$. (E) Western Blot Analyse der Expression von Gephyrin in primären hippocampalen Neuronen, nach 30 minütiger Stimulation mit BDNF bzw. EphrinA5-Fc. (F) Quantifizierung der Western Blot Banden aus (E). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler, $n = 4$. Keine Signifikanten Unterschiede konnten detektiert werden.

BDNF wurde als klassischer Ligand für den TrkB Rezeptor ausgewählt. Dieser bindet mit hoher Affinität an diesen Rezeptor und führt zur Aktivierung der nachfolgenden Signalwege (Yoshii and Constantine-Paton). Analog hierzu wurde EphrinA5-Fc als klassischer Ligand des EphA7 Rezeptors ausgewählt. Auch hier kommt es nach

Bindung des Liganden an seinen Rezeptor zu Aktivierung nachgeschalteter Signalwege (Nakanishi et al., 2007). Das physiologisch membranständig vorkommende EphrinA5 lag dank einer Kopplung der extrazellulären Domäne von EphrinA5 an den Fc-Teil humaner Antikörper löslich vor. Bei Betrachtung der Abbildung 16 A' im Vergleich zu Abbildung 16 B' und C' ist deutlich zu erkennen, dass nach Stimulation mit den natürlichen Liganden mehr Gephyrincluster detektiert werden konnten. Die Anzahl der Gephyrincluster wurde wie in Abbildung 16 D zu sehen quantifiziert und eine Zunahme in der Gephyrinclusteranzahl nachgewiesen. Die Fc-Kontrolle (NF166-Fc) blieb dabei auf Kontrollniveau (93% der unbehandelten Kontrolle). Um die Wirkung der Stimulation auf die exzitatorischen Postsynapsen zu untersuchen, wurde zusätzlich die Anzahl an PSD95 positiven Clustern nach 24 stündiger Inkubation mit BDNF, EphrinA5-Fc, oder NF166-Fc bestimmt. Im Gegensatz zu den Gephyrinclustern konnte bei den PSD95 positiven Clustern kein Unterschied in der Anzahl auf den ersten 20 µm der Dendriten detektiert werden (Abbildung 16 D; PSD95).

Um feststellen zu können, ob die Steigerung in der Anzahl der Gephyrincluster durch eine Änderung der Lokalisation von Gephyrin in den Neuronen, oder durch vermehrte Expression, oder Translation von Gephyrin nach BDNF oder EphrinA5-Fc Stimulation zu Stande kam, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. In Abbildung 16 E sind die Western Blot Banden für Gephyrin sowie die Ladekontrolle Aktin dargestellt. Die Intensität der einzelnen Banden für die Kontrolle bzw. die zwei mit BDNF oder EphrinA5-Fc stimulierten Proben sehen auf den ersten Blick sehr ähnlich in ihrer Intensität aus. Bei der Quantifizierung der Western Blot Banden mittels ImageJ Analyse wurde die Intensität der Gephyrinbanden auf ihre jeweilige Ladekontrolle (Aktin) normiert. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Menge an Gephyrinprotein in den Neuronen festgestellt werden (Abbildung 16F). Somit konnte also gezeigt werden, dass auch die Stimulation mit den natürlichen Liganden ausschließlich einen Effekt auf inhibitorisch postsynaptische Proteine, nicht aber auf exzitatorisch postsynaptische Proteine hatte. Außerdem kann mit Hilfe der Western Blot Analyse angenommen werden, dass es zu einer Umverteilung von vorhandenem Gephyrin kam, da keine Zunahme in der Gesamtmenge an Gephyrinprotein nachgewiesen werden konnte.

5.3 Die Beteiligung des PI3K-Akt-mTOR, sowie MAPK Signalwegs an der Regulation der Gephyrinaggregation

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Modulation der beiden Oberflächenrezeptoren TrkB (Genname NTRK2) sowie EphA7 durch Herunterregulation oder auch Stimulation zu Veränderung in der Stabilität und dem Clusterungsverhalten von Gephyrin führte, sollte nun die Beteiligung der nachgeordneten intrazellulären Signalwege analysiert werden.

5.3.1 Beteiligung des MAPK Signalwegs an der Gephyrinclusterung

Wie in Abbildung 9, sowie Abbildung 10 in Kapitel 5.1.2. zu sehen war, gehörten neben den 13 Oberflächenrezeptoren auch diverse Moleküle des MAPK Signalwegs zu den Hits, die während des siRNA basierten Screens (mit Neurofascin) in HeLa Zellen identifiziert werden konnten. Die Analyse des MAPK Signalwegs auf direktem Weg, dass heißt durch den Einsatz einer dominant negativen Variante von MEK2, sowie einer siRNA gegen MEK2 wurde in der Diplomarbeit von Simone Beuter 2011 gezeigt (unveröffentlichte Daten).

Neben den direkten Komponenten des MAPK Signalwegs konnten während des HeLa Zell basierten Screens (mit Neurofascin) auch Modulatoren des MAPK Signalwegs als Hits identifiziert werden (Abbildung 10). Hierzu gehörten die beiden Kinasen DYRK1A sowie TESK1. Beide Moleküle werden im Gehirn exprimiert und für beide Moleküle wurde beschrieben, dass sie das Protein Sprouty2 negativ regulieren (Toshima et al., 2001, Aranda et al., 2008, Chandramouli et al., 2008). Sprouty2 ist selbst ein Negativregulator des MAPK Signalwegs (Hanafusa et al., 2002). Aus diesem Grund sollte in dem folgenden Experiment gezeigt werden, dass auch ein indirektes Eingreifen in den MAPK Signalweg zum gleichen Phänotyp führt, wie die direkte Herunterregulation von Komponenten dieses Signalwegs.

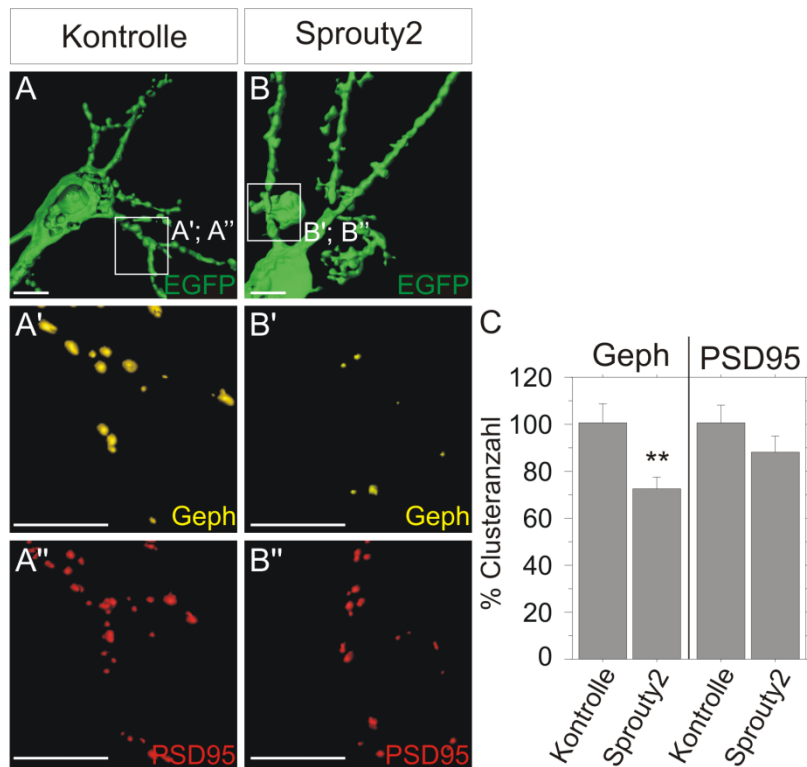


Abbildung 17 Einfluss von Sprouty2 auf die Anzahl von Gephyrin- und PSD95-Clustern. (A) Mit pEGFP_N1 transfiziertes Neuron. EGFP dient der Identifikation der transfizierten Zelle. (A') Vergrößerung des in A angegebenen Bildausschnitts mit der Darstellung von Gephyrinclustern. (A'') Gleicher Bildausschnitt aus A, mit der vergrößerten Darstellung PSD95 positiver Cluster. (B) Mit pEGFP_N1, sowie Sprouty2 transfizierte Zelle. EGFP dient der Identifikation der erfolgreich transfizierten Zellen. (B') Vergrößerung des in B eingezeichneten Bildausschnitts. Gezeigt sind Gephyrincluster. (B'') Gleicher Bildausschnitt aus B. Dargestellt sind PSD95 positive Cluster. Bei allen vergrößerten Bildausschnitten handelt es sich um die ca. ersten 20 µm eines Dendriten. Alle Bilder wurden mit Hilfe der Imaris Software (Bitplane AG, Basel, Schweiz) bearbeitet. Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. (C) Quantifizierung der Anzahl von Gephyrin- und PSD95-Clustern auf den ersten 20 µm der Dendriten. $p = 0,01^{**}$, $n > 33$. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Sprouty2 wurde in primären Neuronen überexprimiert und die Anzahl von Gephyrin- und PSD95-Clustern analysiert. In drei unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Gephyrinclustern gegenüber der Kontrolltransfektion mit dem pEGFP_N1 Plasmidvektor reduziert war (Vergleiche Abbildung 17 A' und B'). Die quantitative Auswertung in Abbildung 17 C zeigt eine signifikante Reduktion der inhibitorisch postsynaptischen Gephyrinclustern auf ca. 70% des Kontrollniveaus. Während die Gephyrinclusteranzahl deutlich reduziert war, konnte wie in den vorherigen Experimenten ebenfalls keine Veränderung in der Anzahl exzitatorischer PSD95-positiver Cluster nachgewiesen werden (Abbildung 17 A'' und B'' sowie C). Dies bestätigte auch die Ergebnisse, die in der Diplomarbeit von Simone Beuter gezeigt werden konnten. Unveröffentlichte Daten von Simone Beuter zeigen

außerdem, dass die Abnahme der Gephyrincluster durch den siRNA abhängigen knockdown von NTRK2 (TrkB-Rezeptor), durch den Einsatz einer konstitutiv aktiven Variante von MEK2 wiederum gesteigert werden kann. Dies unterstützt weiterhin die hier durch Sprouty2 gewonnenen Daten zur Funktion des MAPK Signalwegs in der Regulation der Gephyrinclusteraggregation. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der MAPK Signalweg an der Stabilisierung von Gephyrin unterhalb der inhibitorischen Postsynapse beteiligt ist.

5.3.2 Beteiligung des PI3K – Akt – mTOR Signalwegs an der Gephyrinclusterung

Während des siRNA basierten Screens in HeLa Zellen konnten vier dem PI3K Signalweg zugehörige Moleküle als Hits definiert werden. Bei drei dieser Hits handelte es sich um verschiedene Untereinheiten der PI3K, bzw. um eine Klasse II PI3K. Der vierte Hit war AKT2, welches ebenfalls Bestandteil des PI3K- Akt- mTOR Signalwegs ist. Außerdem gehört der PI3K Signalweg zur typischen Aktivierungsweiterleitung durch den TrkB Rezeptor (Patapoutian and Reichardt, 2001). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob der PI3K Signalweg auch in primären hippocampalen Neurone während der Regulation der Gephyrinclusteraggregation eine Rolle spielt.

5.3.2.1 Die Inhibition der PI3K führt zur Destabilisierung von inhibitorisch postsynaptischen Proteinen

Unabhängig vom siRNA Ansatz, sollte der PI3K Signalweg mit Hilfe von pharmakologischen Inhibitoren untersucht werden. Hierfür wurde der Inhibitor LY294002 ausgewählt, welcher direkt die PI3K inhibiert. Die primären hippocampalen Kulturen wurden 24 h mit dem Inhibitor LY294002 bzw. als Negativkontrolle mit dem Lösemittel DMSO behandelt, fixiert und anschließend auf die Anzahl an Gephyrin- und PSD95-Cluster untersucht.

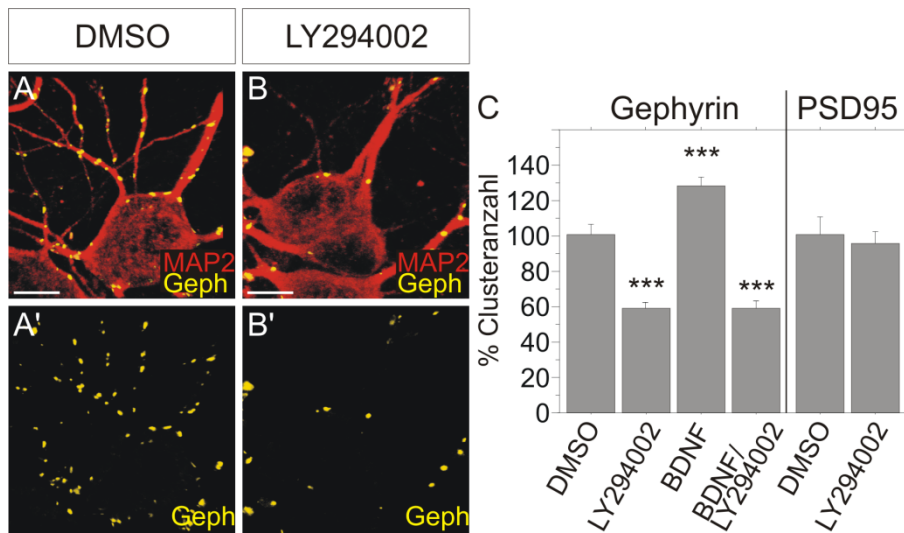


Abbildung 18 Die Inhibition der PI3K führt zur Reduktion in der Anzahl von Gephyrin- aber nicht von PSD95-Clustern. (A) DMSO behandelte Zelle. MAP2 (rot) dient der Identifizierung einzelner Zellen, sowie Dendriten. Gephyrin positive Signale sind in gelb dargestellt. (A') Gleicher Bildausschnitt wie in A, nur ohne MAP2 Signal. (B) Die Zellen wurden für 24 h mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 behandelt. MAP2 (rot) dient der Identifizierung einzelner Zellen, sowie Dendriten. Gephyrin positive Signale sind in gelb dargestellt. (B') Gleicher Bildausschnitt wie in A, nur ohne MAP2 Signal. Alle Bilder wurden mit Hilfe der Imaris Software (Bitplane AG, Basel, Schweiz) bearbeitet. Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. (C) Quantitative Auswertung der Anzahl an Gephyrin- und PSD95-Clustern auf den ersten 20 µm der Dendriten. LY294002 wurde 30 min vorinkubiert, bevor BDNF für 24 h zugegeben wurde. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. $p < 0,0001^{***}$, $n > 39$.

Im Vergleich der Abbildung 18 A' zu B' ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl an Gephyrinclustern nach Einsatz des Inhibitors LY294002 deutlich reduziert wurde. Dies wird durch die quantitative Auswertung in Abbildung 18 C bestätigt. Es konnte eine Reduktion auf ca. 60% der Kontrollsituation ausgelöst werden. Da aber bekannt ist, dass Neurone auch in Kultur fähig sind BDNF aktivitätsabhängig auszuschütten, sollte untersucht werden, ob eine zusätzliche Stimulation mit BDNF eine Änderung in der Wirkung des PI3K Inhibitors hervorruft (Lu, 2003). Wie aber in Abbildung 18 C zu erkennen, reduziert der PI3K Inhibitor die Gephyrinclusteranzahl auf das gleiche Niveau (ca. 60%), wie auch ohne die zusätzliche Stimulation durch BDNF. Die Anzahl an PSD95-Clustern wurde jedoch durch den Einsatz von LY294002 nicht beeinflusst (Abbildung 18 C).

5.3.2.2 Die Inhibition von mTOR führt zur Destabilisierung von inhibitorisch postsynaptischen Proteinen

Durch die Inhibition der PI3K alleine können keine Rückschlüsse auf die weiter unten liegenden Signalwegskomponenten und deren Effekt auf die Gephyrinclusterung gezogen werden. Der PI3K Signalweg, kann verschiedene nachfolgende intrazelluläre Signalwege aktivieren. Zum Beispiel auf der einen Seite Signalwege welche Veränderungen im Aktinzytoskelett auslösen, oder auch Signalwege, die über Akt und TSC Komplex Richtung mTOR weiterführen (Jimenez et al., 2000, Kumar et al., 2005). Aus diesem Grund wurde auch mTOR durch den Einsatz eines spezifischen Inhibitors blockiert und der Effekt auf die Gephyrin- und PSD95-Clusteranzahl ausgewertet.

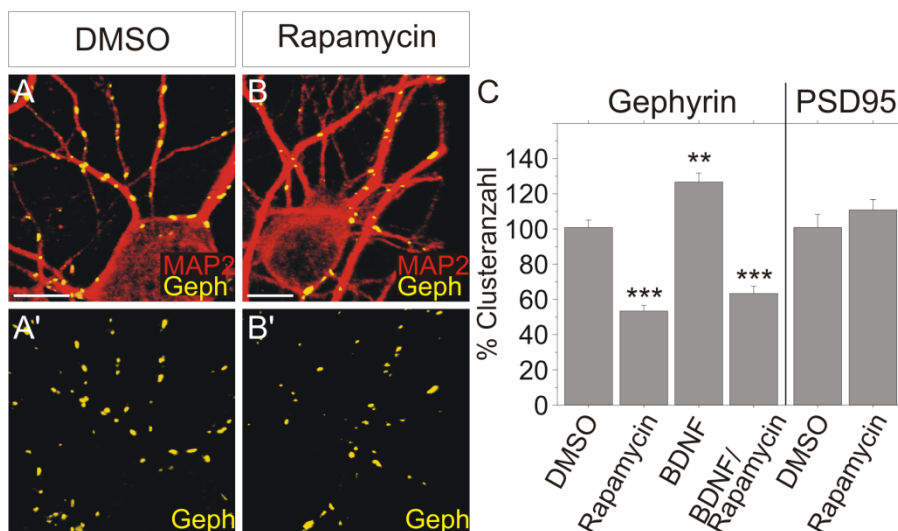


Abbildung 19 Rapamycin hat einen Effekt auf die Anzahl von Gephyrin- aber nicht PSD95-Clustern. (A) DMSO behandelte Zelle. MAP2 (rot) dient der Identifizierung einzelner Zellen, sowie Dendriten. Gephyrin positive Signale sind in gelb dargestellt. (A') Gleicher Bildausschnitt wie in A, nur ohne MAP2 Signal. (B) Zellen die für 24 h mit dem mTOR Inhibitor Rapamycin behandelt wurden. MAP2 (rot) dient der Identifizierung einzelner Zellen, sowie Dendriten. Gephyrin positive Signale sind in gelb dargestellt. (B') Gleicher Bildausschnitt wie in B, nur ohne MAP2 Signal. Alle Bilder wurden mit Hilfe der Imaris Software (Bitplane AG, Basel, Schweiz) bearbeitet. Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. (C) Quantitative Auswertung der Anzahl an Gephyrin- und PSD95-Clustern auf den ersten 20 µm der Dendriten. Rapamycin wurde 30 min vorinkubiert bevor BDNF für 24 h zugegeben wurde. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. $p < 0,0001^{***}$, $p = 0,0003^{**}$. Signifikanzen wurden im Vergleich zur DMSO Kontrolle berechnet, $n > 29$.

Der pharmakologische Inhibitor Rapamycin ist ein sehr spezifischer Inhibitor der mTOR Komplexe. Der Inhibitor wirkt bei kurzfristiger Behandlung auf den mTORC1 Komplex, während er bei längerer Inkubationszeit beide mTORC Komplexe inhibieren kann (Sarbasov et al., 2006). Im Vergleich zur DMSO Kontrolle

(Abbildung 19 A') führte die 24 stündige Inkubation von Neuronen mit dem Inhibitor zu einer deutlichen Reduktion der Gephyrincluster (Abbildung 19 B'). Die quantitative Analyse der Gephyrinclusteranzahl auf den ersten 20 µm der Dendriten, wies wie in Abbildung 19 C dargestellt, eine hoch signifikante Reduktion auf ca. 55% der Kontrollsituation auf. Bei gleichzeitiger Stimulation mit BDNF löste Rapamycin eine Reduktion der Gephyrinclusteranzahl auf ein ähnliches Niveau, wie nach alleiniger Inhibitorbehandlung aus. Die Behandlung mit BDNF alleine zeigte aber weiterhin eine signifikante Erhöhung der Clusteranzahl (Abbildung 19 C). Keine signifikanten Effekte konnten jedoch bei der Anzahl exzitatorischer PSD95-Cluster detektiert werden (Abbildung 19 C). Somit konnte gezeigt werden, dass der PI3K-Akt-mTOR Signalweg eine wichtige Rolle für Regulation der Gephyrinclusteranzahl spielt.

5.3.3 EphrinA5-Fc aktiviert den PI3K – Akt – mTOR Signalweg, nicht aber den MAPK Signalweg

Die Aktivierungsmuster des MAPK-, PI3K und GSK3β Signalwegs nach Stimulation mit BDNF sind in der Literatur oft beschrieben (Li et al., 2007, Yoshii and Constantine-Paton, 2007, Zadran et al., 2010). Vergleichbare Analysen für den Einsatz von EphrinA5-Fc existieren nur für die Analyse anderer physiologischer Aufgaben, wie zum Beispiel der Wirkung im Neuritenwachstum. Diese Vorgänge wurden aber eher in embryonalen, d.h. unreifen Neuronen bzw. Neuronenkulturen untersucht (Meier et al., 2011). Für die in dieser Arbeit zu untersuchende Fragestellung wurden aber schon weiter gereifte Neuronenkulturen in einem Alter von 17 Tagen *in vitro* verwendet. Daher sollten die Aktivierungsmuster der oben genannten Signalwege weitergehend untersucht werden.

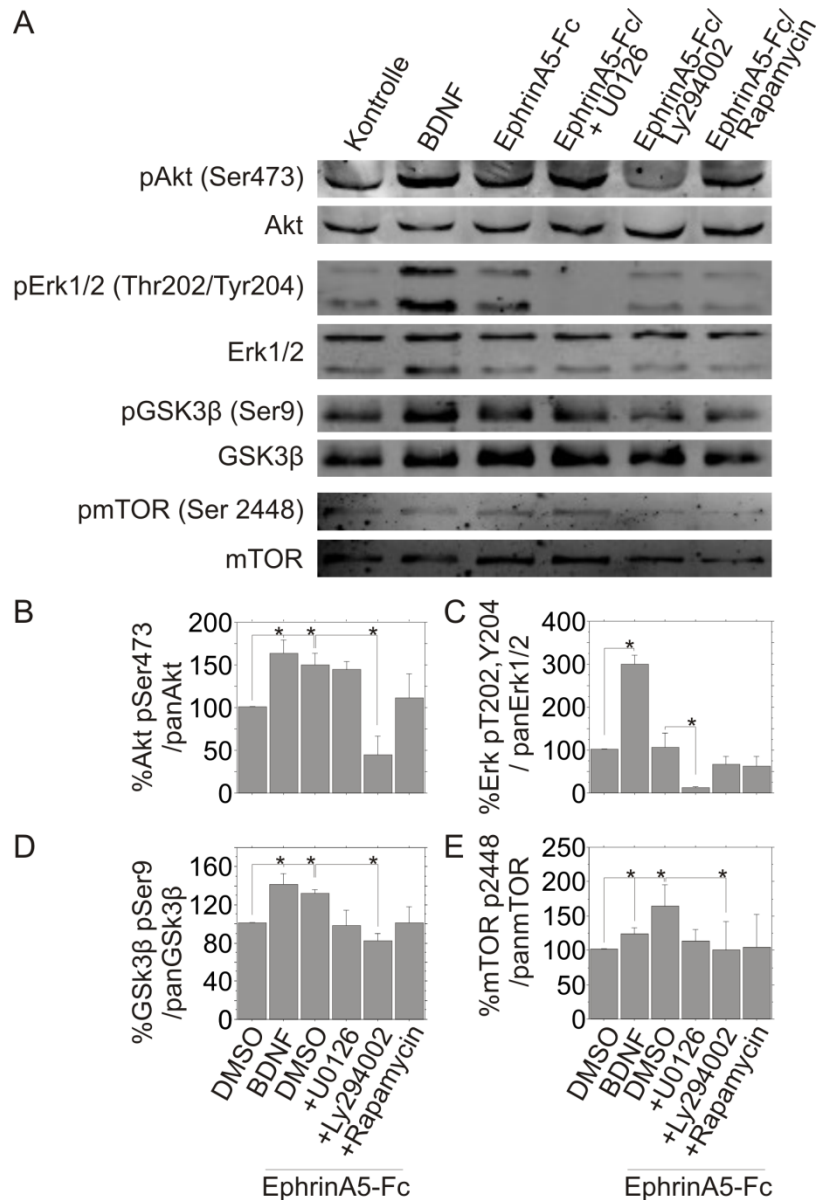


Abbildung 20 Analyse des Aktivierungsmusters verschiedener Signalwege nach Stimulation mit EphrinA5-Fc sowie BDNF als Kontrolle. (A) Western Blot Analyse der EphA Rezeptor Signalwege nach Stimulation mit oligomerisiertem EphrinA5-Fc, sowie mit vorinkubierten Inhibitoren U0126, LY294002 und Rapamycin. Als Kontrolle wurde eine 30 minütige BDNF Stimulation verwendet. Gezeigt sind Western Blot Signale von Akt pSer473, pan Akt, Erk1/2 pT202/Y204, pan Erk1/2, GSK3β pSer9, pan GSK3β, mTOR pSer2448 sowie pan mTOR Antikörpern. (B) Quantifizierung von Akt pSer473 / panAkt, $n = 3$, $p = 0,015$ (DMSO und BDNF), $p = 0,018$ (DMSO und EphrinA5-Fc), $p = 0,014$ (EphrinA5-Fc und EphrinA5-Fc+LY294002). (C) Quantifizierung von Erk1/2 pT202/Y204 / pan Erk1/2, $n = 4$, $p = 0,034$ (DMSO und BDNF), $p = 0,034$ (EphrinA5-Fc und EphrinA5-Fc+U0126). (D) Quantifizierung von GSK3β pSer9 / pan GSK3β, $n = 3$, $p = 0,028$ (DMSO und BDNF), $p = 0,003$ (DMSO und EphrinA5-Fc), $p = 0,0073$ (EphrinA5-Fc und EphrinA5-Fc+LY294002). (E) Quantifizierung von mTOR pSer2448 / pan mTOR, $n = 4$, $p = 0,033$ (DMSO und BDNF)*, $p = 0,048$ (DMSO und EphrinA5-Fc)*, $p = 0,08$ (EphrinA5-Fc und EphrinA5-Fc/LY294002)#.

Bei der Auswahl der zu analysierenden Signalwege wurde vor allem Bezug auf die Ergebnisse aus dem HeLa Zell basierten Screen genommen. Aus diesem Grund,

sollten vor allem der MAPK Signalweg, sowie der PI3K-mTOR Signalweg analysiert werden. In der Literatur wurde außerdem beschrieben, dass die GSK3 β , welche auch mit dem PI3K Signalweg in Zusammenhang steht, einen Einfluss auf Gephyrin hat (Tyagarajan et al., 2011b). Daher sollte die EphrinA5-Fc abhängige Aktivität dieser Proteinkinase ebenfalls untersucht werden. Als Positivkontrolle wurde gleichzeitig eine Stimulation mit BDNF eingebunden. Außerdem sollte die Spezifität der analysierten Signalwege über den Einsatz verschiedener Inhibitoren gegen Komponenten dieser Signalwege nachgewiesen werden. Die Inhibitoren wurden jeweils 30 min vorinkubiert. Erst dann erfolgte die 30 minütige Stimulation mit den natürlichen Liganden EphrinA5-Fc sowie BDNF. Abbildung 20 A zeigt die Ergebnisse der einzelnen Western Blots nach Inkubation mit verschiedenen Antikörpern. Es kann ein deutlicher Anstieg des Akt phospho Ser473 Signals nach Stimulation der Neurone mit BDNF, sowie EphrinA5-Fc festgestellt werden. Diese erhöhte Phosphorylierung von Akt wird durch den PI3K Inhibitor LY294002 reduziert. Dies konnte nach quantitativer Auswertung der Western Blot Banden mittels ImageJ Analyse wie in Abbildung 20 B dargestellt, gezeigt werden. Die Inhibitoren U0126 und Rapamycin hatten allerdings keinen Einfluss auf Akt phospho Ser473. Die Aktivierung des MAPK Signalwegs, nachgewiesen durch einen Anstieg des Erk1/2 phospho Thr202/Tyr204 Signals, konnte nur nach Stimulation mit BDNF, nicht aber mit EphrinA5-Fc nachgewiesen werden. Der Phosphorylierungsstatus von Erk1/2 an den Stellen Thr202/Tyr204 blieb nach EphrinA5-Fc Stimulation auf Kontrollniveau, es konnte keine Änderung in der Bandenintensität nachgewiesen werden (Abbildung 20 C). Der zusätzliche Einsatz des Inhibitors U0126 während der Stimulation mit EphrinA5-Fc reduzierte das Signal des Erk1/2 phospho Thr202/Tyr204 Antikörpers, während LY294002 und Rapamycin keine Auswirkung hatten (Abbildung 20 C). Die Western Blot Bande, welche die Phosphorylierung an Serin9 der GSK3 β nachwies, wurde wiederum durch beide Liganden im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. Durch den Einsatz des PI3Kinase Inhibitors LY294002, nicht aber durch U0126 und Rapamycin, wurde die Intensität dieser Bande wieder abgeschwächt (Abbildung 20 A). Dies konnte durch die Quantifizierung in Abbildung 20D bestätigt werden. Die phosphorylierte Variante von mTOR an Ser2448 ließ sich nur durch sehr schwache Banden im Western Blot nachweisen. Es konnte trotzdem gezeigt werden, dass es zu einer leichten Steigerung der Phosphorylierung an Position Ser2448 kam, nachdem die Neurone mit BDNF oder EphrinA5-Fc stimuliert wurden. Die Banden

sind im Gegensatz zur Kontrolle intensiver. Diese Steigerung der Phosphorylierung wies nach Inkubation mit LY294002 eine tendenzielle Reduktion auf, konnte aber mit einem p-Wert von 0,08 nicht als signifikant beschrieben werden (Abbildung 20 E). Die Wirkung des MAPK Inhibitors U0126 und des mTOR Inhibitors Rapamycin wiesen keine Reduktion der Phosphorylierung auf.

Es konnte also gezeigt werden, dass sowohl der MAPK als, auch der PI3K Signalweg wichtig für die Stabilisierung von Gephyrinclustern sind. Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass beide Signalwege nach Stimulation mit BDNF und nur der PI3K Signalweg nach Stimulation mit EphrinA5-Fc aktiviert werden. Die GSK3 β wurde durch beide Liganden phosphoryliert.

5.3.4 Interaktion zwischen mTOR und Gephyrin als möglicher Regulationsmechanismus der Gephyrinclusterung

Aus der Literatur ist bekannt, dass mTOR als ein Molekül des PI3K Signalwegs mit Gephyrin in einem Überexpressionssystem interagiert (Sabatini et al., 1999). Dies legt eine Möglichkeit für Regulation der Gephyrincluster an der Oberfläche hippocampaler Neurone nahe. Daher sollte nun untersucht werden, ob die vorher beschriebene Aktivierung der Signalwege, die Interaktion von Gephyrin und mTOR beeinflussen.

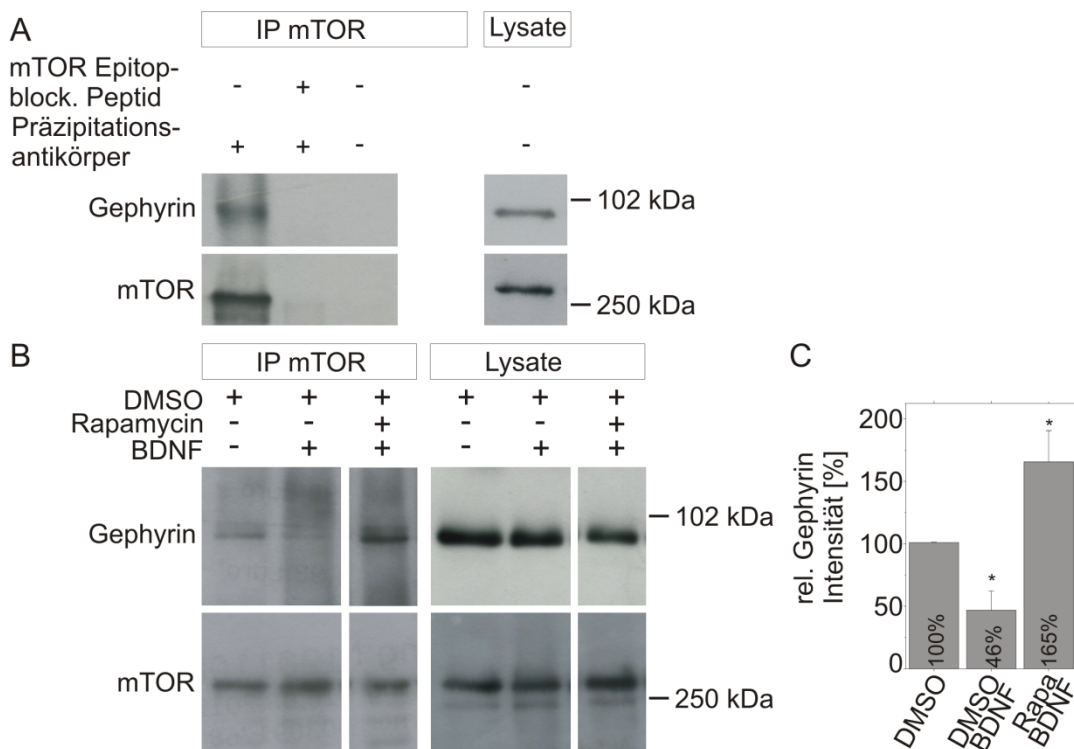


Abbildung 21 Immunpräzipitation von mTOR und Gephyrin nach Behandlung mit BDNF und Rapamycin. (A) Immunpräzipitation mit einem gegen mTOR gerichteten Antikörper. Nachgewiesen wurden sowohl mTOR selbst, als auch Gephyrin. Spur1 zeigt die tatsächliche Präzipitation. Spur2 ist

eine Kontrolle, bei der der Präzipitationsantikörper 30 min mit einem blockierenden Peptid vorinkubiert wurde. Spur3 entspricht einer Kontrolle, bei welcher der Präzipitationsantikörper weggelassen wurde. Gleichzeitig wurde das Lysat vor der Präzipitation aufgetragen und ebenfalls mTOR und Gephyrin nachgewiesen. (B) Immunpräzipitation mit einem gegen mTOR gerichteten Antikörper. Nachgewiesen wurden sowohl mTOR selbst, als auch Gephyrin. Auf Spur1 wurden die Neurone nur mit DMSO inkubiert. Auf Spur2 wurden die Neurone erst mit DMSO vorinkubiert und dann mit 30 min BDNF stimuliert. In Spur3 wurden die Neurone mit Rapamycin 30 min vorinkubiert und dann 30 min mit BDNF stimuliert. Die Gleichen Behandlungen gelten für die Auftragsreihenfolge bei den Lysaten. Obwohl die Banden ausgeschnitten sind, wurden alle Proben auf dem gleichen Gel geladen, auf die gleiche Membran geblottet und auch gleichmäßig entwickelt. (C) Quantifizierung der Bandenintensität aus der in B gezeigten Immunpräzipitation. $n = 3$, $p = 0,022$ (DMSO und DMSO/BDNF)*, $p = 0,037$ (DMSO und Rapamycin/BDNF)*.

In der vorliegenden Arbeit wurden Präzipitationen mit endogen exprimierten Proteinen aus primären kortikalen Neuronen durchgeführt. Die Koimmunpräzipitation wurde mit einem gegen mTOR gerichteten Antikörper als Präzipitationsantikörper durchgeführt. Der Nachweis des präzipitierten mTOR wurde mit einem anderen Antikörper gegen dieses Molekül durchgeführt. Auf der gleichen Membran wurde ebenfalls das Gephyrinprotein nachgewiesen, da dieses bei ca. 93 kDa läuft, während mTOR mit seinen 289 kDa weiter oben auf der Membran zu finden sein sollte. Beide Banden konnten in der Western Blot Analyse eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 21 A). Dies lässt eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen vermuten. Zusätzlich wurden 2 Kontrollen eingeführt. Bei der ersten Kontrolle wurde der Präzipitationsantikörper durch ein Peptid blockiert und so an der Bindung an mTOR gehindert. Die zweite Kontrolle wurde komplett ohne Präzipitationsantikörper durchgeführt. In beiden Kontrollen konnten jeweils weder mTOR noch Gephyrin Banden im Western Blot detektiert werden (Abbildung 21 A). In weiteren Versuchen sollte analysiert werden, ob die in den Clusterungsversuchen eingesetzten natürlichen Liganden oder auch der mTOR Inhibitor Rapamycin die Interaktion zwischen Gephyrin und mTOR beeinflussen. Die Behandlung der Neurone mit BDNF, führte wie im vorherigen Kapitel gezeigt zu einer Steigerung in der Anzahl der Gephyrincluster (Kapitel 5.2.6). Nach der Immunpräzipitation konnte eine Reduktion in der Intensität der Gephyrin positiven Bande im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (Abbildung 21 B). Diese Reduktion konnte durch die Quantifizierung in Abbildung 21 C bestätigt werden. Im Gegensatz dazu führte die Inhibition von mTOR mit Hilfe von Rapamycin zu einer, im Western Blot intensiver wirkenden Bande für Gephyrin (Abbildung 21 B). Die Quantifizierung der Intensität der Bande ist in Abbildung 21 C dargestellt, und bestätigt die Steigerung in der Gephyrinintensität.

Die Gephyrin positiven Banden wurden dabei jeweils auf die mTOR Präzipitationsbanden normiert.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Stimulation der Zellen mit BDNF die jeweilig kopräzipitierte Bande im Western Blot im Vergleich zu Kontrolle abschwächte, sollte nun untersucht werden, ob diese Reduktion auch durch eine Stimulation mit EphrinA5-Fc ausgelöst werden kann.

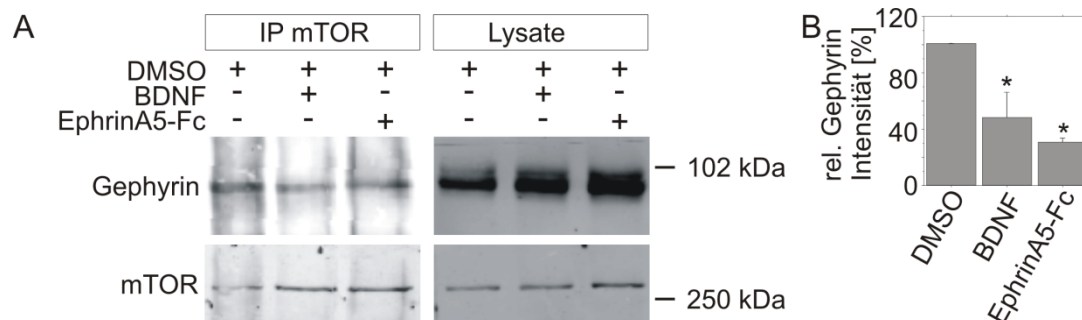


Abbildung 22 Immunpräzipitation von mTOR und Gephyrin nach Stimulation mit EphrinA5-Fc.

(A) Immunpräzipitation mit einem gegen mTOR gerichteten Antikörper. Nachgewiesen wurden sowohl mTOR selbst, als auch Gephyrin. Auf Spur1 wurden die Neurone nur mit DMSO inkubiert. Auf Spur2 wurden die Neurone erst mit DMSO vorinkubiert und dann 30 min mit EphrinA5-Fc, welches vorher 30 min mit anti human IgG Antikörpern oligomerisiert wurde, stimuliert. In Spur3 wurden die Neurone mit 30 min mit vorgeclustertem EphrinA5-Fc stimuliert. Die gleichen Behandlungen gelten für die Auftragungsreihenfolge bei den Lysaten. (B) Quantitative Auswertung der relativen Bandenintensität nach Koimmunpräzipitation. Normiert wurde erst auf die mTOR Präzipitationsbanden, dann wurde die DMSO Kontrolle als 100% definiert. $n = 3$; $p = 0,0134^*$ (DMSO und BDNF), $p = 0,0035^*$ (DMSO und EphrinA5-Fc).

Nach Aktivierung der EphA Rezeptoren durch EphrinA5-Fc konnte, wie in Abbildung 22 A und B zu sehen, deutlich weniger Gephyrin mit mTOR kopräzipitiert werden, als in der Kontrollsituation. Trotz der leicht unterschiedlichen Aktivierungsmuster der nachgeschalteten Signalwege nach BDNF-TrkB- und EphrinA5-Fc-EphA-Rezeptor Stimulation konnte eine vergleichbare Abnahme der kopräzipitierten Gephyrin Bande im Western Blot nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die beiden Rezeptoren nach Stimulation vergleichbare Effekte auf die Gephyrin-mTOR Interaktion hatten. Dies lässt vermuten, dass hierbei die gleichen nachfolgenden intrazellulären Signalwege beteiligt sind.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Proteinkinasen oder kinase-assoziierten Proteinen, welche regulatorisch in das Clusterungsverhalten des an inhibitorischen Postsynapsen lokalisierten Gerüstproteins Gephyrin eingreifen.

Hierfür sollte ein auf RNA Interferenz basiertes Screeningsystem etabliert werden. Um ein robustes Screeningsystem zu entwickeln, wurden Proteine der inhibitorischen Postsynapse, in HeLa Zellen überexprimiert. Die Charakterisierung deren Verhaltens in HeLa Zellen, diente als Grundlage für die Erarbeitung von Richtlinien zur späteren Auswertung des Screens.

Im eigentlichen Screen wurden dann insgesamt 39 Gene bzw. ihre Proteine als mögliche Effektoren der Gephyrinclusterung identifiziert. Einen großen Anteil der sogenannten Hits machten hierbei Rezeptortyrosinkinasen, sowie deren intrazelluläre Signalwege aus.

Durch weitere siRNA basierte Experimente im relevanten Zellsystem der primären hippocampalen Neurone, konnten zwei der Rezeptortyrosinkinasen als wichtig für die Gephyrinclusterung bestätigt werden. Diese Ergebnisse wurden durch weiteres Eingreifen in die Funktionalität der Rezeptortyrosinkinasen, zum Beispiel durch die Stimulation mit ihren natürlichen Liganden erhärtet.

Damit übereinstimmend erwiesen sich auch die typischen weiterführenden Signalwege dieser Rezeptortyrosinkinasen (MAPK- und PI3K Signalweg) als wichtig für die Regulation der Gephyrinaggregation.

Als letzter Punkt dieser Arbeit wurde dann versucht, auf Grundlage dieser Ergebnisse ein Modell zur Regulation der Gephyrincluster an der postsynaptischen Membran zu entwickeln, welches am Ende dieser Arbeit vorgestellt werden soll.

6.1 Neuartige Screeningmethode zur funktionellen Analyse neuronaler Proteine

6.1.1 Vergleich mit schon bestehenden Screeningmethoden

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Durchführung eines Screens zur Analyse von Proteinen, die in der Regulation von Gephyrinaggregaten an der Zelloberfläche eine Rolle spielen. Auf Basis der Methode der RNA Interferenz sollten Kinasen und kinase-assoziierte Proteine herunterreguliert werden. Die hierdurch ausgelöste Destabilisierung von Gephyrinaggregaten sollte durch eine Abnahme der

Gephyrinclustergröße an der Zelloberfläche detektiert werden. Hierzu sind bildgebende Methoden notwendig, die eine Größenveränderung nachweisen können. Für die Anwendung in der Neurobiologie sind einige Screeningsysteme beschrieben, wobei nur wenige bildgebende Auswertemethoden verwenden. Die Identifizierung neuer Komponenten zur Behandlung von Alzheimer stützt sich zum Beispiel auf die Analyse der Zellviabilität. Die Experimente sind dabei meist auf die Messung von Stoffwechselprodukten (ATP-Assays), oder Markerproteinen zur Bestimmung der Apoptoserate (Caspase-3 Assay) ausgelegt und können so einfach und schnell mit Hilfe von *microplate readern* ausgewertet werden (Stockwell, 2002). Andere Screeningmethoden, die wie die vorher beschrieben eine sehr hohe Durchsatzfähigkeit zeigen, sind durch die Isolierung und Analyse von Synaptosomen mehr auf einen rein neuronalen Hintergrund spezifiziert. Diese dienen aber vor allem der Analyse proteomischer Veränderungen dieser Strukturen, zum Beispiel mit Hilfe der Massenspektrometrie. Gleiches gilt für *Yeast two Hybrid* Screeningmethoden, bei denen zwar die Interaktion von neuronalen Proteinen untersucht werden kann, diese jedoch auf die Detektion von Proteininteraktionen ausgerichtet ist, und zudem in Hefesystemen durchgeführt wird (Khanna et al., 2007, Pantakani et al., 2011, Malpass, 2012). Die eben beschriebenen Methoden sind aber alle nicht geeignet um morphologische oder phänotypische Effekte von Proteinen der inhibitorischen Postsynapse zu detektieren. Die Auswertung eines Screens durch bildgebende Methoden wird häufig bei Neuritenwachstumsversuchen eingesetzt, senkt aber gleichzeitig durch die aufwendige Datenerhebung am Mikroskop die Durchsatzfähigkeit (Linhoff et al., 2009, Yeyeodu et al., 2010, Hutson et al., 2011). Das dendritische Netzwerk der Modellzellen wird oft nach manueller Bildakquisition halb automatisch vermessen, was die Durchführung wiederum erleichtert (Yeyeodu et al., 2010). Hierfür ist aber die Analyse gut definierbarer Strukturen, wie z.B. von komplette Dendritenbäumen unerlässlich. Dies schließt die Verwendung primärer Neurone für die Analyse synaptischer Endigungen praktisch aus. Denn bei synaptischen Endigungen sollten immer die einzelnen, unter Umständen unterschiedlich regulierten Subkompartimente der Neurone wie Soma, Dendriten und Axone, getrennt voneinander analysiert werden (Tao-Cheng and Zhou, 1999). Außerdem muss durch die aufwendige Zellkultur, die eingeschränkte Verfügbarkeit und schlechte Transfektionseffizienz der primären Neurone die Anzahl der zu untersuchenden Proteine schon im Voraus eingeschränkt werden (Paradis et al.,

2007), (Ray et al., 1993). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modellsystem gewählt, welches eine automatisierte Auswertung, sowie eine höhere Durchsatzfähigkeit für die Analyse des kompletten Kinoms, sowie von Proteinen, welche an Kinasen assoziiert sind erlaubt. Durch das Modellsystem muss aber natürlich später eine aufwendigere Analyse einzelner sogenannter Hits im primären und damit relevanten Zellsystem in Kauf genommen werden.

6.1.2 Etablierung und Bewertung der Screeningmethode

Wie erwähnt wurde für die Durchführung des siRNA basierten Screens in dieser Arbeit, ein einfaches Zellsystem gewählt. Obwohl die Transfektionseffizienz primärer Neurone, vor allem für siRNAs, in den letzten Jahren deutlich gesteigert werden konnte, lassen sich die hier verwendeten HeLa Zellen trotzdem noch viel effizienter transfizieren und sind im praktischen Umgang im Labor einfacher zu handhaben (Ohki et al., 2001, Karra and Dahm, 2010). HeLa Zellen enthalten zwar endogenes Gephyrin, sind aber trotzdem keine neuronenähnlichen, sondern Zervixkarzinomzellen (Nawrotzki et al., 2012). Aus diesem Grund wurden alle Proteine der inhibitorischen Postsynapse in diesem Zellsystem überexprimiert. Für die spätere Verwendung als Screeningsystem musste aber das Verhalten dieser Proteine in HeLa Zellen genau charakterisiert werden (Boutros and Ahringer, 2008). In Übereinstimmung mit Harvey et al. 2004 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Überexpression von EGFP-markiertem Gephyrin zusammen mit CollybistinI_{SH3}- zu einer Ausbildung kleiner Oberflächencluster führt (Harvey et al., 2004). Wie in primären Neuronen, kolokalisieren GABA_A Rezeptoren (in einer Zusammensetzung von $\alpha_2\beta_3\gamma_2$) und Gephyrin auch im artifizialen HeLa Zellsystem, sobald Gephyrin CBII_{SH3}- abhängig an die Zelloberfläche transloziert wurde (Sassoe-Pognetto et al., 1995, Todd et al., 1996, Kneussel et al., 2000, Sassoe-Pognetto et al., 2000, Sun et al., 2004). Dies ist wichtig, da in der Literatur eine direkte Abhängigkeit von Gephyrin und GABA_A Rezeptoren in der Zusammensetzung von $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ beschrieben ist. Fehlt eine dieser Komponenten, kann auch die andere nicht mehr in Form von organisierten Oberflächenclustern detektiert werden (Essrich et al., 1998, Kneussel et al., 1999, Levi et al., 2004, Papadopoulos et al., 2007, Yu et al., 2007, Papadopoulos et al., 2008, Saiepour et al.).

Die Oberflächencluster von EGFP-Gephyrin in HeLa Zellen waren sehr klein. Dies erschwerte die Detektion von Komponenten, welche die Gephyrincluster destabilisieren, da diese Destabilisierung anhand einer weiteren Verkleinerung der

Gephyrinaggregate nachgewiesen werden sollte. Durch die zusätzliche Kotransfektion des Zelladhäsionsmoleküls Neurofascin, konnte die Größe der einzelnen EGFP-Gephyrincluster aber deutlich gesteigert werden, da die Cluster miteinander verschmolzen sind. Neurofascin war bis zu diesem Zeitpunkt vor allem mit der Organisation von Axoninitialsegmenten, sowie mit der Initiation des Aufbaus von Ranvierschen Schnürringen in Zusammenhang gebracht worden (Davis et al., 1996, Eshed et al., 2005, Hedstrom et al., 2007, Zonta et al., 2008, Kirschbaum et al., 2009, Zonta et al., 2011, Kriebel et al., 2012). Nachgewiesenermaßen gibt es aber auch einen Einfluss von Neurofascin auf die Stabilität des Gerüstproteins Gephyrin *in vivo* (Kriebel et al., 2011). Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass ebenfalls ein Effekt im *in vitro* HeLa Zellsystem erwartet werden konnte (Kriebel et al., 2011). Im *in vitro* System konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass die intrazelluläre Domäne von Neurofascin ausreichend für die Ausbildung dieses vergrößernden Effekts ist. Neurofascin ist außerdem für seine Interaktion mit dem FGFR1 und seiner FGFR1 abhängige Rolle im Neuritenwachstum bekannt (Kirschbaum et al., 2009). Durch die Verwendung eines pharmakologischen Inhibitors, sowie einer dominant negativen FGFR1 Isoform konnte diese FGFR1 Abhängigkeit auch für den Neurofascin spezifischen Effekt auf die Gephyrinclustergröße gezeigt werden. Dies weist zusätzlich darauf hin, dass der FGFR1 Signalweg, als ein typischer Vertreter der Rezeptortyrosinkinasesignale in Neuronen und HeLa Zellen konserviert abläuft, was weiterhin die Eignung des HeLa Zellsystems für diesen Screen bestätigt (Kirschbaum et al., 2009). Als direkte Vorarbeit zum Screen wurde die Verbindung von Neurofascin und dem FGFR1 genutzt um zu zeigen, dass auch siRNA abhängig eine Reduktion in der Gephyrinclustergröße ausgelöst und quantifiziert werden kann. Obwohl es viele Hinweise gibt, dass sich dieses Zellsystem für die Durchführung eines solchen Screens eignet, müssen auch die Einschränkungen dieses Systems in Betracht gezogen werden. So kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle Signalwege in HeLa Zellen und Neuronen gleich, bzw. mit den gleichen beteiligten Molekülen ablaufen. Es kann also in einem solchen Screen nur ein Hinweis auf beteiligte Signalwege im Allgemeinen, aber kaum über die Beteiligung spezifischer Proteine oder sogar Proteinuntereinheiten gewonnen werden. Dies macht eine weitere Validierung der Ergebnisse im primären relevanten Zellsystem unerlässlich.

Trotzdem soll die Verlässlichkeit dieses Zellsystem in der folgenden Bewertung der Ergebnisse des Screens diskutiert werden.

6.2 Bewertung der Ergebnisse des siRNA basierten Screens in HeLa Zellen

Die Einteilung der im Screen als wirksam auf die Gephyrinclustergröße definierten Proteine wies eine große Dichte von Rezeptortyrosinkinasen, sowie ihrer typischen downstream Signalwege auf. Mit den Hits TrkB, TrkC, cMet, FGFR1 und Axl konnten fünf Vertreter der Rezeptortyrosinkinasen identifiziert werden, welche typischerweise alle über die gleichen Signalwege ihre Aktivierung ins Zellinnere weiterleiten (Eswarakumar et al., 2005, Reichardt, 2006, Kono et al., 2009). Außerdem konnten fünf Vertreter der großen Eph Rezeptorfamilie als Hit definiert werden (Pasquale, 1997). Diese große Redundanz an Rezeptortyrosinkinasen, sowie ihrer nachgeschalteten Signalwege zeigt also, dass im HeLa Zellsystem eventuell nicht zwischen den eigentlich spezifischen Aufgaben der einzelnen Eph Rezeptoren im neuronalen Hintergrund unterschieden werden kann. Somit führte das Fehlen eines dieser Rezeptoren und seiner Signalwege schon zu einer Auswirkung auf die Gephyrincluster in HeLa Zellen. Es können aber durchaus Rückschlüsse auf die Beteiligung komplexerer Signalwege gezogen werden. Zum Einen spricht die Identifizierung von TrkB, welches schon häufig mit der Synaptogenese, aber auch der Stabilisierung inhibitorisch synaptischer Strukturen in Verbindung gebracht wurde für die Verwendung dieses Zellsystems im Screen (Chen et al., 2003, Chen and Olsen, 2007, Hu et al., 2011). Zum Anderen validieren sich einige der Hits sogar gegenseitig. Neben den typischen Rezeptortyrosinkinasen, wie zum Beispiel TrkB, welche alle den PI3K Signalweg aktivieren, konnten ebenso vier Vertreter dieses Signalwegs selbst als Hit identifiziert werden. Das Gleiche gilt für den MAPK Signalweg, welcher ebenfalls durch die typischen Rezeptortyrosinkinasen aktiviert wird. Der MAPK Signalweg wurde selbst auch durch zwei Hits repräsentiert. Interessanterweise sind aber nicht nur diese zwei direkten Vertreter des MAPK Signalwegs nämlich A-Raf und Mek2 identifiziert worden, sondern auch zwei Regulatoren von Sprouty-2, welcher selbst ein Negativregulator des Ras-MAPK Signalwegs ist (Hanafusa et al., 2002, Gross et al., 2007, Aranda et al., 2008, Chandramouli et al., 2008, Hausott et al., 2012). Insgesamt kann also

geschlussfolgert werden, dass HeLa Zellen zur Identifizierung von Signalwegen, die an der Regulation von Gephyrin beteiligt sind verwendet werden können.

6.3 Vergleich der Rezeptortyrosinkinasen TrkB und EphA7

Zwei Vertreter der jeweiligen Gruppen, nämlich TrkB als Vertreter der „typischen“ Rezeptortyrosinkinasen und EphA7 als Vertreter der Eph Rezeptoren sollten nun im neuronalen Hintergrund als wichtig für die Gephyrinclusterregulation bestätigt werden. Die Beschreibung „typische“ Rezeptortyrosinkinase bezieht sich auf die einheitlichen nachgeschalteten Signalwege, die von diesem Rezeptortyrosinkinasentyp normalerweise aktiviert werden. Die EphA Rezeptoren hingegen unterscheiden sich durch ihre nachgeschalteten Signalwege von den „typischen“ Rezeptortyrosinkinasen (Miao et al., 2001, Shamah et al., 2001, Eswarakumar et al., 2005, Reichardt, 2006, Kono et al., 2009). In Übereinstimmung mit der Literatur konnte beschrieben werden, dass nach BDNF Stimulation des TrkB Rezeptor der Ras-MAPK Signalweg aktiviert wurde (Gross et al., 2007, Meier et al., 2011). Im Gegensatz dazu führen EphA Rezeptoren entweder zu einer drastischen Reduktion einer BDNF-abhängigen Aktivierung des MAPK Signalwegs, oder inhibieren den Signalweg sogar komplett (Miao et al., 2001, Bi et al., 2011, Meier et al.). In der vorliegenden Arbeit konnte aber keine EphrinA5-Fc abhängige Veränderung in der Aktivität des MAPK Signalwegs gezeigt werden. Der Vergleich zu Meier et al., 2011 lässt aber Spekulationen zu, dass ältere und damit reifere Neurone mit einer unterschiedlichen Aktivierung des MAPK Signalwegs auf die EphrinA5-Fc Stimulation reagieren, als jüngere unreifer Kulturen (Meier et al., 2011). Dies zeigt einen ersten deutlichen Unterschied der beiden oben genannten Rezeptortypen auf. Ebenfalls in Übereinstimmung mit früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass der PI3K Signalweg durch BDNF und EphrinA5 stimuliert wurde (Wong et al., 2004, Kumar et al., 2005, Yoshii and Constantine-Paton, 2007). Während in Übereinstimmung mit der Literatur für BDNF eine Aktivierung von mTOR gezeigt werden konnte, ist die gezeigte EphrinA5-Fc abhängige Aktivierung von mTOR eher gegensätzlich zur bisherigen Literatur (Nie et al., 2010, Sahin, 2010). Neben mTOR ist auch die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), ein vom PI3K-Akt Signalweg reguliertes Protein. Durch die Aktivität des PI3K Signalwegs, wird die GSK3 β an Serin 9 phosphoryliert, was eine Inhibition dieser Kinase zur Folge hat. Diese Inhibition wurde von Tyagarajan et al. in ihrer Publikation 2011, mit der

Regulation von Gephyrinclustern in Verbindung gebracht (Tyagarajan et al., 2011b). Der inhibierende Effekt auf die GSK3 β konnte in dieser Arbeit ebenfalls BDNF und EphrinA5-Fc abhängig gezeigt werden, was einen gemeinsamen Mechanismus der beiden Rezeptortypen und ihrer Liganden darstellt. Es kann also geschlossen werden, dass TrkB und EphA7 in primären Neuronen gemeinsame aber auch unterschiedliche nachgeschaltete Signalwege aktivieren.

6.4 BDNF-TrkB Rezeptor abhängige Regulationsmechanismen an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen

Inhibitorische und exzitatorische Synapsen sind unterschiedliche Synapsentypen, die verschiedene Proteine oder Rezeptoren auf der präsynaptischen- und auf der postsynaptischen Seiten beinhalten, woraus sich unterschiedliche Funktionen ableiten lassen (Nakanishi, 1994, Eric R. Kandel, 2000, Kneussel and Betz, 2000). Beide Synapsentypen werden jedoch durch BDNF-TrkB moduliert. Die BDNF-abhängige Regulation exzitatorischer Synapsen kann durch die Induktion der Phosphorylierung von NMDA Rezeptoren die Leitfähigkeit der Ionenkanäle steigern und gleichzeitig zur vermehrten Translokation dieser Rezeptoren in die Membran führen (Caldeira et al., 2007). Diese BDNF abhängigen Effekte auf NMDA Rezeptoren sind aber ebenso Kalzium- und aktivitätsabhängig wie sie auch für inhibitorische Systeme gezeigt werden konnten (Crozier et al., 2008). Die Literatur zum Einfluss von BDNF auf GABAerge Synapsen ist sehr kontrovers. Eine Quelle beschreibt zum Beispiel eine Abnahme GABAerger Postsynapsen nach BDNF Stimulation (Brunig et al., 2001). Im Gegensatz dazu konnte aber für inhibitorische Postsynapsen ebenfalls eine aktivitätsgesteuerte und BDNF abhängige Steigerung GABAerger Synapsen gezeigt werden. Die Aktivitätsabhängigkeit kann aber durch weitere BDNF Stimulation ersetzt werden (Bao et al., 1999, Chen et al.). Gleichzeitig initiiert BDNF einen positiven Feedback-loop der Ca²⁺ abhängig für den weiteren Einbau von GABA_A Rezeptoren in die Membran sorgt (Porcher et al., 2011).

Diese Ähnlichkeiten in der Regulation von beiden Synapsentypen durch BDNF und seinen Rezeptor TrkB lässt vermuten, dass gemeinsame Mechanismen für die Bildung und Aufrechterhaltung der beiden Synapsentypen wichtig sind (Seil and Drake-Baumann, 2000, Seil, 2003, Yoshii and Constantine-Paton, 2007, Chen et al.). Ob aber die in dieser Arbeit gezeigte BDNF abhängige Steigerung der GABA_A

Rezeptoreinheiten alleine aus diesen aktivitäts- und kalziumabhängigen Mechanismen resultiert, bleibt erst einmal offen.

Für die exzitatorischen Systeme sind BDNF-TrkB Rezeptor abhängige Mechanismen der Regulation von PSD95-Aggregaten beschrieben, die wahrscheinlich parallel zu den Veränderungen der Leitfähigkeit ablaufen. Diese Mechanismen beruhen auf der Aktivierung des PI3K Signalwegs durch den TrkB Rezeptor, was jedoch in der vorliegenden Arbeit so nicht bestätigt werden konnte (Yoshii and Constantine-Paton, 2007). Weder die Herunterregulation des TrkB Rezeptors noch die Inhibition der PI3K löste einen Effekt auf das an exzitatorischen Postsynapsen lokalisierte PSD95 aus. Dafür konnte aber in Übereinstimmung mit der Literatur gezeigt werden, dass die Herunterregulation des TrkB Rezeptors die Anzahl GABAerger Rezeptorcluster reduziert (Yoshii and Constantine-Paton, 2007, Hu et al., 2011). Gleichzeitig wurde auch die Anzahl der Gephyrinaggregate reduziert, was zwar durch die enge Verbindung zu den GABA_A Rezeptoren erwartet worden war, aber trotzdem die bisher bekannte Literatur erweitert (Essrich et al., 1998, Kneussel et al., 1999, Lardi-Studler and Fritschy, 2007, Tretter et al., 2008). Zusätzlich konnte durch den Einsatz von Inhibitoren gezeigt werden, dass die Gephyrinaggregate im Vergleich zu PSD95 ebenfalls einer PI3K abhängigen Regulation unterliegen (Yoshii and Constantine-Paton, 2007).

Die Regulation exzitatorischer Synapsen über den PI3K-Akt-mTOR Signalweg beruht aber zumindest teilweise auf der translationsabhängigen Neubildung von Proteinen der Postsynapse (Yoshii and Constantine-Paton, 2007, Hu et al., 2011). Ein Zusammenhang zwischen dem PI3K-Akt-mTOR Signalweg und der Gephyrinclusterung konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden, jedoch konnte kein Hinweis auf die Veränderung der Translation von Gephyrin nachgewiesen werden.

Trotzdem bleibt die Frage offen, warum auch nach Stimulation mit BDNF keine Auswirkung auf PSD95 nachgewiesen werden konnte, obwohl ein Effekt in der Literatur schon gezeigt wurde (Cunha et al., 2010). Die Publikation von Elmariah et al., 2004 könnte allerdings einen Hinweis darauf geben, warum in dieser Arbeit keine Veränderungen von PSD95 gezeigt werden konnten. Der Effekt von BDNF wurde hier als abhängig von der Aktivität GABAerger Synapsen, und damit als zeitlich verzögert gegenüber GABAergen Systemen beschrieben (Elmariah et al., 2004). Trotzdem konnte von Elmariah et. al schon nach 24h eine Veränderung in PSD95

Clustern beschrieben werden, was in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall war. Dies kann aber durch die Verwendung reiferer Neuronenkulturen und damit schon stärker stabilisierten synaptischen Endigungen vor der BDNF Stimulation erklärt werden.

Folglich läuft die BDNF-TrkB abhängige Regulation exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen in grundlegenden Mechanismen sehr ähnlich ab. Möglicherweise ergibt sich aber aus der Abhängigkeit der exzitatorischen, von den inhibitorischen Postsynapsen ein Unterschied, der die Ergebnisse für PSD95 in dieser Arbeit im Vergleich zur Literatur erklären kann.

6.5 EphrinA5-EphA Rezeptor abhängige Regulationsmechanismen an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen

Eph Rezeptoren konnten bis heute nur mit der Regulation von exzitatorischen Synapsen in Verbindung gebracht werden. EphB Rezeptoren interagieren extrazellulär direkt mit den NMDA Rezeptoren und regulieren über Ephexin Aktinzytoskelett-abhängig die Lokalisation der Rezeptoren in der postsynaptischen Membran (Dalva et al., 2000, Dabrowski and Umemori, 2011). Als Vertreter der EphA Rezeptoren konnten EphrinA5 abhängige Effekte des EphA5 Rezeptors in der Regulation der Expression von NMDA und PSD95 Komplexen gezeigt werden. Diese Mechanismen beinhalten die Kalzium abhängige Aktivierung der PKA, CaMKII und PI3K und der folgenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (Akaneya et al., 2010). Diese Effekte auf PSD95 konnte durch die EphrinA5-Fc Stimulation in der vorliegenden Arbeit jedoch ebenfalls nicht gezeigt werden. Hierbei kann die Vermutung angestellt werden, dass es ebenfalls zu einer zeitlich verzögerten Regulation exzitatorischer Postsynapsen kommen kann. Diese kann wie vorher diskutiert, eine Folge der Abhängigkeit des exzitatorischen Systems von der Aktivität inhibitorischer GABA_A Rezeptoren sein (Elmariah et al., 2004). Die in diesem Abschnitt beschriebene Aktivierung der PI3K, PKA, und CaMKII, sowie die Umstrukturierung des Aktinzytoskelett sind aber ebenfalls Prozesse, die eine indirekte Wirkung auf PSD95 haben können, und somit auch einen zeitverzögerten Einfluss auf PSD95 ausüben könnten. Der EphA7 Rezeptor selbst konnte bis jetzt nur mit repulsiver Wirkung während der axonalen Wegfindung in der Embryonalentwicklung in Verbindung gebracht werden (Torii and Levitt, 2005). Eine Kinase-defiziente verkürzte Form des EphA7 Rezeptors, welche die Phosphorylierung der *full-length* EphA7 Rezeptoren inhibiert und dadurch *in vitro* die

repulsive in eine attraktive Wirkung ändert ist ebenso bekannt (Holmberg et al., 2000). Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass dieser verkürzte Rezeptor für die Regulation der Gephyrinclusterung verantwortlich ist, da er keine Kinaseaktivität mehr besitzt (Ciossek et al., 1999). Die Kinaseaktivität zur Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen ist aber, wie vorher diskutiert, ebenfalls wichtig für Regulation der Gephyrinclusterung. Außerdem konnte nach Überexpression einer Kinase-defizienten (dominant negativen) Variante des EphA7 Rezeptors ebenfalls eine Reduktion in der Gephyrin- oder γ_2 -Clusterung gezeigt werden. Dies widerspricht einer stabilisierenden Wirkung des physiologisch exprimierten verkürzten EphA7 Rezeptors.

Folglich muss also dem Fazit des vorherigen Kapitels angefügt werden, dass die Regulation von exzitatorischen Synapsen neben den vergleichbaren Mechanismen auch auf anderen Mechanismen beruht. Gemeint sind hierbei die Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts, sowie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Dieser Unterschied in der Regulation der beiden Synapsentypen könnte daher eine weitere zeitliche Verzögerung verursachen, was eine Detektion von Veränderungen der PSD95 Cluster in der vorliegenden Arbeit auf Grund der kurzen Inkubationszeit von 24h unwahrscheinlicher macht und daher erklärt.

6.6 Präsynaptische Systeme bleiben unbeeinflusst

Für keinen der beiden untersuchten Rezeptoren konnte nach Herunterregulation ein Effekt auf das inhibitorisch präsynaptische Markerprotein GAD65 gezeigt werden, obwohl in der Literatur beschrieben ist, dass der Verlust von inhibitorischen Synapsen, ebenfalls zu einem Verlust von präsynaptischen Kompartimenten führt (Eaton and Davis, 2003). Dies konnte auch nach Herunterregulation von Neurofascin *in vivo* beobachtet werden. 14 Tage nachdem die Herunterregulation lentiviral ausgelöst wurde, konnte eine Reduktion von sowohl Gephyrin- als auch GAD65 positiven Clustern gezeigt werden (Kriebel et al., 2011). Man könnte aber mutmaßen, dass dieser Effekt ebenfalls zeitlich verzögert auftritt und daher der Prozess zum Zeitpunkt der Analyse nach 24 h noch nicht abgeschlossen war, was die starken Schwankungen in der Detektion von GAD65 positiven Clustern erklären würde.

6.7 Funktionelle Interaktion zwischen mTOR und Gephyrin als Regulationsmechanismus

Es konnte bislang gezeigt werden, dass die Gephyrinaggregation durch die Stimulation mit BDNF und EphrinA5-Fc gesteigert werden kann. Dies könnte zu einer Erhöhung der allgemeinen Aktivität der Neuronenkultur führen, was, wie vorher beschrieben, zu einem vermehrten Einbau von Rezeptoren in die postsynaptische Membran führen könnte (Bao et al., 1999, Caldeira et al., 2007, Crozier et al., 2008, Chen et al., 2011). Ein weiterer möglicher Regulationsmechanismus der Gephyrinaggregation stellt aber die bekannte Interaktion von Gephyrin mit mTOR dar (Sabatini et al., 1999). 1999 wurde von Sabatini et al. die Interaktion von Gephyrin und mTOR (Raft1) beschrieben. Es konnte damals gezeigt werden, dass der Einsatz von 10 nM Rapamycin keinen Einfluss auf die Gephyrin-mTOR Interaktion hatte, was im Widerspruch zu der hier gezeigten Abhängigkeit der Gephyrin-mTOR Interaktion von Rapamycin steht (Sabatini et al., 1999). Im Vergleich zu Sabatini et al. wurden allerdings in der vorliegenden Arbeit endogen exprimierte Proteine kopräzipitiert. Durch den Einsatz von 100 nM Rapamycin konnte die Interaktion zwischen den beiden Proteinen gesteigert werden. Die hier eingesetzte Konzentration von Rapamycin ist zwar höher als die von Sabatini et al., wurde aber in anderen neueren Veröffentlichungen ebenfalls verwendet (Ruegg et al., 2007, Li et al., 2008, Morita and Sobue, 2009). Die relevantere Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von Rapamycin könnte in den verwendeten Zellsystemen liegen. Während bei Sabatini et al. *Yeast two Hybrid* Analysen, oder Immunpräzipitationen überexprimierter Proteine durchgeführt wurden, wurden in der vorliegenden Arbeit endogene Proteine aus kortikalen Neuronen präzipitiert (Sabatini et al., 1999). Endogene Proteine reagieren, wahrscheinlich auf Grund ihrer natürlichen Mengen und dem physiologischen Hintergrund, im Gegensatz zu, in einem anderen Zellsystem überexprimierten Proteinen sensitiver und natürlicher auf die Wirkung von Rapamycin.

Auf Grund der Ergebnisse von Rapamycin und BDNF bzw. EphrinA5-Fc auf die Clusterung von Gephyrin, sowie auf die Gephyrin-mTOR Interaktion, soll nun ein Modell zur mTOR abhängigen Regulation der Gephyrinclusterung vorgestellt werden, welches in Abbildung 23 zu sehen ist.

Während also Rapamycin zum Einen die Interaktion von Gephyrin und mTOR steigert, führt es auf der anderen Seite zu einer Reduktion in der Anzahl von

Gephyrinoberflächenclustern. Es könnte also sein, dass die Inhibition von mTOR durch Rapamycin-FKBP12 Komplexe, eventuell durch die Auflösung des mTORC1 Komplexes, die Bindung an Gephyrin erhöht, wodurch weniger Gephyrin für die Bildung von Gephyrinaggregaten an der Oberfläche zu Verfügung steht (Abbildung 23 B) (Liu et al., 2009, Thoreen and Sabatini, 2009, Ehninger and Silva, 2011). Dieses Modell wird weiter durch die BDNF bzw. EphrinA5-Fc Stimulationsexperimente unterstützt, die beide die Anzahl von Gephyrinaggregaten an der Oberfläche steigerten, während aber beide die Gephyrin-mTOR Interaktion verminderten. Außerdem konnten keine Veränderungen der Proteinlevel detektiert werden (Abbildung 23 A). Es kann also gemutmaßt werden, dass die Aktivierung von mTOR und damit die Bindung in seinen Komplexen, zu einer verminderten Bindung an Gephyrin führt, wodurch mehr Gephyrin für die Bildung von Oberflächenaggregaten zur Verfügung steht (Abbildung 23 A). Nachdem also diese verminderte Bindung von mTOR und Gephyrin durch beide Stimulanzen ausgelöst werden kann, ist es naheliegend, dass der MAPK Signalweg keinen Einfluss auf diese Interaktion nimmt. Dieser Signalweg wird nämlich zwar durch BDNF stimuliert, nicht aber durch EphrinA5-Fc. Folglich ist der

PI3K Signalweg, der von beiden Stimulanzen aktiviert wird, ausreichend für diese Interaktionsmodulation von Gephyrin und mTOR. Dennoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibierung des MAPK Signalwegs die Anzahl von Gephyrinaggregaten reduzierte. Dies spricht dafür, dass der MAPK Signalweg über andere Regulationsmechanismen auf die Gephyrinclusterung einwirkt (Abbildung 23 A und B). Hierbei könnte die MAPK abhängige Aktivierung von Regulatoren des Aktinzytoskeletts eine Rolle spielen, da Gephyrin selbst mit dem Aktinzytoskelett interagiert (Shamah et al., 2001, Giesemann et al., 2003, Lardi-Studler and Fritschy, 2007). Außerdem ist bekannt, dass Cdc42, als Regulator des Aktinzytoskeletts, den Transport und die Lokalisation von Gephyrin beeinflussen kann (Reddy-Alla et al., 2010, Tyagarajan et al., 2011a).

Gleichzeitig muss aber beachtet werden, dass auch die GSK3 β schon mit der Regulation von Gephyrinclustern in Verbindung gebracht wurde (Tyagarajan et al., 2011b). Es konnte eine Reduktion in der Anzahl von Gephyrinclustern detektiert werden, wenn Gephyrin durch eine aktive GSK3 β phosphoryliert wurde (Bausen et al., 2010, Tyagarajan et al., 2011b). Im Fall der Stimulation mit BDNF und EphrinA5-Fc wird die GSK3 β inhibiert. Durch die Inhibition der GSK3 β konnten durch

Tyagarajan et al. wiederum eine gesteigerte Anzahl von Gephyrinclustern detektiert werden (Tyagarajan et al., 2011b). Ob es aber einen Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungsstatus von Gephyrin und der Interaktion zwischen Gephyrin und mTOR gibt bleibt offen. Es könnte sich bei den beiden Prozessen auch um parallel ablaufende Regulationsmechanismen handeln.

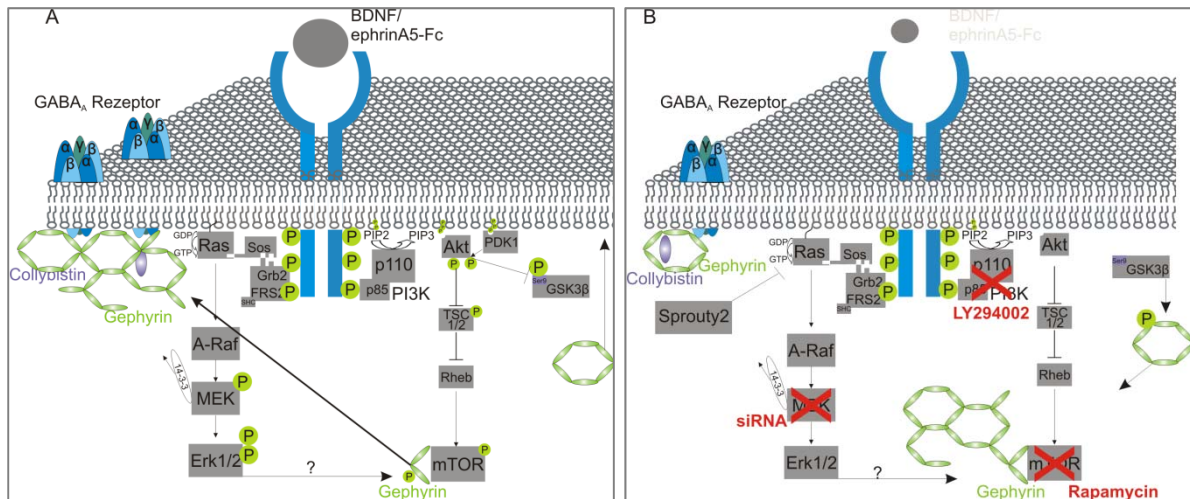


Abbildung 23 Modell zur Regulation der Stabilisierung von Gephyrinclustern. (A) Stimulation der Zellen mit BDNF oder EphrinA5-Fc mit nachfolgender Aktivierung des PI3K-Akt-mTOR Signalwegs. Die Bindung von Gephyrin an mTOR wird vermindert, während gleichzeitig mehr Gephyrinoberflächenaggregate detektiert werden können. Außerdem kann die GSK3β durch eine Akt-abhängige Phosphorylierung an Serin9 inhibiert werden. So kann keine Phosphorylierung von Gephyrin mehr stattfinden, was zu einer Steigerung der Oberflächenclustern führt. Der Einfluss des durch BDNF aktivierten Ras-MAPK Signalwegs ist unklar. (B) LY294002 blockiert die PI3K während Rapamycin mTOR inhibiert. Damit wird zum einen die Interaktion von mTOR und Gephyrin verstärkt, wodurch Gephyrin im Zytoplasma gehalten werden könnte. Es sind weniger Gephyrinoberflächenaggregate zu detektieren. Zusätzlich kommt es nicht mehr zur Inhibition der GSK3β was die Phosphorylierung von Gephyrin erlaubt. Die Inhibition des Ras-MAPK Signalwegs führt ebenfalls zur Reduktion der Oberflächencluster von Gephyrin. Wie dieser Einfluss ausgeübt wird ist allerdings unklar.

6.8 Ausblick

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden unterschiedliche Inkubationszeiten für die Gephyrinclusteranalyse und die Koimmunpräzipitation gewählt. Die kurze Rapamycin Inkubation bei der Kopräzipitation führte dabei nur zu einer Inhibition des mTORC1 Komplex. Der zweite existierende Komplex von mTOR (mTORC2) ist bekannt für seine Sensitivität gegenüber Rapamycin nach lang anhaltender Behandlung. Nachdem die Behandlung mit Rapamycin für die Gephyrinclusteranalyse länger war, wäre es sicher sehr interessant zu untersuchen, ob dies eine Folge der mTORC1 Inhibition alleine oder einer Inhibition beider mTORC Komplexe ist.

Des Weiteren wäre es, wie gerade erwähnt, von großem Interesse, in wie fern der MAPK Signalweg, der nachgewiesenermaßen einen Einfluss auf die Gephyrinclusterung hat, in das hier vorgeschlagene Modell integriert werden kann. Es gibt Hinweise, dass die Phosphorylierung von Gephyrin die Bindung an Glyzin-Rezeptoren erleichtert. Dies könnte ebenfalls für die Bindung an GABA_A Rezeptoren der Fall sein und wäre damit eine weitere Möglichkeit für die phosphorylierungsabhängige Regulation von Gephyrin durch den MAPK Signalweg (Tyagarajan and Fritschy, 2010).

Für die Wirkung der EphA Rezeptoren wäre außerdem noch eine Beteiligung des Aktinzytoskeletts zu untersuchen, mit welchem Gephyrin ja auch selbst interagiert (Shamah et al., 2001, Giesemann et al., 2003, Lardi-Studler and Fritschy, 2007).

Während sich die eben genannten offenen Fragestellungen vor allem auf die hier schon im neuronalen Hintergrund untersuchten Hits EphA7 und TrkB beziehen wäre es auch sehr interessant weitere Hits im primären System zu untersuchen. Die fehlende Stabilisierung der inhibitorischen Synapsen und somit die Ausbildung eines Ungleichgewichts zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen wurde schon oft mit dem Auftreten verschiedener psychischer Erkrankungen in Verbindung gebracht (Brose et al., 2010, Sheffler-Collins and Dalva, 2012). Dies ist insofern sehr interessant, da sieben der 39 Hits schon früher mit dem Auftreten von psychischen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden. Dazu gehören der FGFR1, cMET, EphB Rezeptoren sowie zum Beispiel der Hit PIK3C2G (Kyosseva et al., 1999, Irie and Yamaguchi, 2004, Gaughran et al., 2006, Jungerius et al., 2008, Burdick et al., 2010, Correia et al., 2010).

7 Publikationen

7.1 Publikationen

Jennifer **Wuchter**, Simone Beuter, Fridolin Treindl, Thoralf Herrmann, Guenther Zeck, Markus Templin, and Hansjürgen Volkmer (2012); A comprehensive small interfering RNA screen identifies signalling pathways required for gephyrin clustering "The Journal of Neuroscience" in press

Kriebel M*, **Metzger J***, Trinks S, Chugh D, Harvey RJ, Harvey K, Volkmer H (2011) The cell adhesion molecule neurofascin stabilizes axo-axonic GABAergic terminals at the axon initial segment. J Biol Chem 286:24385-24393.

*both authors contributed equally

7.2 Kongressbeiträge

Volkmer, H., Kriebel, M., **Metzger, J.** and Trinks, S. Cell adhesion molecule neurofascin in synaptic plasticity. First Annual Conference of COST Action ECMNET Brain Extracellular Matrix in Health and Disease, Loano, Italy, May 2011.

Metzger, J., Kriebel, M., Trinks, S., Volkmer, H., Effects of neurofascin on the scaffolding protein gephyrin at inhibitory synapses, Poster T7-12A, 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, March 2011.

Trinks, S., Kriebel, M., **Metzger, J.**, Volkmer, H., Role of neurofascin in inhibitory synapse organization at the axon initial segment, Poster T7-3C, 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, March 2011.

Metzger, J., Kriebel, M., Trinks, S., Chugh, D., Kirschbaum, K., Volkmer, H., Impact of neurofascin on the clustering of gephyrin and collybistin *in vitro*, FENS Abstr. vol 5, 161.19, 7th Forum of European Neuroscience, Amsterdam, July 2010.

Volkmer, H., Kriebel, M., Kirschbaum, K., **Metzger, J.** and Trinks, S. FGFR-neurofascin interactions regulate neurite outgrowth and postsynaptic stabilisation. Gordon Research Conferences, Fibroblast Growth Factors In Development & Disease, Ventura CA, March 2010.

8 Referenzen

- (1997) Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. *Cell* 90:403-404.
- Akaneya Y, Sohya K, Kitamura A, Kimura F, Washburn C, Zhou R, Ninan I, Tsumoto T, Ziff EB (2010) Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development. *PLoS One* 5:e12486.
- 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* 18:2423-2436.
- Aranda S, Alvarez M, Turro S, Laguna A, de la Luna S (2008) Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. *Mol Cell Biol* 28:5899-5911.
- Baki L, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzman A, Gama-Sosa M, Neve R, Robakis NK (2004) PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J* 23:2586-2596.
- Bao S, Chen L, Qiao X, Thompson RF (1999) Transgenic brain-derived neurotrophic factor modulates a developing cerebellar inhibitory synapse. *Learn Mem* 6:276-283.
- Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53:719-734.
- Bausen M, Weltzien F, Betz H, O'Sullivan GA (2010) Regulation of postsynaptic gephyrin cluster size by protein phosphatase 1. *Mol Cell Neurosci* 44:201-209.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG (2009) Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:327-347.
- Bi C, Yue X, Zhou R, Plummer MR (2011) EphA activation overrides the presynaptic actions of BDNF. *Journal of neurophysiology* 105:2364-2374.
- Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Sudhof TC (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297:1525-1531.
- Borden LA (1996) GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochemistry international* 29:335-356.
- Bortolotto ZA, Bashir ZI, Davies CH, Collingridge GL (1994) A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation. *Nature* 368:740-743.
- Boutros M, Ahringer J (2008) The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nature reviews Genetics* 9:554-566.
- Brose N, O'Connor V, Skehel P (2010) Synaptopathy: dysfunction of synaptic function? *Biochem Soc Trans* 38:443-444.
- Brunig 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* 13:1320-1328.
- Buchser WJ, Slepak TI, Gutierrez-Arenas O, Bixby JL, Lemmon VP (2010) Kinase/phosphatase overexpression reveals pathways regulating hippocampal neuron morphology. *Molecular systems biology* 6:391.
- Burdick KE, DeRosse P, Kane JM, Lencz T, Malhotra AK (2010) Association of genetic variation in the MET proto-oncogene with schizophrenia and general cognitive ability. *The American journal of psychiatry* 167:436-443.
- Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho RF, Carvalho AL, Duarte CB (2007) BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 35:208-219.

- Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA, Moreau J, Bonneil E, Thibault P, Fingar DC, Roux PP (2011) ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem* 286:567-577.
- Chandramouli S, Yu CY, Yusoff P, Lao DH, Leong HF, Mizuno K, Guy GR (2008) Tek1 interacts with Spry2 to abrogate its inhibition of ERK phosphorylation downstream of receptor tyrosine kinase signaling. *J Biol Chem* 283:1679-1691.
- Chao MV, Rajagopal R, Lee FS (2006) Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 110:167-173.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci* 18:9733-9750.
- Chen AI, Nguyen CN, Copenhagen DR, Badurek S, Minichiello L, Ranscht B, Reichardt LF (2011) TrkB (tropomyosin-related kinase B) controls the assembly and maintenance of GABAergic synapses in the cerebellar cortex. *J Neurosci* 31:2769-2780.
- Chen L, El-Husseini A, Tomita S, Brecht DS, Nicoll RA (2003) Stargazin differentially controls the trafficking of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate and kainate receptors. *Mol Pharmacol* 64:703-706.
- Chen ZW, Olsen RW (2007) GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. *J Neurochem* 100:279-294.
- Ciossek T, Ullrich A, West E, Rogers JH (1999) Segregation of the receptor EphA7 from its tyrosine kinase-negative isoform on neurons in adult mouse brain. *Brain research Molecular brain research* 74:231-236.
- Correia CT, Coutinho AM, Sequeira AF, Sousa IG, Lourenco Venda L, Almeida JP, Abreu RL, Lobo C, Miguel TS, Conroy J, Cochrane L, Gallagher L, Gill M, Ennis S, Oliveira GG, Vicente AM (2010) Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *Genes, brain, and behavior* 9:841-848.
- Craig AM, Graf ER, Linhoff MW (2006) How to build a central synapse: clues from cell culture. *Trends Neurosci* 29:8-20.
- Crozier RA, Bi C, Han YR, Plummer MR (2008) BDNF modulation of NMDA receptors is activity dependent. *Journal of neurophysiology* 100:3264-3274.
- Cunha C, Brambilla R, Thomas KL (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in molecular neuroscience* 3:1.
- Dabrowski A, Umemori H (2011) Orchestrating the synaptic network by tyrosine phosphorylation signalling. *Journal of biochemistry* 149:641-653.
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103:945-956.
- Davis JQ, Lambert S, Bennett V (1996) Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *The Journal of cell biology* 135:1355-1367.
- Davis S, Gale NW, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Lhotak V, Pawson T, Goldfarb M, Yancopoulos GD (1994) Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266:816-819.

- Eaton BA, Davis GW (2003) Synapse disassembly. *Genes & development* 17:2075-2082.
- Ehninger D, Silva AJ (2011) Rapamycin for treating Tuberous sclerosis and Autism spectrum disorders. *Trends Mol Med* 17:78-87.
- 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* 24:2380-2393.
- Eric R. Kandel JHS, Thomas M. Jessell (2000) *Principles of neural science*: McGraw-Hill Companies.
- Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, Sabanay H, Sarig-Nadir O, Spiegel I, Bermingham JR, Jr., Peles E (2005) Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron* 47:215-229.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B (1998) Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1:563-571.
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 16:139-149.
- Fallon JR (2000) Building inhibitory synapses: exchange factors getting into the act? [comment]. *Nat Neurosci* 3:5-6.
- Fayard B, Loeffler S, Weis J, Vogelien E, Kruttgen A (2005) The secreted brain-derived neurotrophic factor precursor pro-BDNF binds to TrkB and p75NTR but not to TrkA or TrkC. *Journal of neuroscience research* 80:18-28.
- Flanagan JG, Vanderhaeghen P (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annual review of neuroscience* 21:309-345.
- Flores CE, Nannapaneni S, Davidson KG, Yasumura T, Bennett MV, Rash JE, Pereda AE (2012) Trafficking of gap junction channels at a vertebrate electrical synapse in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E573-582.
- Fobian K, Owczarek S, Budtz C, Bock E, Berezin V, Pedersen MV (2010) Peptides derived from the solvent-exposed loops 3 and 4 of BDNF bind TrkB and p75(NTR) receptors and stimulate neurite outgrowth and survival. *Journal of neuroscience research* 88:1170-1181.
- Fritschy JM, Harvey RJ, Schwarz G (2008) Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends Neurosci* 31:257-264.
- Fritschy JM, Schweizer C, Brunig I, Luscher B (2003) Pre- and post-synaptic mechanisms regulating the clustering of type A gamma-aminobutyric acid receptors (GABAA receptors). *Biochem Soc Trans* 31:889-892.
- Gallagher M, Chiba AA (1996) The amygdala and emotion. *Curr Opin Neurobiol* 6:221-227.
- Gaughran F, Payne J, Sedgwick PM, Cotter D, Berry M (2006) Hippocampal FGF-2 and FGFR1 mRNA expression in major depression, schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Res Bull* 70:221-227.
- Giachello CN, Fiumara F, Giacomini C, Corradi A, Milanese C, Ghirardi M, Benfenati F, Montarolo PG (2010) MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity. *J Cell Sci* 123:881-893.
- 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* 23:8330-8339.
- Goda Y, Davis GW (2003) Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 40:243-264.

- Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119:1013-1026.
- Gray EG (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *Journal of anatomy* 93:420-433.
- Gross I, Armant O, Benosman S, de Aguilar JL, Freund JN, Kedinger M, Licht JD, Gaiddon C, Loeffler JP (2007) Sprouty2 inhibits BDNF-induced signaling and modulates neuronal differentiation and survival. *Cell Death Differ* 14:1802-1812.
- Gu C, Park S (2003) The p110 gamma PI-3 kinase is required for EphA8-stimulated cell migration. *FEBS Lett* 540:65-70.
- Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E (2002) Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nature cell biology* 4:850-858.
- Harrison PJ (2004) The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology* 174:151-162.
- 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* 24:5816-5826.
- Harvey Lodish AB, Paul Matsudaira (2004) *Molecular cell biology*: Palgrave Macmillan.
- Hausott B, Vallant N, Schlick B, Auer M, Nimmervoll B, Obermair GJ, Schwarzer C, Dai F, Brand-Saberi B, Klimaschewski L (2012) Sprouty2 and -4 regulate axon outgrowth by hippocampal neurons. *Hippocampus* 22:434-441.
- He XL, Garcia KC (2004) Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304:870-875.
- Hedstrom KL, Xu X, Ogawa Y, Frischknecht R, Seidenbecher CI, Shrager P, Rasband MN (2007) Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *The Journal of cell biology* 178:875-886.
- Holmberg J, Clarke DL, Frisen J (2000) Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 408:203-206.
- Hu X, Ballo L, Pietila L, Viesselmann C, Ballweg J, Lumbard D, Stevenson M, Merriam E, Dent EW (2011) BDNF-induced increase of PSD-95 in dendritic spines requires dynamic microtubule invasions. *J Neurosci* 31:15597-15603.
- Huang ZJ, Scheiffele P (2008) GABA and neuroligin signaling: linking synaptic activity and adhesion in inhibitory synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 18:77-83.
- Hutson TH, Buchser WJ, Bixby JL, Lemmon VP, Moon LD (2011) Optimization of a 96-Well Electroporation Assay for Postnatal Rat CNS Neurons Suitable for Cost-Effective Medium-Throughput Screening of Genes that Promote Neurite Outgrowth. *Frontiers in molecular neuroscience* 4:55.
- Hyman SE (2005) Neurotransmitters. *Current biology* : CB 15:R154-158.
- Irie F, Yamaguchi Y (2004) EPHB receptor signaling in dendritic spine development. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9:1365-1373.
- Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, Saliba RS, Kittler JT, Haydon PG, Moss SJ (2005) Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors. *J Neurosci* 25:10469-10478.
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 9:331-343.

- Jarrard LE (1993) On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and neural biology* 60:9-26.
- Ji Y, Pang PT, Feng L, Lu B (2005) Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 8:164-172.
- Jimenez C, Portela RA, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Collard J, Serrano A, Martinez AC, Avila J, Carrera AC (2000) Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *The Journal of cell biology* 151:249-262.
- Jin I, Kandel ER, Hawkins RD (2011) Whereas short-term facilitation is presynaptic, intermediate-term facilitation involves both presynaptic and postsynaptic protein kinases and protein synthesis. *Learn Mem* 18:96-102.
- Jungerius BJ, Hoogendoorn ML, Bakker SC, Van't Slot R, Bardoel AF, Ophoff RA, Wijmenga C, Kahn RS, Sinke RJ (2008) An association screen of myelin-related genes implicates the chromosome 22q11 PIK4CA gene in schizophrenia. *Molecular psychiatry* 13:1060-1068.
- Karra D, Dahm R (2010) Transfection techniques for neuronal cells. *J Neurosci* 30:6171-6177.
- Kayser MS, McClelland AC, Hughes EG, Dalva MB (2006) Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors. *J Neurosci* 26:12152-12164.
- Khanna R, Zougman A, Stanley EF (2007) A proteomic screen for presynaptic terminal N-type calcium channel (CaV2.2) binding partners. *Journal of biochemistry and molecular biology* 40:302-314.
- Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:771-781.
- Kins S, Betz H, Kirsch J (2000) Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat Neurosci* 3:22-29.
- 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.
- Kirschbaum K, Kriebel M, Kranz EU, Potz O, Volkmer H (2009) Analysis of non-canonical fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) interaction reveals regulatory and activating domains of neurofascin. *J Biol Chem* 284:28533-28542.
- Klaus Aktories UF, Franz Hofmann, Klaus Starke (2005) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*: Elsevier: Urban & Fischer.
- Klein R (2009) Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling. *Nat Neurosci* 12:15-20.
- 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, Brandstatter JH, Laube B, Stahl S, Muller U, Betz H (1999) Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* 19:9289-9297.
- Kneussel M, Haverkamp S, Fuhrmann JC, Wang H, Wassle H, Olsen RW, Betz H (2000) The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated

- protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8594-8599.
- Kono SA, Marshall ME, Ware KE, Heasley LE (2009) The fibroblast growth factor receptor signaling pathway as a mediator of intrinsic resistance to EGFR-specific tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 12:95-102.
- 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.
- Kriebel M, Metzger J, Trinks S, Chugh D, Harvey RJ, Harvey K, Volkmer H (2011) The cell adhesion molecule neurofascin stabilizes axo-axonic GABAergic terminals at the axon initial segment. *J Biol Chem* 286:24385-24393.
- Kriebel M, Wuchter J, Trinks S, Volkmer H (2012) Neurofascin: A switch between neuronal plasticity and stability. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44:694-697.
- Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY (2005) Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 25:11288-11299.
- Kyosseva SV, Elbein AD, Griffin WS, Mrak RE, Lyon M, Karson CN (1999) Mitogen-activated protein kinases in schizophrenia. *Biological psychiatry* 46:689-696.
- Lackmann M, Oates AC, Dottori M, Smith FM, Do C, Power M, Kravets L, Boyd AW (1998) Distinct subdomains of the EphA3 receptor mediate ligand binding and receptor dimerization. *J Biol Chem* 273:20228-20237.
- Lai KO, Ip NY (2009) Synapse development and plasticity: roles of ephrin/Eph receptor signaling. *Curr Opin Neurobiol* 19:275-283.
- Langosch D, Hoch W, Betz H (1992) The 93 kDa protein gephyrin and tubulin associated with the inhibitory glycine receptor are phosphorylated by an endogenous protein kinase. *FEBS Lett* 298:113-117.
- Lardi-Studler B, Fritschy JM (2007) Matching of pre- and postsynaptic specializations during synaptogenesis. *Neuroscientist* 13:115-126.
- Levi S, Logan SM, Tovar KR, Craig AM (2004) Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:207-217.
- Li YH, Werner H, Puschel AW (2008) Rheb and mTOR regulate neuronal polarity through Rap1B. *J Biol Chem* 283:33784-33792.
- Li Z, Tan F, Thiele CJ (2007) Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta contributes to brain-derived neurotrophic factor/TrkB-induced resistance to chemotherapy in neuroblastoma cells. *Molecular cancer therapeutics* 6:3113-3121.
- Linhoff MW, Lauren J, Cassidy RM, Dobie FA, Takahashi H, Nygaard HB, Airaksinen MS, Strittmatter SM, Craig AM (2009) An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. *Neuron* 61:734-749.
- Liu Q, Thoreen C, Wang J, Sabatini D, Gray NS (2009) mTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery. *Drug discovery today Therapeutic strategies* 6:47-55.
- Lu B (2003) BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 10:86-98.
- Lu W, Man H, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF, Wang YT (2001) Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 29:243-254.

- Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL (2011) GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70:385-409.
- Luscher B, Keller CA (2004) Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* 102:195-221.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862-866.
- Malpass K (2012) Motor neuron disease: Functional screening identifies novel candidate risk genes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews Neurology* 8:1.
- Marty S, Wehrle R, Sotelo C (2000) Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus. *J Neurosci* 20:8087-8095.
- Meier C, Anastasiadou S, Knoll B (2011) Ephrin-A5 suppresses neurotrophin evoked neuronal motility, ERK activation and gene expression. *PLoS One* 6:e26089.
- Miao H, Wei BR, Peehl DM, Li Q, Alexandrou T, Schelling JR, Rhim JS, Sedor JR, Burnett E, Wang B (2001) Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nature cell biology* 3:527-530.
- Morita T, Sobue K (2009) Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J Biol Chem* 284:27734-27745.
- Nakanishi H, Nakamura T, Canaani E, Croce CM (2007) ALL1 fusion proteins induce deregulation of EphA7 and ERK phosphorylation in human acute leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14442-14447.
- Nakanishi S (1994) Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 13:1031-1037.
- Nawrotzki R, Islinger M, Vogel I, Volkl A, Kirsch J (2012) Expression and subcellular distribution of gephyrin in non-neuronal tissues and cells. *Histochemistry and cell biology* 137:471-482.
- Nie D, Di Nardo A, Han JM, Baharanyi H, Kramvis I, Huynh T, Dabora S, Codeluppi S, Pandolfi PP, Pasquale EB, Sahin M (2010) Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance. *Nat Neurosci* 13:163-172.
- O'Sullivan GA, Hofer W, Betz H (2009) Inhibitory postsynaptic membrane specializations are formed in gephyrin-deficient mice. *Neurosci Lett* 458:106-110.
- Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC, Price PJ (2001) Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *Journal of neuroscience methods* 112:95-99.
- Pantakani DV, Czyzewska MM, Sikorska A, Bodda C, Mannan AU (2011) Oligomerization of ZFYVE27 (Protrudin) is necessary to promote neurite extension. *PLoS One* 6:e29584.
- Papadopoulos T, Eulenburg V, Reddy-Alla S, Mansuy IM, Li Y, Betz H (2008) Collybistin is required for both the formation and maintenance of GABAergic postsynapses in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 39:161-169.
- Papadopoulos T, Korte M, Eulenburg V, Kubota H, Retiounskaia M, Harvey RJ, Harvey K, O'Sullivan GA, Laube B, Hulsmann S, Geiger JR, Betz H (2007) Impaired GABAergic transmission and altered hippocampal synaptic plasticity in collybistin-deficient mice. *EMBO J* 26:3888-3899.
- Paradis S, Harrar DB, Lin Y, Koon AC, Hauser JL, Griffith EC, Zhu L, Brass LF, Chen C, Greenberg ME (2007) An RNAi-based approach identifies molecules

- required for glutamatergic and GABAergic synapse development. *Neuron* 53:217-232.
- Pasquale EB (1997) The Eph family of receptors. *Current opinion in cell biology* 9:608-615.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11:272-280.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22:153-183.
- Porcher C, Hatchett C, Longbottom RE, McAinch K, Sihra TS, Moss SJ, Thomson AM, Jovanovic JN (2011) Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. *J Biol Chem* 286:21667-21677.
- Poulopoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, Papadopoulos T, Zhang M, Paarmann I, Fuchs C, Harvey K, Jedlicka P, Schwarzacher SW, Betz H, Harvey RJ, Brose N, Zhang W, Varoqueaux F (2009) Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63:628-642.
- Purves D AG, Fitzpatrick D, et al., editors. (2001a) *Neuroscience*: Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Purves D AG, Fitzpatrick D, et al., editors. (2001b) *Neuroscience*: Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH (1993) Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3602-3606.
- Reddy-Alla S, Schmitt B, Birkenfeld J, Eulenburg V, Dutertre S, Bohringer C, Gotz M, Betz H, Papadopoulos T (2010) PH-domain-driven targeting of collybistin but not Cdc42 activation is required for synaptic gephyrin clustering. *Eur J Neurosci* 31:1173-1184.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564.
- Ruegg S, Baybis M, Juul H, Dichter M, Crino PB (2007) Effects of rapamycin on gene expression, morphology, and electrophysiological properties of rat hippocampal neurons. *Epilepsy research* 77:85-92.
- Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, Bahr BA, Kirsch J, Betz H, Snyder SH (1999) Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science* 284:1161-1164.
- Sahin M (2010) Eph receptor and mTOR pathway crosstalk: implications for cancer. *Cell Cycle* 9:2053-2054.
- Saiepour L, Fuchs C, Patrizi A, Sassoe-Pognetto M, Harvey RJ, Harvey K (2010) Complex role of collybistin and gephyrin in GABAA receptor clustering. *J Biol Chem* 285:29623-29631.
- Saiyed T, Paarmann I, Schmitt B, Haeger S, Sola M, Schmalzing G, Weissenhorn W, Betz H (2007) Molecular basis of gephyrin clustering at inhibitory synapses: role of G- and E-domain interactions. *J Biol Chem* 282:5625-5632.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22:159-168.

- 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.
- Sassoe-Pognetto M, Panzanelli P, Sieghart W, Fritschy JM (2000) Colocalization of multiple GABA(A) receptor subtypes with gephyrin at postsynaptic sites. *J Comp Neurol* 420:481-498.
- Schecterson LC, Bothwell M (2010) Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Dev Neurobiol* 70:332-338.
- Scheiffele P (2003) Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annual review of neuroscience* 26:485-508.
- Schneggenburger R, Neher E (2000) Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* 406:889-893.
- Schweizer C, Balsiger S, Bluethmann H, Mansuy IM, Fritschy JM, Mohler H, Luscher B (2003) The gamma 2 subunit of GABA(A) receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Mol Cell Neurosci* 24:442-450.
- Seil FJ (2003) TrkB receptor signaling and activity-dependent inhibitory synaptogenesis. *Histology and histopathology* 18:635-646.
- Seil FJ, Drake-Baumann R (2000) TrkB receptor ligands promote activity-dependent inhibitory synaptogenesis. *J Neurosci* 20:5367-5373.
- Shamah SM, Lin MZ, Goldberg JL, Estrach S, Sahin M, Hu L, Bazalakova M, Neve RL, Corfas G, Debant A, Greenberg ME (2001) EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105:233-244.
- Sheffler-Collins SI, Dalva MB (2012) EphBs: an integral link between synaptic function and synaptopathies. *Trends Neurosci*.
- Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, Armanini MP, Phillips HS, Carroll K, Spencer SD, Levinson AD (1995) Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci* 15:477-491.
- Soderling TR (1993) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: role in learning and memory. *Molecular and cellular biochemistry* 127-128:93-101.
- Stockwell BR (2002) Chemical genetic screening approaches to neurobiology. *Neuron* 36:559-562.
- Sun C, Sieghart W, Kapur J (2004) Distribution of alpha1, alpha4, gamma2, and delta subunits of GABAA receptors in hippocampal granule cells. *Brain research* 1029:207-216.
- Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Nikonenko AG, Schachner M (2006) NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex. *The Journal of cell biology* 174:1071-1085.
- Tao-Cheng JH, Zhou FC (1999) Differential polarization of serotonin transporters in axons versus soma-dendrites: an immunogold electron microscopy study. *Neuroscience* 94:821-830.
- Thomson AM, Jovanovic JN (2010) Mechanisms underlying synapse-specific clustering of GABA(A) receptors. *Eur J Neurosci* 31:2193-2203.
- Thoreen CC, Sabatini DM (2009) Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy* 5:725-726.
- 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.
- Torii M, Levitt P (2005) Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism. *Neuron* 48:563-575.

- Toshima J, Toshima JY, Suzuki M, Noda T, Mizuno K (2001) Cell-type-specific expression of a TESK1 promoter-linked lacZ gene in transgenic mice. *Biochemical and biophysical research communications* 286:566-573.
- Tretter V, Jacob TC, Mukherjee J, Fritschy JM, Pangalos MN, Moss SJ (2008) The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *J Neurosci* 28:1356-1365.
- Tretter V, Kerschner B, Milenkovic I, Ramsden SL, Ramerstorfer J, Saiepour L, Maric HM, Moss SJ, Schindelin H, Harvey RJ, Sieghart W, Harvey K (2011) Molecular basis of the gamma-aminobutyric acid A receptor alpha3 subunit interaction with the clustering protein gephyrin. *J Biol Chem* 286:37702-37711.
- Turrigiano GG (1999) Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci* 22:221-227.
- Tyagarajan SK, Fritschy JM (2010) GABA(A) receptors, gephyrin and homeostatic synaptic plasticity. *J Physiol* 588:101-106.
- Tyagarajan SK, Ghosh H, Harvey K, Fritschy JM (2011a) Collybistin splice variants differentially interact with gephyrin and Cdc42 to regulate gephyrin clustering at GABAergic synapses. *J Cell Sci* 124:2786-2796.
- Tyagarajan SK, Ghosh H, Yevenes GE, Nikonenko I, Ebeling C, Schwerdel C, Sidler C, Zeilhofer HU, Gerrits B, Muller D, Fritschy JM (2011b) Regulation of GABAergic synapse formation and plasticity by GSK3beta-dependent phosphorylation of gephyrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:379-384.
- Wang Q, Liu L, Pei L, Ju W, Ahmadian G, Lu J, Wang Y, Liu F, Wang YT (2003) Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron* 38:915-928.
- Wong EV, Kerner JA, Jay DG (2004) Convergent and divergent signaling mechanisms of growth cone collapse by ephrinA5 and slit2. *Journal of neurobiology* 59:66-81.
- Wu H, Jin Y, Buddhala C, Osterhaus G, Cohen E, Jin H, Wei J, Davis K, Obata K, Wu JY (2007) Role of glutamate decarboxylase (GAD) isoform, GAD65, in GABA synthesis and transport into synaptic vesicles-Evidence from GAD65-knockout mice studies. *Brain research* 1154:80-83.
- Wu J, Rowan MJ, Anwyl R (2006) Long-term potentiation is mediated by multiple kinase cascades involving CaMKII or either PKA or p42/44 MAPK in the adult rat dentate gyrus in vitro. *Journal of neurophysiology* 95:3519-3527.
- Xu W (2011) PSD-95-like membrane associated guanylate kinases (PSD-MAGUKs) and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21:306-312.
- Yeyeodu ST, Witherspoon SM, Gilyazova N, Ibeanu GC (2010) A rapid, inexpensive high throughput screen method for neurite outgrowth. *Current chemical genomics* 4:74-83.
- Yoshii A, Constantine-Paton M (2007) BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation. *Nat Neurosci* 10:702-711.
- Yoshii A, Constantine-Paton M (2010) Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol* 70:304-322.
- Yu W, Jiang M, Miralles CP, Li RW, Chen G, de Blas AL (2007) Gephyrin clustering is required for the stability of GABAergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 36:484-500.
- Yue Y, Chen ZY, Gale NW, Blair-Flynn J, Hu TJ, Yue X, Cooper M, Crockett DP, Yancopoulos GD, Tessarollo L, Zhou R (2002) Mistargeting hippocampal axons by expression of a truncated Eph receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10777-10782.

- Zadran S, Jourdi H, Rostamiani K, Qin Q, Bi X, Baudry M (2010) Brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor activate neuronal m-calpain via mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation. *J Neurosci* 30:1086-1095.
- Zonta B, Desmazieres A, Rinaldi A, Tait S, Sherman DL, Nolan MF, Brophy PJ (2011) A critical role for Neurofascin in regulating action potential initiation through maintenance of the axon initial segment. *Neuron* 69:945-956.
- Zonta B, Tait S, Melrose S, Anderson H, Harroch S, Higginson J, Sherman DL, Brophy PJ (2008) Glial and neuronal isoforms of Neurofascin have distinct roles in the assembly of nodes of Ranvier in the central nervous system. *The Journal of cell biology* 181:1169-1177.