

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Oliver Schlicker
aus Neunkirchen

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Thema

**Untersuchungen zum differentiellen Transport
der α_1 - und α_2 -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors
und zur TNT-vermittelten interzellulären Kommunikation
zwischen Astrozyten und Neuronen**

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Hermann Gerdes
Prof. Dr. Klaus Unsicker

Für meine Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>I</u>
<u>2</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>3</u>
<u>3</u>	<u>„SUMMARY“</u>	<u>3</u>
<u>4</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>3</u>
4.1	NEURONALE SIGNALÜBERTRAGUNG	3
4.2	SIGNALWEITERLEITUNG ZWISCHEN NEURONEN	3
4.3	CHEMISCHE SYNAPSEN	3
4.4	GABA _A -REZEPTOREN	3
4.5	UNTEREINHEITENZUSAMMENSETZUNG SYNAPTISCHER UND EXTRASYNAPTISCHER GABA _A -REZEPTOREN	3
4.6	STRUKTURELLE EIGENSCHAFTEN VON GABA _A -REZEPTOREN	3
4.7	LOKALISIERUNG VON GABA _A -REZEPTOREN IN ABHÄNGIGKEIT VON IHRER UNTEREINHEITENZUSAMMENSETZUNG	3
4.8	VERANKERUNG DER GABA _A -REZEPTOREN AN DIE POSTSYNAPSEN	3
4.9	DIE „POSTSYNAPTIC DENSITY“ (PSD)	3
4.10	PROTEINE UND SIGNALMECHANISMEN ZUR REGULIERUNG DER EXPRESSION VON GABA _A -REZEPTOREN	3
4.11	WEITERE INTERZELLULÄRE KOMMUNIKATIONSWEGE	3
4.11.1	„GAP JUNCTIONS“	3
4.11.2	„TUNNELING NANOTUBES“ (TNTs)	3
4.12	ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	3
<u>5</u>	<u>MATERIAL</u>	<u>3</u>
5.1	PLASTIKWAREN	3
5.2	CHEMIKALIEN	3
5.3	ENZYME	3
5.3.1	PROTEASEN	3
5.4	PLASMIDE	3
5.5	BAKTERIENSTÄMME	3
5.6	EUKARYOTISCHE ZELLINIEN UND PRIMÄRKULTUREN	3
5.7	ANTIKÖRPER	3
5.8	FILME	3
5.9	<i>IN VIVO</i> FARBSTOFFE	3
5.10	ZYTOSKELETTGIFTE	3
5.11	GERÄTE	3
5.12	PUFFER, MEDIEN UND STAMMLÖSUNGEN	3
5.13	SOFTWARE	3

6	<u>METHODEN</u>	3
6.1	MOLEKULARBIOLOGIE	3
6.1.1	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN FÜR DIE TRANSFORMATION	3
6.1.2	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	3
6.1.3	PRÄPARATION VON NUKLEINSÄUREN	3
6.1.4	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	3
6.1.5	MUTAGENESE NACH KUNKEL ET AL.	3
6.1.6	MEGA-PRIMER MUTAGENESE	3
6.2	ZELLBIOLOGIE	3
6.2.1	KULTIVIERUNG VON PC12-ZELLEN	3
6.2.2	EINFRIEREN VON PC12-ZELLEN	3
6.2.3	KULTIVIERUNG VON HEK293-ZELLEN	3
6.2.4	EINFRIEREN VON HEK293-ZELLEN	3
6.2.5	KULTIVIERUNG VON NRK-ZELLEN	3
6.2.6	EINFRIEREN VON NRK-ZELLEN	3
6.2.7	TRANSFEKTION VON HEK293-ZELLEN	3
6.2.8	PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG HIPPOKAMPALER NEURONE	3
6.2.9	PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG PRIMÄRER ASTROZYTEN AUS E18-RATTENEMBRYONEN	3
6.2.10	TRANSFEKTION VON HIPPOKAMPALEN NEURONEN	3
6.2.11	ELEKTROPHYSIOLOGIE	3
6.2.12	STANDARD-IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	3
6.2.13	OBERFLÄCHENIMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	3
6.2.14	ENTWÄSSERN UND FIXIEREN VON ZELLEN FÜR REM-AUFNAHMEN	3
6.2.15	KRITISCH-PUNKT-TROCKNUNG UND KOHLENSTOFFBEDAMPFUNG DER PROBEN FÜR REM-AUFNAHMEN (IN KOLLABORATION MIT PROF. DR. SPATZ (PHYSIKALISCHE CHEMIE, HEIDELBERG))	3
6.2.16	CELLTRACKER™GREEN/DiD-FÄRBUNG VON ZELLEN FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE:	3
6.2.17	HERSTELLUNG MIKROSTRUKTURIERTER OBERFLÄCHEN ZUR KULTIVIERUNG VON ASTROZYTEN UND HIPPOKAMPALER NEURONE	3
6.2.18	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)	3
6.2.19	LEBEND-ZELL-FÄRBUNG NEURONALER ZELLEN FÜR DIE MIKROSKOPISCHE ANALYSE VON TNTs	3
6.3	BIOCHEMIE	3
6.3.1	LUBROL®-EXTRAKTION VON GABA _A -REZEPTOREN AUS TRANSIENT TRANSFIZIERTEN HEK293-ZELLEN	3
6.3.2	METHANOL-CHLOROFORM-FÄLLUNG VON PROTEINEN NACH WESSEL / FLÜGGE	3
6.3.3	SDS-POLYAKRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	3
6.3.4	WESTERN-BLOT (NASSVERFAHREN)	3
7	<u>ERGEBNISSTEIL 1: UNTERSUCHUNGEN ZUM TRANSPORT DER GABA_A-REZEPTOR-UNTEREINHEITEN α_1 UND α_2</u>	3
7.1	C-TERMINALE FUSION DER GABA_A-REZEPTOR UNTEREINHEITEN α_1 UND α_2 MIT GFP-SPEKTRALMUTANTEN	3

7.1.1	ANALYSE DER FLUORESCENZEIGENSCHAFTEN VON C-TERMINAL MARKIERTEN UNTEREINHEITEN MIT KURZEN ABSTAND ZWISCHEN GFP UND UNTEREINHEIT	3
7.1.2	ANALYSE DER FLUORESCENZEIGENSCHAFTEN VON C-TERMINAL MARKIERTEN UNTEREINHEITEN MIT GROSSEM ABSTAND ZWISCHEN GFP UND UNTEREINHEIT	3
7.2	N-TERMINALE FUSION VON GFP-SPEKTRALMUTANTEN MIT α_1- UND α_2-UNTEREINHEITEN	3
7.2.1	ANALYSE DER TRANSPORTEIGENSCHAFTEN VON N-TERMINAL MARKIERTEN GABA _A -REZEPTOR-UNTEREINHEITEN	3
7.2.2	INSERTION IMMUNOREAKTIVER EPITOPE (<i>CMYC</i> UND <i>HA</i>) BEI N-TERMINAL GFP-MARKIERTEN GABA _A -REZEPTOR-UNTEREINHEITEN	3
7.2.3	ANALYSE VON N-TERMINAL MARKIERTEN α_1 - UND α_2 -UNTEREINHEITEN DES GABA _A -REZEPTORS IN KULTIVIERTEN HIPPOKAMPALEN NEURONEN	3
7.2.4	ANALYSE DER PENTAMERISIERUNGSEIGENSCHAFTEN DER GFP-FUSIONSPROTEINE	3
7.2.5	CHARAKTERISIERUNG DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN FUNKTIONALITÄT DER GFP-FUSIONSPROTEINE	3
7.2.6	ANALYSE DER TRANSPORTEIGENSCHAFTEN DER GFP-FUSIONSPROTEINE IN HIPPOKAMPALEN NEURONEN	3
7.2.7	ANALYSE DER FUNKTIONALITÄT VON ZUSÄTZLICH INTEGRIERTEN PROTEASESCHNITTSTELLEN	3
7.2.8	BIDIREKTIONALER TRANSPORT VON GABA _A -REZEPTORCHIMÄREN IN HIPPOKAMPALEN NEURONEN	3
7.2.9	MOBILITÄT VON GABA _A -REZEPTOR-„CLUSTERN“ UND TRANSPORTVESIKELN	3
7.2.10	ZEITLICH ABHÄNGIGE „CLUSTERBILDUNG“ DER GABA _A -REZEPTOR-UNTEREINHEITEN α_1 UND α_2 IN DIFFERENZIERENDEN NEURONEN	3
8	<u>ERGEBNISSTEIL 2: TNT-VERMITTELT INTERZELLULÄRER MEMBRANTRANSFER ZWISCHEN ASTROZYTEN UND NEURONEN</u>	3
8.1	TNTS IN KULTUREN NEURONALER ZELLEN	3
8.2	TNTS: VORLÄUFER NEURONALER AUSLÄUFER?	3
8.3	ANALYSE DES INTERZELLULÄREN AUSTAUSCHS VON MEMBRANKONTAINERN ZWISCHEN ASTROZYTEN UND NEURONEN	3
8.4	QUANTITATIVE ANALYSE DES INTERZELLULÄREN MEMBRANTRANSFERS UNTER DEM EINFLUSS VON ZYTOSKELETTGIFTEN	3
8.5	UNTERSUCHUNGEN DES INTERZELLULÄREN MEMBRANTRANSFERS ZWISCHEN ASTROZYTEN UND NEURONEN MITTELS FACS	3
8.6	ANALYSE DER ENDOZYTOSEGESCHWINDIGKEIT VON PLASMAMEMBRANEN IN GEGENWART VON PHALLOIDIN BEI NRK-ZELLEN	3
8.7	ANWENDUNG NANOSTRUKTURIERTER OBERFLÄCHEN ZUR ANALYSE VON TNTS IN KOKULTUREN VON ASTROZYTEN UND NEURONEN	3
8.7.1	OPTIMIERUNG DER SELEKTIVEN ADHÄSION NEURONALER ZELLEN DURCH VARIATION DES DURCHMESSERS DER GOLDFLÄCHEN	3
8.7.2	OPTIMIERUNG DER SELEKTIVEN ADHÄSION NEURONALER ZELLEN DURCH VERSCHIEDENE LIGANDEN	3
8.7.3	OPTIMIERUNG DER SELEKTIVEN ADHÄSION NEURONALER ZELLEN DURCH VARIATION DES ABSTANDES DER GOLDFLÄCHEN	3

8.7.4	OPTIMIERUNG DER SELEKTIVEN ADHÄSION NEURONALER ZELLEN DURCH VARIATION DER ZELLZAHL	3
8.7.5	ANALYSE NEURONALER ZELLEN AUF FUNKTIONALISIERTEN GOLDFLÄCHEN UND ANALYSE DER OPTIMALEN KULTIVIERUNGSDAUER	3
8.7.6	REM-ANALYSE VON TNTs ZWISCHEN NEURONALEN ZELLEN AUF FUNKTIONALISIERTEN OBERFLÄCHEN	3
8.7.7	ANALYSE LANGER TNT-ÄHNLICHER STRUKTUREN ZWISCHEN NEURONALEN ZELLEN AUF FUNKTIONALISIERTEN GOLDFLÄCHEN	3
9	<u>DISKUSSION</u>	3
9.1	UNTERSUCHUNGEN ZUM TRANSPORT UND ZUR DIFFERENTIELLEN VERTEILUNG DER GABA_A-REZEPTOR UNTEREINHEITEN α_1 UND α_2	3
9.1.1	EXPRESSION UND TRANSPORT VON α_1 - UND α_2 -FUSIONSPROTEINEN	3
9.1.2	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON GABA _A -REZEPTORCHIMÄREN	3
9.1.3	RÄUMLICHE UND ZEITLICHE VERTEILUNGSMUSTER VON α_1 - UND α_2 -GFP-FUSIONSPROTEINEN	3
9.2	INTERZELLULÄRER MEMBRANTRANSFER ZWISCHEN ASTROZYTEN UND NEURONEN	3
9.2.1	TNT-ABHÄNGIGE KOMMUNIKATION ZWISCHEN ASTROZYTEN UND NEURONEN?	3
9.2.2	UNTERSUCHUNGEN ZUM TNT-ABHÄNGIGEN INTERZELLULÄREN MEMBRANTRANSFER	3
9.2.3	ANWENDUNG VON MIKROSTRUKTURIERTEN OBERFLÄCHEN ZUR ANALYSE VON TNT-VERBINDUNGEN	3
9.2.4	VOR- UND NACHTEILE MIKROSTRUKTURIERTER OBERFLÄCHEN	3
10	<u>PUBLIKATIONEN</u>	3
11	<u>LITERATUR</u>	3
12	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	3
13	<u>DANKSAGUNG</u>	3
14	<u>ANHANG</u>	3
14.1	KLONIERUNGSSTRATEGIEN UND SEQUENZANALYSEN (AUF CD; ORDNER: ANHANG, ANHANG.PDF)	3
14.2	ORIGINALVEKTOREN	3
14.2.1	pRK5 / GABA _A - α_1	3
14.2.2	pRK7 / GABA _A - α_2	3
14.2.3	pECFP-N1	3
14.2.4	pEYFP-N1	3
14.2.5	pCDNA3.1/MYC-HIS A(+)	3
14.3	AMINOSÄUREN	3

2 Zusammenfassung

GABA_A-Rezeptoren sind pentamere Neurotransmitterrezeptoren, die in ihrer Untereinheitenzusammensetzung stark variieren können. Verschiedene Rezeptor-Subtypen zeigen dabei eine differentielle Verteilung an der somato-dendritischen Membran hippokampaler Neurone. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der differentielle Transport der Untereinheiten α_1 und α_2 des GABA_A-Rezeptors in hippokampalen Neuronen untersucht. Hierzu wurden die Untereinheiten entweder C- oder N-terminal mit GFP-Varianten mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften markiert, um eine simultane mikroskopische Untersuchung *in vivo* zu ermöglichen. Mit Hilfe sensitiver Oberflächenimmunfluoreszenzfärbungen sowie über die GFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine konnten die Rezeptorchimären sowohl in kultivierten Zelllinien, als auch in hippokampalen Neuronen an der Plasmamembran detektiert werden - ein Hinweis auf ihren effizienten Transport. Mittels Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation konnte zudem gezeigt werden, dass die Fusionsproteine in Gegenwart der Untereinheiten β_2 und γ_2 zu pentameren Rezeptoren oligomerisieren können. Elektrophysiologische Analysen der Rezeptorchimären zeigten, dass diese funktionelle, GABA-sensitive Chlorid-Kanäle ausbilden können. Die als funktionell charakterisierten Fusionsproteine wurden anschließend für mikroskopische *in vivo* Transportstudien in kultivierten, hippokampalen Neuronen verwendet. Diese Studien zeigten, dass α_1 - und α_2 -Rezeptorchimären an unterschiedlichen Bereichen der Plasmamembran „Cluster“ bilden. Während die „Cluster“ von α_1 -Rezeptor-Subtypen homogen verteilt, sowohl am Zellsoma, als auch an den Dendriten detektiert werden konnten, waren die „Cluster“ von α_2 -Rezeptor-Subtypen hauptsächlich im Bereich des Zellsomas zu finden. Neben der räumlich differentiellen Verteilung beider Untereinheiten, konnte auch eine vom Differenzierungsgrad der kultivierten Neurone abhängige Bildung von „Clustern“ beobachtet werden. Erste „Cluster“ der α_1 -Rezeptor-Subtypen waren bereits nach 5 Tagen zu erkennen, während „Cluster“ von α_2 -Rezeptor-Subtypen erst nach 8 Tagen nachweisbar waren. Mit Hilfe der generierten Fusionsproteine konnten in hippokampalen Neuronen neben „Rezeptorclustern“ auch Strukturen beobachtet werden, die aufgrund ihrer Bewegungseigenschaften auf Transportvesikel hindeuten. Diese wiesen im Gegensatz zu den immobilien „Clustern“ eine deutlich höhere Mobilität auf.

Während den Untersuchungen zum GABA_A-Rezeptor-Transport konnte beobachtet werden, dass hippokampale Neurone und in der Kultur verbliebene Astrozyten durch „tunneling nanotubes“ (TNTs) verbunden waren. Aus diesem Grund wurde ein weiteres Augenmerk auf den TNT-vermittelten, interzellulären Transfer membranöser Strukturen zwischen kultivierten Astrozyten und Neuronen gelegt. Dabei gelang es, den Austausch von kleinen Membranstrukturen zwischen den Zellen zu visualisieren und zu quantifizieren. Durch Applikation von Zytoskelettgiften konnten Hinweise auf einen F-Aktin-basierten Transfer der übertragenen Strukturen gefunden werden, wenngleich ein endgültiger Beweis für eine Beteiligung von TNTs so nicht zu erbringen war. Um den beobachteten Membrantransfer mit der Existenz von TNT-Strukturen zu korrelieren, wurde deshalb ein spezielles Zellkultivierungssystem - basierend auf mikrostrukturierten Oberflächen - entwickelt. Dieses System erleichterte die Visualisierung von TNT-ähnlichen Strukturen in den Kulturen dramatisch und könnte somit zukünftig eine Korrelation zwischen dem Auftreten von TNT-ähnlichen Strukturen und dem beobachteten Vesikeltransfer ermöglichen.

3 „Summary“

GABA_A receptors are pentameric neurotransmitter receptors, which show a strong variety in subunit composition. Different receptor subtypes show thereby a differential distribution at the somato-dendritic membrane of hippocampal neurons. Within the scope of this graduation the differential distribution of GABA_A receptor subunits α_1 and α_2 in hippocampal neurons was analysed. For this purpose the subunits were fused either at their C- or N-terminal end with GFP colour variants in order to perform a microscopic *in vivo* analysis of both subunits simultaneously. Employing sensitive surface immunofluorescence stainings and analysing the emitted GFP fluorescence of the fusion proteins, receptor chimeras could be detected at the plasma membrane of both, cultivated cell lines and hippocampal neurons - which is consistent with an efficient transport. Via sucrose density gradient centrifugation, it could be shown that in the presence of the wild-type subunits β_2 and γ_2 , fusion proteins were able to oligomerise into pentameric receptors. Electrophysiological analysis showed that the receptor chimeras could form functional, GABA sensitive chloride channels. As a consequence the functional fusion proteins were used for microscopic *in vivo* transportation studies in cultivated hippocampal neurons. It could be shown, that α_1 and α_2 receptor subtypes form clusters at different plasma membrane regions. While clusters of α_1 receptor subtypes were homogeneously distributed at the cell soma and at the dendritic membrane, clusters of α_2 receptor subtypes were distributed at the membrane of the cell soma only. In addition to the spatially differing distribution of both subunits, a time dependent formation of receptor clusters, correlated with the neuronal differentiation state, could be observed. Whereas clusters of α_1 receptor subtypes were recognized after 5 days, clusters of α_2 receptor subtypes were first detectable after 8 days. During the analysis of the generated fusion proteins, structures other than receptor clusters could be found in hippocampal neurons, indicative of transport vesicles. These structures exhibited a higher mobility rate compared to the immobile clusters.

During the analysis of GABA_A receptor transport, it could be observed that hippocampal neurons and astrocytes, which remained in the cell cultures, were connected via “tunnelling nanotubes” (TNTs). For this reason further attention was drawn to the TNT-mediated transfer of membranous structures between both cell-types. During these experiments it was achieved to monitor and to quantify the intercellular exchange of small membranous structures. Application of cytoskeleton toxins gave first indications towards an f-actin dependent transfer of transferred structures, even though the involvement of TNTs could not be finally adduced. To simplify the analysis of TNT-based membrane transfer between astrocytes and neurons, a specialised cell-cultivation system - based on microstructured surfaces - was developed. This system facilitated the visualisation of TNT-like structures between cells and could therefore enable to correlate the presence of TNT-like structures and the observed vesicular transfer in the near future.

4 Einleitung

4.1 Neuronale Signalübertragung

Jedes Neuron besteht aus einem Zellkörper, welcher den Kern enthält, und einer Anzahl von langen, dünnen Fortsätzen, die von ihm strahlenförmig nach außen führen (Abbildung 1). Typischerweise tritt ein langes Axon auf, das die Signale vom Zellkörper zu entfernten Zielzellen leitet, und eine Vielzahl mehrfach verzweigter Dendriten, die sich vom Zellkörper antennenartig ausbreiten (Abbildung 1). Durch sie wird die Oberfläche, die Signale von den Axonen anderer Neuronen aufnehmen kann vergrößert. Im Allgemeinen spaltet sich das Axon an seinem distalen Ende in viele Zweige auf, welche in einer Nervenendigung (Synapse) auslaufen (Levitan, 1994). Neurone besitzen häufig eine extrem langgestreckte Gestalt, um diesen Aufgaben gerecht zu werden. Beispielsweise die Motoneuronen des Menschen, die Signale vom Rückenmark zu einem Muskel im Fuß weiterleiten, können eine Länge von bis zu einem Meter erreichen (Levitan, 1994).

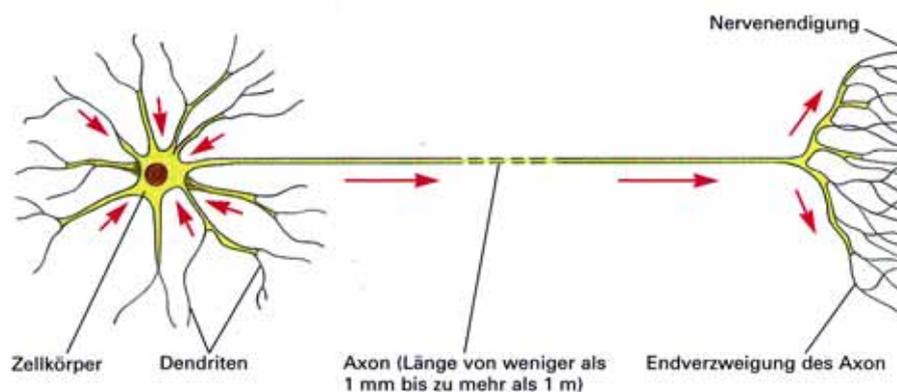


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Nervenzelle.

Rote Pfeile geben die Richtung der Reizweiterleitung an. (aus: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, (Alberts et al., 1999), modifiziert)

Bestandteil des Gehirns sind verschiedenste Arten von Neuronen, u.a. auch die für diese Arbeit interessanten GABAergen Neuronen. Die wichtigste Aufgabe eines Neurons besteht darin, Signale zu empfangen, weiterzuleiten und zu übertragen. Die Neurone leiten die Signale von den Sinnesorganen zum Zentralnervensystem. Dort wird die Information unter Beteiligung äußerst komplexer Netzwerke von einem zum nächsten Neuron weitergeleitet, um

die Signale, die von den Sinnesorganen kommen, zu analysieren, zu übersetzen und zu beantworten (Levitan, 1994).

4.2 Signalweiterleitung zwischen Neuronen

Bei dem Signal, welches ein Neuron weiterleitet, handelt es sich, unabhängig von seiner Bedeutung, immer um eine elektrische Potentialänderung über der Plasmamembran des Neurons. Eine Potentialänderung über die Membran wird durch den Ein- bzw. Ausstrom von Ionen durch die Membran ausgelöst (Hodgkin, 1964). Da die Plasmamembran normalerweise nicht für Ionen durchlässig ist, sind zum Ein- bzw. Ausstrom von Ionen Transportkanäle notwendig, die eine hohe Spezifität bezüglich der Ionen aufweisen. Die Kanäle werden in verschiedene Klassen unterteilt: *spannungs-* und *ligandengesteuerte Ionenkanäle*, sowie die "*Gap Junctions*" (Keynes, 1979; Armstrong, 1992).

Die *spannungsgesteuerten Ionenkanäle* kommen an der gesamten Oberfläche des Neurons vor. Die Öffnung oder der Verschluss eines solchen Kanals ist abhängig von dem Membranpotential in seiner Umgebung. Besonders häufig treten solche Kanäle an der Membran des Axons, wo z.B. Natrium- und Kalium-Kanäle für die Bildung von Aktionspotentialen verantwortlich sind (Aldrich, 1990; Catterall, 1992), auf. Des Weiteren kommen an den Synapsen, genauer an der präsynaptischen Membran, Kalzium-Kanäle vor, die für die Steuerung der Neurotransmitterausschüttung verantwortlich sind (siehe Abschnitt 4.3).

Eine weitere wichtige, wenn nicht sogar die wichtigste Klasse von gesteuerten Ionenkanälen, sind die *ligandengesteuerten Ionenkanäle*. Sie kommen ausschließlich an der postsynaptischen Membran vor, wo nach Bindung eines Neurotransmitters (z.B. γ -Aminobuttersäure (GABA)) der Ionenkanal geöffnet wird und somit Ionen durch die Membran strömen können. Dies führt schließlich zu einer Potentialänderung der postsynaptischen Membran (Thomas et al., 1992).

4.3 Chemische Synapsen

An chemischen Synapsen besteht kein direkter Kontakt der beiden Membranen von sendender und empfangender Zelle. Vielmehr sind die beiden Membranen durch einen engen Spalt, den synaptischen Spalt, getrennt. Die Membran an der das Signal ankommt, wird als präsynaptische Membran, und die Membran an die das Signal weitergeleitet wird, als postsynaptische Membran bezeichnet. Die generelle Funktionsweise chemischer Synapsen ist in Abbildung 2 und Abbildung 3 dargestellt.

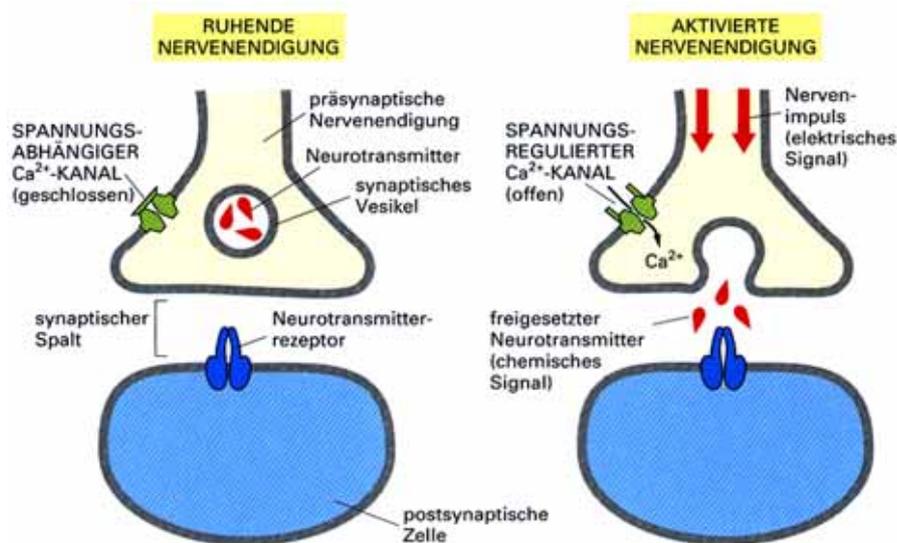


Abbildung 2: Reizweiterleitung an chemischen Synapsen
(aus: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, (Alberts et al., 1999), modifiziert)

Ein an der präsynaptischen Membran ankommendes Aktionspotential verursacht an dieser eine Potentialänderung, welche zu einer Konformationsänderung der dort befindlichen Kalzium-Kanäle führt (Abbildung 2) (Hodgkin, 1964). Durch diese Kanäle erfolgt ein Kalzium-Ionen-Einstrom, der die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran steuert (Abbildung 2) (O'Connor et al., 1994). Diese Vesikel geben ihren Inhalt, die Neurotransmitter, in den synaptischen Spalt ab. Die Neurotransmitter diffundieren an die postsynaptische Membran, wo sie, nach Bindung an die dort befindlichen Ligandengesteuerten Ionenkanäle, eine Öffnung des Ionenkanals und einen anschließenden Einstrom von Ionen durch die postsynaptische Membran bewirken (Abbildung 3). Die chemischen Synapsen werden unterteilt in *exzitatorische chemische Synapsen*, die eine Depolarisation der postsynaptischen Membran bewirken und *inhibitorische chemische Synapsen*, die eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran bewirken. An inhibitorischen Synapsen

führt die Bindung des Transmitters an den Liganden-gesteuerten Ionenkanal zu einem Einstrom von Chlorid-Ionen. In Folge dessen kommt es zu einer Absenkung des Membranpotentials der postsynaptischen Membran, was als Hyperpolarisation bezeichnet wird. Da ein Aktionspotential nur bei Überschreitung einer Potentialschwelle ausgelöst werden kann, aber inhibitorische chemische Synapsen eine Absenkung des Potentials verursachen, können somit Signale, welche die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotentials überschreiten würden, verhindert werden (Hodgkin, 1964).

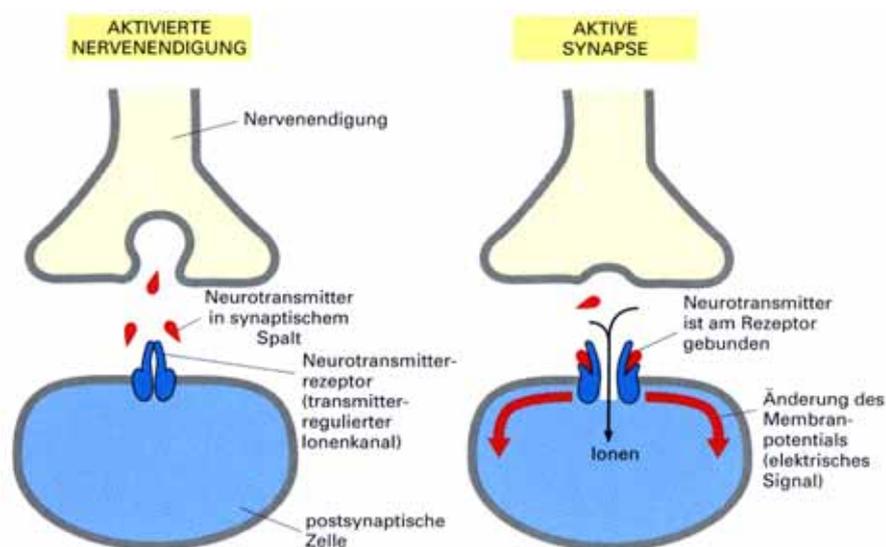


Abbildung 3: Reizweiterleitung an chemischen Synapsen
 (aus Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, (Alberts et al., 1999), modifiziert)

Typische Beispiele für Neurotransmitter von exzitatorischen Synapsen sind Acetylcholin und Glutamat, Beispiele für Neurotransmitter inhibitorischer chemischer Synapsen sind Glyzin und γ -Aminobuttersäure (GABA). An exzitatorischen chemischen Synapsen erfolgt nach Bindung des Transmitters an den Liganden-gesteuerten Ionenkanal meist ein Einstrom von Natrium-Ionen, was zu einer Anhebung des Membranpotentials der postsynaptischen Membran, der Depolarisation, führt. An inhibitorischen Synapsen hingegen erfolgt meist ein Einstrom von negativ geladenen Chlorid-Ionen, was zu einer Absenkung des Membranpotentials, einer Hyperpolarisation, führt.

4.4 GABA_A-Rezeptoren

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der abundanteste Transmitter des Zentralnervensystems der Säugetiere (Chebib et al., 1999). Er vermittelt die schnelle, hemmende, synaptische Aktivität durch Öffnung eines Chlorid-Kanals und den damit freigegebenen Einstrom von Chlorid-Ionen durch den GABA_A-Rezeptor. GABA_A-Rezeptoren sind pentamere Membranproteinkomplexe (Nayeem et al., 1994), von deren Untereinheiten momentan insgesamt 19 verschiedene Isoformen aus acht unterschiedlichen Klassen bekannt sind (α_1 - α_6 , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ρ_{1-3} , ϵ , π und θ) (Sieghart et al., 1999; Whiting, 1999). Alle weisen eine ähnliche Transmembrantopologie auf (Abbildung 4C), die eine große, extrazelluläre N-terminale Domäne, sowie vier Transmembrandomänen mit einer großen intrazellulären Schleife zwischen Transmembrandomäne 3 und 4 (TM3 und TM4, Abbildung 4B) beinhaltet (Lin et al., 1994).

4.5 Untereinheitenzusammensetzung synaptischer und extrasynaptischer GABA_A-Rezeptoren

Da GABA_A-Rezeptoren aus einer Reihe von homologen Untereinheiten zusammengesetzt werden können, ergibt sich ein großes Potential für die strukturelle Diversität der GABA_A-Rezeptoren (Lin et al., 1994). Zusätzliche strukturelle Komplexität erhalten die GABA_A-Rezeptoren durch alternatives Splicing der γ_2 -Untereinheit, die in einer kurzen (γ_2S) und einer langen Variante (γ_2L) existiert. Diese beiden Varianten unterscheiden sich durch 8 Aminosäuren in der zytoplasmatischen Schleife zwischen TM3 und TM4 (siehe dazu Abbildung 4). Die große Anzahl an Untereinheiten ermöglicht eine große Anzahl von pentameren GABA_A-Rezeptoren, die sich in vielfältiger Hinsicht unterscheiden. GABA_A-Rezeptoren mit differierender Untereinheitenzusammensetzung können sich in ihrer Affinität bezüglich diverser Agonisten, ihrer Kanaleigenschaften und ihrer Pharmakologie unterscheiden. Eine Koexpression von α - und β -Untereinheiten ist zwar ausreichend für eine Assemblierung der Rezeptoren an der Zelloberfläche, aber nur eine zusätzliche Expression von γ_{1-3} -, δ -, ϵ -, π - oder θ -Untereinheiten bewirkt, dass die GABA_A-Rezeptoren die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der nativen Rezeptoren besitzen (Whiting, 1999; Bowery et al., 2002). Ein Großteil der synaptischen GABA_A-Rezeptoren ist aus den Untereinheiten α , β und γ aufgebaut (Adkins et al., 2001), während

extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren anstelle der γ -Untereinheit eine δ -Untereinheit besitzen (Nusser et al., 1996b; Brickley et al., 1999).

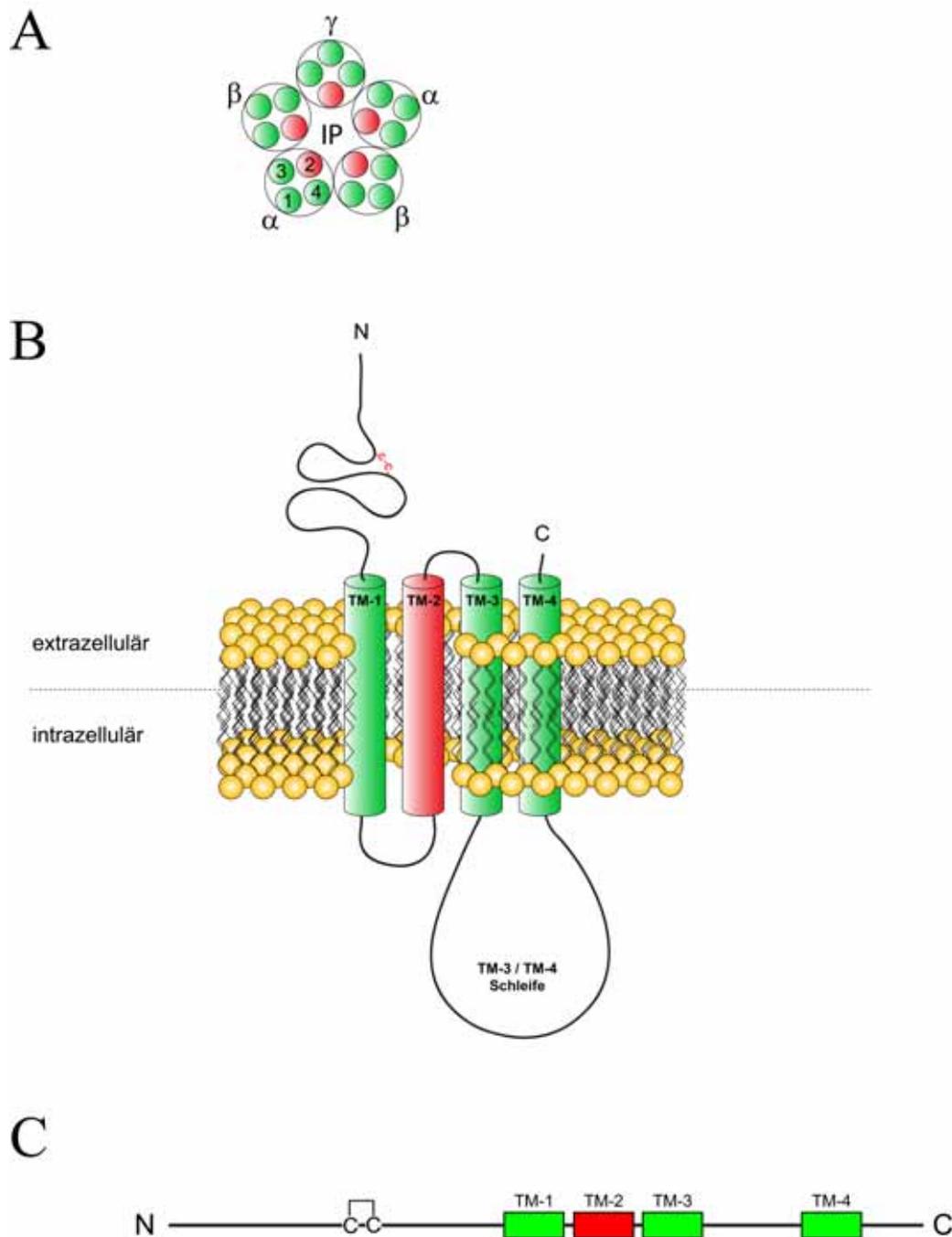


Abbildung 4: Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors. Bild (A) zeigt den GABA_A-Rezeptor als gesamten Multi-Proteinkomplex; Bild (B) zeigt die schematische Darstellung einer einzelnen α -Untereinheit und Bild (C) zeigt die schematische Darstellung der Domänenstruktur einer Untereinheit

In situ-Hybridisierungs-Experimente und immunzytochemische Studien lassen außerdem eine große zeitliche und räumliche Diversität der GABA_A-Rezeptor-Struktur im Gehirn vermuten, wobei verschiedene Neuronentypen viele unterschiedliche Rezeptor-Untereinheiten

exprimieren (Lin et al., 1994). Anatomische, sowie elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass sich GABA_A-Rezeptoren auf Dendriten, Zellkörpern und Axonen befinden (Baude et al., 1992; Pearce, 1993; Zhang et al., 1993; Vautrin et al., 1994) und eine differentielle Verteilung der α_1 und α_2 -Isoformen zu beobachten ist (Jones et al., 1997). Aufgrund der Tatsache, dass sich die Effizienz der Reizweiterleitung an Synapsen verändern kann, ist es möglich, dass die Reaktion auf einen gleichbleibenden Reiz im Laufe der Zeit entweder abgeschwächt oder verstärkt wird. Eine solche Veränderung der Reizantwort an chemischen Synapsen geht wahrscheinlich mit einer Veränderung der Untereinheitenzusammensetzung einher (Maitra et al., 1999). Dadurch wird bestimmt, mit welcher Effizienz der Kanal Chlorid-Ionen ins Innere der Zelle strömen lässt. Außerdem kann so die Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden gesteuert werden (Hevers et al., 1998). GABA_A-Rezeptoren, die eine hohe Durchlässigkeit für Chlorid-Ionen haben, können durch Austausch einer Untereinheit gegen eine andere Klasse (z.B. Austausch einer γ - gegen eine δ -Untereinheit) beispielsweise eine niedrigere Durchlässigkeit für Chlorid-Ionen erlangen. Dieser damit verbundene Prozess des Austauschs einzelner Untereinheiten ist allerdings kaum verstanden. Vor allem die Transportwege der einzelnen Untereinheiten sind bis heute nur wenig untersucht worden. Zudem ist nicht bekannt, wie eine differentielle Verteilung der α_1 - und α_2 -Untereinheiten zustande kommt. Es stellt sich die Frage, ob diese Untereinheiten zusammen oder getrennt in unterschiedlichen Vesikeln zur Plasmamembran transportiert werden und wie der Transport dieser Vesikel verläuft. Aus diesen Gründen ist es interessant, den Transportweg einer oder mehrerer GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten von ihrer Synthese bis zur Präsentation an der Plasmamembran zu verfolgen.

4.6 Strukturelle Eigenschaften von GABA_A-Rezeptoren

Obwohl eine sehr große Anzahl von Membranproteinen bekannt ist, konnten nur von einigen wenigen hochaufgelöste Strukturanalysen durchgeführt werden. Die größten Hindernisse liegen darin, ausreichende Mengen von reinen Proteinen zu erhalten. Zudem besteht eine weitere Schwierigkeit darin, die erhaltenen Proteine zu kristallisieren, ein Prozess, der für die Röntgen-Beugungsanalyse unumgänglich ist. Erste Erfolge in der Strukturanalyse von Neurotransmitterrezeptoren konnten anhand von Acetylcholin-Rezeptoren, die aus dem elektrischen Organ des Torpedo-Rochens isoliert wurden, verbucht werden (Miyazawa et al., 2003). Durch Homologiemodellierung konnten die Ergebnisse der

Torpedo-Rochen Acetylcholin-Rezeptoren auf strukturell ähnliche Rezeptoren übertragen werden (Hosie et al., 2003; Reeves et al., 2003). Die Strukturanalysen führten zu einer Unterteilung der liganden-gesteuerten Ionenkanäle in mehrere Rezeptor-Familien. Zuerst sei die „Cys-Loop“-Familie erwähnt, welche die 5-HT (5-hydroxytryptamine)-Rezeptoren, die nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR), die Glyzin-Rezeptoren (GlyR), sowie die für diese Arbeit interessanten GABA_A-Rezeptoren (GABA_AR) enthält. Weitere Rezeptorfamilien sind die Glutamat-Rezeptoren (NMDA-(N-methyl-D-aspartat)-Rezeptoren, AMPA-(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure)-Rezeptoren und Kainat-Rezeptoren), die TRP (transientes Rezeptorpotential)-Kanäle, sowie die ATP-abhängigen Kanäle. Die Mitglieder der „Cys-Loop“-Familie zeichnen sich alle durch eine vergleichbare Architektur aus (Brejc et al., 2001). Alle Mitglieder besitzen eine Cystein-Schwefel-Brücke an ihrem extrazellulär liegenden N-Terminus (Abbildung 4C), vier Transmembrandomänen (Abbildung 4B) und sie zeichnen sich durch ihre pentamere Struktur zur Bildung des Ionenkanals aus (Abbildung 4A). Sequenzvergleiche der extrazellulären Bereiche der Untereinheiten verschiedener Rezeptorklassen zeigten nur eine geringe Homologie der Primärstruktur (Abbildung 5).

Trotz der großen Unterschiede in der Primärstruktur zwischen den einzelnen Mitgliedern der „Cys-Loop“-Familie sind einige Aminosäuren durchgehend in allen Mitgliedern konserviert (Srinivasan et al., 1999; Deane et al., 2001; Jin et al., 2004). Obwohl auf Aminosäureebene große Unterschiede zwischen den Mitgliedern der „Cys-Loop“-Familie auftauchen, sind die strukturellen Unterschiede in der Sekundär- und Tertiärstruktur nur marginal. Die Quartärstruktur der pentameren Rezeptoren innerhalb der „Cys-Loop“-Familie unterscheidet sich ebenfalls kaum.

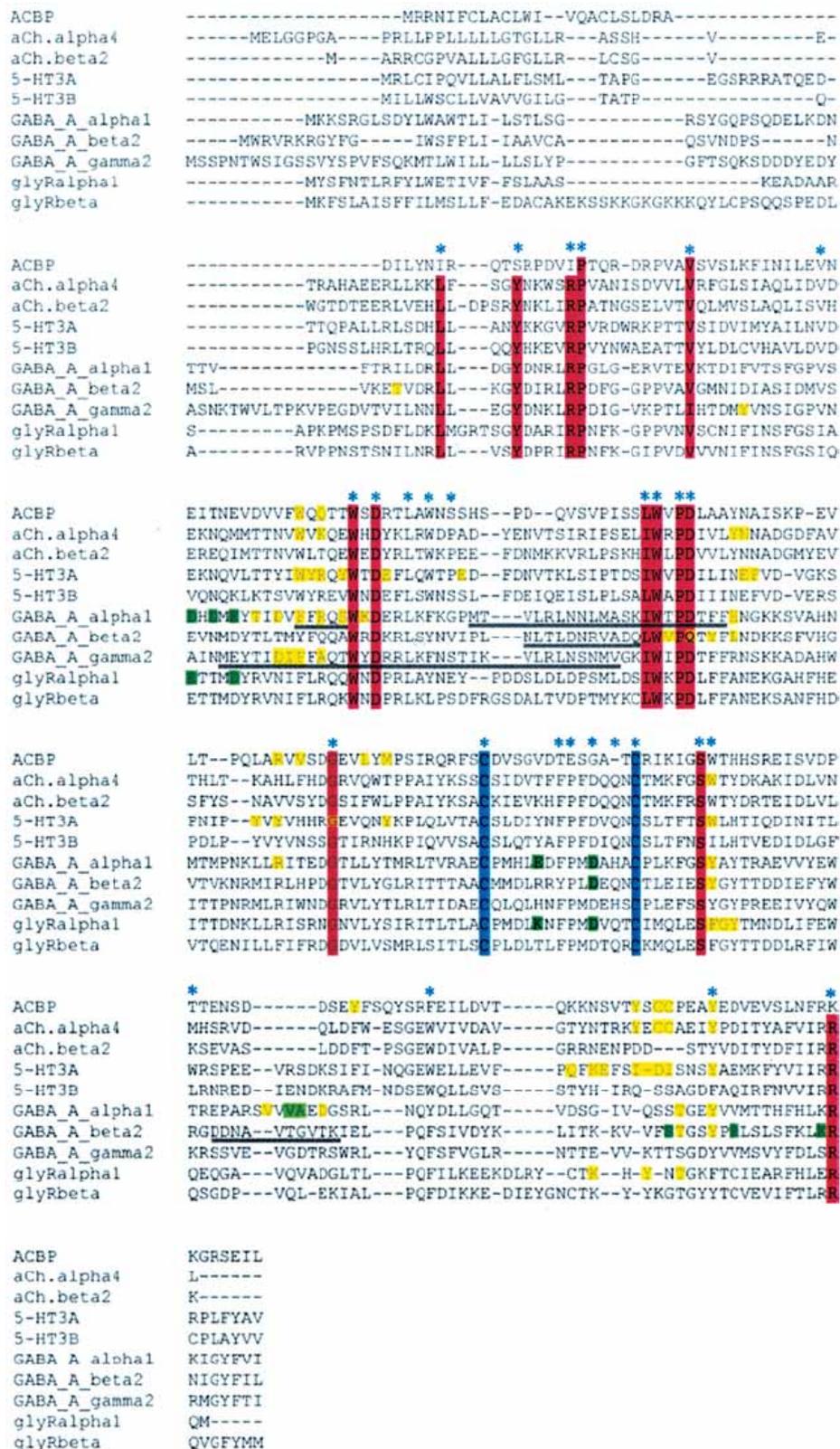


Abbildung 5: Sequenzvergleich ausgewählter Untereinheiten unterschiedlicher Rezeptorklassen der „Cys-Loop“-Familie. Rote Markierungen deuten auf konservierte Aminosäuren innerhalb der Mitglieder der Familie. Blaue Markierungen deuten auf die Cysteine, die an der Bildung der Cystein-Schwefel-Brücke beteiligt sind. Gelbe Markierungen deuten auf Aminosäuren hin, die an der Bindung des Liganden beteiligt sind. Grüne Markierungen bezeichnen Aminosäuren, die an der Bildung des Ionenkanals beteiligt sind. Blaue Sterne bezeichnen essentielle Aminosäuren, und unterstrichene Aminosäuren sind an der Zusammenlagerung der Untereinheiten zu einem nativen Rezeptor beteiligt. ((Connolly et al., 2004), modifiziert).

4.7 Lokalisierung von GABA_A-Rezeptoren in Abhängigkeit von ihrer Untereinheitenzusammensetzung

Die funktionelle Spezifität von unterschiedlichen GABA_A-Rezeptor-Subtypen mit diversen pharmakologischen Eigenschaften spiegelt sich auch in ihrer differentiellen Verteilung auf zellulärer Ebene wider. Verschiedene postsynaptische Subtypen der GABA_A-Rezeptoren sind, wie an hippokampalen Pyramidalzellen gezeigt wurde, auch an verschiedenen Orten in den Neuronen lokalisiert. Diese Neurone enthalten α_1 -, α_2 - und α_5 -Untereinheiten zusammen mit β_{1-3} - und γ_2 -Untereinheiten, was darauf hindeutet, dass in der gleichen Zelle mehrere verschiedene Untereinheiten koexprimiert werden (Fritschy et al., 1995; Pirker et al., 2000). GABA_A-Rezeptoren, die mittels Antikörper gegen die α_2 -Untereinheit visualisiert wurden, kommen in großer Menge am Axonhügel (AIS, „axon initial segment“) der Pyramidalzellen vor (Nusser et al., 1996a; Fritschy et al., 1998). Daher sind α_2 enthaltende GABA_A-Rezeptoren strategisch optimal positioniert, um Aktionspotentiale dieser Neurone effektiv zu inhibieren (Miles et al., 1996; Maccaferri et al., 2000; Megías et al., 2001). Zusätzlich zu dem Axonhügel wurden GABA_A-Rezeptoren mit α_2 -Untereinheiten an axo-somatischen Synapsen GABAerger Endplatten gefunden, die von Cholecystinin-positiven Korbzellen herrühren (Nyíri et al., 2001). Im Gegensatz zu α_2 enthaltenden GABA_A-Rezeptoren sind GABA_A-Rezeptoren, die α_1 -Untereinheiten enthalten selektiv an GABAergen Endplatten in der Somaregion von Pyramidalzellen angereichert. Diese Endplatten stammen von Parvalbumin-positiven Korbzellen (Thomson et al., 2000; Klausberger et al., 2002). Beide dieser Rezeptorsubtypen wurden auch in extrasynaptischen Membranen beobachtet (Nusser et al., 1996a; Fritschy et al., 1998; Brünig et al., 2002a). Ein dritter Rezeptorsubtyp wurde mit Hilfe eines α_5 -spezifischen Antikörpers fast ausschließlich extrasynaptisch beobachtet (Nusser et al., 1996a; Fritschy et al., 1998; Brünig et al., 2002a; Crestani et al., 2002). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lokalisierung der unterschiedlichen GABA_A-Rezeptor-Subtypen zumindest teilweise durch die Strukturunterschiede der α_1 -, α_2 -, α_5 - und γ_2 -Untereinheiten bestimmt werden könnten. Wie jedoch die Strukturunterschiede der hier beschriebenen Untereinheiten einen Einfluss auf die differentielle Verteilung der Rezeptor-Subtypen haben können, ist noch wenig verstanden.

4.8 Verankerung der GABA_A-Rezeptoren an die Postsynapsen

Die postsynaptische Anreicherung oder „Clusterbildung“ von Neurotransmitterrezeptoren wird als essentiell für das Funktionieren der synaptischen Transmission vermutet. Jedoch ist der Mechanismus, wie GABA_A-Rezeptoren an die Plasmamembran transportiert werden und wie sie dort verankert werden, nur in seinen Grundzügen verstanden. Eine bedeutsame Rolle für diesen Prozess wird dem 93kDa großen Protein Gephyrin zugesprochen. Gephyrin kommt in hoher Konzentration im subsynaptischen Kompartiment sowohl von inhibitorischen glyzinergeren als auch von GABAergen Synapsen vor. Zuerst wurde Gephyrin als Kontamination in einer Fraktion von aufgereinigten Glyzinrezeptoren aus dem Rückenmark identifiziert (Pfeiffer et al., 1982; Nusser et al., 1996a; Fritschy et al., 1998; Brünig et al., 2002a; Crestani et al., 2002). Dieses Protein bindet mit hoher Affinität an eine amphipatische Sequenz, bestehend aus 20 Aminosäuren, die sich in der großen zytoplasmatischen Schleife der β -Untereinheit des Glyzinrezeptors befindet (Meyer et al., 1995; Kneussel et al., 1999c). Des Weiteren hat Gephyrin die Fähigkeit an polymerisiertes Tubulin zu binden und es wird für die postsynaptische Anreicherung von Glyzinrezeptoren im Rückenmark, der Retina und in hippokampalen Neuronen benötigt (Kirsch et al., 1993; Feng et al., 1998; Fischer et al., 2000; Lévi et al., 2004). Weiterhin konnte mittels hochauflösender Immunfluoreszenzmikroskopie sowie Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass im Gehirn, wo vergleichsweise wenige Glyzinrezeptoren vorkommen, Gephyrin hochgradig mit GABA_A-Rezeptoren kolokalisiert (Rao et al., 2000; Sassoè-Pognetto et al., 2000; Brünig et al., 2002a; Brünig et al., 2002b; Studler et al., 2002). Gephyrin kann daher auch als Marker für GABAerge Synapsen im Gehirn angesehen werden. Erste Hinweise für eine funktionelle Rolle von Gephyrin an GABAergen Synapsen basieren auf Analysen von Neuronen, die die γ_2 -Untereinheit nicht exprimieren, sowie auf Hirnschnitten, bei denen neben einem Verlust der postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren auch ein deutlicher Verlust von Gephyrin an den Postsynapsen zu beobachten war (Essrich et al., 1998). Ein Verlust von Anhäufungen von Gephyrin an den Postsynapsen ist auch bei 3 Wochen alten „knock-out“-Mäusen zu beobachten, bei denen das γ_2 -Gen ausgeschaltet wurde (Schweizer et al., 2003). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die funktionelle Assoziation zwischen GABA_A-Rezeptoren, die die γ_2 -Untereinheit enthalten und Gephyrin nicht auf frühe Entwicklungsstadien der Neurone limitiert ist. „Antisense“-Experimente in kultivierten hippokampalen Neuronen geben Hinweise darauf, dass Gephyrin für die „Clusterbildung“ von α_2 - und α_3 -enthaltenen GABA_A-Rezeptoren benötigt wird (Essrich et al., 1998; Kneussel et

al., 1999b; Kneussel et al., 2001). Somit könnte Gephyrin bei GABAergen Synapsen dieselbe Rolle einnehmen, wie bei glyzineren Synapsen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die postsynaptische Lokalisierung von α_1 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren in kultivierten hippocampalen Neuronen aus Gephyrin „knock-out“ Mäusen gänzlich vom Verlust des Gephyrin unberührt bleibt (Kneussel et al., 2001; Lévi et al., 2004). Diese Beobachtung steht jedoch ganz im Gegensatz zu Beobachtungen, die man bei γ_2 -„knock-out“-Mäusen machte. Bei diesen Mäusen konnte man eine Reduktion von GABA_A-Rezeptor-„Clustern“ bei allen Synapsen beobachten, auch bei solchen, die normalerweise Rezeptoren mit α_1 -Untereinheiten enthalten (Essrich et al., 1998; Baer et al., 1999). Anhand dieser Daten kann man vermuten, dass Gephyrin wichtige Funktionen bei α_1 -enthaltenen Rezeptoren besitzt, die jedoch bei den Experimenten mit Gephyrin-„knock-out“-Mäusen nicht aufgezeigt werden konnten. Es wäre daher möglich, dass solche Synapsen ein bis dato unbekanntes Protein enthalten, welches funktionell mit Gephyrin zu vergleichen ist.

Aufgrund der Eigenschaft von Gephyrin mit hoher Affinität an Mikrotubuli und Tubulin zu binden (Kirsch et al., 1991), hatte man lange vermutet, dass Gephyrin die Verankerung von Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren an die Synapsen vermittelt (Kirsch, 1999; Kneussel et al., 2000b). Jedoch bewirkte eine Zerstörung von Mikrotubuli keinen messbaren Effekt auf die postsynaptische Lokalisation von GABA_A-Rezeptoren und Gephyrin in kultivierten hippocampalen Neuronen (Allison et al., 2000). Bei glyzineren Synapsen von kultivierten Rückenmarkneuronen sind Mikrotubuli für die postsynaptische Lokalisation von Glyzin-Rezeptoren und Gephyrin notwendig (Kirsch et al., 1995), aber nur bei immaturren Neuronen (Van Zundert et al., 2004). Anhand dieser Daten lässt sich vermuten, dass eine Interaktion zwischen Mikrotubuli und Gephyrin zwar wichtig für den Transport von Gephyrin und Glyzin-Rezeptoren in Dendriten und Synapsen sind, aber nicht für den Verbleib an den postsynaptischen Membranen in maturaen Neuronen (Hanus et al., 2004). Die Sensitivität von immaturren GABAergen Neuronen gegenüber Mikrotubuli-depolymerisierenden Agenzien ist zur Zeit noch unklar, aber einige Daten deuten darauf hin, dass sich GABA_A-Rezeptoren ohne die Gegenwart von Gephyrin zu „Clustern“ formen können.

Während die Bildung von „Clustern“ bei Glyzin-Rezeptoren direkt von der Gegenwart von Gephyrin abhängt, können GABA_A-Rezeptoren in immaturren Neuronen „Cluster“ formen, bevor eine Koloalokalisation mit Gephyrin beobachtet werden kann (Dumoulin et al., 2000; Danglot et al., 2003). Diese Daten zeigen, dass Gephyrin bei glyzineren Synapsen

vermutlich eine ganz andere Rolle spielt, als bei GABAergen Synapsen. Es deutet vieles darauf hin, dass Gephyrin eine stabilisierende Funktion bei zu „Clustern“ zusammengeführten GABA_A-Rezeptoren besitzt, und nicht, wie bei Glyzin-Rezeptoren eine Funktion zum Transport der Rezeptoren an die Synapsen (Hanus et al., 2004).

4.9 Die „postsynaptic density“ (PSD)

Neurotransmitterrezeptoren sind in der synaptischen Membran verankert. Um diese Rezeptoren zu verankern sind verschiedene Proteine notwendig. Durch die hohe Anzahl (etwa 70 Proteine) von solchen verankernden Proteinen in der postsynaptischen Membran erscheint diese bei elektronenmikroskopischen Beobachtungen als elektronendichtes, und somit dunkel erscheinendes Material. Aufgrund dieser Eigenschaft spricht man daher von der postsynaptischen Dichte („postsynaptic density“, PSD). Ein Protein der PSD, Gephyrin, ist im vorangegangenen Abschnitt schon deutlich beschrieben worden (siehe Abschnitt 4.8). Neben den Proteinen, die für die Verankerung der Neurotransmitterrezeptoren verantwortlich sind, befinden sich auch viele Gerüstproteine, Rezeptorproteine, sowie Signalproteine in der PSD (Husi et al., 2000; Kennedy, 2000). Als erstes an Gephyrin bindendes Protein wurde durch „Zwei-Hybrid-Screenings“ das Protein Collybistin entdeckt. Collybistin ist ein Mitglied der Familie der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), die den Austausch von GDP zu GTP bei den kleinen GTPasen der Rho-Familie steuern (Reid et al., 1999; Kins et al., 2000). Analysen mit dem humanen Collybistin-Homolog hPEM-2 zeigten, dass das Protein selektiv Cdc42, einen Regulator des Aktin-Zytoskeletts (Erickson et al., 2001) aktiviert, aber keine Interaktionen mit Rac oder RhoA GTPasen zeigte (Reid et al., 1999). Daher wird vermutet, dass Collybistin eine wichtige Rolle im Transport von Proteinen zum subsynaptischen Aktin-Zytoskelett einnimmt (Kneussel et al., 2000a).

4.10 Proteine und Signalmechanismen zur Regulierung der Expression von GABA_A-Rezeptoren

Die Assemblierung und der Transport der unterschiedlichen GABA_A-Rezeptor-Subtypen in einzelnen Zellen und zu unterschiedlichen Kompartimenten ist von speziellen Kontrollschritten zur Regulierung der Sortierung in einzelne Transportvesikeln genauso abhängig, wie von den Transportmechanismen, die die Transportwege der Vesikel zu ihren

Bestimmungsorten steuern. Durch die Entdeckung des 13,9kDa großen GABA_A-Rezeptor assoziierten Proteins (GABARAP), konnte ein großer Schritt bei der Identifikation von transportrelevanten Faktoren erbracht werden. GABARAP ist ein Protein, welches an die zytoplasmatische Domäne (TM3-TM4-Schleife) von γ -Untereinheiten bindet (Wang et al., 1999; Nymann-Andersen et al., 2002b). Von GABARAP ist derzeit bekannt, dass es an Mikrotubuli sowie an N-Ethylmaleimid sensitiven Faktor (NSF) binden kann, und dass es vorwiegend im Golgi-Komplex und subsynaptischen Zisternen angereichert vorliegt (Wang et al., 2000; Kittler et al., 2001). Es besteht die Annahme, dass GABARAP eine entscheidende Rolle bei der Anreicherung von GABA_A-Rezeptoren an den Synapsen einnimmt. Erstens interagiert GABARAP selektiv mit GABA_A-Rezeptoren, die γ -Untereinheiten enthalten und von denen man weiß, dass sie an Postsynapsen transportiert werden (Kneussel et al., 2000a; Nymann-Andersen et al., 2002b). Zweitens hat man durch „Zwei-Hybrid-Screenings“ und Glutathion-S-Transferase-„pull-down“-Assays beobachtet, dass GABARAP mit Gephyrin interagiert und zudem diese beiden Proteine eine starke Kollokalisierung bei einer Expression in Säugerzellen aufweisen (Kneussel et al., 2000b). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass GABARAP die Fähigkeit zur Dimerisierung besitzt (Coyle et al., 2002; Nymann-Andersen et al., 2002a). Obwohl diese Daten aussagen, dass GABARAP eine Brückenfunktion zwischen Gephyrin und γ_2 enthaltenden GABA_A-Rezeptoren einnimmt, konnte bis jetzt in Neuronen keine signifikante Kollokalisierung zwischen GABARAP und Gephyrin beobachtet werden. Zudem konnte das Protein GABARAP durch Immunfluoreszenzexperimente an inhibitorischen Synapsen nicht nachgewiesen werden (Kneussel et al., 2000b; Kittler et al., 2001).

Ein weiteres Protein, welches die Oberflächenexpression von GABA_A-Rezeptoren steuern könnte, ist das Protein Plic-1. Dabei handelt es sich um ein 67kDa großes Protein, das Proteine, die mit Integrin interagieren, mit dem Zytoskellert verbindet. Plic-Proteine besitzen einen mit Ubiquitin vergleichbaren N-Terminus, sowie eine mit Ubiquitin assoziierte Domäne (UBA, ubiquitin-associated domain). Charakteristisch für diese Proteinklasse ist, dass sie mit der Ubiquitinligase E6-AP und mit Proteasomen in großen Komplexen interagieren (Wu et al., 1999; Kleijnen et al., 2000). Bisher wurde vermutet, dass diese Proteine nur an der *in vivo* Degradation von Ubiquitin-abhängigen Proteasomsubstraten beteiligt sind (Kleijnen et al., 2000). Das Protein Plic-1 interagiert beispielsweise mit der zweiten intrazellulären Schleife (TM3-TM4-Schleife) von α - und β -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors und beeinflusst ungeachtet der subzellulären Lokalisierung der Rezeptoren deren Oberflächenexpression

(Bedford et al., 2001). Weiterhin zeigte eine Überexpression von Plic-1 in unterschiedlichsten Zelltypen, dass sich die Halbwertszeit und die Intensität der Oberflächenexpression von koexprimierten GABA_A-Rezeptoren erhöhen. Das Gleichgewicht zwischen der Anzahl von neu an der Plasmamembran exprimierten GABA_A-Rezeptoren zu abgebauten Rezeptoren verschiebt sich dadurch in Richtung der Stabilisierung von Rezeptoren, die sich an der Plasmamembran befinden. Es wird vermutet, dass der proteasomale Abbau von GABA_A-Rezeptoren durch die Präsenz von Plic-1 reduziert wird. Diese Vermutung wird durch weitere Beobachtungen gestärkt, bei denen nach einer Injektion von einem synthetischen Peptid, welches mit Plic-1 um die Bindestelle an der α_1 -Untereinheit kompetitiert, eine starke Dezimierung der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Hyperpolarisation eintrat. Durch das eingesetzte synthetische Peptid wurde allerdings die Sensitivität der Rezeptoren nicht vermindert. Dies deutet darauf hin, dass Plic-1 mit GABA_A-Rezeptoren interagieren und dadurch die proteasomale Degradation steuern kann (Lüscher et al., 2001). Plic-1 wurde zudem in Synapsen, subsynaptischen Membrankompartimenten an den äußeren Rändern des Golgi-Apparates gefunden (Bedford et al., 2001).

4.11 Weitere interzelluläre Kommunikationswege

4.11.1 „Gap Junctions“

Anders als chemische Synapsen, die keine direkte Kopplung zwischen zwei Zellen ausbilden, bilden „Gap Junctions“ eine direkte Kopplung zweier benachbarter Zellen aus. „Gap Junctions“ bilden in den Plasmamembranen Felder von hexagonal angeordneten hexameren Kanälen, den Connexonen, die in einer Art Kopf-Kopf-Kontakt die Membranen zweier Zellen verbinden und auf diese Weise eine plasmatische Brücke schaffen (Abbildung 6A). „Gap Junctions“ werden schon sehr früh während der Embryonalentwicklung angelegt, und bei Zellkontakt können sie innerhalb weniger Minuten entstehen. Im Bereich von „Gap Junctions“ ist die Plasmamembran bis auf 3nm angenähert. Connexone haben einen Außendurchmesser von 6,5nm und enthalten eine Pore mit einem Durchmesser von etwa 1,5nm, während die Gesamtlänge der Pore von Zytoplasma zu Zytoplasma etwa 18nm beträgt. Connexone bestehen aus sechs Untereinheiten, die als Connexine bezeichnet werden. Connexine sind integrale Membranproteine mit vier Membrandurchgängen, deren Gen-Familie 14 Mitglieder umfasst. „Gap Junctions“ kommen in fast allen vielzelligen Organismen (Metazoen) vor. Durch den Kanal, der durch die Connexine ausgebildet wird, können Ionen,

aber auch größere Moleküle bis zu einer Molekularmasse von 1kDa frei von einer Zelle zur anderen gelangen. Während die Bereiche, die die Membranpore bilden, und Bereiche der extrazellulären Seite sehr konserviert sind, sind die Bereiche auf der zytoplasmatischen Seite variabel. Die variablen zytoplasmatischen Bereiche sind für die unterschiedliche Permeabilität, Selektivität und Öffnungscharakteristik verantwortlich. Zudem können die variablen Bereiche phosphoryliert werden, was auf eine Steuerung von „Gap Junctions“ hindeutet. Die Kanäle können sich über Mechanismen, die noch wenig verstanden sind, aufweiten oder auch komplett schließen.

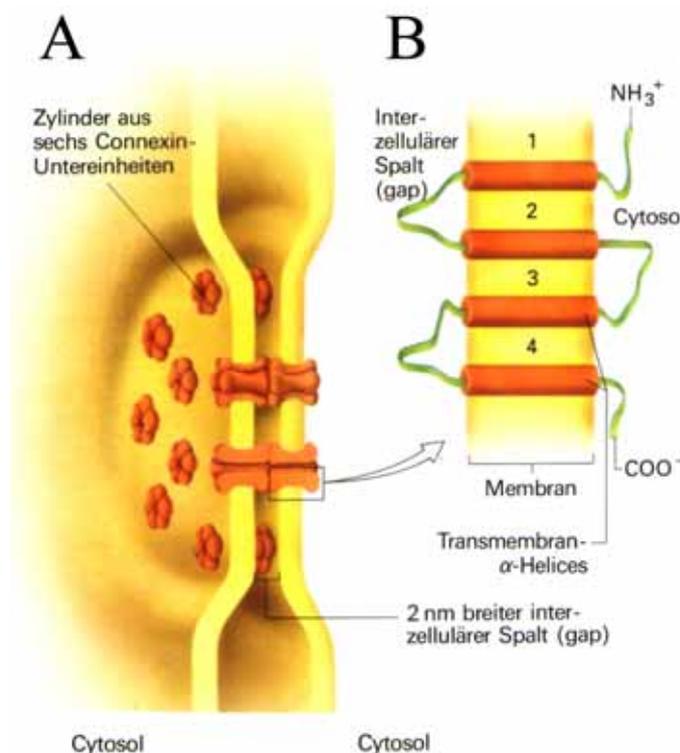


Abbildung 6: Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus von „Gap Junctions“.

(A), „Gap Junctions“ sind Ansammlungen einzelner hexamerer Connexonen. Connexone benachbarter Zellen lagern sich aneinander und bilden „Gap Junction“-Kanäle. (B), Schematischer molekulare Aufbau einer Connexin-Untereinheit. Jede Untereinheit besitzt 4 Transmembrandomänen. Es ist zu erkennen, dass sich sowohl N- als auch C-Terminus in der zytoplasmatischen Seite befinden. (Lodish et al., 2003), modifiziert)

Eine bedeutende Rolle spielen „Gap Junctions“ beispielsweise in der Herzmuskulatur. Die einzelnen Herzmuskelzellen sind über „Gap Junctions“ elektrisch miteinander gekoppelt. Ein im Sinusknoten entstehendes Aktionspotenzial wird über sie nahezu ohne Zeitverlust an die anderen Muskelzellen weitergeleitet, wodurch eine koordinierte Kontraktion von großen Muskelbereichen möglich wird. „Gap Junctions“ sind immer dann notwendig, wenn eine schnelle elektrische Synchronisation von Zellen gegeben sein muss. Beispiele hierfür sind die

Muskulatur, die bei Fischen für die Fluchtreaktion verantwortlich ist oder das elektrische Organ des Zitteraals.

Connexine konnten bisher nur in Chordaten gefunden werden. In Invertebraten fehlen jedoch homologe Proteine. Vor kurzem ist jedoch eine neue Proteinfamilie entdeckt worden, die strukturelle Ähnlichkeiten mit Connexinen zeigt (Bruzzone et al., 2003). Diese neue Proteinfamilie wurde als Pannexine bezeichnet (lat. *pan* = alles, überall; *nexus* = Verbindung, Band). In Vertebraten kommen drei verschiedene Pannexin-kodierende Gene vor. Das Pannexin PANX1 (*pannexin1*) ist ubiquitär in unterschiedlichen Geweben präsent, aber in embryonalem Gewebe stärker als in anderen. PANX2 kommt spezifisch im Gehirn vor und PANX3 wurde im Gehirn, sowie in Osteoblasten nachgewiesen. Pannexine bilden wie Connexine interzelluläre Kanäle. Es ist jedoch unklar, ob Pannexine die Funktion der Connexine ergänzen oder ob sie eine spezielle Aufgabe haben. Eine weitere Variante der Pannexine ist vor kurzem ebenfalls bei Polydnaviren entdeckt worden. Die Pannexinhomologe werden als Vinnexine (= virale Homologe von Pannexinen) bezeichnet.

4.11.2 „Tunneling Nanotubes“ (TNTs)

Neben „Gap Junctions“ wurde erst 2004 eine neue, direkte interzelluläre Verbindung zwischen tierischen Zellen beschrieben. Diese Verbindungen wurden aufgrund ihrer Struktur bezeichnenderweise „tunneling nanotubes“ (TNTs) bezeichnet (Rustom et al., 2004). Bei diesen Strukturen handelt es sich um sehr dünne, tubuläre Membrankanäle, die zwischen Zellen aufgespannt sind, einen Durchmesser zwischen 50 und 200nm besitzen und eine Länge von bis zu 500µm erreichen können (Abbildung 7). Experimente mit GFP-markiertem F-Aktin haben gezeigt, dass TNTs, ähnlich wie Cytoneme (Ramirez-Weber et al., 1999) und Plasmodesmata (Baluska et al., 2004), ein Aktinbündel enthalten. Die Polymerisation von Aktin ist zudem die treibende Kraft für die Bildung dieser Strukturen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass kleine endosomale Vesikel durch TNTs zwischen Zellen transportiert werden. Dass dieser Transport vermutlich F-Aktin-abhängig ist, wird durch Immunfluoreszenzexperimente mit Antikörpern gegen MyosinVa, ein Aktin-abhängiges Motorprotein, welches am Organellentransport beteiligt ist, deutlich.

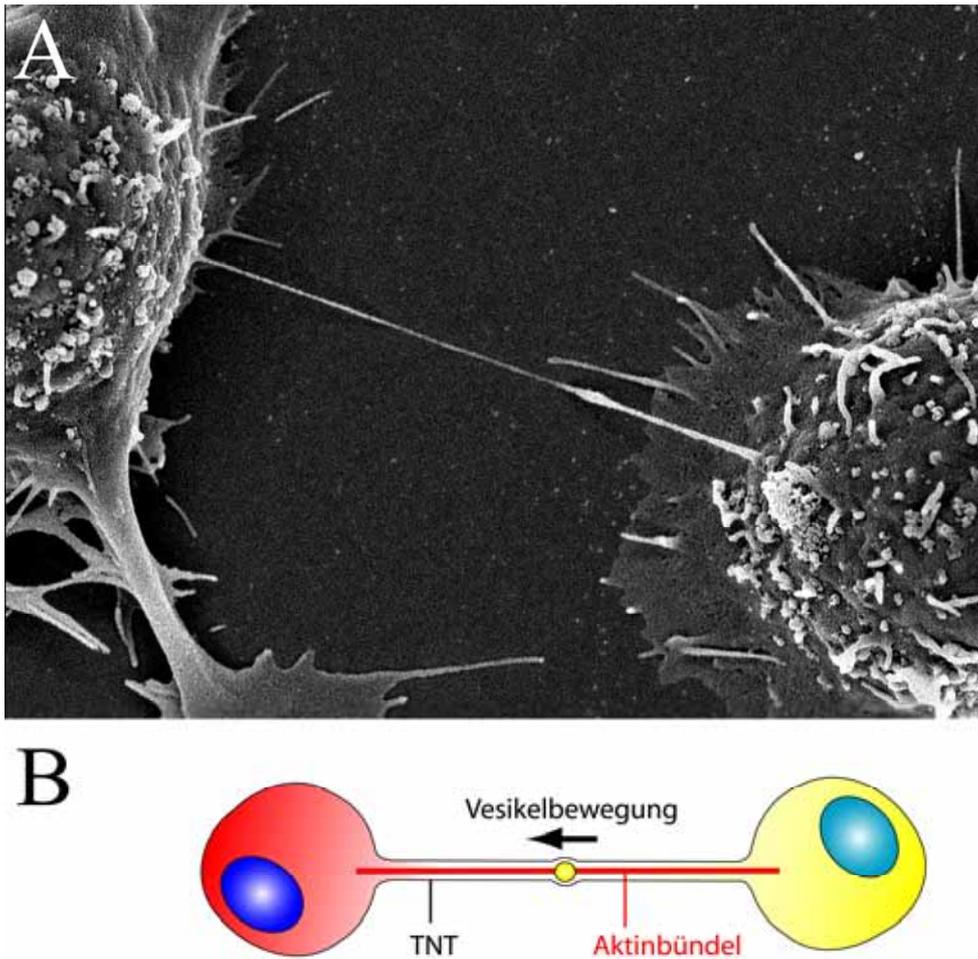


Abbildung 7: „Tunneling Nanotubes“ zwischen kultivierten PC12-Zellen. (A) REM-Aufnahme zweier PC12-Zellen, die über ein TNT verbunden sind. (aus (Rustom et al., 2004)) (B) Schematische Darstellung von TNTs zwischen Zellen. TNTs sind zwischen Zellen an den Stellen des geringsten Abstands aufgespannt. Im Lumen der TNTs befindet sich ein Aktinbündel, das vermutlich auch für den Transfer vesikulärer Strukturen verantwortlich ist.

Aufgrund des hohen Anteils an Aktin in TNTs ist eine passive Diffusion von zytoplasmatisch exprimiertem GFP und von dem niedermolekularen Farbstoff Calcein nicht möglich (Rustom et al., 2004). Das Aktinbündel im Lumen des TNTs verhindert vermutlich den passiven Transport. Durch Experimente mit einem farnisylierten GFP (f-GFP), welches in der Plasmamembran inseriert, konnte gezeigt werden, dass eine Membrankontinuität zwischen mit TNTs verbundenen Zellen besteht. Dazu wurden transient transfizierte Zellen der Zelllinie PC12 mit f-GFP transfiziert und zu einer Empfängerpopulation gegeben. Nach 24 bis 48 Stunden konnte in den TNT-verbundenen Zellen ebenfalls eine GFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Aber auch bei Kulturen anderer Zelllinien, wie z.B. in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) und normalen Ratten-Nierenzellen (NRK), konnten TNTs nachgewiesen werden. Interessant ist auch die Beobachtung, dass TNTs vermutlich an der Entstehung von so genannten Immunsynapsen zwischen Immunzellen beteiligt sind

(Onfelt et al., 2004). Die Immunsynapse besteht aus einer Ansammlung von T-Zell-Rezeptoren umgeben von einem Ring aus Adhäsionsmolekülen. Über sie werden Protein- und Lipid-„Cluster“, die zur Regulation einer Vielfalt von biologischen Prozessen, wie z.B. Zellproliferation und gerichtete Sekretion sowie weiteren Signaltransduktionsprozessen dienen, ausgetauscht. Wie ein solcher Austausch stattfindet, war lange Zeit unklar. Jedoch wurden auch bei Kulturen diverser Immunzellen TNT-ähnliche Strukturen entdeckt, mittels derer ein interzellulärer Transfer von GPI (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol)-verankertem GFP gezeigt werden konnte. Eine Ausbildung *de novo* von TNTs bei Immunzellen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Vielmehr sind die beobachteten TNT-Strukturen sekundär an den Stellen entstanden, an denen sich eine Immunsynapse befand (Onfelt et al., 2004). Die TNTs entstehen dann, wenn sich die zuvor berührenden Zellen voneinander weg bewegen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TNTs zwischen kultivierten Myozyten-Vorläuferzellen vorkommen und vermutlich für den interzellulären Transfer von Mitochondrien verantwortlich sind (Koyanagi et al., 2005). Während bei PC12-Zellen ein Transfer von kleinen Farbstoffmolekülen beobachtet werden konnte, so konnte bei Kokulturen von primären Dendritischen Zellen und Monozyten ein Transfer des Zellfarbstoffs Lucifer Yellow beobachtet werden, wobei ein fluoreszierendes Dextran nicht interzellulär transferiert wurde. Auch konnten bei diesen Kulturen Kalzium-Signale über TNT vernetzte Zellen übertragen werden. TNTs scheinen somit auch eine Funktion bei der Reizübertragung zwischen bestimmten Zellarten zu haben. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass TNTs wahrscheinlich nicht auf einzelne Zelllinien oder Zellsysteme beschränkt sind, sondern in vielen Zellsystemen vorkommen und dort unterschiedliche Funktionen ausüben können.

4.12 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Da der Mechanismus und die Wege dieses differentiellen Transports der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α_1 und α_2 noch nicht verstanden sind, stellt sich die Frage, ob der Transport der beiden Isoformen der α -Untereinheiten in gleichen oder verschiedenen Vesikeltypen erfolgt. Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, ein System zur *in vivo*-Analyse der Transporteigenschaften der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten α_1 und α_2 zu erstellen. Zur Adressierung dieser Fragestellung sollen mit Hilfe von Farbvarianten des grün fluoreszierenden Proteins die Untereinheiten α_1 und α_2 markiert werden, um deren Transportverhalten mittels zeitlich hochauflösender Videomikroskopie

fluoreszenzmikroskopisch *in vivo* untersuchen zu können. Die erstellten Konstrukte sollen dann zunächst hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften und ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften untersucht werden. Außerdem sollen die Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Oligomerisierungseigenschaften charakterisiert werden. Funktionelle Fusionsproteine sollen dann dazu verwendet werden, die Transporteigenschaften sowohl in kultivierten Zelllinien als auch in kultivierten hippocampalen Neuronen zu analysieren. Dabei soll besonderes Augenmerk auf die zeitlich und räumlich differentielle Verteilung der beiden Untereinheiten α_1 und α_2 gelegt werden.

Aufgrund der Entdeckung einer neuen Form der Zell-Zell-Verbindung, den TNTs, sollen im Laufe dieser Arbeit auch Studien an neuronalen Zellsystemen durchgeführt werden. Dabei interessiert vor allem, ob Astrozyten und Neurone über TNT-ähnliche Strukturen kommunizieren. Zur Adressierung dieser Fragestellung soll anhand von Kokulturen von Astrozyten und hippocampalen Neuronen analysiert werden, ob ein interzellulärer Transfer von membranösem Material erfolgt. Neben einer mikroskopischen Analyse des interzellulären Transfers soll dieser Transfer auch quantitativ mittels FACS (= „fluorescence activated cell sorting“) untersucht werden. Durch den Einsatz von Zytoskelettgiften, soll zudem untersucht werden, ob die gemessene Transferrate mit dem Auftreten von TNT-ähnlichen Strukturen korreliert. Weiterhin soll zur mikroskopischen Analyse ein Kultivierungssystem entwickelt werden, welches eine vereinfachte Analyse neu entstehender TNTs zwischen Astrozyten und Neuronen ermöglicht. Besonders die Problematik, dass Neurone eine sehr komplexe Morphologie aufweisen und so eine simultane Analyse der gesamten Zelloberfläche mit den heutigen Mikroskopiertechniken nahezu unmöglich ist, soll mit einem neuen Kultivierungssystem vereinfacht werden.

5 Material

5.1 Plastikwaren

Reaktionsgefäße wurden von der Firma Eppendorf, Plastikwaren für die Zell- und Bakterienkultur von den Firmen Nunc, Sarstedt sowie Greiner und Söhne bezogen.

5.2 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Roth, Sigma, Merck oder Riedel-De Haen bezogen, Reagenzien für die Zellkultur von Invitrogen.

5.3 Enzyme

Restriktionsenzyme, DNA-Polymerasen, Ligasen und alkalische Phosphatasen wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Stratagene, New England Biolabs oder MBI-Fermentas bezogen.

5.3.1 Proteasen

- Thrombin Protease (27-0846-01, Amersham Biosciences) Stock: 10U/ μ l in PBS
- TEV-Protease (Sigma) Stock: 10U/ μ l in PBS

5.4 Plasmide

pEYFP-N1, Clontech
pECFP-N1, Clontech
pcDNA3.1-myc-HIS, Invitrogen

- pRK5/GABA_A- α_1 (Seeburg et al., 1990)
- pRK7/GABA_A- α_2 (Seeburg et al., 1990)
- pRK7/GABA_A- β_2 (Seeburg et al., 1990)
- pRK7/GABA_A- γ_2 (Ymer et al., 1989)
- pCMV/myc-GlyzinR- α_1 (Rosenberg et al., 2001)
- pCMV/myc-Thr-GlyzinR- α_1 (Rosenberg et al., 2001)

5.5 Bakterienstämme

- TG2 (Gibson, 1984; Sambrook, 1989)
Genotyp: supE, hsd Δ 5, thi, Δ (lac-proAB), Δ (srl-recA)306:Tn10(Tet^R), F'[traD36, proAB⁺, laqI^q, lacZ Δ M15]
- CJ236 (Kunkel et al., 1987; Kunkel et al., 1991)
Genotyp: F' cat (*pCJ105 = pOX38::cat=FD(HindIII)::cat [Tra⁺ Pil⁺ Cam^R]/ung-1 relA1 dut-1 thi-1 spoT1*)
- DH5 α (Hanahan, 1983)
Genotyp: supE44, Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1

5.6 Eukaryotische Zelllinien und Primärkulturen

- PC12-Zellen
Die neuroendokrine Zelllinie PC12 (Klon 251, (Heumann et al., 1983)) entstammt einem Pheochromocytoma-Tumor der Nebenniere der Ratte. Der verwendete Klon stammt ursprünglich aus dem Labor von Prof. Dr. Hans Thoenen (Martinsried).
- HEK 293-Zellen
Die Zelllinie HEK293 wurde aus einer humanen, embryonalen Nieren-Primärkultur gewonnen und durch Adenoviren des Typ 5 transformiert (Graham et al., 1977). Die hier verwendeten HEK 293-Zellen stammen aus dem Labor von Prof. Dr. Seeburg (MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg).
- NRK-Zellen
Normale Ratten-Nierenzellen (Mrs. M. Freshney, Glasgow, UK)

- Neuronen-Primärkulturen aus E18-Embryonen von Wistar-Ratten

Die Neuronen stammen aus der Hippokampusregion von E18-Embryonen (Wistar-Ratten) und wurden nach Standardmethoden präpariert (Banker et al., 1988). Die Neurone wurden entweder in LabTek™-Kammern oder in „24-Well“-Platten auf Deckgläschen kultiviert (siehe Methoden 6.2.8)

- Astrozyten-Primärkulturen aus E18-Embryonen von Wistar-Ratten

Die Astrozyten wurden nach Standardmethoden (Zimmer et al., 2003) präpariert und kultiviert.

5.7 Antikörper

Monoklonale Primärantikörper:	Antigen (verwendete Verdünnung)
Maus-anti-cmyc (9E10), Invitrogen	cmyc (1:200 IF, 1:2000 WB)
Maus-anti-HA (1583816), Roche, Mannheim	Hämagglutinin (1:150 IF)

Polyklonale Primärantikörper::	Antigen (verwendete Verdünnung)
Kaninchen anti-GFP, MoBiTec	GFP (1:300 IF, 1:5000 WB)

Sekundärantikörper:	Antigen (verwendete Verdünnung)
Ziege-anti-Maus HRP, Dianova, Hamburg	Maus-IgG (1:5000 WB)
Ziege-anti-Maus Cy5, Dianova, Hamburg	Maus-IgG (1:300 IF)
Ziege-anti-Maus Cy3, Dianova, Hamburg	Maus-IgG (1:200 IF)
Ziege-anti-Kaninchen Cy5, Dianova, Hamburg	Kaninchen-IgG (1:200 IF)
Ziege-anti-Kaninchen Cy3, Dianova, Hamburg	Kaninchen-IgG (1:200 IF)
Ziege-anti-Kaninchen Cy2, Dianova, Hamburg	Kaninchen-IgG (1:200 IF)

5.8 Filme

Für die Agarosegel-Aufnahmen wurden Thermofilme der Firma Mitsubishi verwendet.

Für die ECL[®]-Analyse wurden Röntgenfilme (Hyperfilm ECL) der Firma Amersham-Biosciences (GE-Healthcare) verwendet.

5.9 *in vivo* Farbstoffe

- DiI, DiO, DiD Vybrant™ Multicolor Cell-Labeling Kit (V-22889; Molecular Probes Inc., USA)
- Celltracker™ Blue CMAC (7-amino-4-chloromethylcoumarin) (C2110; Molecular Probes Inc., USA)
- Celltracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetat) (C7025; Molecular Probes Inc., USA)
- Weizenkeim Agglutinin (What Germ Agglutinin AlexaFluor®488) (W11261; Molecular Probes Inc., USA)

5.10 Zytoskelettgifte

- Latrunculin-B (428020; Calbiochem, USA) Stock: 2mM in PBS/10%DMSO
- 2,3-Butandion-monoxim (BDM) (31555; Fluka, Deutschland) Stock: 5M in DMSO
- Cytochalasin D (C8273; Sigma., Deutschland) Stock: 1mM in DMSO
- Phalloidin (P2141; Sigma, Deutschland) Stock: 1mM in Ethanol
- Nocodazol (M1404; Sigma, Deutschland) Stock: 1mM in DMSO

5.11 Geräte

Allgemein:

- Zentrifugen: Avanti J25 (Beckman Coulter)
Optima™ TL (Beckman Coulter)
Optima™ L-70K (Beckman Coulter)
Biofuge pico (Heraeus)
Biofuge fresco (Heraeus)
- Rotoren: JLA 16.250 (Beckman Coulter)
JA 25.50 (Beckman Coulter)
SW 40Ti (Beckman Coulter)
TLA-55 (Beckman Coulter)
- Inkubatoren: Hera Cell (Heraeus)
Funktion Line (Heraeus)
Vacuotherm (Heraeus)
- PCR-Maschine: RoboCycler Gradient 96 (Stratagene)
- Sterilbank: 56-400 (The Baker Co.)
- pH-Meter: 766 Calimatic (Knick)
- Wasserbad: W14 (Grant)
- Elektroporator: GenePulser®
mit „Capacitance Extender“ (BioRad)
- Spektralphotometer: Ultrospec3000 (Pharmacia Biotech)
- Gradientenmischer: Gradient Master® (Biocomp, USA)
- FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter): FACSCalibur® (BD Biosciences)

Mikroskope:

- Leica Leitz DM IRB

Konventionelles, inverses Fluoreszenzmikroskop (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH). Das Mikroskop war ausgestattet mit einer Quantix[®] CCD-Digitalkamera (Photometrics, Roper Scientific Germany, Ottobrunn), einem 63x Plan APO 1,4 NA, sowie einem 100x Plan APO 1,4-0,7 NA Ölimmersionsobjektiv (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH). Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden Standard-Filtersätze für FITC / TRITC, sowie ECFP / EYFP (Leica Mikrosystems Vertrieb GmbH) verwendet.

- Leica TCS SP2 AOBS[®]

Konfokales Mikroskop (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH). Das Mikroskop war ausgestattet mit einem 100x HCX PL APO 100x/1,40 NA sowie einem 63x Plan APO 63x/1,20 NA Ölimmersionsobjektiv, Standard-Filtersätzen und einer Wärmekammer (Live Imaging Services, Olten, Schweiz). Das Mikroskop war zudem mit einem Ar-, einem Ar/Kr- und einem He/Ne-Laser ausgestattet.

- Olympus IX70

Konventionelles, inverses Fluoreszenzmikroskop (Olympus Optical. Co. Europa GmbH, Hamburg) ausgestattet mit einem T.I.L.L. Photonics System (Rustom et al., 2000) (T.I.L.L. Photonics GmbH, Martinsried), verschiedenen Ölimmersionsobjektiven (100x PlanApo 100x/1,40 NA und 40x PlanApo 40x/0,95 NA; Olympus Optical Co. Europe GmbH, Hamburg) und zwei verschiedenen Filtersets (ein „Tripleband“-Filterset DAPI/FITC/TRITC F61-020 sowie ein „Dualband“-Filterset ECFP/EYFP F51-017; AHF-Analysentechnik AG, Tübingen, Germany). Das Mikroskop war zudem mit einer 37°C Wärmekammer und einer CO₂-Begasungsanlage ausgerüstet (Live Imaging Services). Das Anregungslicht stammt von einem Monochromator (Polychrome IV) mit einer 100W Xenon Lampe. Die Bilder wurden am Seitenport des Mikroskops mit einer Digitalkamera (IMAGO-QE, T.I.L.L. Photonics GmbH) unter Kontrolle der TILLvisION-Software aufgenommen. Zur 3D-Analyse wurde ein Piezzo z-Stepper E-662 (Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Karlsruhe/Palmbach) unter Kontrolle des TILLvisION-Systems verwendet.

- ZEISS Stemi SV11

Präparationsmikroskop (Binocular)

- ZEISS LEO 1530 (Rasterelektronenmikroskop)

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden in Kollaboration mit Prof. Dr. Spatz (Physikalische Chemie, Heidelberg) angefertigt.

Digitalkameras:

- Quantix[®] CCD-Digitalkamera Photometrix
- T.I.L.L. ImagoQE TILL-Photonics, München

5.12 Puffer, Medien und Stammlösungen

Zellkultur:

Boratpuffer:	15mM Borsäure in H ₂ O pH=8,4
PBS:	37 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4
PC12-Zellkulturmedium:	10% Pferdeserum (HS) 5% Fötale Kälberserum (FCS) 4mM Glutamin DMEM
HEK293-/NRK- Zellkulturmedium:	10% FCS 4mM Glutamin DMEM
NMEM-B27:	1mM Natrium-Pyruvat 2mM L-Glutamin 0,22% (w/v) NaHCO ₃ (5.5%) 33mM D(+)-Glukose 2% (v/v) B27-Zusatzmedium MEM
Einfriermedium HEK 293-Zellen:	40% FCS 40% HEK293-Zellkulturmedium 20% DMSO
Einfriermedium PC12-/NRK-Zellen:	90% FCS 10% DMSO
SaSo:	40mM Tris/HCl, pH 7,4-7,5 1mM EDTA 250mM NaCl
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,125% Trypsin in HBSS
Fibronektin (Roche, #688851):	100µg/ml Stocklösung in PBS Verwendung 1:10 (PBS) zur Beschichtung von Deckgläsern

poly-L-Lysin (Sigma, P-1524):	1mg/ml Stocklösung in PBS Verwendung 1:10 (PBS) zur Beschichtung von Deckgläsern
poly-D-Ornithin (Sigma, P-3655):	1mg/ml Stocklösung in Boratpuffer Verwendung 1:10 (in H ₂ O) zur Beschichtung von Deckgläsern
Laminin (Sigma, L-2020):	1mg/ml Stocklösung in H ₂ O Verwendung 1:1000 (in NMEM-B27) zur Beschichtung von Deckgläsern

Biochemie:

Lubrol [®] -Extraktionspuffer:	1% (v/v)	Lubrol-PX [®]
	0,18% (w/v)	Phosphatidylcholin
	150mM	NaCl
	5mM	EDTA
	50mM	Tris/HCl, pH=7,4
	0,3mM	PMSF
	1mM	Benzamidin
	10mg	Bacitracin

Saccharose-Dichte-Gradient (5-20%):	5% (w/v)	Saccharose in Lubrol [®] -Extraktionspuffer
	20% (w/v)	Saccharose in Lubrol [®] -Extraktionspuffer

Zuerst 6ml der 5%-Lösung vorlegen, dann mit 6ml der 20%-Lösung unterschichten und anschließend für 2:12min bei 16u/min bei einem Neigungswinkel von 80° im Gradientenmischer mischen.

AMBA-Stammlösung:	300g	Acrylamid
	8g	Bisacrylamid
		auf 1l mit H ₂ O auffüllen

Unter Rühren bei 35°C im Wasserbad lösen, unter Zugabe von 5g Aktivkohle weitere 5min rühren. Anschließend Filtrieren und im Dunkeln bei 4°C lagern.

SDS-PAGE Sammelgel-Puffer:	0,5M	Tris/HCl, pH 6,8
	0,4% (v/v)	SDS

SDS-PAGE Trenngel-Puffer:	1,5M	Tris/HCl, pH 8,8
	0,4% (v/v)	SDS

5× SDS-Probenpuffer:	312,5mM 15% (v/v) 50% (v/v) 16,67% (v/v) 30mM 1mg	Tris/HCl, pH 6,83 SDS Glycerin β-Mercaptoethanol EDTA Bromphenol-Blau
10× SDS-Gellaufpuffer:	1,9M 250mM 1% (v/v)	Glyzin Tris SDS pH=8,8
Gelfärbelösung:	50% (v/v) 0,1% (v/v) 10% (v/v)	Methanol Coomassie blue® R250 Essigsäure
Gelentfärbelösung:	10% (v/v) 10% (v/v)	Isopropanol Essigsäure
Western-Blot-Puffer:	10% (v/v) 20% (v/v)	10× SDS-Gellaufpuffer Methanol H ₂ O
Western-Blot-Blockpuffer:	5% (w/v) 0,2% (v/v)	Magermilchpulver Tween-20® PBS
Western-Blot Papier:	Whatman 3MM Zellulosepapier	
Western-Blot Membran:	Whatman Protran® (0,2µm)	

Molekularbiologie:

TE:	10mM 1mM	Tris/HCl, pH 7.4 EDTA
10x TBE:	890mM 890mM 25mM	Tris-Base Borsäure EDTA
10× DNA- Probenpuffer:	80% 0,1% 0,1%	Glyzerin Brompenolblau Xylenzyanol

Ethidiumbromid-Lösung:	25mg/ml Ethidiumbromid-Stocklösung in H ₂ O für Agarosegele 5µl/100ml Agaroselösung	
TFB I:	100mM	RbCl
	30mM	KOAc
	50mM	MgCl ₂
	10mM	CaCl ₂
	15% (v/v)	Glyzerin
	Einstellen auf pH=5,8; sterilfiltrieren und bei 4°C lagern	
TFB II:	10mM	RbCl
	75mM	CaCl ₂
	10mM	MOPS
	15% (v/v)	Glyzerin
	Einstellen auf pH=7,0; sterilfiltrieren und bei 4°C lagern	
LB-Medium:	10g	NaCl
	10g	Bacto-Trypton
	5g	Bacto-Yeast extract
		pH 7,5
	auf 1l mit Wasser auffüllen	
PNK-Puffer (10×):	0,5M	Tris / HCl (pH 7,5)
	0.1M	MgCl ₂
	50mM	DTT
	10mM	ATP
	0.5mg/ml	BSA
Annealing-Puffer (10×):	200mM	Tris-HCl, pH 7,4
	20mM	MgCl ₂
	500mM	NaCl
Synthese-Puffer (10×):	100mM	Tris-HCl, pH 7,4
	5mM	je dNTP
	10mM	ATP
	50mM	MgCl ₂
	20mM	DTT (Dithiothreitol)
LB-Platten:	LB-Medium mit 15g/l Bacto-Agar	
Ampizillin:	50mg/ml Stocklösung in H ₂ O Verwendung: 1:1000 verdünnt in LB oder LB-Agar	
Kanamycin:	10mg/ml Stocklösung in H ₂ O Verwendung: 1:500 verdünnt in LB oder LB-Agar	
Chloramphenicol	30mg/ml Stocklösung in Ethanol Verwendung 1:1000 verdünnt in LB oder –LB-Agar	

Tetracyclin:	5mg/ml Stocklösung in H ₂ O Verwendung 1:400 verdünnt in LB oder LB-Agar
--------------	--

Transfektion von Neuronen:

NMEM-B27-HEPES:	1mM 2mM 15mM 33mM 2% (v/v)	Natrium-Pyruvat L-Glutamin HEPES, pH=7,7 D(+)-Glukose B27-Zusatzmedium MEM
2×BBS:	50mM 280mM 1,5mM	BES / NaOH, pH=7,05 NaCl Na ₂ HPO ₄
CaCl ₂ -Lösung:	250mM	CaCl ₂

Immunfluoreszenz:

PBS/Ca/Mg:	0,5mM 1mM	MgCl ₂ CaCl ₂ PBS
Blocklösung:	0,2% (w/v)	Gelatine PBS
Blocklösung/Ca/Mg:	0,5mM 1mM 0,2% (w/v)	MgCl ₂ CaCl ₂ Gelatine PBS
Fixierlösung:	4% (w/v) 4% (w/v)	Paraformaldehyd Saccharose PBS
Quenchlösung:	10mM	NH ₄ Cl PBS

5.13 Software

Mac OS 9.1 (Apple, USA)

Windows XP (Microsoft, USA)

Word 2003 (Microsoft, USA)

Excel 2003 (Microsoft, USA)

Illustrator CS2 (Adobe, USA)

Photoshop CS2 (Adobe, USA)

Premiere pro 2.0 (Adobe, USA)

ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)

Imaris v4.1.3 (Bitplane, Schweiz)

DNA-Strider v1.3 (CEA, USA)

Vector NTI Suite v10.0 (Invitrogen, USA)

Endnote v7.0 (Niles Software, USA)

TILLvisION v4.00 build 4745 (T.I.L.L. Photonics GmbH, Deutschland)

6 Methoden

Die folgenden elementaren Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren und Proteinen wurden nach Protokollen methodischer Standardwerke der Biologie durchgeführt (Sambrook, 1989):

- Phenol-Chloroformextraktion von Nukleinsäuren
- Fällern von Nukleinsäuren
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Restriktionsverdau von DNA
- Agarose-Gelelektrophorese

6.1 Molekularbiologie

6.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

Um Plasmid-DNA aufnehmen zu können, wurden die Bakterien zunächst vorbehandelt (Hanahan, 1983). 100ml einer Bakterien-Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,4 - 0,55$) wurden auf Eis gekühlt und in zwei Aliquots 10 Minuten bei 4°C und 3000×g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 30ml kaltem TFB I suspendiert, 10 Minuten auf Eis gekühlt und wie oben zentrifugiert. Die kompetenten Zellen wurden in 4ml kaltem TFB II aufgenommen und in 200µl Aliquots bei -80°C gelagert.

6.1.2 Transformation von Bakterien

Standard-Transformation

Als Transformation wird das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien bezeichnet. Dazu wurden 3-5µl eines Ligationsansatzes oder 10ng zirkuläre Plasmid-DNA mit 100µl kompetenten Bakterien 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 2 Minuten bei 42°C und danach die Zugabe von 800µl LB-Medium. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37°C rotiert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agar-Platten (vorgewärmt und mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt) verteilt. Es folgte

eine Inkubation bei 37°C bis Kolonien sichtbar wurden.

Quick-Transformation (nur bei TG2-Bakterien möglich)

Kompetente Bakterien wurden mit dem kompletten Ligationsansatz oder 20ng zirkulärer Plasmid-DNA mit 100µl kompetenten Bakterien 5 Minuten auf Eis inkubiert und danach direkt auf LB-Agar-Platten (vorgewärmt und mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.1.3 Präparation von Nukleinsäuren

Plasmid-DNA-Schnellpräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde das Qiagen[®] Mini-Präparations-Kit verwendet und die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

Plasmid-DNA-Maxi-Präparation

Zur Gewinnung größerer Mengen sauberer Plasmid-DNA (zum Beispiel für die Transfektion eukaryotischer Zellen) wurden Säulen der Firmen Marligen[®] verwendet. Die Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Aus 400ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden auf diese Weise 600 bis 800µg Plasmid-DNA isoliert.

6.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Herstellung bzw. Amplifikation von DNA-Teilen einer DNA-Matrize. Die Amplifizierung wird unter Ausnutzung der Eigenschaften einer hitzestabilen DNA-Polymerase durchgeführt. Bei den für die vorliegende Arbeit verwendeten DNA-Polymerasen handelt es sich um Enzyme, die eine interne Korrekturfunktion ("proof-reading") beinhalten, die im Falle von falsch eingebauten Nukleotiden während der PCR für eine Korrektur auf Nukleotidebene sorgen. Dadurch weisen diese Enzyme eine 12-fach geringere Fehlerrate bei der Herstellung der Amplifikate gegenüber Enzymen ohne diese Funktion auf. Um eine Verdunstung von Flüssigkeit während der Aufheizperioden zu verhindern, wurde der PCR-Ansatz mit Paraffinöl überschichtet. Da die Amplifikationsbedingungen stark von den Oligonukleotiden und der verwendeten DNA-Matrize abhängen wurden mehrere Ansätze

erstellt, um gleichzeitig unterschiedliche Temperaturen für Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA-Matrize zu ermöglichen. Die der PCR unterzogenen Ansätze wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und über ein Agarosegel aufgetrennt.

PCR mit Pfu-Polymerase (Pfu = *Pyrococcus furiosum*)

Standard-Ansatz :

DNA (100ng/μl)	1μl
Primer 1 (100ng/μl)	2,5μl
Primer 2 (100ng/μl)	2,5μl
DMSO	5μl
MgCl ₂ (2mM)	2μl
dNTP-Mix (je 10mM)	2μl
Pfu-Puffer	10μl
Pfu-DNA-Polymerase	2μl
H ₂ O	73μl

Amplifikationsprotokoll:

96°C	5min	} 30 Zyklen
96°C	30s	
42°C-66°C	1min	
74°C	4min	
74°C	10min	

6.1.5 Mutagenese nach Kunkel et al.

Die Mutagenese nach Kunkel (Kunkel et al., 1991) beruht darauf, dass die zu mutierende DNA in einem Bakterienstamm (CJ236) amplifiziert wurde, der die Mutationen *dut* und *ung*⁻ trägt. Beide Mutationen sind irreversibel und führen durch eine Deaktivierung der dUTPase und Uracil-N-Glykosylase zu einer Anhäufung von dUTP, das während der DNA-Replikation an Stelle des dTTP in die Tochter-Stränge eingebaut wird. Durch die Deaktivierung der Uracil-N-Glykosylase werden die falsch eingebauten Uracil-Nukleotide nicht durch die Bakterien-eigenen Reparaturmechanismen repariert und verbleiben in den synthetisierten Tochter-Plasmiden (Abbildung 8-2). Nachdem die Bakterien dann mit einem M13KO7-Helferphagen infiziert worden sind, wird die Uracil-reiche DNA als Einzelstrang-DNA (ssDNA) in die Phagen verpackt (Abbildung 8-3). Nach der Lyse der Bakterien befinden sich die Phagen im Kulturmedium, werden gefällt und die ssDNA wird isoliert und aufgereinigt. Anschließend werden zur ssDNA komplementäre Mutageneseprimer, die die gewünschte Mutation an der gewünschten Stelle tragen, an die ssDNA angebunden („annealing“) (Abbildung 8-4) und der komplementäre Strang mit Hilfe einer T₇-DNA-Polymerase vervollständigt (Abbildung 8-5). Diese DNA-Polymerase besitzt eine sehr gute

Fehlerkorrektur („proof-reading“-Aktivität), sowie eine sehr niedrige Austausch-Aktivität für den Mutageneseprimer („strand-displacement“-Aktivität), so dass der Mutageneseprimer nicht entfernt wird. Die Vervollständigung des komplementären Strangs erfolgt durch Einbau der zur Verfügung gestellten Nukleotide dTTP, dATP, dGTP und dCTP. Somit entsteht eine Hybrid-DNA, bei der ein Strang noch Uracil-Nukleotide und der komplementäre Strang Thymin-Nukleotide, sowie die gewünschte Mutation enthält (Abbildung 8-5). Nachdem die Hybrid-DNA in einen Bakterienstamm transformiert wurde, der keine Mutationen aufweist, wird der Uracil-reiche Strang der Hybrid-DNA durch die Uracil-N-Glykosylase abgebaut und unter der Verwendung des mutagenen Strangs als Matrize neu synthetisiert (Abbildung 8-6). Die vollständig mutierten DNA-Plasmide werden schließlich nach Standardmethoden isoliert und aufgereinigt. Nach einer Kontrolle der Richtigkeit der Mutation durch Sequenzierung können die mutierten Konstrukte für Experimente verwendet werden.

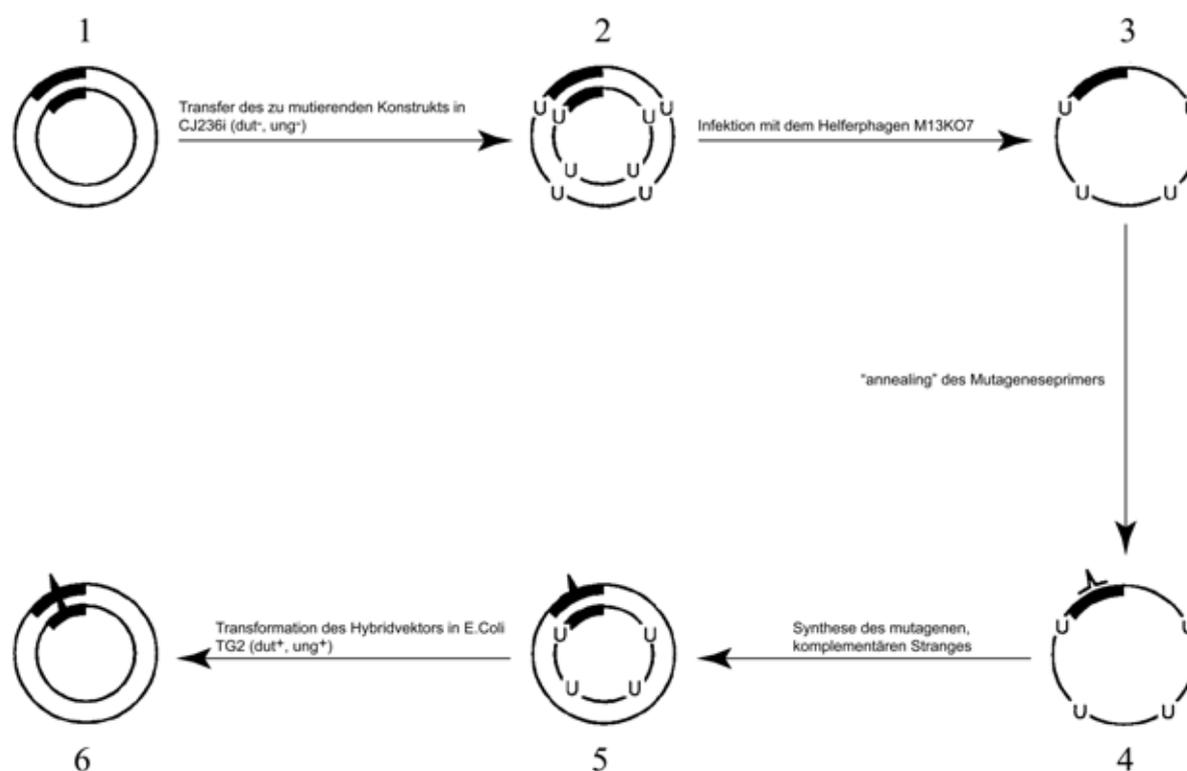


Abbildung 8: Schematische Darstellung der ssDNA-Mutagenese. Ein dut^-/ung^- *Echerichia Coli*-Stamm (CJ236) wird mit einem Plasmid, welches das zu mutierende Konstrukt (1, schwarzer Balken) enthält, transformiert. In diesen Stamm wird während der Replikation des Plasmids dUTP eingebaut (2, U=Uracil). Nach der Infektion der Bakterien mit dem Helferphagen M13KO7 wird ein Strang des Plasmids in die Phagenhüllen verpackt (3). Die einzelsträngige DNA (ssDNA) wird aus den Phagen isoliert und aufgereinigt. Dann wird ein Mutageneseprimer, der einen nicht komplementären Abschnitt enthält, an die ssDNA angeheftet (4). Dann folgt *in vitro* die Vervollständigung des komplementären Strangs mit der Uracil-DNA als Matrize (5). Die entstandene Hybrid-DNA wird schließlich in einen dut^+/ung^+ *Echerichia Coli*-Stamm (z.B. TG2) transformiert, der die Uracil enthaltende DNA abbaut und durch Thymin-DNA ersetzt (6).

Nachfolgend ist das Protokoll zur Mutagenese von DNA-Konstrukten nach der oben beschriebenen Methode tabellarisch dargestellt:

Benötigte Materialien:

- E-Coli-Klon: CJ236 Cam^R
- „wt“ E.Coli-Klon: TG2 Tet^R
- Helfer-Phage: M13KO7 Kan^R
- LB-Agar-Platten, LB-Medium
- Antibiotika (Chloramphenicol (Cam), Ampizillin (Amp), Kanamycin (Kan), evtl Tetracyclin (Tet))

Protokoll:

I. Herstellung und Aufreinigung der ssDNA

TAG 1:

- Cj236 mit zu mutierender DNA transformieren und über Nacht (ÜN) auf LB-Platten (immer mit Chloramphenicol (Cam) versetzt) inkubieren.

TAG 2:

- einzelne Klone picken und DNA überprüfen. Wenn die DNA in Ordnung ist, dann eine ÜN-Kultur (5ml) in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (zusätzlich zu Cam) ansetzen.

TAG 3:

- morgens 100µl der ÜN-Kultur in 10ml LB-Medium (mit Antibiotika) überimpfen und bis zu einer $OD_{600}=0,6-0,8$ (ca. 5-7h) inkubieren
- 2ml davon in 100ml vorgewärmtes LB-Medium (OHNE Antibiotika) überimpfen und mit $7,5 \times 10^9$ pfu von M13KO7 Phagen versetzen.
- nach 1h bei 37°C Kanamycin (Endkonzentration: 70µg/ml) zugeben.
- ÜN schütteln bei 37°C

TAG 4:

- Bakterien in entsprechendem Rotor und in entsprechenden Tubes abzentrifugieren. z.B. 15min bei 10.000 u/min, 4°C im JLA 16.250!
- Überstand in 50ml Röhrchen überführen und nochmals bei $2000 \times g$ für 20min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand (32ml) mit 8ml 20% PEG₆₀₀₀/2,5M NaCl versetzen und
- 30min auf Eis inkubieren

- 60min bei $2000 \times g$, 4°C zentrifugieren
- Überstand abnehmen und nochmals für 3min bei $2000 \times g$ bei 4°C zentrifugieren
- Phagenpellet in 0,8ml TE lösen
- in 2ml Eppendorf-Gefäß mit 0.8ml Phenol/TE 2min stark vortexen
- 5min bei 13.000 u/min (Tischzentrifuge) bei RT zentrifugieren
- Überstand mit 0,8ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 2min stark vortexen
- 5min bei 13.000 u/min (Tischzentrifuge) bei RT zentrifugieren
- solange wiederholen bis keine Interphase mehr sichtbar ist
- ÜS (0.5ml) im 2ml Eppi + $50\mu\text{l}$ 3M Natrium-Acetat + 1,35ml 100% EtOH fällen
- 15min bei -20°C inkubieren
- 15min bei 13.000 u/min (Tischzentrifuge) bei RT zentrifugieren
- Pellet mit 70% Ethanol waschen, 5min zentrifugieren bei 13.000 u/min, trocknen und in $30\mu\text{l}$ TE lösen

II. Mutagenesereaktion

1. Oligokinasierung:

Wenn die Primer am 5'-Ende phosphoryliert sind, entfällt dieser Schritt!

Ansonsten:

- 200pmol Primer
- + $3\mu\text{l}$ PNK Puffer + $3\mu\text{l}$ 10mM ATP + $1.5\mu\text{l}$ BSA (1mg/ml)
- + H_2O ad 30ml
- 5U T_4 -Polynukleotidkinase
- Inkubation 30min bei 37°C dann 10min bei 70°C (Deaktivierung der PNK)

2. Annealing:

- $0,5\mu\text{g}$ ssDNA
- + $1\mu\text{l}$ kinasiertes Oligo
- + $1\mu\text{l}$ 10x Annealing buffer
- + H_2O ad $10\mu\text{l}$
- Inkubation bei 70°C für 3min, dann langsam im Wasserbad auf 37°C abkühlen lassen
- kurz zentrifugieren dann wieder für 15min bei 37°C im Wasserbad inkubieren

3. *Synthese:*

- Annealing-Reaktion auf Eis stellen
- +1.3µl 10x Synthesepuffer
- +1µl T₄-Ligase (10U)
- +1U T₇-Polymerase
- Inkubation 5min auf Eis, 5min Raumtemperatur und dann für 90min bei 37°C
- Transformation in TG2

6.1.6 MEGA-Primer Mutagenese

Im Gegensatz zur Mutagenese nach Kunkel et al. kann bei dieser Methode mit Hilfe einer PCR und insgesamt vier Primern, wovon zwei die Mutation enthalten müssen, relativ schnell eine spezifische Mutation durchgeführt werden. Als Primer werden zwei das Konstrukt flankierende Primer (Abbildung 9, a+d) benötigt, die den Amplifikationsbereich festlegen. Des Weiteren werden zwei Mutageneseprimer benötigt, die zueinander in der zu mutierenden Region komplementär sein müssen (Abbildung 9, b+c). In einer ersten PCR mit jeweils einem flankierenden Primer und einem Mutageneseprimer werden zwei „MEGA-Primer“ synthetisiert, die jeweils die Mutation enthalten (Abbildung 9 (1) und (2), AB und CD). Dann erfolgt eine PCR, bei der die beiden amplifizierten MEGA-Primer zusammen mit den beiden flankierenden Primern verwendet werden und das gewünschte mutierte Produkt bilden (Abbildung 9 (3)).

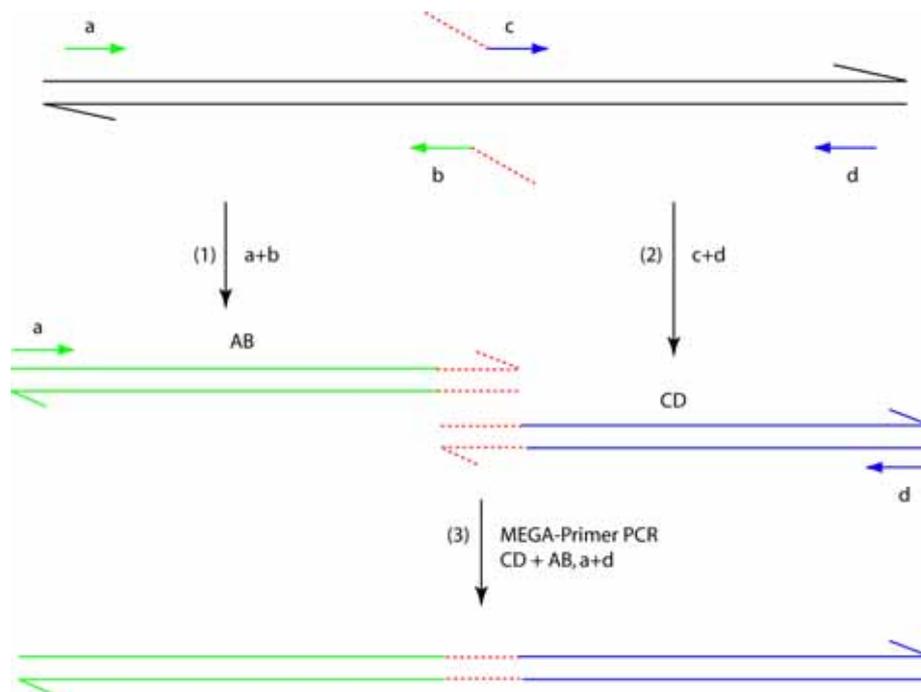


Abbildung 9: Schematische Abbildung der Funktionsweise der Mutagenese mittels MEGA-Primer-PCR. a,d, flankierende Primer; b,c, Mutageneseprimer mit Insertionssequenz; rote gepunktete Linie, Insertionssequenz; AB, CD, MEGA-Primer, mit überlappender Insertionssequenz.

Protokoll:

Reaktion 1 (MEGA-Primer Synthese):

Ansatz 1:

DNA (100ng/ μ l)	1 μ l	} ergibt MEGA-Primer „AB“
Primer a (100ng/ μ l)	2,5 μ l	
Primer b (100ng/ μ l)	2,5 μ l	
DMSO	5 μ l	
MgCl ₂ (2mM)	2 μ l	
dNTP-Mix (je 10mM)	2 μ l	
Pfu-Puffer	10 μ l	
Pfu-DNA-Polymerase	2 μ l	
H ₂ O	73 μ l	

Ansatz 2:

DNA (100ng/ μ l)	1 μ l	} ergibt MEGA-Primer „CD“
Primer c (100ng/ μ l)	2,5 μ l	
Primer d (100ng/ μ l)	2,5 μ l	
DMSO	5 μ l	
MgCl ₂ (2mM)	2 μ l	
dNTP-Mix (je 10mM)	2 μ l	
Pfu-Puffer	10 μ l	
Pfu-DNA-Polymerase	2 μ l	
H ₂ O	73 μ l	

Für beide Ansätze wurde folgendes Amplifikationsprotokoll verwendet:

96°C	5min	} 15 Zyklen
96°C	30s	
56°C	1min	
74°C	4min	
74°C	10min	

Die erhaltenen Amplifikate wurden über ein einprozentiges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende Bande extrahiert und aufgereinigt und in Reaktion 2 verwendet.

Reaktion 2 (Synthese des mutierten Produkts):

Ansatz:

MEGA-Primer „AB“	1 µl	} ergibt mutiertes Produkt
MEGA-Primer „CD“	1 µl	
Primer a (100ng/µl)	2,5 µl	
Primer d (100ng/µl)	2,5 µl	
DMSO	5 µl	
MgCl ₂ (2mM)	2 µl	
dNTP-Mix (je 10mM)	2 µl	
Pfu-Puffer	10 µl	
Pfu-DNA-Polymerase	2 µl	
H ₂ O	72 µl	

Für diesen Ansatz wurde folgendes Amplifikationsprotokoll verwendet:

96°C	5min	} 25 Zyklen
96°C	30s	
56°C	1min	
74°C	4min	
74°C	10min	

Das erhaltene Amplifikat wurde dann über ein einprozentiges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende Bande extrahiert und aufgereinigt. Die erfolgreiche Mutation wurde durch Sequenzierung überprüft.

6.2 Zellbiologie

6.2.1 Kultivierung von PC12-Zellen

PC12-Zellen wurden in PC12-Zellkulturmedium bei 37°C / 10% CO₂ kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 5 bis 10 Minuten in 0.25% Trypsin/EDTA, pH 7.2 inkubiert und in 5ml Medium aufgenommen und 5 Minuten bei 250×g abzentrifugiert. Vor dem Ausplattieren (PC12-Zellen 1:7) mussten PC12-Zellen zur Vereinzelung 50 mal durch eine verengte Pasteurpipette auf- und abpipettiert werden. In allen Versuchen wurden PC12-Zellen der Passagen 10-20 verwendet.

6.2.2 Einfrieren von PC12-Zellen

Zum Einfrieren wurden trypsinierte und in Medium aufgenommene Zellen fünf Minuten bei 250×g abzentrifugiert und in eiskaltem Einfriermedium für PC12-/NRK-Zellen aufgenommen. Die Aliquote wurden in gekühlte Nunc-Kryoröhrchen gegeben und in einer Styroporbox zunächst bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

6.2.3 Kultivierung von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden in HEK293-/NRK-Zellkulturmedium bei 37°C / 5% CO₂ kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 5 bis 10 Minuten in SaSo, pH 7,4 inkubiert und in 5ml Medium aufgenommen und 5 Minuten bei 250×g abzentrifugiert. Vor dem Ausplattieren mussten die HEK293-Zellen zur Vereinzelung 20mal durch eine Pasteurpipette auf- und abpipettiert werden. In allen Versuchen wurden HEK293-Zellen der Passagen 28-35 verwendet.

6.2.4 Einfrieren von HEK293-Zellen

Die Zellen werden mit SaSo von der Zellkulturschale abgelöst und fünf Minuten bei 250×g abzentrifugiert. Die Zellzahl wird mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen werden erneut 5 Minuten bei 250×g abzentrifugiert. Danach werden die Zellen so in

HEK293-Einfriermedium resuspendiert, dass man eine Zellzahl von 6×10^6 Zellen/ml erhält. Die Zellen werden daraufhin in 500µl Aliquote bei -80°C langsam eingefroren. Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

6.2.5 Kultivierung von NRK-Zellen

NRK-Zellen wurden in HEK293-/NRK-Zellkulturmedium bei 37°C / 5% CO_2 kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen 2mal mit PBS gewaschen, für 15 Minuten in 0.25% Trypsin/EDTA, pH 7.2 inkubiert und in 5ml Medium aufgenommen. Dann wurden die Zellen für 5 Minuten bei $250 \times g$ abzentrifugiert. Vor dem Ausplattieren mussten die NRK-Zellen zur Vereinzelnung 20mal mit einer 1ml Gilson[®]-Pipette auf- und abpipettiert werden. In allen Versuchen wurden NRK-Zellen der Passagen 19-23 verwendet.

6.2.6 Einfrieren von NRK-Zellen

Die Zellen werden mit 0,25% Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und fünf Minuten bei $250 \times g$ abzentrifugiert. Die Zellzahl wurde mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen werden erneut 5 Minuten bei $250 \times g$ abzentrifugiert. Danach werden die Zellen zu einer Zelldichte von 6×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium verdünnt. Die Zellen werden daraufhin in 500µl Aliquote bei -80°C langsam eingefroren. Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt

6.2.7 Transfektion von HEK293-Zellen

Eine Zellkulturschale ($\text{Ø}15\text{cm}$) mit HEK293-Zellen, die eine Konfluenz zwischen 70 und 80% aufweist wurde zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 2ml SaSo für 10min bei 37°C / 5% CO_2 inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 2ml HEK-Medium von der Zellkulturschale mit einer 10ml Pipette abgespült und in ein 15ml Röhrchen überführt und anschließend für 5 Minuten bei $250 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1,8ml vorgewärmter PBS-Lösung mit einer Pasteurpipette durch 15-maliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden anschließend je 0,8ml mit einer Zelldichte von $2-3 \times 10^7$ Zellen in eine Elektroporationsküvette überführt. Dann wurde die entsprechende Menge zirkularisierte cDNA hinzu gegeben (30µg bei einer

Einzeltransfektion, 50µg bei Mehrfachtransfektionen) und das Zellen-DNA-Gemisch dreimal durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren weiter resuspendiert. Anschließend wurde die DNA-Zell-Suspension mit einer Spannung von 0.260 kV und einer Kapazität von 960µF elektroporiert. Die Zellen wurden anschließend in vorgewärmtem HEK-Medium aufgenommen und auf mit Fibronectin beschichtete Deckgläschen oder LabTek™-Kammern ausplattiert und anschließend für 24 – 48 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert.

6.2.8 Präparation und Kultivierung hippokampaler Neurone

Die Präparation der Hippokampi erfolgte wie bei (Banker et al., 1988) beschrieben. Die isolierten Hippokampi wurden in einem 15ml Röhrchen, das mit 5ml HBSS gefüllt war, gesammelt. Für die Weiterverarbeitung wurde das HBSS vorsichtig abgesaugt. Die Hippokampi wurden dann mit 1ml Trypsin/EDTA versetzt, für 20 Minuten bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und anschließend nach Zugabe von 2ml NMEM-B27 unter Zuhilfenahme einer 10ml Pipette durch 20-maliges Auf- und Abpipettieren vorsichtig dissoziiert. Die Suspension wurde dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sich eventuell vorhandene Aggregate und Hirnhautreste absetzten, die vereinzelt Neurone aber in Suspension bleiben. Der Überstand wurde dann in ein neues 15ml Röhrchen überführt, mit 12ml NMEM-B27 versetzt und anschließend bei 250×g für 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde dann in 1ml NMEM-B27 mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit konditioniertem NMEM-B27 auf 10ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Mit Hilfe einer Neubauer™-Zählkammer wurde dann die Zellkonzentration bestimmt und auf die gewünschte Konzentration mit konditioniertem NMEM-B27 verdünnt und anschließend auf zuvor über Nacht mit Laminin / poly-D-Ornithin beschichtete Deckgläschen in „24-Well“-Schalen oder LabTek™-Kammern ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel mit konditioniertem NMEM-B27 durchgeführt.

6.2.9 Präparation und Kultivierung primärer Astrozyten aus E18-Rattenembryonen

Zunächst wurden E18-Rattenembryonen dekapitiert, die Schädeldecke entlang des Schädelmedians geöffnet und die beiden Großhirnhälften entnommen. Jeder Großhirnhälfte wurde die Hippokampus-Region entnommen, die für die spätere Weiterverarbeitung in HBSS auf Eis gelagert wurde. Die Großhirnhemisphären wurden von den Meningen befreit und je

ein Großhirn wurde in einem 15ml Röhrchen, welches 2ml HBSS enthielt, gesammelt. Zur weiteren Verarbeitung wurde die HBSS-Lösung vorsichtig abgesaugt und durch 1ml DNase-Lösung (0.5mg DNase / 1ml HBSS) ersetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Hirne wurden dann mit Hilfe einer 10ml Pipette durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren grob dissoziiert. Zur weiteren Vereinzelnung wurden die grob dissoziierten Hirne mit 1ml Trypsin/EDTA für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach mit 10ml DMEM / 10% FCS versetzt und dann für 10 Minuten bei 500×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10ml DMEM / 10% FCS resuspendiert und anschließend in poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturflaschen der Firma Nunc ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C / 5% CO₂ für insgesamt 12 Tage inkubiert und jeweils an Tag 2, 3 und 8 das Zellkulturmedium gewechselt um tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Zusätzlich wurden an Tag 8 nach dem Ausplattieren die Flaschen verschlossen und leicht auf einen harten Untergrund geschlagen. Die in Kultur befindlichen Neurone und Mikrogliazellen lösen sich bei diesem Vorgang ab, wobei die im Vergleich zu Neuronen und Mikrogliazellen fest adhären Astrozyten nicht abgelöst werden können und in der Flasche verbleiben. Das Medium wird dann gegen frisches DMEM / 10% FCS ausgetauscht und bis zu Tag 12 weiter bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. An Tag 12 sollte sich ein konfluenter „Monolayer“ aus Astrozyten ausgebildet haben. Die Astrozyten wurden dann unter Zugabe von 2ml Trypsin/EDTA und 30-minütiger Inkubation bei 37°C / 5% CO₂ von der Zellkulturschale gelöst, in einem 15ml Röhrchen gesammelt und anschließend bei 250×g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2ml DMEM / 10% FCS resuspendiert und anschließend in 18ml DMEM / 10% FCS verdünnt. Die erhaltenen 20ml Zellsuspension wurden auf zwei Zellkulturschalen (Ø10cm) verteilt. Die Zellen wurden dann für sieben Tage bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Nach drei Tagen wurde das Medium gegen frisches DMEM / 10% FCS getauscht. Während diesen sieben Tagen erfolgt eine weitere Differenzierung der Astrozyten. Danach wird das DMEM / 10% FCS gegen NMEM-B27 ausgetauscht um ein Astrozyten-konditioniertes Neuronen-Zellkulturmedium zu erhalten.

6.2.10 Transfektion von hippokampalen Neuronen

Die Transfektion kultivierter hippokampaler Neurone erfolgte mittels einer angepassten DNA-Kalzium-Phosphat-Präzipitation (Goetze et al., 2004). Für die Transfektion wurden Neurone verwendet, die zuvor in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² auf Laminin/poly-D-Ornithin beschichtete LabTek™-Kammern bzw. Deckgläschen ausplattiert worden sind. Für

die Transfektion konnten Neuronen verwendet werden, die bis zu 14 Tagen in Kultur waren. Abhängig von ihrem Alter, konnten Transfektionseffizienzen zwischen 1% (1 Tag) bis zu 20% (9-12 Tage) beobachtet werden. Um mögliche CO₂-Schwankungen und die daraus folgenden pH-Wert-Differenzen ausschließen zu können, erfolgte die Transfektion in einem CO₂ unabhängigen, HEPES gepufferten Kulturmedium. Für die Transfektion wurde das Zellkulturmedium der Neurone (NMEM-B27) durch 500µl Transfektionsmedium pro Kammer (NMEM-B27-HEPES, pH 7.7) ersetzt und die Zellen für 20 Minuten bei 37°C / 0% CO₂ inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Präzipitat vorbereitet. Hierzu wurden pro LabTek™-Kammer 15µl einer CaCl₂-Lösung (250mM) mit 0,5µg zirkulärer cDNA (Gesamtmenge) vermischt und anschließend 15µl 2xBBS (pH 7.05) unter ständigem Mischen hinzu pipettiert. Die angegebenen Mengen können nach Belieben skaliert werden. Anschließend wird pro LabTek™-Kammer die gesamte Menge der Präzipitat-Lösung (insgesamt 30µl) unter leichtem Schütteln der Kammer zu dem vorgelegten Transfektionsmedium pipettiert und direkt für 1-2 Stunden bei 37°C / 0% CO₂ inkubiert. Die Dauer der Inkubation hängt entscheidend von der Größe des Präzipitats ab. Sobald das Präzipitat eine durchschnittliche Größe von 250 bis 500nm erreicht hat (ca. die Hälfte des Durchmessers eines Neuriten) ist die Reaktion sofort durch Waschen mit HBSS-HEPES (pH 7.3) zu stoppen. Hierzu wird das NMEM-B27-HEPES vorsichtig abgesaugt und durch 500µl HBSS-HEPES (pH 7.3) ersetzt gefolgt von einer anschließenden Inkubation für 20 Minuten bei 37°C/0% CO₂. Danach wird das HBSS-HEPES (pH 7.3) durch NMEM-B27 ersetzt und die Neuronen für 24 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert.

6.2.11 Elektrophysiologie

Transfizierte HEK293-Zellen wurden für 48 Stunden auf Fibronectin beschichteten Deckgläschen kultiviert und für die elektrophysiologische Untersuchung auf den Objektisch eines Inversmikroskopes transferiert. Die Zellen wurden kontinuierlich mit einer Lösung bestehend aus 136mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl₂ und 5mM HEPES (=externe Lösung; pH 7.25 –eingestellt mit NaOH) perfundiert (Abbildung 10). Fluoreszierende Zellen wurden mittels der „whole-cell“-Konfiguration der „patch-clamp“-Technik untersucht. Die interne Lösung der Pipette beinhaltete 140mM CaCl, 10mM HEPES, 10mM EGTA und 2mM Adenosin-Triphosphat (ATP, Mg²⁺-Salz; pH 7.25 – eingestellt mit CaOH). Für die GABA-Applikation wurden 30µM γ -Aminobuttersäure (GABA) in der externen Lösung gelöst und für 20ms mit Hilfe einer Piezo-gesteuerten, Applikationspipette, die zwei Kanäle besitzt, zu

den von Substrat gelösten Zellen appliziert. GABA_A-Rezeptor vermittelte Ströme wurden bei einem festgesetzten Potential von -60mV bei Raumtemperatur aufgezeichnet.

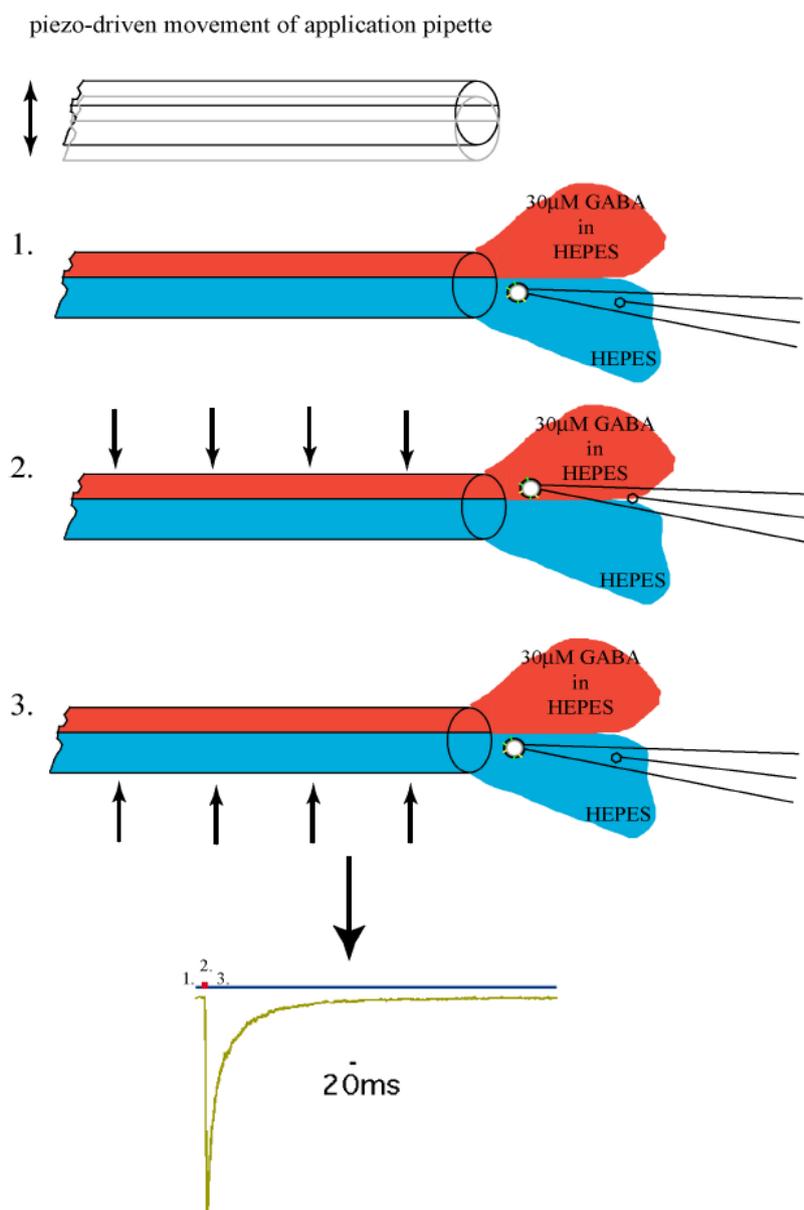


Abbildung 10: Elektrophysiologische Messungen mit Hilfe einer Doppelkammer-Applikationspipette. Die Applikationspipette besteht aus zwei Kammern, durch die entweder eine HEPES gepufferte Salzlösung ohne GABA (blau) bzw. mit 30 μM GABA (rot) gepumpt wird. Die Applikationspipette selbst kann mit Hilfe einer Piezo-Steuerung innerhalb weniger Millisekunden in vertikaler Richtung bewegt werden. **(1)** Zur elektrophysiologischen Ableitung wird die zu untersuchende Zelle (Kreis) mit der Ableitungspipette im „whole-cell“-Verfahren „gepatcht“ und damit auch gleichzeitig fixiert. Die Applikationspipette befindet sich zunächst in einer Position, dass die „gepatchte“ Zelle mit der Lösung ohne GABA umspült wird. In dieser Stellung wird die Nullableitung vorgenommen. **(2)** Mittels eines elektrischen Impulses bewegt sich die Piezo-gesteuerte Applikationspipette so, dass die zu untersuchende Zelle jetzt für ca. 20ms mit der GABA-angereicherten Salzlösung umspült wird. Während dieses Augenblicks erfolgt die Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren, was sich in einem verstärkten Einstrom negativ geladener Chlorid-Ionen und somit in einem negativen Stromfluss äußert. **(3)** Direkt im Anschluss bewegt sich die Applikationspipette wieder in ihre Ausgangsposition und die zu untersuchende Zelle wird wieder mit der HEPES-gepufferten Salzlösung umspült. Während dieser Regenerationsphase gehen die aktiven GABA_A-Rezeptoren wieder in ihre inaktive (impermeable) Form über und der Chlorid-Einstrom kommt zum Erliegen.

6.2.12 Standard-Immunfluoreszenzfärbung

Das Prinzip beruht auf der Markierung von Epitopen mit Hilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper. Man verwendet dazu einen nicht markierten, primären Antikörper, der das Epitop erkennt. Ein sekundärer, fluoreszenzmarkierter, Antikörper ist gegen den primären Antikörper gerichtet. Da mehrere Antikörper an einen primären Antikörper binden, führt diese Methode zu einer Signalverstärkung.

Die Zellen werden zuerst fixiert, dann wird die Zellmembran durch Detergenzien teilweise permeabilisiert. Anschließend wird die Antikörpermarkierung durchgeführt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann die Lokalisierung der Antikörper und damit der markierten Proteine analysiert werden.

Protokoll:

- Waschen der Zellen mit PBS
- fixieren mit Fixierlösung für 30min
- stoppen der Fixierreaktion mit Quenclösung für 10min
- Waschen mit PBS
- permeabilisieren der Zellen durch 0,2% (w/v) Triton-X-100 / PBS für 5min
- Waschen mit PBS
- 2x Waschen mit Blocklösung
- inkubieren mit Blocklösung für 10min
- auf Parafilm[®] werden 15µl des in Blocklösung entsprechend verdünnten Primärantikörpers aufgetragen
- die Deckgläschen werden mit den Zellen nach unten jeweils auf einen Tropfen der Antikörperlösung gelegt und unter Lichtabschluß in Wasser-gesättigter Atmosphäre für 30min inkubiert
- 2x Waschen mit Blocklösung
- inkubieren mit dem in Blocklösung entsprechend verdünnten Sekundärantikörper in Wasser-gesättigter Atmosphäre für 30min
- 3x Waschen mit Blocklösung
- 2x Waschen mit PBS
- auf Objektträger jeweils einen 5µl Mowiol[®] pro Deckgläschen vorlegen
- Deckgläschen kurz in destilliertes Wasser tauchen, überschüssiges Wasser mit einem Papiertuch vom Rand her absaugen und mit den Zellen nach unten luftblasenfrei auf den Mowioltropfen legen.
- mindestens 1h bei 37°C oder über Nacht im Kühlschrank aushärten lassen

6.2.13 Oberflächenimmunfluoreszenzfärbung

Bei der Oberflächenfärbung von Zellen ist es wichtig, dass die Zellen bei der Inkubation mit dem Primärantikörper noch leben, da durch eine Fixierung die Plasmamembran permeabilisiert werden könnte. Eine ungewollte Detektion von intrazellulär liegenden Epitopen des zu untersuchenden Proteins wäre die Folge.

Für die Oberflächenimmunfluoreszenzfärbung wurden die zu färbenden, lebenden Zellen, die sich auf Deckgläschen befanden, auf eine eisgekühlte Metallplatte transferiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit eiskalter PBS-Lösung, die 1mM CaCl₂ und 0.5mM MgCl₂ enthält (PBS-Ca-Mg), gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindestellen durch fünfminütige Inkubation mit PBS-Ca-Mg / 2% Gelatine (w/v) (Blocklösung-Ca-Mg) geblockt. Danach wurde der Primärantikörper (gelöst in PBS-Ca-Mg / 2% Gelatine (w/v)) direkt auf die Zellen gegeben und die Zellen wurden für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Antikörperlösung vorsichtig abgesaugt und die Zellen zunächst zweimal mit eiskalter Blocklösung-Ca-Mg, dann zweimal mit eiskalter PBS-Ca-Mg gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd / 4% Saccharose auf Eis für 20 Minuten fixiert. Alle folgenden Schritte konnten nun bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Um die Fixierreaktion zu stoppen, wurden die Zellen für 10 Minuten mit 50mM NH₄Cl inkubiert und anschließend zunächst zweimal mit PBS gewaschen und dann mit Blocklösung (PBS / 2% Gelatine) für 5 Minuten inkubiert. Der in Blocklösung gelöste Sekundärantikörper wurde dann für 30 Minuten auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann zweimal mit Blocklösung und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit den Zellen kurz in Millipore®-Wasser getaucht und schließlich in Mowiol® auf Glas-Objektträger eingebettet.

6.2.14 Entwässern und Fixieren von Zellen für REM-Aufnahmen

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit 2,5% Glutaraldehyd / 0,1M Na-Cacodylat (pH 7,4) für 15 Minuten fixiert. Anschließend erfolgte eine Entwässerung der Proben nach folgendem Schema:

1. Ethanol 50% 20 Minuten
2. Ethanol 60% 20 Minuten
3. Ethanol 70% 20 Minuten

4. Ethanol 80% 20 Minuten
5. Ethanol 90% 20 Minuten
6. Ethanol 100% 20 Minuten

Bei Bedarf können die Proben bei 4°C gelagert werden. Wichtig ist, dass die Proben in diesem Zustand nicht austrocknen dürfen.

6.2.15 Kritisch-Punkt-Trocknung und Kohlenstoffbedampfung der Proben für REM-Aufnahmen (in Kollaboration mit Prof. Dr. Spatz (Physikalische Chemie, Heidelberg))

Die nachfolgende Beschreibung der Probenaufbereitung für die REM-Analyse wurde freundlicherweise von Dipl. Chem. Marcus Patrick Abel (AG Prof. Dr. Spatz, Physikalische Chemie, Heidelberg) durchgeführt. Die sich in 100-prozentigem Ethanol befindlichen Proben wurden zügig in den Probenhalter gesteckt und in die Kammer der kritischen Punkt-Trocknung gestellt. Die Probenkammer wurde mit 100-prozentigem Ethanol bis zur Hälfte befüllt und anschließend verschlossen. Nachdem eine Solltemperatur von 10°C erreicht wurde, strömt CO₂ in die Kammer ein. Das Mediumgemisch wurde 2 Minuten durchmischt und anschließend soweit abgelassen, dass die Proben gerade noch von der Flüssigkeit bedeckt waren. Anschließend wurde ein Teil des Ethanols durch das Ablassventil entfernt. Dieser Vorgang des Austausches von Ethanol gegen CO₂ wurde insgesamt 12 mal wiederholt. Dann wurde die Probenkammer auf 40°C erwärmt, wobei nach Überschreiten des kritischen Punktes von 38°C das Ablassventil geöffnet und das CO₂ langsam und kontrolliert abgelassen wurde, bis Atmosphärendruck in der Kammer herrscht. Die Proben wurden nun aus der Kammer entnommen und mit Hilfe einer Besputter-Anlage mit Kohlenstoff bedampft.

6.2.16 Celltracker™green/DiD-Färbung von Zellen für die Durchflusszytometrie:

NRK-Zellen:

Zwei Zellkulturschalen mit NRK-Zellen mit einer Konfluenz von maximal 70-80% wurden 2 mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,25% Trypsin/EDTA für 15 Minuten bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden in HEK293-/NRK-Zellkulturmedium aufgenommen (in zwei Röhrchen) und für 5 Minuten bei 250×g zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen. Ein Zellpellet wurde dann für die beiden unterschiedlichen Färbungen nach den folgenden Protokollen bearbeitet:

DiD-Färbung:

- Pellet in 1ml PBS aufnehmen und mit einer 1ml Gilson[®]-Pipette 20 mal resuspendieren
- 2µl DiD-Lösung unter Schütteln hinzu pipettieren und für 10 Minuten bei 37°C inkubieren. Alle 2-3 Minuten invertieren um ein Zusammenklumpen der Zellen zu verhindern
- mit PBS auffüllen und für 5 Minuten bei 250×g zentrifugieren
- Pellet 5 mal mit PBS waschen
- Pellet nochmals 2mal mit HEK293-/NRK-Zellkulturmedium waschen
- Pellet in HEK293-/NRK-Zellkulturmedium resuspendieren und die Zellzahl bestimmen

CelltrackerTM-green Färbung:

- Pellet in 1ml HEK293-/NRK-Zellkulturmedium (enthält 2µM CelltrackerTM-green) aufnehmen und mit einer 1ml Gilson[®]-Pipette 20mal resuspendieren
- für 30 Minuten bei 37°C inkubieren und alle 5 Minuten Röhren invertieren
- nach den 30 Minuten mit HEK93-/NRK-Zellkulturmedium auffüllen und bei 250×g für 5 Minuten zentrifugieren
- Pellet in 10ml HEK293-/NRK-Zellkulturmedium resuspendieren und für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubieren und danach bei 250×g für 5 Minuten zentrifugieren
- Pellet in HEK293-/NRK-Zellkulturmedium resuspendieren und die Zellzahl bestimmen

Von beiden Populationen wurden Kontrollkulturen ausplattiert, die entweder nur CelltrackerTM-green gefärbte Zellen oder nur DiD gefärbte Zellen enthalten. Pro Kontrollkultur wurden 250.000 Zellen in eine Ø3,5cm Schale ausplattiert. Bei Kokulturen von DiD-gefärbten und CelltrackerTM-green gefärbten Zellen wurden von jeder Population 125.000 Zellen in Zellkulturschalen (Ø3,5cm) ausplattiert. Die Kulturen wurden anschließend für insgesamt 6 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Nach 30 Minuten wurden zu einigen Kokulturen die folgenden Zytoskelettgifte in den beschriebenen Endkonzentrationen hinzu gegeben:

- Latrunculin-B (Endkonzentration 5µM)
- BDM (Endkonzentration 10mM)
- Cytochalasin D (Endkonzentration 10µM)
- Phalloidin (Endkonzentration 5µM)
- Nocodazol (Endkonzentration 5µM)

Nach der sechsstündigen Inkubation wurden die Zellen jeder Schale mit 0,25ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in 0,25ml PBS in separate Röhren aufgenommen und auf Eis gelagert. Es erfolgte die Analyse am FACS-Gerät.

Neuronale Zellen:

DiD-Färbung von Astrozyten:

5 Zellkulturschalen (\varnothing 10cm) mit Astrozyten wurden 2mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,25% Trypsin/EDTA für 15 Minuten bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden in HEK293-/NRK-Zellkulturmedium aufgenommen und für 10 Minuten bei 250×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde dann nach folgendem Protokoll gefärbt:

- Pellet in 1ml PBS aufnehmen und mit einer 1ml Gilson[®]-Pipette 10 mal resuspendieren
- 2µl DiD-Lösung unter Schütteln hinzu pipettieren und für 15 Minuten bei 37°C inkubieren. Alle 2-3 Minuten invertieren um ein Zusammenklumpen der Zellen zu verhindern
- mit PBS auffüllen und für 5 Minuten bei 250×g zentrifugieren
- Pellet 5 mal mit PBS waschen
- Pellet nochmals 2 mal mit HEK293-/NRK-Zellkulturmedium waschen
- Pellet in HEK293-/NRK-Zellkulturmedium resuspendieren und die Zellzahl bestimmen

CelltrackerTM-green-Färbung von Neuronen:

Hippokampale Neurone wurden wie in Abschnitt 6.2.8 beschrieben präpariert und mit einer Gesamtzellzahl von 200.000 Zellen auf Laminin/poly-D-Ornithin beschichtete \varnothing 3,5cm Zellkulturschalen ausplattiert und über Nacht bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann mit CelltrackerTM-green (gelöst in NMEM-B27 (5µM Endkonzentration)) für 30 Minuten bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen einmal mit frischem NMEM-B27 gewaschen und für weitere 30 Minuten mit frischem NMEM-B27 inkubiert.

Zu den gefärbten Neuronen wurden dann die DiD gefärbten Astrozyten (100.000 pro Ø3,5cm Schale) zugegeben und für insgesamt 6 Stunden inkubiert. Nach 30 Minuten wurden dann folgende Zytoskelettgifte in den beschriebenen Endkonzentrationen hinzu gegeben:

- Latrunculin-B (Endkonzentration 5µM)
- BDM (Endkonzentration 10mM)
- Cytochalasin D (Endkonzentration 10µM)
- Phalloidin (Endkonzentration 5µM)
- Nocodazol (Endkonzentration 5µM)

Nach der sechsstündigen Inkubation wurden die Zellen jeder Schale mit 0,5ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, in 0,5ml PBS resuspendiert und anschließend auf 1ml einer zweiprozentigen, eiskalten Ficoll™-Lösung geschichtet. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 250×g (4°C) wurde der Überstand verworfen und das nahezu unsichtbare Pellet in 0,4ml eiskaltem PBS vorsichtig mit einer 1ml Gilson®-Pipette resuspendiert und auf Eis gelagert. Dann erfolgte die Analyse am FACS-Gerät.

6.2.17 Herstellung mikrostrukturierter Oberflächen zur Kultivierung von Astrozyten und hippocampaler Neurone

Mikrostrukturierte Oberflächen zur Kultivierung von Astrozyten und Neuronen in definierten Abständen (Abbildung 12) wurden freundlicherweise von Dipl. Chem. Marcus Patrick Abel (Institut für Physikalische Chemie, Heidelberg) hergestellt.

Zur Funktionalisierung wurden folgende Materialien verwendet:

- 11-Aminoundecan-1-thiol (siehe Abbildung 11B)
- 11-Mercaptoundecansäure (siehe Abbildung 11A)
- c(RGDfK)-thiol ((Kantlehner et al., 2000), siehe Abbildung 11C)
- Laminin

6.2.18 Durchflusszytometrie (FACS)

Die vorbereiteten Zellen (siehe Methoden 6.2.16) wurden auf Eis gelagert und der Durchflusszytometer mit der Software FACSCComp eingerichtet. Hierzu wurden die Zellen in den Probenhalter eingespannt, die Durchflussgeschwindigkeit auf „low“ eingestellt und die Messung gestartet. Die Zellen werden zunächst nach unterschiedlichen Größen („forward scatter“ = FSC) und unterschiedlichen Granularitäten („side scatter“ = SSC) untersucht und das Ergebnis in einem FSC/SSC-Diagramm dargestellt (Abbildung 13A).

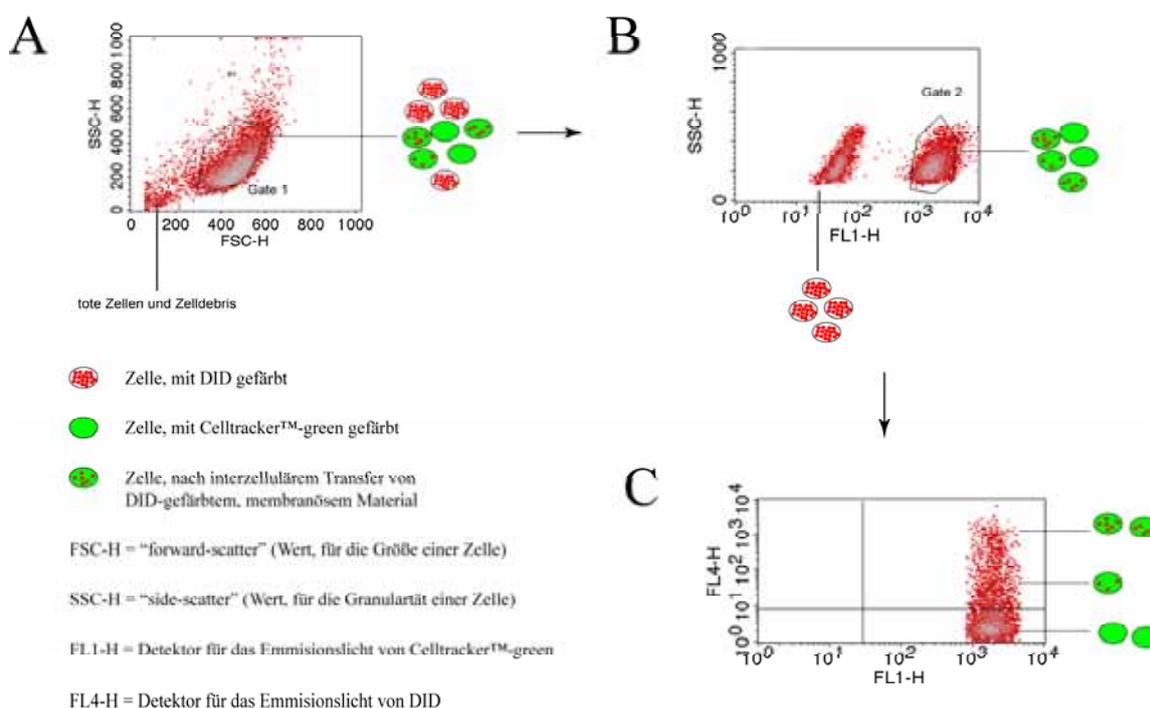


Abbildung 13: Bedeutung der Diagramme des Durchflusszytometers. (A); Im ersten Schritt werden die Zellen nach ihrer Granularität (SSC-H) und nach ihrer Größe (FSC-H) dargestellt. Die gewünschte Population wird mit einem Rahmen markiert (Gate 1). Tote Zellen und Zelltrümmer werden für die weiteren Analysen ausgeschlossen. (B); Im nächsten Schritt werden die Zellen nach ihrer Fluoreszenzintensität bezüglich der Celltracker™-Färbung aufgetrennt und nur Zellen markiert, die für den Celltracker™-Farbstoff positiv sind (Gate 2). (C); Im dritten Diagramm wird die Fluoreszenzintensität des DiD-Signals untersucht.

Die gewünschte Population wurde mit Hilfe eines Rahmens markiert (Abbildung 13A Gate1). Damit ist es möglich, für die weiteren Analysen nur lebende Zellen zu untersuchen, tote Zellen bzw. Zelltrümmer jedoch auszuschließen (Abbildung 13A). Die Zellen der markierten Population wurden dann auf ihre Fluoreszenzeigenschaften und Größe analysiert und das Ergebnis in einem weiteren Diagramm dargestellt (Abbildung 13B). Es wurde derjenige Emmissionsdetektor ausgewählt, mit dem die Fluoreszenz der Akzeptorpopulation (Celltracker™-green gefärbte Neurone) detektiert werden kann (Abbildung 13B FL-1H). Bei der untersuchten Mischpopulation erscheinen zwei Populationen, die aber unterschiedliche

Fluoreszenzstärken im Detektionsbereich des FL-1H Detektors aufweisen. Diejenige Population, die ein starkes Celltracker™-Signal aufwies, wurde ebenfalls mit einem Rahmen markiert (Abbildung 13B Gate 2) und auf ihre Fluoreszenzeigenschaften für DiD (FL-4H) und Celltracker™-green (FL-1H) untersucht. Das Ergebnis wurde in einem neuen Diagramm dargestellt (Abbildung 13C). Die Signale von Zellen, die kein Transfer zeigen, befinden sich im unteren Teil der FL-4H-Skala. Je mehr Farbstoff in die Celltracker™-green gefärbten Zellen transferiert wurde, desto intensiver wurde das Signal. In Abbildung 14 ist der beschriebene Ablauf noch anhand einiger Beispiele schematisch dargestellt.

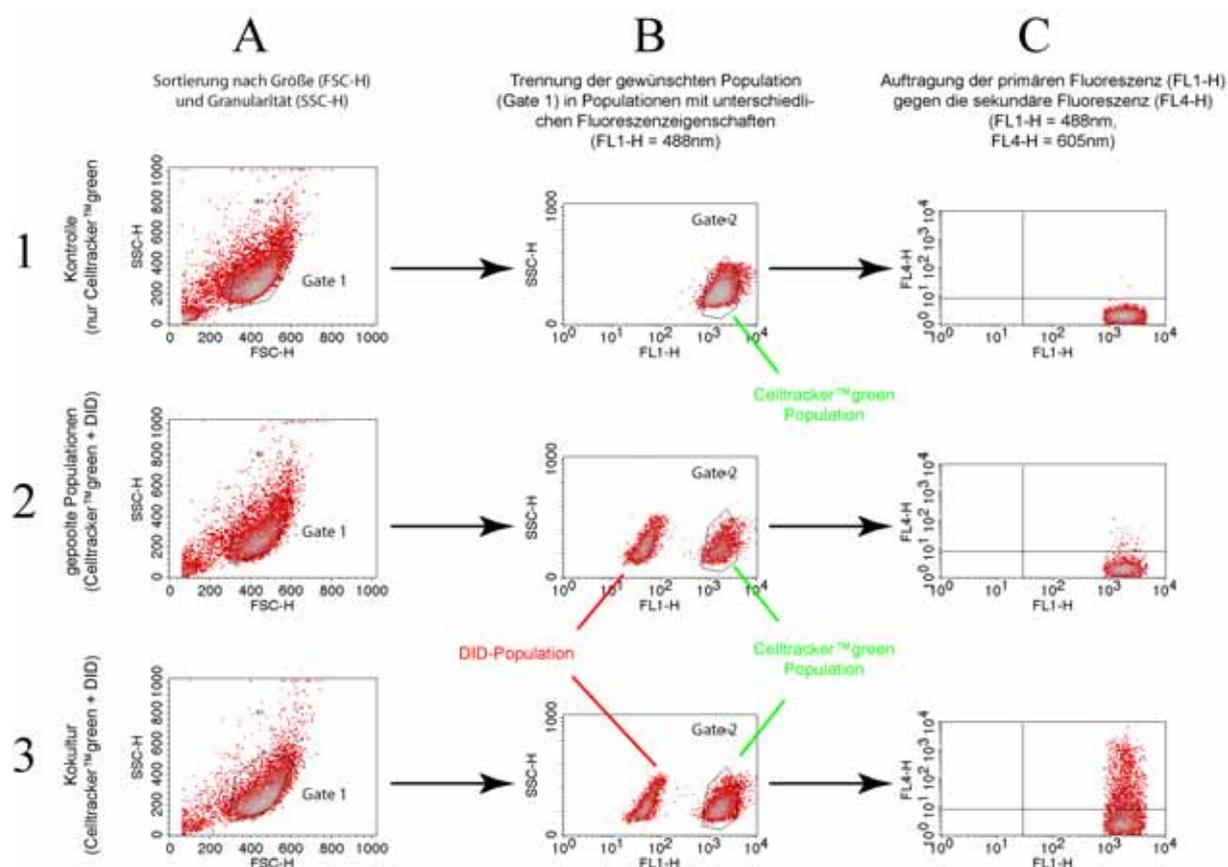


Abbildung 14: Vergleich von unterschiedlichen Experimenten zur Analyse des Membrantransfers zwischen Astrozyten und Neuronen. (1) Kontrollexperiment einer Monokultur von Celltracker™-green gefärbten Neuronen; (2) getrennt kultivierte DiD-gefärbte Astrozyten und Celltracker™-green gefärbte Neuronen wurde für 10 Sekunden gemischt und direkt analysiert; (3) sechsstündige Kokultur von DiD gefärbten Astrozyten und Celltracker™-green gefärbten Neuronen. (A) Analyse der Zellen nach Größe („forward scatter“ = FSC) und Granularität („side scatter“ = SSC) und Darstellung des Ergebnisses in einem FSC/SSC-Diagramm. Die dominante Population wird mit einem Auswahlrahmen (=Gate 1) markiert; (B) Die markierte Population aus (A) wird hinsichtlich ihrer Fluoreszenzstärke bezüglich des Celltracker™-Signals untersucht (FL1-H). Die Celltracker™-green gefärbten Zellen zeigen eine 100mal intensivere Fluoreszenz als die DiD-gefärbten Zellen. Die Celltracker™-green gefärbte Population wird mit einem Auswahlrahmen markiert (= Gate-2). (C) Die in (B) ausgewählte Population wird auf ihre Fluoreszenzstärke bezüglich des DiD-Signals untersucht und das Ergebnis in einem FL1-H/FL4-H-Diagramm grafisch dargestellt (FL1-H = Celltracker™-green-Signal; FL4-H = DiD-Signal). Bei der Kontrolle (1C) und bei den nur für 10 Sekunden gemischten Populationen (2C) ist keine nennenswerte Erhöhung des DiD-Signals zu erkennen, wobei bei den für 6 Stunden kokultivierten Zellen (3C) eine Erhöhung festzustellen ist.

6.2.19 Lebend-Zell-Färbung neuronaler Zellen für die mikroskopische Analyse von TNTs

Hippokampale Neuronen wurden wie zuvor beschrieben präpariert (siehe Methoden 6.2.8), auf Laminin/poly-D-Ornithin beschichtete LabTek™-Kammern in einer Zelldichte von 80.000 Zellen pro Kammer ausplattiert und über Nacht bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Dann erfolgte die Celltracker™-Färbung mit Celltracker™-blue oder -green. Hierzu wurden die Zellen mit 5µM Celltracker™ (gelöst in NMEM-B27) für 30 Minuten bei 37°C / 5% CO₂ gefärbt. Nach einmaligem Waschen mit frischem NMEM-B27 wurden die Zellen erneut mit frischem NMEM-B27 für mindestens 30 Minuten inkubiert. Dann wurde das Medium durch frisches NMEM-B27 ersetzt. Kortikale Astrozyten wurden wie beschrieben präpariert und kultiviert (siehe Methoden 6.2.9). Insgesamt 5 Schalen (Ø10cm) kultivierter Astrozyten wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung für 15 Minuten inkubiert, in 10ml PBS aufgenommen und für 5 Minuten bei 250×g in einem 15ml Röhrchen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml PBS mit einer 1ml Gilson®-Pipette vorsichtig resuspendiert. Dann wurden 2µl der DiI-Lösung unter Schütteln zu der Zellsuspension pipettiert und für insgesamt 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Röhrchen wurde während dieser Zeit alle 2-3 Minuten invertiert. Nach der Inkubationszeit wurde auf ein Gesamtvolumen von 12ml mit PBS aufgefüllt und für 5 Minuten bei 250×g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann insgesamt dreimal mit PBS und zweimal mit NMEM-B27 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 5ml NMEM-B27 resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und 50.000 Zellen pro LabTek™-Kammer (mit Celltracker™-gefärbten Neuronen) ausplattiert. Die Kokulturen wurden für 18 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

6.3 Biochemie

6.3.1 Lubrol®-Extraktion von GABA_A-Rezeptoren aus transient transfizierten HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mittels Elektroporation (siehe Methoden 6.2.7) mit den gewünschten GABA_A-Rezeptor-Konstrukten transfiziert und für 44 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Zellen von vier Zellkulturschalen (Ø10cm) wurden mit Hilfe eines Zellschabers in 1,6ml Lubrol®-Extraktionspuffer in einem 15ml Röhrchen gesammelt und für weitere 8 Stunden bei 4°C invertiert. Der Extrakt wurde für 40 Minuten bei 150.000×g bei

4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 200µl des Überstands auf einen 5% - 20% Saccharose-Dichte-Gradienten (12ml Gesamtvolumen) geladen und für 23 Stunden bei 120.000×g bei 4°C zentrifugiert. Der Gradient wurde anschließend in 24 Fraktionen à 500µl fraktioniert, indem jeweils 500µl von oben mit einer 1ml Gilson[®]-Pipette abpipettiert wurden. Die Proteine jeder Fraktion wurden gefällt (siehe Methoden 6.3.2) und über ein SDS-Polyakrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden dann auf Nitrozellulosemembranen elektrophoretisch transferiert und mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Mit Hilfe des ECL[®]-Detektions-Kits wurden die Antikörpersignale mit Röntgenfilmen sichtbar gemacht und anschließend quantifiziert.

6.3.2 Methanol-Chloroform-Fällung von Proteinen nach Wessel / Flügge

Die in (Wessel et al., 1984) beschriebene Methode der Methanol-Chloroform-Fällung von Proteinen besitzt den Vorteil, dass Detergenzien in Proteinlösungen beseitigt werden.

Protokoll:

- 0,4ml Methanol pro 0,1ml Protein-Lösung
- vortexen + zentrifugieren (10s bei 9.000×g)
- 0,1ml Chloroform hinzu (0,2ml bei einer hohen Konz. von Lipiden)
- vortexen + zentrifugieren (10s bei 9.000×g)
- 0,3ml H₂O hinzu zur besseren Phasentrennung
- vortexen + zentrifugieren (1min bei 9.000×g)
- entfernen der oberen Phase
- 0,3ml Methanol zu der unteren Phase
- mixen + zentrifugieren (2min bei 9.000×g)
- Überstand entfernen
- das Pellet kann nun gelagert werden

6.3.3 SDS-Polyakrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyakrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) bilden Proteine mit negativ geladenen Natriumdodecylsulfatmolekülen (SDS) Komplexe. Die Proteine haben daher ein Überschuss an negativen Ladungen. Nach Laden des SDS-Gels und Anlegen einer Spannung, wandern die negativ geladenen Moleküle in Richtung des Pluspols. Durch die Verwendung

von β -Mercaptoethanol im Probenpuffer, in dem die Proteine zuvor gelöst wurden, werden interne Schwefelbrücken gespalten. Die Proteine wandern somit nur aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekularmasse in unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel und werden so voneinander getrennt.

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden SDS-Polyakrylamidgele verwendet, die aus einem 4% Sammelgel und einem 10% Trenngel bestehen. Die auspolymerisierten Gele wurden dann in einer Vorrichtung gespannt, in die SDS-Gellaufpuffer gefüllt wird. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und in die vorbereiteten Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei „Minigelen“ bei einer stabilen Stromstärke von 50mA und bei „Maxigelen“ bei einer Stromstärke von 80mA.

Folgende Volumina wurden für „Maxigele“ benötigt. Für „Minigele“ wurden die jeweiligen Volumina halbiert.

4% Sammelgel:	5ml	Sammelgelpuffer
	2,7ml	AMBA
	12,08ml	H ₂ O
	200 μ l	APS 10%
	20 μ l	TEMED

10% Trenngel:	10ml	Trenngelpuffer
	13,3ml	AMBA
	16,48ml	H ₂ O
	200 μ l	APS 10%
	20 μ l	TEMED

6.3.4 Western-Blot (Nassverfahren)

Mit Hilfe des sehr empfindlichen Western-Blotting-Verfahrens (auch Immunoblotting genannt), ist es möglich, mittels eines spezifischen Antikörpers ein bestimmtes Protein von zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen mit hoher Sensitivität nachzuweisen. Als erstes wird eine Proteinmischung elektrophoretisch mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Dann wird das Gel auf eine Nitrozellulosemembran aufgelegt und mit Hilfe einer senkrecht zum Gel und zur Nitrozellulosemembran angelegten Spannung die Proteine auf die Membran

übertragen. Mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch ein oder mehrere Epitope des gesuchten Proteins erkennt, kann das gesuchte Protein nachgewiesen werden.

Protokoll:

- in eine Western-Blot-Kammer die Kathode einlegen
- darauf zwei 0,5cm dicke Western-Blot Schwämme legen (in Western-Blot Puffer getränkt)
- dann 3 Schichten mit Whatman 3MM Zellulosepapier legen (in Western-Blot Puffer getränkt)
- die in Western-Blot-Puffer angefeuchtete Whatman Nitrozellulosemembran luftblasenfrei auf auf die bisherigen Zellose-schichten legen
- dann das SDS-Polyacrylamidgel luftblasenfrei auf die Nitrozellulosemembran legen
- es folgen drei Schichten Whatman 3MM Zellulosepapier und anschließend 2 Western-Blot-Schwämme
- als letztes wird die Anode aufgelegt
- die gesamte Konstruktion wird in eine Western-Blot Kammer eingeschoben
- mit Western-Blot Puffer auffüllen und etwas klopfen, um Luftblasen zu entfernen
- mit einer Spannung von 20V für 1,5 Stunden blotten
- danach die Nitrozellulosemembran entnehmen und für mindestens 30 Minuten in Western-Blot-Blockpuffer inkubieren (unspezifische Bindestellen werden blockiert)
- den Western-Blot mit dem in Western-Blot-Blockpuffer verdünnten Primärantikörper für 1 Stunde inkubieren
- 3x für jeweils 5 Minuten in Western-Blot-Blockpuffer waschen
- 1 Stunde mit dem in Western-Blot-Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörper (gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase = HRP) inkubieren
- 5x für jeweils 5 Minuten in Western-Blot-Blockpuffer waschen
- 1x für 5 Minuten in PBS waschen
- Detektion durch ECL[®] nach Herstellerangaben

7 Ergebnisteil 1

Untersuchungen zum Transport der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α_1 und α_2

Obwohl zum heutigen Zeitpunkt schon sehr viel über die Funktionsweise von Ligandengesteuerten Neurotransmitterrezeptoren bekannt ist, ist immer noch unklar, wie der Transport von Neurotransmitterrezeptoren an die postsynaptische Membran erfolgt. Aufgrund verschiedenster Untersuchungen mit Hilfe GFP-markierter Untereinheiten von Neurotransmitterrezeptoren, „Zwei-Hybrid-Screenings“ und „pull-down“-Assays konnten einige Proteine analysiert werden, die an der Membranverankerung der Rezeptoren beteiligt sind. So ist vermutlich das Protein Gephyrin an der Verbindung von Glyzin-Rezeptoren an das Zytoskelett beteiligt, was schlussendlich zur Immobilisierung dieser Rezeptoren an der postsynaptischen Membran führt. Von GABA_A-Rezeptoren weiß man anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen, dass bei Rezeptoren, die aus unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzt sind, auch eine unterschiedliche Verteilung in hippokampalen Pyramidalzellen zu beobachten ist. Beispielsweise sind GABA_A-Rezeptoren, die α_1 -Untereinheiten enthalten, homogen über das Zellsoma und die Dendriten der Pyramidalzellen verteilt (Nusser et al., 1996a). Dagegen sind GABA_A-Rezeptoren, die α_2 -Untereinheiten enthalten, nur in Bereichen des Zellsomas und im Bereich des Axonhügels gehäuft zu beobachten (Nusser et al., 1996a). Zur Untersuchung der differentiellen Verteilung der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten α_1 und α_2 sollten daher GFP-Fusionsproteine erstellt werden, mit deren Hilfe anhand von *in vivo*-Experimenten in hippokampalen Neuronen, diese differentielle Verteilung zeitlich hoch aufgelöst dargestellt werden kann.

Mit Hilfe des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* kann man Proteine markieren, um deren Transport in lebenden Zellen zu untersuchen. Die Fusion eines GFP-Moleküls an das zu untersuchende Molekül hat meist keine negativen Auswirkungen auf dessen Funktionalität (Marshall et al., 1995). Aus diesen Gründen wurden zur Untersuchung der Transporteigenschaften der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten α_1 und α_2 GFP-Fusionsproteine angefertigt. Hierzu wurden diese Untereinheiten mit unterschiedlichen Spektralmutanten von GFP markiert. Aufgrund ihrer Fluoreszenzspektren lassen sich die beiden Farbvarianten ECFP (enhanced cyan fluorescent protein, Emissionsmaximum: 433nm) und EYFP (enhanced yellow fluorescent protein, Emissionsmaximum: 535nm) mittels geeigneter Filtersysteme sehr effektiv spektral voneinander trennen (siehe Material 5.11).

Die Markierung der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten kann auf unterschiedliche Arten erfolgen. Eine Fusion von GFP mit dem N-Terminus der Untereinheiten ist aufgrund der bei allen Transmembranproteinen vorhandenen Signalsequenz schwieriger, als eine Fusion von GFP mit dem C-Terminus. Die Problematik bei einer Fusion von GFP-Varianten am N-Terminus besteht darin, dass ein für die jeweilige GFP-Variante kodierender DNA-Abschnitt hinter die erwähnte Signalsequenz inseriert werden muss, um die kotranslationale Insertion des Membranproteins weiterhin zu gewährleisten. Bei einer Fusion am C-Terminus entfällt diese Problematik. Im Folgenden werden nun unterschiedliche Varianten von Fusionsproteinen aus GFP und den GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α_1 und α_2 dargestellt und charakterisiert. Schließlich sollen mit funktionell charakterisierten Fusionsproteinen Transportstudien, sowohl in einfachen Zelllinien (HEK293, PC12), als auch in kultivierten hippokampalen Neuronen durchgeführt werden.

7.1 C-terminale Fusion der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten α_1 und α_2 mit GFP-Spektralmutanten

Die Markierung von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten wurde schon von diversen Arbeitsgruppen erfolgreich durchgeführt. So gelang es F. Bueno und Mitarbeitern, die α_1 -Untereinheit am C-Terminus mit GFP zu markieren und in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* zu exprimieren (Bueno et al., 1998). Diese Fusionsproteine konnten an der Plasmamembran der Oozyten nachgewiesen werden, was auf einen erfolgreichen Transport hindeutet. Außerdem zeigten Rezeptore, die diese markierte Untereinheit enthalten, keine Beeinträchtigung der Funktionalität und Spezifität des Chlorid-Kanals (Bueno et al., 1998).

7.1.1 Analyse der Fluoreszenzeigenschaften von C-terminal markierten Untereinheiten mit kurzen Abstand zwischen GFP und Untereinheit

Um die Rezeptor-Untereinheiten α_1 und α_2 des GABA_A-Rezeptors in lebenden Zellen untersuchen zu können, wurden diese zunächst mit den GFP-Spektralmutanten ECFP und EYFP (siehe Abschnitt 7) C-terminal markiert. Dazu wurde die für die GFP-Varianten kodierende DNA-Sequenz direkt an das 3'-Ende der für die Untereinheiten kodierende Konstrukte eingefügt (Abbildung 15).

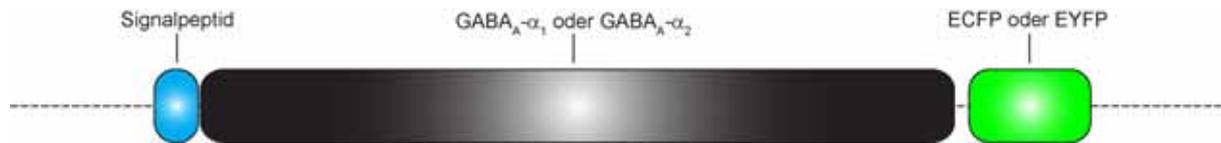


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Konstrukte pECFP-N1/GABA_A-α₁-ECFP, pEYFP-N1/GABA_A-α₁-EYFP und pEYFP-N1/GABA_A-α₂-EYFP. Dargestellt ist der für die jeweiligen Rezeptorchimäre kodierende Teil des Expressionsvektors. Farbige Kästen stellen einzelne Domänen der Chimären dar. Die ausführliche Klonierungsstrategie und die entsprechenden Vektorkarten zu diesen Konstrukten sind auf der beiliegenden CD zu finden (Ordner: Anhang, Datei: Anhang.pdf, Abschnitte A.2.1.1 und A.3.1.1).

Zur Untersuchung der Funktionalität und der Expressionseigenschaften der klonierten Konstrukte, wurde jeweils eines der Konstrukte pECFP-N1/GABA_A-α₁-ECFP, pEYFP-N1/GABA_A-α₁-EYFP bzw. pECFP-N1/GABA_A-α₂-ECFP in HEK293-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden anschließend mit Paraformaldehyd fixiert, mit dem Detergenz Triton-X 100 permeabilisiert und mit Antikörpern gegen GFP-Epitope markiert. Mit Hilfe der GFP-Antikörper konnten die Konstrukte in den Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 16 B, D, F). Es konnte beobachtet werden, dass die exprimierten Konstrukte, mit Ausnahme der Zellkernregion, in einer retikulären Verteilung in den Zellen vorlagen (Abbildung 16 B, D, F; Stern). Obwohl eine Expression der C-terminal markierten Konstrukte mittels der Antikörperfärbung nachgewiesen werden konnte, konnte keine GFP-Fluoreszenz der Konstrukte nachgewiesen werden (Abbildung 16 A, C, E). Dies ist möglicherweise durch einen zu geringen Abstand des GFP-Moleküls zu der jeweiligen GABA_A-Untereinheit bedingt und könnte zu einer suboptimalen, räumlichen Faltung des GFP-Moleküls und somit zur Verringerung bzw. zum Verlust der Fluoreszenzeigenschaften führen.

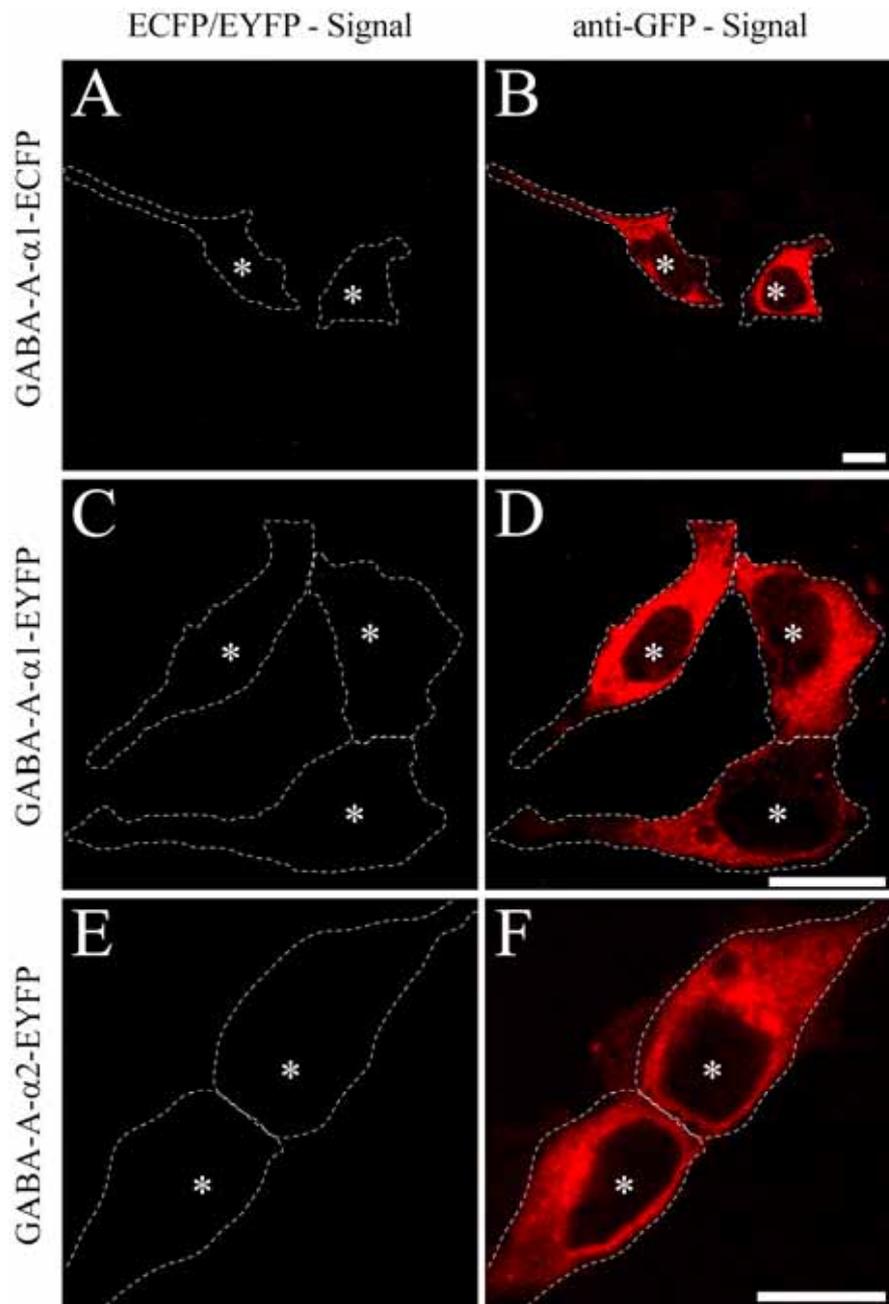


Abbildung 16: Kontrolle der Expression der Konstrukte pECFP-N1/GABA_A-α₁-ECFP, pEYFP-N1/GABA_A-α₁-EYFP und pEYFP-N1/GABA_A-α₂-EYFP. HEK293-Zellen wurden mittels Elektroporation mit den Konstrukten pECFP-N1/GABA_A-α₁-ECFP, pEYFP-N1/GABA_A-α₁-EYFP und pEYFP-N1/GABA_A-α₂-EYFP transfiziert und anschließend für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd / 5% Saccharose fixiert, mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert und schließlich mit Hilfe eines Antikörpers gegen GFP einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Als Primäntikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-GFP-Antikörper, als Sekundäntikörper ein TRITC-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Dargestellt ist die GFP-Fluoreszenzaktivität der Konstrukte (A, C, E), sowie das Signal der Antikörperfärbung (B, D, F). Gestrichelte Linien, Umrisse der Zellen; Sterne, Zellkerne. Maßstabsbalken, 10µm.

7.1.2 Analyse der Fluoreszenzeigenschaften von C-terminal markierten Untereinheiten mit großem Abstand zwischen GFP und Untereinheit

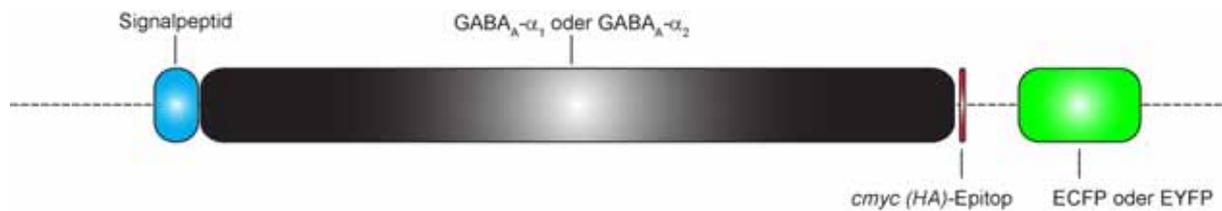


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Konstrukte pECFP-N1/GABA_A-α₁-ECFP-myc, pEYFP-N1/GABA_A-α₁-EYFP-myc, pECFP-N1/GABA_A-α₂-ECFP-HA und pEYFP-N1/GABA_A-α₂-EYFP-HA. Dargestellt ist der für das jeweilige Fusionsprotein kodierende Teil des Expressionsvektors. Farbige Kästen stellen einzelne Domänen des Fusionsproteins dar. Die ausführliche Klonierungsstrategie und die entsprechenden Vektorkarten zu diesen Konstrukten sind auf der beiliegenden CD zu finden (Ordner: Anhang, Datei: Anhang.pdf, Abschnitte A.2.1.2 und A.3.1.2).

Da die zuvor klonierten Konstrukte aufgrund der fehlenden GFP-Fluoreszenz nicht für *in vivo*-Untersuchungen verwendet werden konnten, wurde eine optimierte Klonierungsstrategie zur C-terminalen Fusion mit GFP angewendet. Da angenommen wurde, dass eine Behinderung der räumlichen Faltung der GFP-Proteine bei den Fusionsproteinen die Ursache für die fehlende Fluoreszenz darstellen könnte, wurde die Verbindungsstelle zwischen der Untereinheit und dem GFP-Molekül durch den Einsatz eines *myc*-Epitops (bei α₁) bzw. eines *HA*-Epitops (bei α₂) verlängert (Abbildung 17). Die Fluoreszenzeigenschaften der neuen Konstrukte pECFP-N1/GABA_A-α₁-myc-ECFP, pEYFP-N1/GABA_A-α₁-myc-EYFP, pECFP-N1/GABA_A-α₂-HA-ECFP und pEYFP-N1/GABA_A-α₂-HA-EYFP wurden erneut in HEK293 Zellen untersucht. Es ist bekannt, dass für einen effektiven Transport der GABA_A-Untereinheiten α₁ und α₂ die zusätzliche Untereinheit β₂ essentiell ist (Connolly et al., 1996a; Connor et al., 1998). Optimale Transporteffizienzen sind jedoch erst dann zu beobachten, wenn die beiden Untereinheiten β₂ und γ₂ zusätzlich exprimiert werden (Connolly et al., 1996a).

Es wurde exemplarisch für die neuen, modifizierten Konstrukte das Konstrukt pEYFP-N1/GABA_A-α₁-myc-EYFP zusammen mit den Konstrukten pRK5/GABA_A-β₂ und pRK5/GABA_A-γ₂ für eine Kotransfektion in HEK293-Zellen verwendet. Die transfizierten Zellen wurden anschließend für 24h bei 37°C inkubiert und danach fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In Abbildung 18 sind punktuelle Strukturen sowohl im Zellsoma, als auch in der Zellperipherie zu erkennen. Auffällig ist, dass diese punktuellen Strukturen teilweise in einer Reihe entlang der Zellperipherie aufgereiht sind (Abbildung 18B). Ein Großteil des Signals

befindet sich im perinukleären Bereich, wobei das Erscheinungsbild der GFP-Fluoreszenz auf eine retikuläre Verteilung der Probe hindeutet (Abbildung 18C). Ein starkes retikuläres Signal ist ein Hinweis auf einen ineffizienten Transport der Rezeptoren zur Zellmembran, da unvollständig pentamerisierte Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten und schließlich abgebaut werden (Connolly et al., 1996a).

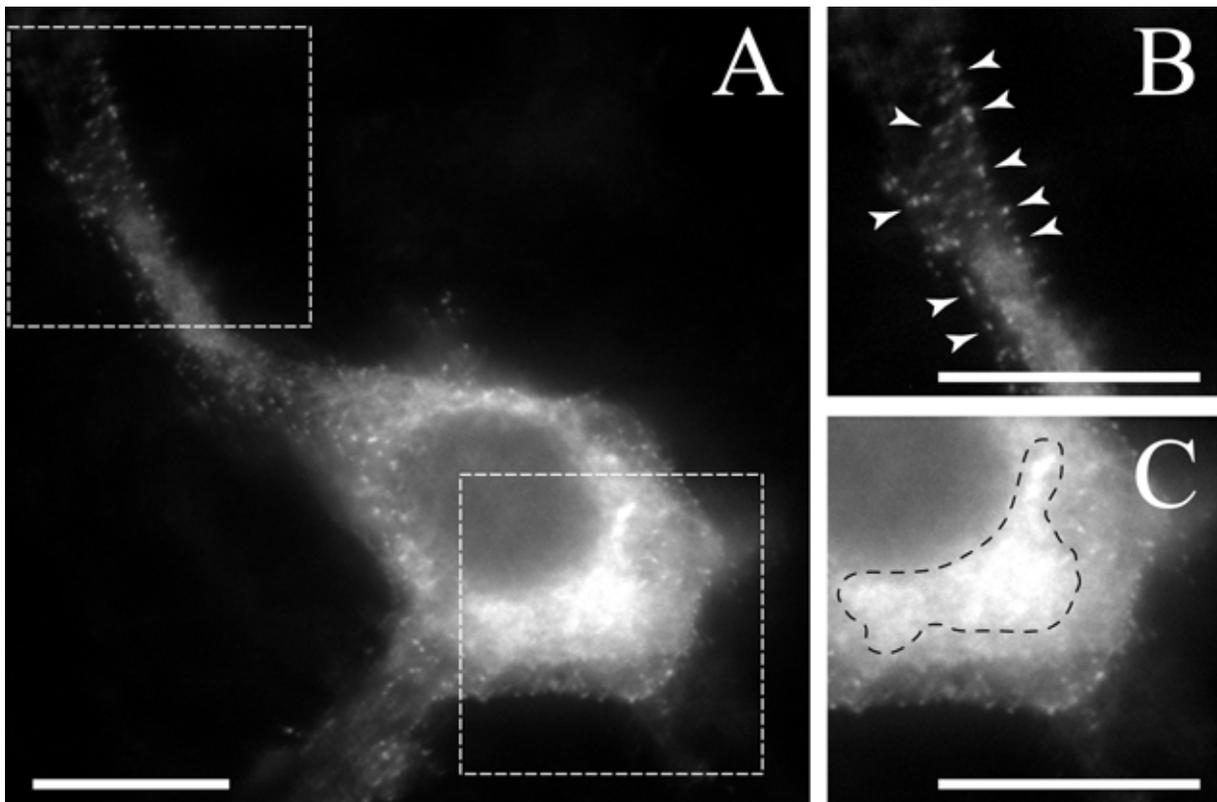


Abbildung 18: Analyse der Transporteigenschaften des Konstruktes pEYFP-N1 / GABA_A-α₁-EYFP-myc. HEK293-Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem Konstrukt pEYFP-N1 / GABA_A-α₁-EYFP-myc, sowie den Konstrukten pRK5 / GABA_A-β₂ und pRK5 / GABA_A-γ₂ kotransfiziert und anschließend auf Fibronektin beschichtete Deckgläschen ausplattiert und für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd / 4% Saccharose fixiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dargestellt ist ein Übersichtsbild einer positiv transfizierten HEK293-Zelle (A) und die dazugehörigen Vergrößerungen (B,C). Pfeile, punktuelle Signale in der Zellperipherie; gestrichelte Linie in (C), perinukleäres Signal; Maßstabsbalken, 10µm.

7.2 N-terminale Fusion von GFP-Spektralmutanten mit α_1 - und α_2 -Untereinheiten

Neben der in Abschnitt 7.1 beschriebenen C-terminalen Markierung der Untereinheiten α_1 und α_2 bestand zudem die Möglichkeit, die Untereinheiten am N-Terminus zu markieren. Josef T. Kittler und Mitarbeiter zeigten, dass eine N-terminale Fusion eines GFP-Moleküls an eine γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors zu einer deutlichen Expression der Fusionsproteine an der Plasmamembran führt (Kittler et al., 2000). Außerdem waren Rezeptoren, die die N-terminal markierte γ_2 -Untereinheit enthalten, elektrophysiologisch und pharmakologisch funktionell (Kittler et al., 2000).

7.2.1 Analyse der Transporteigenschaften von N-terminal markierten GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten

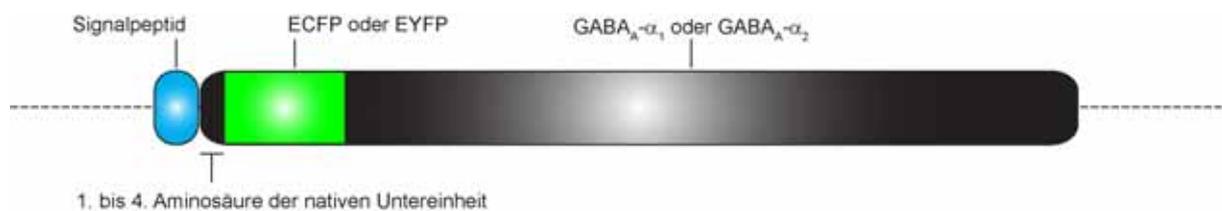


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Konstrukte pRK5/ECFP-GABA_A- α_1 , pRK5/EYFP-GABA_A- α_1 , pRK7/ECFP-GABA_A- α_2 und pRK7/ECFP-GABA_A- α_2 . Dargestellt ist der für das jeweilige Fusionsprotein kodierende Teil des Expressionsvektors. Farbige Kästen stellen einzelne Domänen des Fusionsproteins dar. Die ausführliche Klonierungsstrategie und die entsprechenden Vektorkarten zu diesen Konstrukten sind auf der beiliegenden CD zu finden (Ordner: Anhang, Datei: Anhang.pdf, Abschnitte A.2.2.1 und A.3.2.1).

Zwar können die modifizierten, C-terminal markierten GABA_A-Rezeptor Untereinheiten α_1 und α_2 bei gleichzeitiger Expression der Untereinheiten β_2 und γ_2 in vesikulären Strukturen transportiert werden, jedoch ist der beobachtete Transport noch sehr ineffizient. Dies äußert sich vor allem in einer sehr stark ausgeprägten retikulären Fluoreszenz im perinukleären Bereich der Zellen (Abbildung 18). Um die Effizienz des Transports der Fusionsproteine weiter zu steigern, wurde eine neue Strategie zur Markierung der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten α_1 und α_2 angewandt. Dazu wurde N-terminal mittels der Methode der DNA-Mutagenese (siehe Methoden 6.1.5) eine neue Restriktionsschnittstelle für die Restriktionsendonuklease XhoI eingefügt. Über diese neu generierte Schnittstelle war es dann möglich, die verschiedenen GFP-Spektralmutanten ECFP und EYFP einzufügen (Abbildung 19). Eine vergleichbare Strategie zur Markierung von Neurotransmitterrezeptoren wurde

zuvor schon bei den mit GABA_A-Rezeptoren strukturell verwandten Glyzin-Rezeptoren (Rosenberg et al., 2001) und mit der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Kittler et al., 2000) erfolgreich durchgeführt.

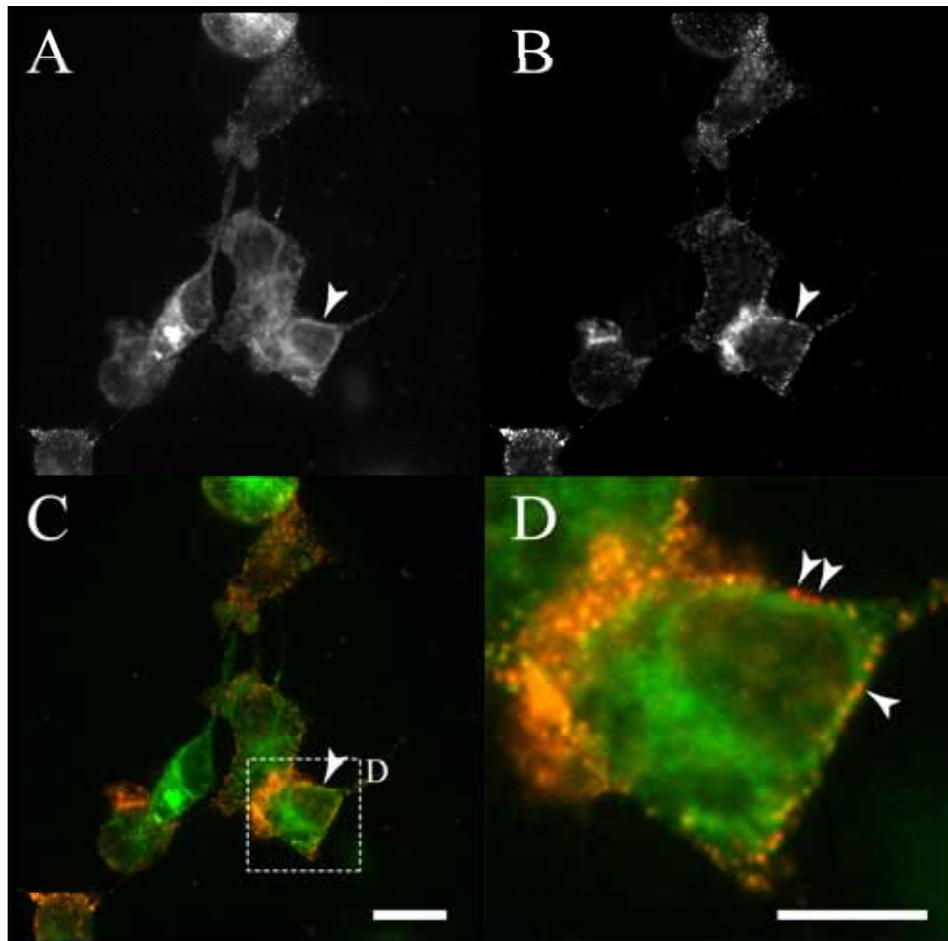


Abbildung 20: Analyse des Transports des Konstruktes pRK5/EYFP-GABA_A- α_1 . HEK293-Zellen wurden mittels Elektroporation mit den Konstrukten pRK5/EYFP-GABA_A- α_1 , sowie pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert, auf Fibronectin beschichtete Deckgläschen ausplattiert und anschließend für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen auf Eis einer Immunfluoreszenzfärbung gegen extrazellulär befindliches GFP unterzogen. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-GFP-Antikörper und als Sekundärantikörper ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelter, polyklonaler Ziegenanti-Kaninchen Antikörper verwendet. Dargestellt ist die GFP-Fluoreszenz der Rezeptorchimäre (A), das Antikörpersignal des extrazellulär liegenden GFP-Teils der α_1 -Untereinheit (B), sowie die Überlagerung der beiden Kanäle (C). Zur Verdeutlichung der Signale wurde eine Region aus (C) vergrößert und in (D) dargestellt. Pfeilspitzen, Signale von Rezeptoranhäufungen an der Plasmamembran; Maßstabsbalken, 10 μ m.

Um die neuen Konstrukte (pRK5/ECFP-GABA_A- α_1 , pRK5/EYFP-GABA_A- α_1 , pRK7/ECFP-GABA_A- α_2 und pRK7/EYFP-GABA_A- α_2) näher zu charakterisieren, wurden HEK293-Zellen mittels Elektroporation mit jeweils einem der klonierten Konstrukte, sowie mit den beiden Konstrukten pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 transfiziert. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und danach einer Immunfluoreszenzfärbung von nicht-permeabilisierten Zellen gegen den extrazellulär liegenden GFP-Teil unterzogen. Die N-terminal markierten Konstrukte pRK5/EC(Y)FP-

GABA_A- α_1 und pRK7/E(C)YFP-GABA_A- α_2 zeigten in HEK293-Zellen einen effektiveren Transport an die Plasmamembran, als es bei den C-terminal markierten Rezeptorchimären der Fall war (Abschnitt 7.1). Es ist erkennbar, dass die Rezeptoren an der Plasmamembran detektiert werden können, aber nicht homogen über die gesamte Zellmembran verteilt sind (Abbildung 20). Bei einer dreidimensionalen Darstellung von Rezeptoren, die sich an der Plasmamembran befinden ist die unregelmäßige Anhäufung deutlicher zu erkennen (Abbildung 21). Im Bereich des Zellsomas, besonders in perinukleären Bereichen, liegt eine retikuläre Verteilung des GFP-Signals vor (Abbildung 20). Die Expressionsstärke der N-terminal markierten Rezeptorchimäre war zudem von Zelle zu Zelle sehr unterschiedlich.

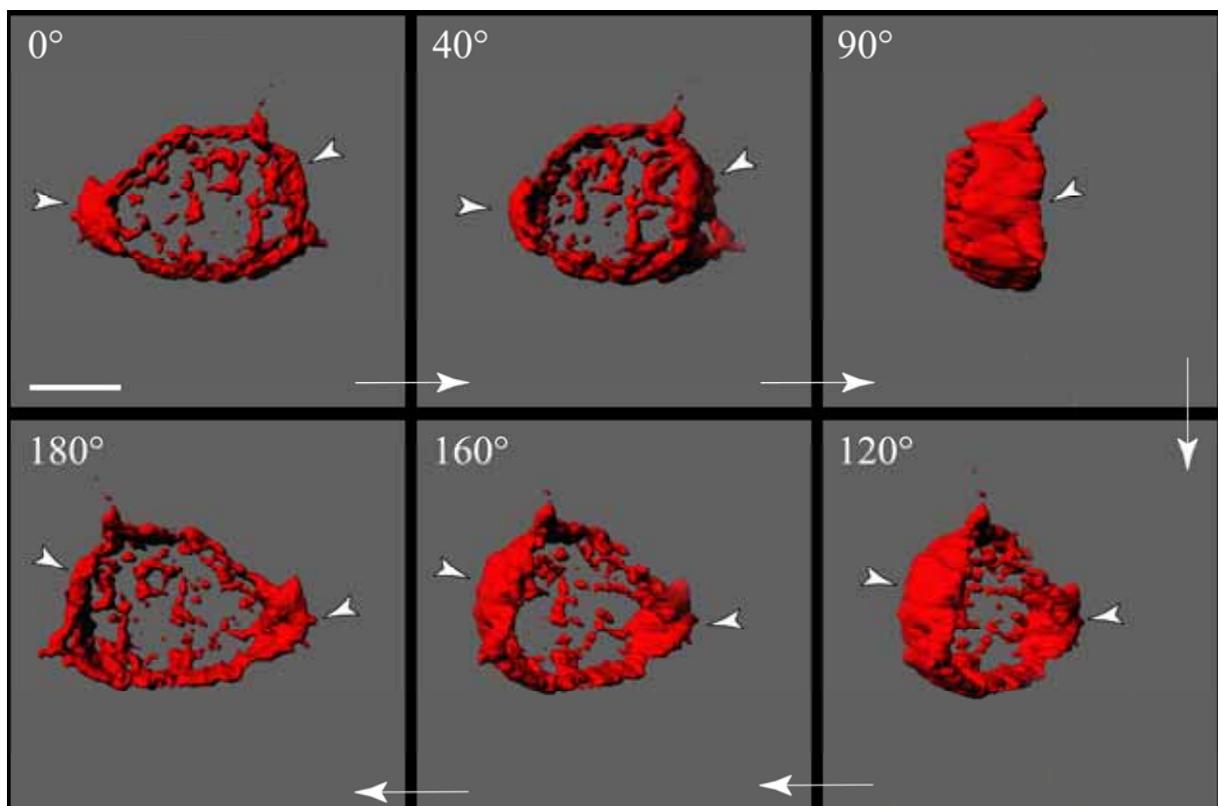


Abbildung 21: Dreidimensionale Darstellung der Anhäufung von Rezeptorchimären an der Plasmamembran von HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mittels Elektroporation mit den Konstrukten pRK5/EYFP-GABA_A- α_1 , sowie pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert, auf Fibronectin beschichtete Deckgläschen ausplattiert und anschließend für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen auf Eis einer Immunfluoreszenzfärbung gegen extrazellulär befindliches GFP unterzogen. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-GFP-Antikörper und als Sekundärantikörper ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelter, polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Anschließend wurden die so vorbereiteten Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert und von positiven Zellen jeweils 50 konfokale x/z-Schnitte angefertigt. Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit Hilfe der Software Imaris[®] prozessiert und eine Drehbewegung gerendert. Dargestellt ist eine Drehung um die horizontale Achse der aufgenommenen Zelle in Schritten von jeweils 40° bzw. 50°. Pfeilspitzen, Anhäufungen von an der Zellmembran befindlichen Rezeptorchimären; Maßstabsbalken, 5 μ m. Das korrespondierende Video, welches die dargestellte Sequenz zeigt, ist als Quicktime-Video auf der beigefügten CD enthalten (Ordner Videos; Video1.mov).

7.2.2 Insertion immunoreaktiver Epitope (*myc* und *HA*) bei N-terminal GFP-markierten GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten

Um eine einfache Unterscheidung der α_1 - und α_2 -Untereinheiten auf Immunfluoreszenzebene durchführen zu können, wurden die Konstrukte zusätzlich modifiziert. Im Falle der α_1 -Konstrukte wurde C-terminal vom ECFP- oder EYFP-Anteil das immunreaktive Epitop *myc* eingefügt (Abbildung 22). Im Falle der α_2 -Konstrukte wurde in gleicher Weise ein Hämagglutinin (*HA*)-Epitop eingefügt (Abbildung 22).

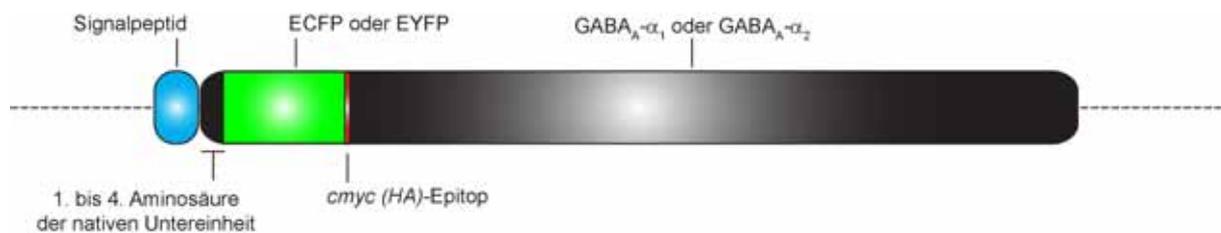


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Konstrukte pRK5/ECFP-*myc*-GABA_A-α₁, pRK5/EYFP-*myc*-GABA_A-α₁, pRK7/ECFP-*HA*-GABA_A-α₂ und pRK7/ECFP-*HA*-GABA_A-α₂. Dargestellt ist der für das jeweilige Fusionsprotein kodierende Teil des Expressionsvektors. Farbige Kästen stellen einzelne Domänen des Fusionsproteins dar. Die ausführliche Klonierungsstrategie und die entsprechenden Vektorkarten zu diesen Konstrukten sind auf der beiliegenden CD zu finden (Ordner: Anhang, Datei: Anhang.pdf, Abschnitte A.2.2.2 und A.3.2.2).

Dadurch ist eine Unterscheidung der Konstrukte bei Western-Blot- und Immunfluoreszenzanalysen möglich, ohne dass spezielle Antikörper gegen Epitope der einzelnen GABA_A-Rezeptor Untereinheiten notwendig wären. Zur Charakterisierung der Transporteigenschaften der Konstrukte wurden HEK293-Zellen mit den Konstrukten pRK5/ECFP-*myc*-GABA_A-α₁, pRK5/EYFP-*myc*-GABA_A-α₁, pRK7/ECFP-*HA*-GABA_A-α₂ oder pRK7/EYFP-*HA*-GABA_A-α₂ zusammen mit den Konstrukten pRK5/GABA_A-β₂ und pRK5/GABA_A-γ₂ kotransfiziert und anschließend für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Danach erfolgte eine Oberflächenfärbung gegen das *myc*- bzw. *HA*-Epitop mit entsprechenden Antikörpern. Die Färbung zeigte eine Anhäufung von Signalen an der Plasmamembran (Abbildung 23A), wobei auch hier die Signale nicht homogen verteilt waren, sondern in Ansammlungen auftraten (Abbildung 23). Es ist davon auszugehen, dass eine Insertion von *myc*- bzw. *HA*-Epitopen keinen Einfluss auf die Transporteigenschaften der Untereinheiten hat, da keine Unterschiede bei Expressionscharakteristik im Vergleich zu den Konstrukten ohne Epitope (Abschnitt 7.2.1) auftraten.

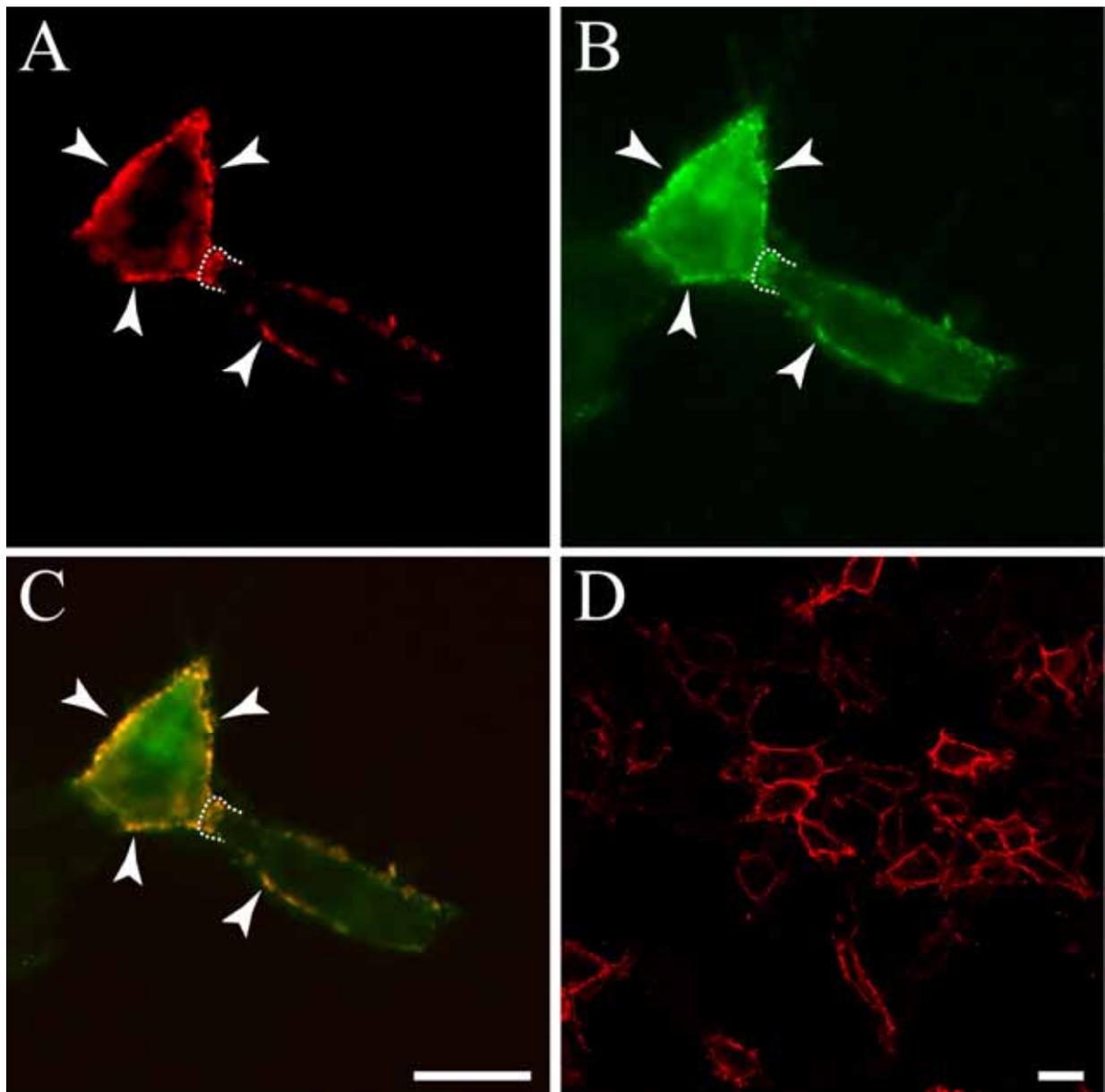


Abbildung 23: Analyse des Transports des Konstruktes pRK5/EYFP-myc-GABA_A-α₁. HEK293-Zellen wurden mittels Elektroporation mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-GABA_A-α₁, sowie pRK5/GABA_A-β₂ und pRK5/GABA_A-γ₂ kotransfiziert, auf Fibronectin beschichtete Deckgläschen ausplattiert und anschließend für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen auf Eis einer Immunfluoreszenzfärbung gegen das extrazellulär befindliche *myc*-Epitop unterzogen. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Maus-anti-*myc*-Antikörper und als Sekundärantikörper ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelter, polyklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper verwendet. Dargestellt ist das Antikörpersignal des extrazellulär liegenden *myc*-Epitops der α₁-Untereinheit (A), die GFP-Fluoreszenz der Rezeptorchimäre (B), sowie die Überlagerung der beiden Kanäle (C). Eine Übersicht von mehreren positiven Zellen ist in (D) dargestellt. Pfeilspitzen, Signale von Rezeptoranhäufungen an der Plasmamembran; gestrichelte Line, Zellgrenze; Maßstabsbalken, 10µm.

7.2.3 Analyse von N-terminal markierten α_1 - und α_2 -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors in kultivierten hippocampalen Neuronen

Bisher wurden alle klonierten Konstrukte (sowohl C-terminal, als auch N-terminal markierte Konstrukte) in HEK293-Zellen auf ihre Fähigkeit, an die Plasmamembran transportiert zu werden, untersucht. Um die klonierten Konstrukte in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen, wurden die Konstrukte in hippocampalen Neuronen auf ihre Transporteigenschaften untersucht. Dazu wurden präparierte hippocampale Neurone in LabTek[™]-Kammern für 8 Tage kultiviert und mit den Konstrukten pRK5/ECFP-myc-GABA_A- α_1 , pRK5/EYFP-myc-GABA_A- α_1 , pRK7/ECFP-HA-GABA_A- α_2 oder pRK7/EYFP-HA-GABA_A- α_2 zusammen mit den Konstrukten pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 mittels einer modifizierten Methode der Kalzium-Phosphat-Präzipitation kotransfiziert (siehe Methoden 6.2.10) und anschließend für 24 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen die jeweilige extrazellulär befindliche GFP-Variante durchgeführt, ohne dass die Zellen vorher permeabilisiert wurden. Dies stellt sicher, dass nur die Rezeptoren markiert werden, die an die Plasmamembran der Neurone transportiert wurden.

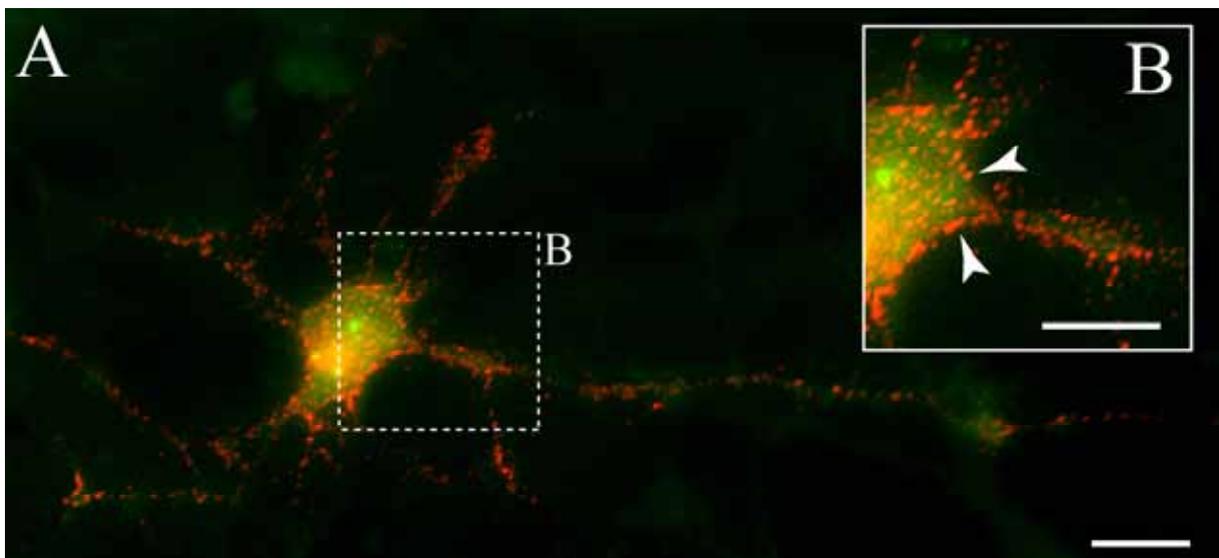


Abbildung 24: Analyse der Expressionseigenschaften des Konstruktes pRK5/EYFP-myc-GABA_A- α_1 in kultivierten, hippocampalen Neuronen. 8 Tage in Kultur befindliche hippocampale Neurone aus E18-Wistar-Rattenembryonen wurden mittels einer modifizierten Kalzium-Phosphat-Präzipitation (siehe Methoden) mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-GABA_A- α_1 , sowie pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert und anschließend für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen auf Eis einer Immunfluoreszenzfärbung gegen extrazellulär befindliches GFP unterzogen. Als Primäntikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-GFP-Antikörper und als Sekundäntikörper ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelter, polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Dargestellt ist die Überlagerung des Signals der GFP-Fluoreszenz (grün) mit dem Antikörpersignal (rot) (A). Eine genauere Ansicht eines ausgewählten Bereichs ist in (B) vergrößert dargestellt. Pfeilspitzen, Signale von Rezeptoranhäufungen an der Plasmamembran; Maßstabsbalken, 10µm.

Die anschließend durchgeführte fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen zeigte deutlich, dass die Konstrukte pRK5/EYFP-myc-GABA_A- α_1 , pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 an der Plasmamembran exprimiert wurden (Abbildung 24). Auffällig war, dass sich ein Großteil des Signals im perinukleären Raum befand (Abbildung 24B, grünes Signal). Darüber hinaus sind Anhäufungen von Rezeptoren an der Zellmembran feststellbar (Abbildung 24B), die mit der Expression der Rezeptoren in HEK293 Zellen vergleichbar sind (Abbildung 23). Bei Betrachtung der gesamten Zellausläufer fällt auf, dass diese Anhäufungen nicht nur in bestimmten Bereichen des Neurons auftreten, sondern gleichmäßig über die gesamte Plasmamembran des Neurons verteilt sind (Abbildung 24).

7.2.4 Analyse der Pentamerisierungseigenschaften der GFP-Fusionsproteine

GABA_A-Rezeptoren sind nur als Pentamere aktiv und können auch nur dann funktionelle, spezifische Chlorid-Kanäle ausbilden. Eine Pentamerisierung der einzelnen Untereinheiten zu einem funktionellen GABA_A-Rezeptor könnte durch die Fusion eines GFP-Moleküls mit der α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit gestört sein. Deshalb wurde mittels biochemischer Methoden die erfolgreiche Pentamerisierung der Fusionsproteine zusammen mit den Wildtyp-Untereinheiten β_2 und γ_2 untersucht. Die dazu angewendete Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation ermöglicht es, verschiedene Zwischenstadien der Pentamerisierung zu detektieren und somit die Effizienz, mit der die Rezeptorchimären sich zu Pentameren zusammenlagern, zu untersuchen. Es ist bekannt, dass verschiedene Aggregationsformen der GABA_A-Rezeptoren unterschiedliche Sedimentationskoeffizienten (S) besitzen (Klausberger et al., 2001). Monomere GABA_A-Rezeptor Untereinheiten haben demnach einen Sedimentationskoeffizienten von 3,3S, Dimere einen von 4,5S, Trimere einen von 5,5S, Tetramere einen von 6,8S und Pentamere haben eine Sedimentationskoeffizienten von 8,7S (Klausberger et al., 2001). Um den einzelnen Fraktionen eines Saccharose-Dichte-Gradienten einen definierten Sedimentationskoeffizienten zuzuordnen, wurden drei verschiedene Markerproteine mit bekannten S-Werten über einen Gradienten aufgetrennt. Als Markerproteine wurden folgende Enzyme verwendet: Karbonische Anhydrase (3,3S), Alkalische Phosphatase (6,7S) und Katalase (11S). Da die Markerproteine alkalische Phosphatase und Katalase aus mehreren gleich großen Untereinheiten (je 57kDa) bestehen, zeigen diese ein ähnliches Laufverhalten auf einem denaturierenden SDS-Polyakrylamidgel. Diese werden aber auf einen Saccharose-Dichte-Gradienten in verschiedenen Fraktionen sedimentiert, da dort keine denaturierenden Bedingungen vorherrschen und daher die

Oligomerisierung der Enzyme erhalten bleibt (Abbildung 25). Aufgrund dessen werden sie nach Fraktionierung des Gradienten und der anschließenden Auftrennung über ein denaturierendes SDS-Polyakrylamidgel in unterschiedlichen Fraktionen detektiert (Abbildung 25). Anhand dieser Daten wurde eine Eichgerade erstellt, die eine spätere Zuordnung einer bestimmten Fraktion zu dem jeweiligen Sedimentationskoeffizienten erlaubt.

Um zu untersuchen, ob die N-terminal markierten Konstrukte in Gegenwart der Untereinheiten β_2 und γ_2 zu einem vollständigen Rezeptor pentamerisieren können, wurden HEK293-Zellen mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-GABA_A- α_1 , pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 mittels Elektroporation kotransfiziert und anschließend für 24 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die exprimierten Rezeptoren mittels Lubrol-Extraktion (siehe Methoden 6.3.1) extrahiert und die verschiedenen Aggregationsformen der Rezeptoren über einen linearen Saccharose-Dichte-Gradienten (5% – 20%) aufgetrennt. Anschließend wurde der Gradient in 16 Fraktionen aufgeteilt, die darin enthaltenen Proteine mittels Methanol-Chloroform-Fällung (siehe Methoden 6.3.2) gefällt und über ein SDS-Polyakrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Rezeptoren wurden dann mittels Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen das *myc*-Epitop nachgewiesen und anschließend quantifiziert. In Abbildung 26 ist das Ergebnis der biochemischen Analyse der Pentamerisierung der α_1 -Chimäre grafisch dargestellt. In den Fraktionen 11 und 12 des Gradienten war die größte Proteinmenge nachgewiesen worden. Im Mittel entsprechen diese Fraktionen einem Sedimentationskoeffizienten von 8,62S. Der gemessene Sedimentationskoeffizient entspricht dem in der Literatur beschriebenen Koeffizient von 8,7S für pentamere GABA_A-Rezeptoren (Klausberger et al., 2001).

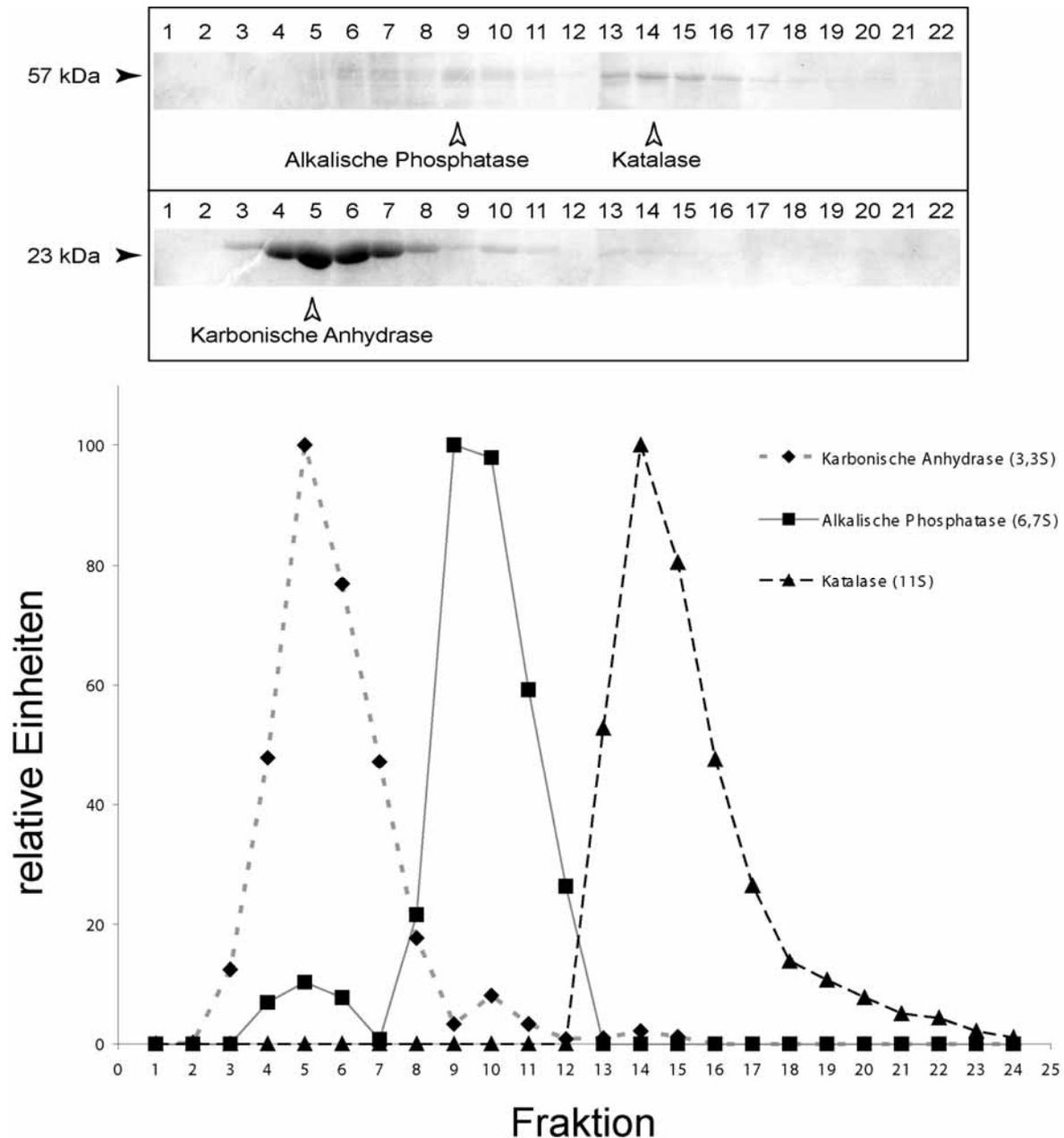


Abbildung 25: Kalibrierung des linearen Saccharose-Dichte-Gradienten mit Hilfe der Markerproteine Karbonische Anhydrase, Alkalische Phosphatase und Katalase. 2µg Katalase, 1,2µg Alkalische Phosphatase und 1µg Karbonische Anhydrase wurden in 200µl Lubrol®-Extraktions-Puffer (siehe Material 5.12) gelöst, anschließend auf einen Saccharose-Dichte-Gradient (5-20% Saccharose in Lubrol®-Extraktions-Puffer, 12ml) geschichtet und für 23h bei 4°C und 120.000 × g zentrifugiert. Der Gradient wurde dann in 22 Fraktionen aufgeteilt und die in den Fraktionen enthaltenen Proteine gefällt (siehe Methoden 6.3.2) und anschließend über ein 10%iges SDS-Polyakrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das SDS-Polyakrylamidgel wurde mit Coomassie®-BrilliantBlue gefärbt um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Die beiden Enzyme „Alkalische Phosphatase“ und „Katalase“ besitzen aufgrund ihrer Quatärstruktur unterschiedliche Sedimentationskoeffizienten (Alkalische Phosphatase, 6.7S; Katalase, 11S). Da ihre Untereinheiten jedoch identische Größen von ca. 57kDa besitzen, lassen sich die korrespondierenden Banden auf den SDS-Akrylamidgelen auf gleicher Höhe detektieren. Das Enzym „Karbonische Anhydrase“ ist aus Untereinheiten mit einer Größe von jeweils ca. 23kDa zusammengesetzt. Die Analyse der Fraktionen des Saccharose-Dichte-Gradienten zeigte, dass die Karbonische Anhydrase (3.3S) in Fraktion 5, die Alkalische Phosphatase (6.7S) in Fraktion 9 und die Katalase in Fraktion 14 sedimentierten.

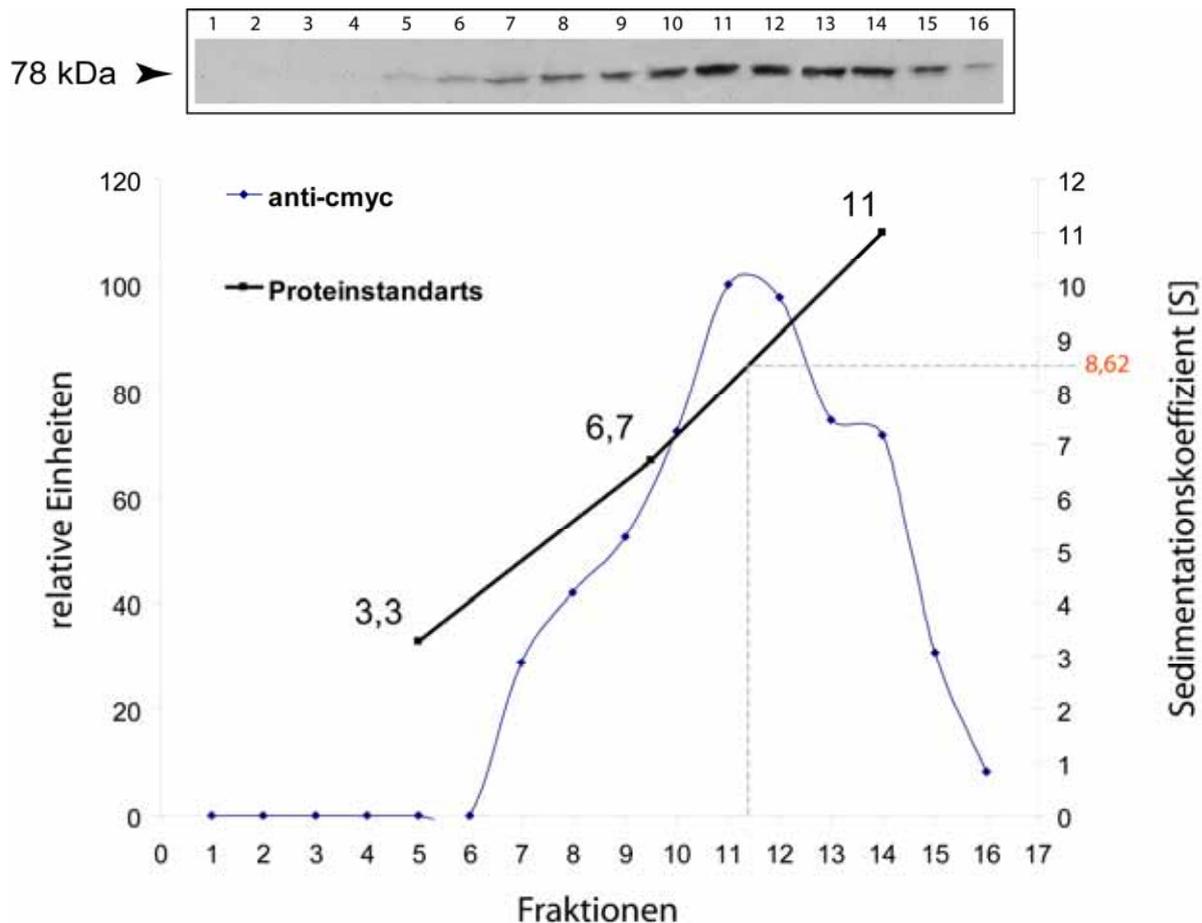


Abbildung 26: Saccharose-Dichte-Gradient mit extrahierten, chimären GABA_A-Rezeptoren. HEK293-Zellen wurden mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-GABA_A- α_1 , pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 mittels Elektroporation kotransfiziert und für 48h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Die Rezeptoren wurden dann extrahiert (siehe Methoden 6.3.1) und über einen 5-20%igen Saccharose-Gradienten zentrifugiert. Der Gradient wurde fraktioniert, die in den Fraktionen enthaltenen Proteine gefällt, anschließend über ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Zur Detektion der α_1 -Untereinheit wurde ein *cmyc*-Antikörper verwendet. Die zu den Fraktionen korrespondierenden Sedimentationskoeffizienten wurden mit Hilfe von Markerproteinen (Alkalische Phosphatase 6.7S; Karbonische Anhydrase 3.3S; Katalase 11S) mit bekannten Sedimentationskoeffizienten bestimmt. Bei einer Koexpression der markierten Untereinheit α_1 mit den Untereinheiten β_2 und γ_2 in HEK293-Zellen konnte die α_1 -Untereinheit bei einem Sedimentationskoeffizient von ca. 8.7S detektiert werden.

7.2.5 Charakterisierung der elektrophysiologischen Funktionalität der GFP-Fusionsproteine

Mit den bisherigen Experimenten konnte zum einen der erfolgreiche Transport der Rezeptorchimären an die Zellmembran gezeigt werden und zum anderen, dass die assemblierten Rezeptoren als Pentamere vorliegen. Mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen sollte daher untersucht werden, ob die Rezeptorchimären zusammen mit den Untereinheiten β_2 und γ_2 funktionelle Rezeptoren bilden können. Hierzu wurden HEK293 Zellen zusätzlich zur α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit mit den Wildtyp-Untereinheiten β_2 und γ_2

mittels einer Kalzium-Phosphat-Präzipitation transfiziert und nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C mittels der *voltage-clamp* Technik analysiert. Mit Hilfe einer Applikationspipette wurde die zu untersuchende Zelle für einen Zeitraum von 2ms mit 30µM γ -Aminobuttersäure umspült (siehe Methoden 6.2.11). Der auftretende Einstrom von Chlorid-Ionen wurde für die verschiedenen Varianten der N-terminal markierten Konstrukte gemessen.

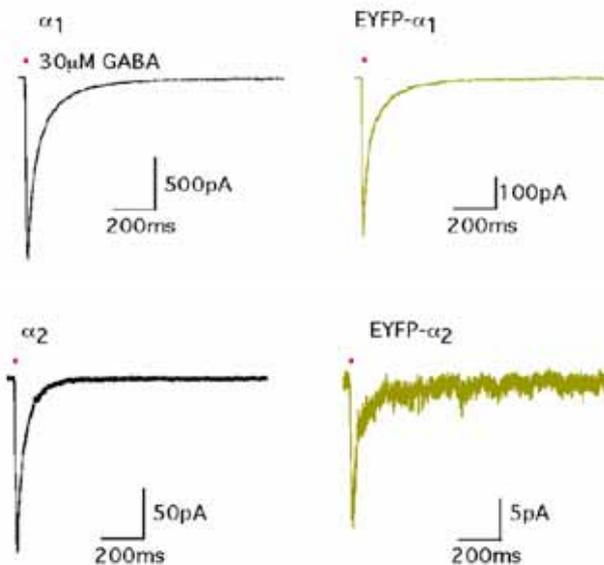


Abbildung 27: Kontrolle der Funktion von chimären GABA_A-Rezeptoren in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-GABA_A- α_1 bzw. pRK7/EYFP-myc-GABA_A- α_2 sowie den Konstrukten pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert. Als Kontrolle wurden statt der markierten α_1 - bzw. α_2 -Untereinheiten die jeweiligen Wildtyp-Formen verwendet. Die Zellen wurden anschließend für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Die elektrophysiologische Messung der exprimierten Konstrukte erfolgte mittels der „voltage-clamp“-Technik. Roter Punkt, Zeitpunkt und Dauer der GABA-Applikation; schwarze Graphen, Ableitungen der Wildtyp-Rezeptoren; gelbe Graphen, Ableitungen der chimären Rezeptoren.

Verglichen mit den Wildtyp-Rezeptoren, zeigten Rezeptoren mit der markierten α_1 -Untereinheit eine Reduktion des Chlorid-Einstroms (Abbildung 27). Zeigte der Wildtyp Rezeptor noch einen Ionenfluss in Höhe von 850pA, so reduzierte sich dieser auf 240pA bei Verwendung einer mit EYFP markierten Variante der α_1 -Untereinheit (Abbildung 27). Dagegen reduzierte sich der Chlorid-Einstrom bei den Rezeptoren, welche die mit ECFP markierte α_1 -Untereinheit enthalten, von 820pA beim Wildtyp-Rezeptor auf 50pA beim chimären Rezeptor. Rezeptoren, die markierte α_2 -Untereinheiten beinhalten, zeigten eine durchweg geringere Aktivität (Abbildung 27). Der Chlorid-Einstrom reduzierte sich von 110pA beim Wildtyp Rezeptor auf 12pA beim chimären Rezeptor (Abbildung 27). Diese Ergebnisse zeigen, dass die chimären, mit GFP-Varianten markierten Rezeptoren, in der Lage sind, selektiv Chlorid-Ionen zu leiten, dies jedoch mit einer geringeren Effizienz im Vergleich

zu den Wildtyp-Rezeptoren erfolgt. Der Grund für eine niedrigere Effizienz könnte durch die Markierung der Rezeptor Untereinheiten mit einem GFP-Molekül bedingt sein. Das GFP-Molekül könnte die nativen Rezeptoren sterisch beeinflussen und somit den effektiven Einstrom von Chlorid-Ionen behindern.

7.2.6 Analyse der Transporteigenschaften der GFP-Fusionsproteine in hippocampalen Neuronen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die N-terminal markierten Fusionsproteine die Fähigkeit besitzen, sich zu funktionelle Rezeptorchimären zusammenzulagern, sollen die einzelnen Untereinheiten in kultivierten hippocampalen Neuronen auf ihre Transporteigenschaften untersucht werden. Die Neurone wurden dazu mit den markierten Untereinheiten und den wt-Untereinheiten β_2 und γ_2 kotransfiziert. Da die Neurone lebend untersucht werden sollten, wurden die Neurone auf LabTek™-Kammern ausplattiert (siehe Methoden 6.2.8). Die transfizierten Neurone wurden danach für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und dann einer Fluoreszenzanalyse unterzogen. In Abbildung 28 ist exemplarisch das Ergebnis einer erfolgreichen Transfektion mit dem Konstrukt pRK5/EYFP-myc-GABA_A- α_1 dargestellt. In Abbildung 28 erkennt man, dass eine Anhäufung des Signals im Bereich des Zellsomas auftritt. Ferner kann man erkennen, dass in den Neuriten Signalanhäufungen in unregelmäßigen Abständen auftreten (Abbildung 28-1 und Abbildung 28-2, Pfeilspitzen), welche auf Rezeptor-„Cluster“ hindeuten. In Abbildung 28 (Kasten 1 und 2) sind diese Anhäufungen im Bereich der Neuriten noch deutlicher dargestellt. Auffällig ist hier besonders die Zellmembran. Diese zeigte durchgehend ein helleres Signal, als das Innere eines Neuriten (Abbildung 28-1 und Abbildung 28-2, Pfeil).

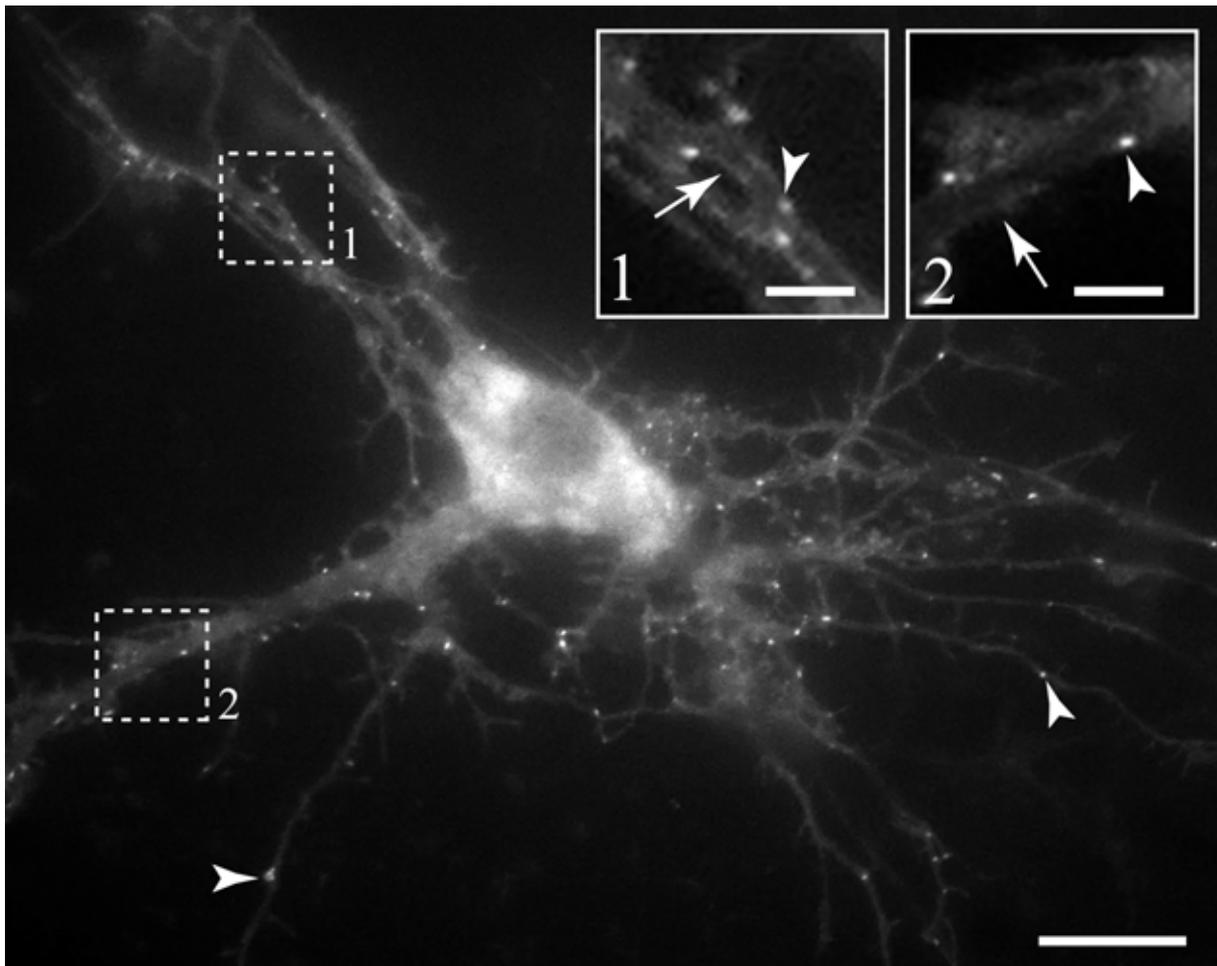


Abbildung 28: Expressionsmuster des Konstruktes pRK5/EYFP-myc-GABA_A-α₁ in hippocampalen Neuronen. Frisch präparierte, hippocampale Neurone aus E18-Wistar-Rattenembryonen wurden zunächst für 8 Tage in LabTek™-Kammern kultiviert. Anschließend wurden die Neurone mittels einer modifizierten Kalzium-Phosphat-Präzipitation (siehe Methoden) mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-GABA_A-α₁, sowie pRK5/GABA_A-β₂ und pRK5/GABA_A-γ₂ kotransfiziert und anschließend für weitere 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Pfeilspitzen, Signale von Rezeptoranhäufungen an der Plasmamembran; Pfeile, homogene Signalverteilung an der Plasmamembran; Maßstabsbalken, 10µm (Hauptbild), 2µm (1,2).

Nachfolgend wurde die räumliche Verteilung der Untereinheiten α₁ und α₂ bei gleichzeitiger Expression in hippocampalen Neuronen untersucht. Dazu wurden sieben Tage alte, auf LabTek™-Kammern kultivierte hippocampale Neurone mit den Konstrukten pRK5/ECFP-GABA_A-myc-α₁ und pRK7/EYFP-GABA_A-HA-α₂ sowie den zusätzlichen Konstrukten pRK5/GABA_A-β₂ und pRK5/GABA_A-γ₂ kotransfiziert und anschließend für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die mikroskopische Untersuchung der Verteilung der verschiedenen Rezeptoren anhand der lebenden Zellen. Es konnte festgestellt werden, dass die auftretenden Rezeptoranhäufungen immer nur Signale von einer Variante der α-Untereinheit zeigten (Abbildung 29B und C).

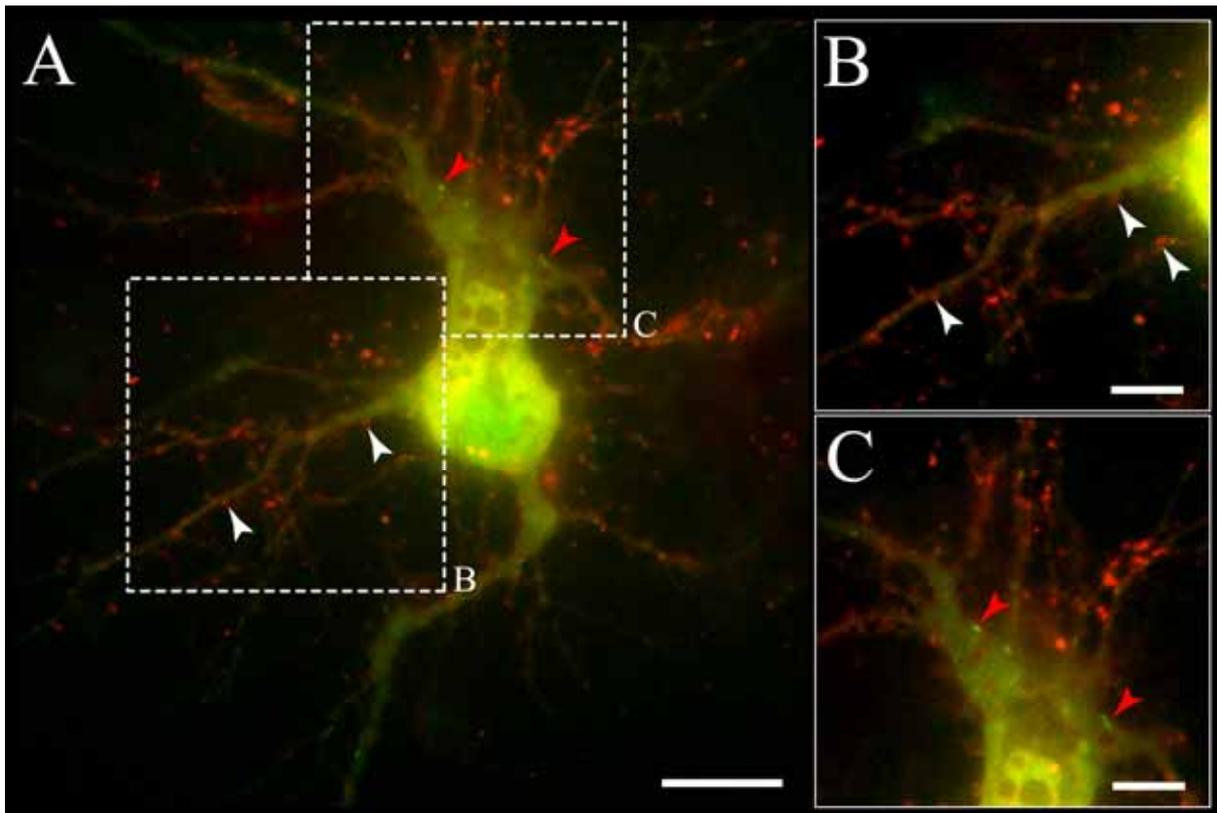


Abbildung 29: Differenzielle Verteilung der GABA_A-Untereinheiten α_1 und α_2 in 7 Tage kultivierten hippocampalen Neuronen. Frisch präparierte, hippocampale Neurone aus E18-Wistar-Rattenembryonen wurden zunächst für 7 Tage in LabTek™-Kammern kultiviert. Anschließend wurden die Neurone mittels einer modifizierten Kalzium-Phosphat-Präzipitation (siehe Methoden) mit den Konstrukten pRK5/ECFP-myc-GABA_A- α_1 bzw. pRK7/EYFP-HA-GABA_A- α_2 , sowie den zusätzlichen Konstrukten pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert und anschließend für weitere 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Gezeigt ist ein Übersichtsbild eines der positiv transfizierten Neurone. Zu erkennen ist die Fluoreszenz der α_1 -Untereinheit (rot) sowie die der α_2 -Untereinheit (grün) (A). Die Abbildungen (B) und (C) stellen Bereiche aus (A) vergrößert dar. Weiße Pfeilspitzen, Signale von Rezeptoranhäufungen mit der Untereinheit α_1 an der Plasmamembran; rote Pfeilspitzen, Signale von Rezeptoranhäufungen mit der Untereinheit α_2 an der Plasmamembran; Maßstabsbalken, 10 μ m (Hauptbild), 2 μ m (B,C).

Die Signalanhäufungen („Cluster“) von Rezeptoren, die die α_1 -Untereinheit enthalten, können in einer homogenen Verteilung sowohl im Bereich des Zellsomas, als auch an den Neuriten festgestellt werden (Abbildung 29A und B, weiße Pfeilspitzen). Rezeptoren, die die markierte α_2 -Untereinheit enthalten, konnten hauptsächlich im Bereich des Zellsomas und in einigen wenigen Neuriten gehäuft beobachtet werden (Abbildung 29A und C, rote Pfeilspitzen). Auffällig war weiterhin, dass α_1 - gehäuft an der Plasmamembran nachzuweisen waren, wobei α_2 - Rezeptorchimären zu diesem Zeitpunkt zu einem großen Teil noch im Zytoplasma nachgewiesen werden konnten (Abbildung 29A, grünes Signal).

7.2.7 Analyse der Funktionalität von zusätzlich integrierten Proteaseschnittstellen

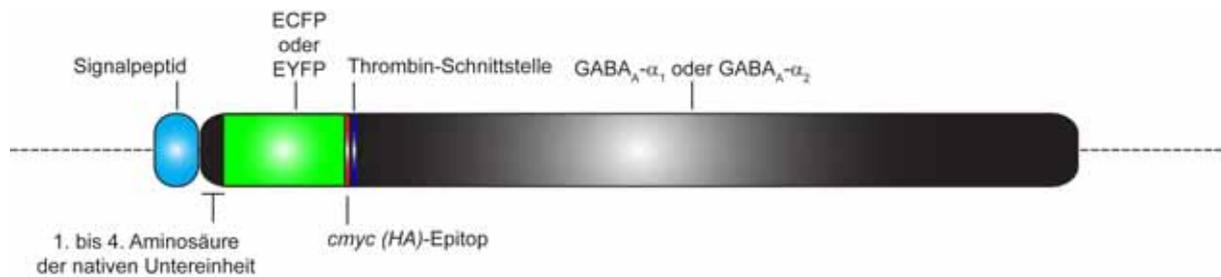


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Konstrukte pRK5/ECFP-myc-Thr-GABA_A-α₁, pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A-α₁, pRK7/ECFP-HA-Thr-GABA_A-α₂ und pRK7/ECFP-HA-Thr-GABA_A-α₂. Dargestellt ist der für das jeweilige Fusionsprotein kodierende Teil des Expressionsvektors. Farbige Kästen stellen einzelne Domänen des Fusionsproteins dar. Die ausführliche Klonierungsstrategie und die entsprechenden Vektorkarten zu diesen Konstrukten sind auf der beiliegenden CD zu finden (Ordner: Anhang, Datei: Anhang.pdf, Abschnitte A.2.2.4 und A.3.2.4).

Aufgrund der hohen Intensität der Oberflächenfluoreszenz und den daraus folgenden Streulichteffekten bei transfizierten Zellen war es nur schwer möglich interne Strukturen, z.B. Transportvesikel, aufgrund ihrer geringen Fluoreszenzintensität zu erkennen. Eine vorübergehende Reduktion des Plasmamembransignals würde daher eine kontrastreichere Visualisierung der Transportvesikel ermöglichen und so die Untersuchung des Transportverhaltens dieser Vesikel sehr vereinfachen. Deswegen wurde eine zusätzliche Proteaseschnittstelle C-Terminal von der inserierten GFP-Variante eingefügt (Abbildung 30 und Abbildung 31). Die Proteaseschnittstelle soll ermöglichen, dass unter Verwendung einer spezifischen Protease, das extrazellulär befindliche ECFP oder EYFP entfernt werden kann. Im vorliegenden Fall sollten zwei grundlegend verschiedene Proteasen zum Einsatz kommen. Zum einen die Protease Thrombin, welche bei der Kaskade der Blutgerinnung eine große Rolle spielt. Thrombin besitzt den Vorteil, dass es nur eine bestimmte Aminosäuresequenz (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser) erkennt (Chang, 1985). Weiterhin wurde auch eine im Vergleich dazu kleine virale Protease des *Tobacco-Etch-Viruses* (TEV) verwendet. Diese Protease ist mit einer Größe von 28kDa bedeutend kleiner, als die zuvor verwendete Thrombin-Protease (78kDa) (Kapust et al., 2000; Kapust et al., 2001). Durch ihre geringere Größe könnte eine sterische Behinderung ihrer Katalyse verhindert werden.

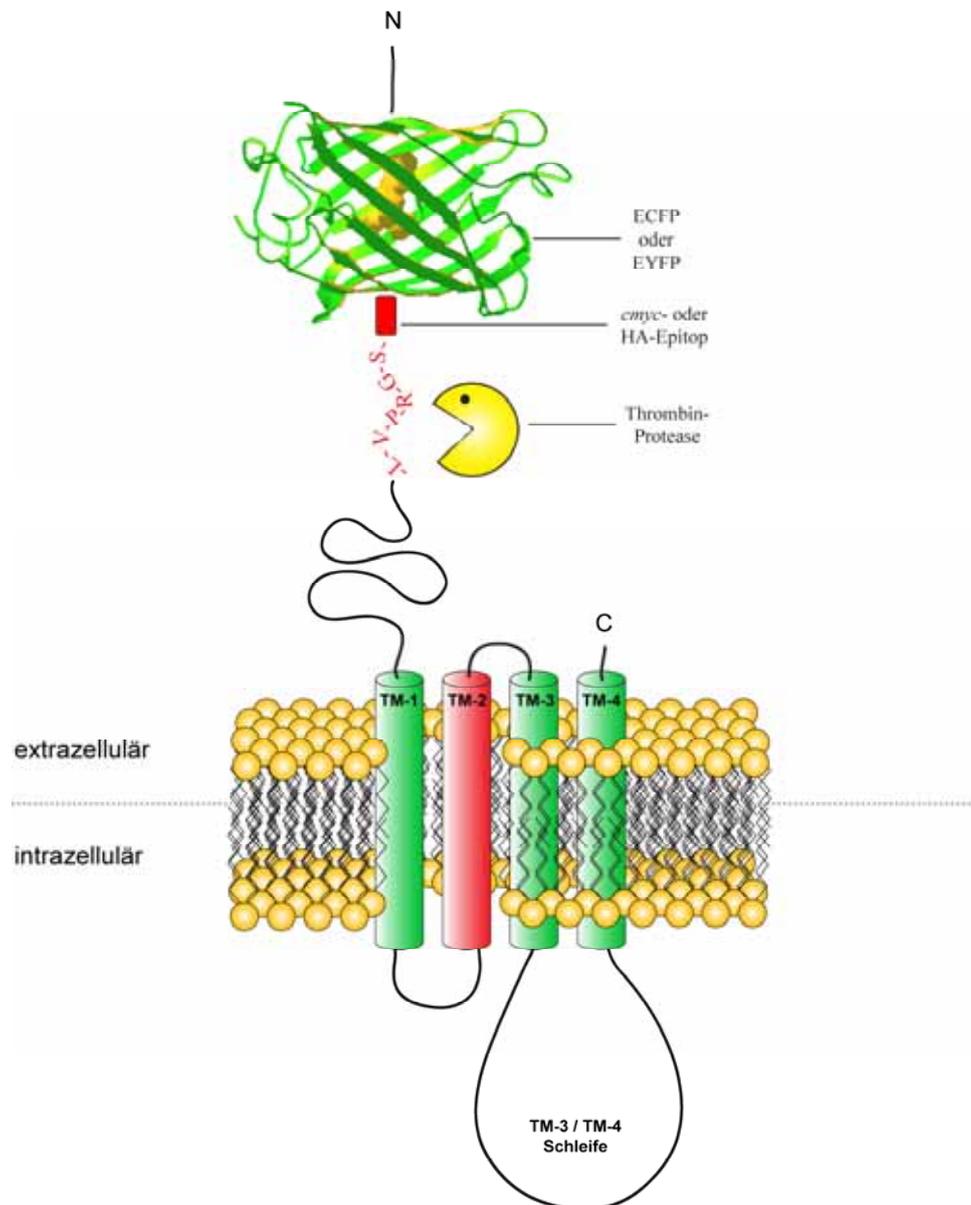


Abbildung 31: Schematische, räumliche Darstellung einer GABA_A-Rezeptor-Untereinheit mit Thrombinschnittstelle. Am extrazellulär befindlichen, N-terminalen Ende der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit wurde zwischen der 4. und 5. Aminosäure eine Spektralmutante des GFP (ECFP oder EYFP), gefolgt von einem *myc*- bzw. *HA*-Epitop eingefügt. Direkt C-terminal des Epitops folgt eine Schnittstelle für die Protease Thrombin (L-V-P-R-G-S).

7.2.7.1 Fusionsproteine mit Thrombinschnittstelle

Zunächst wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um sicherzustellen, dass die verwendeten Proteasen unter den Versuchsbedingungen auch funktionell sind. Dazu wurden HEK293-Zellen mit einer DNA transfiziert, welche die α_1 -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors kodiert, da diese Konstrukte schon erfolgreich für Experimente mit der Protease Thrombin eingesetzt wurden (Rosenberg et al., 2001). Neben einer α_1 -Untereinheit des Glyzin-

Rezeptors, die N-terminal mit einem *myc*-Epitop (ohne eine Thrombinschnittstelle) fusioniert wurde (*myc*-GlyzinR- α_1 , (Rosenberg et al., 2001)), wurde eine Untereinheit verwendet, die neben dem integrierten *myc*-Epitop noch die Thrombin.-Schnittstelle enthält (*myc*-Thr-GlycinR- α_1 , (Rosenberg et al., 2001)). Die Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und anschließend für 24h bei 37°C inkubiert. Um zu verhindern, dass bei einer extrazellulären Behandlung der Zellen mit der Protease Thrombin kontinuierlich neue Rezeptoren an die Plasmamembran transportiert werden, wurden die Zellen mit der Protease Thrombin für zwei Stunden bei 19.5°C (Kälte-Block) inkubiert. Der Kälte-Block verhindert den Proteintransport aus der trans-Golgi-Region und somit eine Detektion neu exprimierter Rezeptoren an der Plasmamembran (Rosenberg et al., 2001). Nach der zweistündigen Inkubation mit Thrombin auf dem Kälte-Block wurden die Zellen auf Eis mit Antikörpern gegen das *myc*-Epitop einer Oberflächenimmunfluoreszenzfärbung unterzogen und anschließend mit Paraformaldehyd fixiert. Zellen, die zur Kontrolle mit dem Konstrukt ohne Thrombinschnittstelle (*myc*-Glyzin- α_1) transfiziert worden sind, zeigten wie erwartet eine Färbung der Zellmembran (Abbildung 32A). Im Gegensatz dazu wurde bei den Zellen, die mit dem Konstrukt *myc*-Thr-GlyzinR- α_1 transfiziert worden sind, nahezu kein Signal mehr an der Plasmamembran festgestellt (Abbildung 32B). Dies weist die katalytische Aktivität von Thrombin unter den verwendeten Bedingungen nach.

Während einer Inkubation der Zellen bei 19,5°C ist nur der Export von Proteinen aus dem Golgi-Apparat blockiert, jedoch nicht die Endozytose von Membranmaterial. Bei Zellen, die mit dem Kontroll-Konstrukt (*myc*-GlyzinR- α_1) transfiziert worden sind, konnte man trotz zweistündigem Kälte-Block, Rezeptoren an der Plasmamembran nachweisen. Somit ist die starke Abnahme des Signals an der Plasmamembran bei Zellen, die mit dem Konstrukt *myc*-Thr-GlyzinR- α_1 transfiziert und mit Thrombin behandelt worden sind, nur auf die katalytische Aktivität der Protease zurückzuführen, jedoch nicht auf die Endozytose membranständiger Rezeptoren.

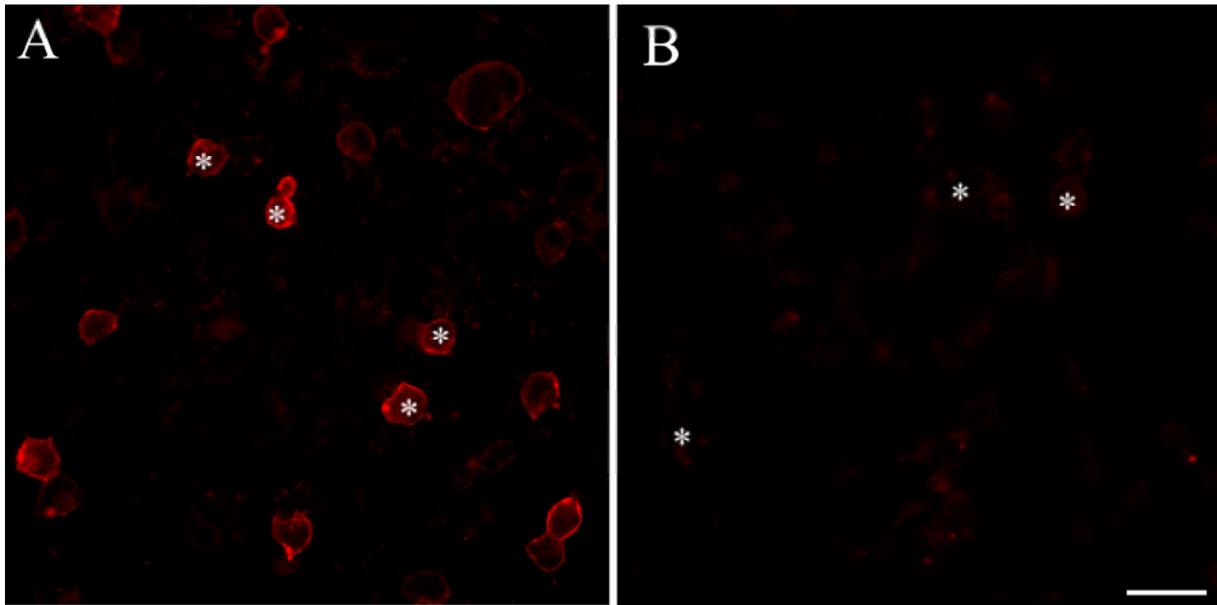


Abbildung 32: Kontrolle der Aktivität der Protease Thrombin. HEK293-Zellen wurden mittels Elektroporation mit den Konstrukten pCMV/myc-GlyzinR- α_1 (A) bzw. pCMV/myc-Thr-GlyzinR- α_1 (B) transfiziert, auf Fibronektin beschichtete Deckgläschen ausplattiert und anschließend für 48h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 19,5°C für zwei Stunden in PBS mit 20U der Thrombin-Protease inkubiert. Die Zellen wurde dann auf Eis einer Immunfluoreszenzfärbung gegen das extrazelluläre *myc*-Epitop unterzogen. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen *myc* und als Sekundärantikörper ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC gekoppelter, polyklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper verwendet. Dargestellt ist das Antikörpersignal des extrazellulär liegenden *myc*-Epitops der Glyzin-Rezeptor Untereinheit α_1 (A und B). Nach Thrombin Applikation bei einer Temperatur von 19,5°C ist bei der Kontrolle nach zwei Stunden noch ein Signal an der Plasmamembran zu detektieren (A), während bei Verwendung von Untereinheiten mit einer Thrombinschnittstelle das Signal nach dieser Zeit verschwunden ist (B). Sterne, Lage von exemplarisch ausgewählten Zellen; Maßstabsbalken, 20 μ m.

7.2.7.2 Analyse der Protease Thrombin bei HEK293-Zellen

Nachdem durch Kontrollexperimente gezeigt werden konnte, dass unter den gewählten Bedingungen eine Funktionalität der Protease Thrombin vorhanden war (siehe Abschnitt 7.2.7.1), wurden die modifizierten GABA_A-Rezeptor Untereinheiten α_1 und α_2 (Abbildung 30), die eine Thrombin Schnittstelle besitzen, auf die Funktionalität der inserierten Thrombinschnittstelle getestet. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit der modifizierten Rezeptor-Untereinheit pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A- α_1 bzw. pRK7/EYFP-myc-Thr-GABA_A- α_2 , sowie den Konstrukten pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert und wie zuvor für 24h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei einer Temperatur von 19.5°C die Protease Thrombin für insgesamt zwei Stunden appliziert, gefolgt von einer Oberflächenimmunfluoreszenzfärbung gegen EYFP. Verglichen mit dem Kontrollversuch mit Glyzin-Rezeptoren war hier nur eine geringe Reduktion des Fluoreszenzsignals für beide verwendeten Untereinheiten zu beobachten (Abbildung 33). Da hier nicht auszuschließen ist,

dass die räumliche Struktur der GABA_A-Rezeptoren sich grundlegend von der der Glyzin-Rezeptoren unterscheidet, könnte eine sterische Behinderung zu der Inaktivität der Protease Thrombin führen. Weiterhin sollte beachtet werden, dass die Protease Thrombin mit einer Größe von 78kDa eine ähnliche Größe aufweist, wie eine einzelne Untereinheit des GABA_A-Rezeptors.

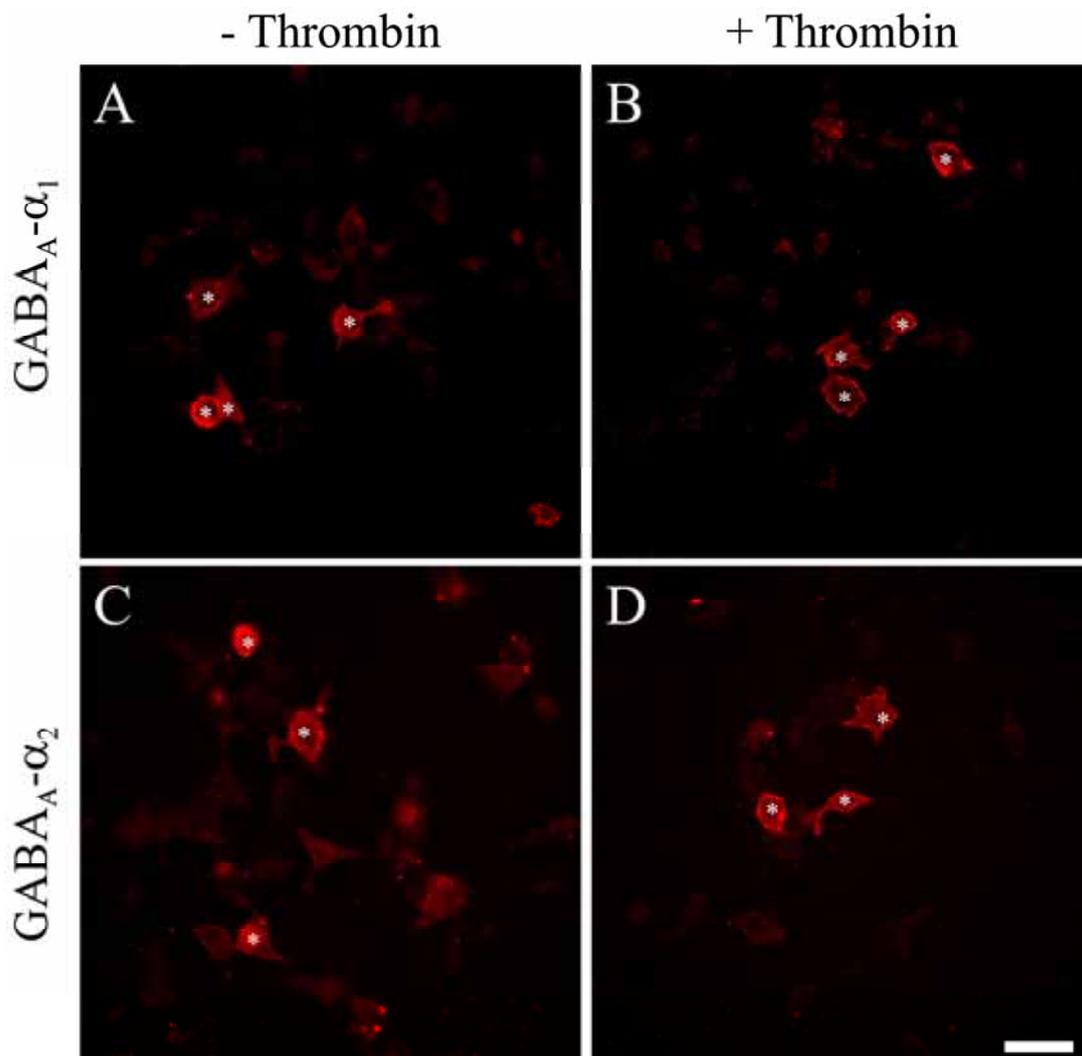


Abbildung 33: Analyse des Oberflächensignals nach Thrombinapplikation an HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mittels Elektroporation mit den Konstrukten pRK5/ECFP-myc-Thr-GABA_A-α₁ bzw. pRK7/ECFP-myc-Thr-GABA_A-α₂, sowie den Konstrukten pRK5/GABA_A-β₂ und pRK5/GABA_A-γ₂ kotransfiziert, auf Fibronectin beschichtete Deckgläschen ausplattiert und anschließend für 48h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 19,5°C für zwei Stunden in PBS mit 20U der Thrombin-Protease inkubiert. Die Zellen wurden dann auf Eis einer Immunfluoreszenzfärbung gegen das extrazelluläre *cmyc*-Epitop unterzogen. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen *cmyc* und als Sekundärantikörper ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC gekoppelter, polyklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper verwendet. Dargestellt ist das Antikörpersignal des extrazellulär liegenden *cmyc*-Epitops der GABA_A-Rezeptor Untereinheit α₁ (A und B) sowie der GABA_A-Rezeptor Untereinheit α₂ (C und D). Nach Thrombin Applikation bei einer Temperatur von 19,5°C ist nach zwei Stunden noch ein Signal an der Plasmamembran von Zellen zu detektieren, die mit der GABA_A-Rezeptor Untereinheit α₁ transfiziert worden sind (B). Bei Zellen die mit der GABA_A-Rezeptor Untereinheit α₂ transfiziert worden sind, ist ebenfalls nach zweistündiger Inkubation mit Thrombin ein Signal an der Oberfläche zu erkennen (D). Sterne, Lage von exemplarisch ausgewählten Zellen; Maßstabsbalken, 20µm.

7.2.7.3 Analyse der Aktivität der Protease Thrombin in hippokampalen Neuronen

Zur Kontrolle, ob die Inaktivität der Protease Thrombin bei den klonierten GABA_A-Rezeptoren nur bei der Expression in HEK293-Zellen vorliegt, wurden hippokampale Neurone ebenfalls mit dem Konstrukt pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A- α_1 sowie den Konstrukten pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert. Nach 60-minütiger Inkubation mit der Protease Thrombin konnte keine Reduzierung des Membransignals beobachtet werden (Abbildung 34B, Pfeile). Ähnlich verhalten sich auch die Fluoreszenzsignale der Anhäufungen von chimären Rezeptoren an der Plasmamembran (Abbildung 34A, Pfeilspitzen). Auch nach einer Inkubation für 24h mit der Protease lässt sich kein Rückgang der Signalintensität der markierten Rezeptoren an der Plasmamembran beobachten (Abbildung 35). Um auch hier eine sterische Behinderung der Protease auszuschließen, wurden die Konstrukte weiter modifiziert. Dazu wurde zwischen GFP-Teil und Thrombinschnittstelle ein insgesamt 50 Aminosäuren umfassender Abstandshalter aus alternierenden Alanin- und Serin-Aminosäuren ((-Ala-Ser-)₂₅) eingefügt, um eine sterische Behinderung von Thrombin durch das GFP-Molekül zu minimieren (Abbildung 36; für Details zur Klonierungsstrategie siehe Anhang A.2.2.6 – A.2.2.9).

Nach einer Transfektion von hippokampalen Neuronen mit diesen neuen Konstrukten konnte wie zuvor keine Reduktion der Signalintensität der chimären Rezeptoren an der Plasmamembran beobachtet werden (nicht gezeigt). Bei genauerer Untersuchung der Aminosäuren, die die Thrombinschnittstelle flankieren, fiel auf, dass sich C-terminal von dieser die Aminosäuren Asparaginsäure (Asp, D) und Glutaminsäure (Glu, E) befinden. Diese Aminosäuren könnten die Katalyseeigenschaften der Protease negativ beeinflussen (Chang, 1985). Um dies zu verhindern, wurde ein neues Konstrukt kloniert, bei dem die Schnittstelle, das GFP-Molekül und das *myc*-Epitop nach der sechsten Aminosäure der nativen Untereinheit α_1 inseriert wurden (für Details siehe Abschnitt A.2.2.12 der Datei „Anhang.pdf“ im Ordner „Anhang“ auf der beiliegenden CD). Dies hat zur Folge, dass saure Aminosäuren nicht mehr C-terminal an die Thrombinschnittstelle angrenzen (siehe Anhang A.2.2.12 und Abbildung A-31 der Datei „Anhang.pdf“ im Ordner „Anhang“ auf der beiliegenden CD). Zudem wurde C-terminal angrenzend an die Schnittstelle ein aus zehn Aminosäuren bestehender Abstandshalter, bestehend aus einer alternierenden Abfolge aus Alanin und Glyzin, eingefügt (siehe Anhang A.2.2.12, Abbildung A-31 der Datei „Anhang.pdf“ im Ordner „Anhang“ auf der beiliegenden CD). Dennoch konnte bei

Verwendung dieser Konstrukte keine Reduktion des Fluoreszenzsignals der an der Plasmamembran befindlichen Rezeptoren bei einer Inkubation mit Thrombin beobachtet werden (nicht gezeigt).

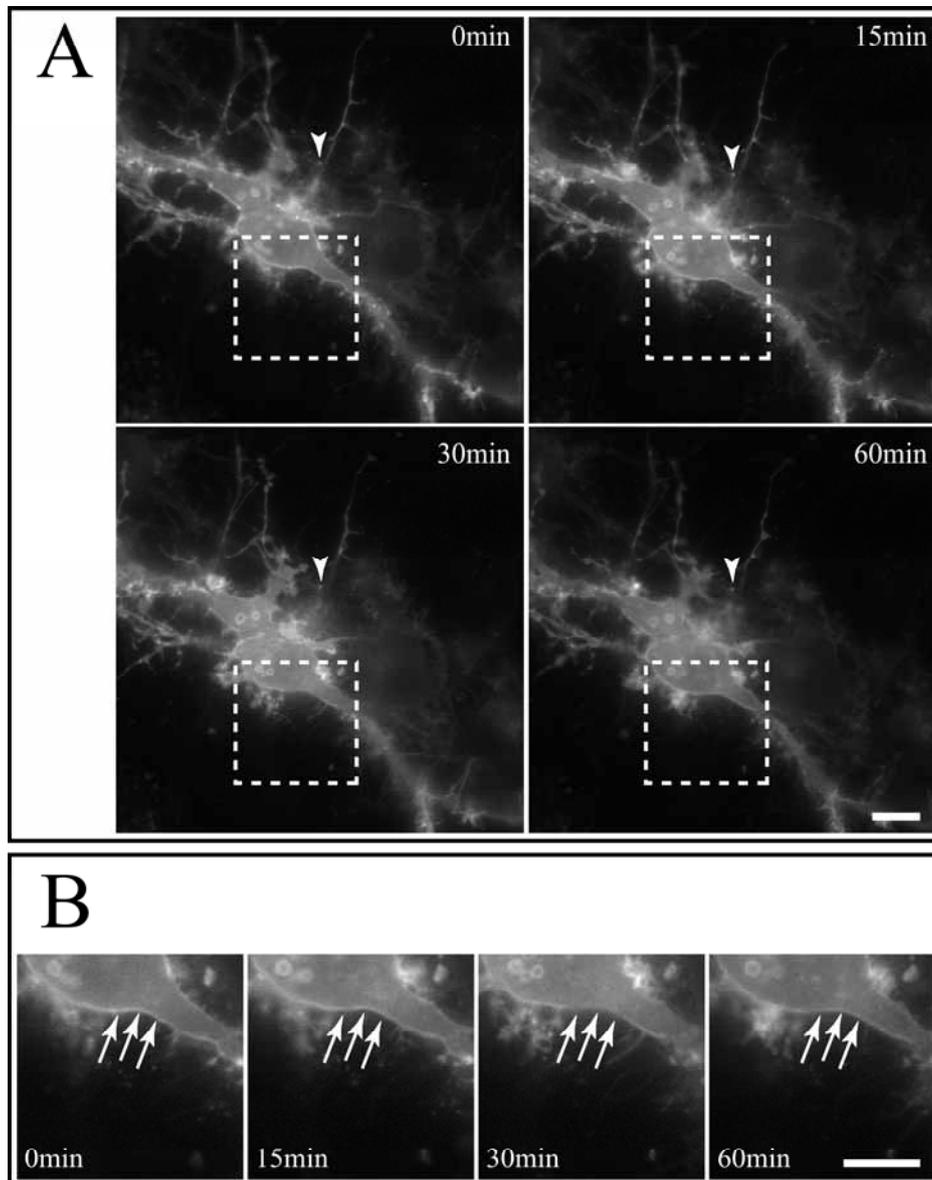


Abbildung 34: Analyse des Oberflächensignals nach 60 minütiger Thrombinapplikation an hippocampalen Neuronen. Frisch präparierte, hippocampale Neurone aus E18-Wistar-Rattenembryonen wurden zunächst für 7 Tage in LabTek™-Kammern kultiviert. Anschließend wurden die Neurone mittels einer modifizierten Kalzium-Phosphat-Präzipitation (siehe Methoden) mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A- α_1 , sowie den zusätzlichen Konstrukten pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert und anschließend für weitere 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 20U Thrombin bei einer Temperatur von 19,5°C für insgesamt 60min inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zu den Zeitpunkten 0min, 15min, 30min und 60min wurde jeweils ein Bild eines positiv transfizierten Neurons aufgenommen (A). Um das Fluoreszenzsignal der Plasmamembran deutlicher zu zeigen, wurde ein Teilausschnitt aus (A) vergrößert dargestellt (B). Pfeile, Signal der GFP-Fluoreszenz der chimären Rezeptoren an der Plasmamembran eines Neurons; Pfeilspitzen, Signalanhäufungen an der Plasmamembran; Maßstabsbalken, 10µm

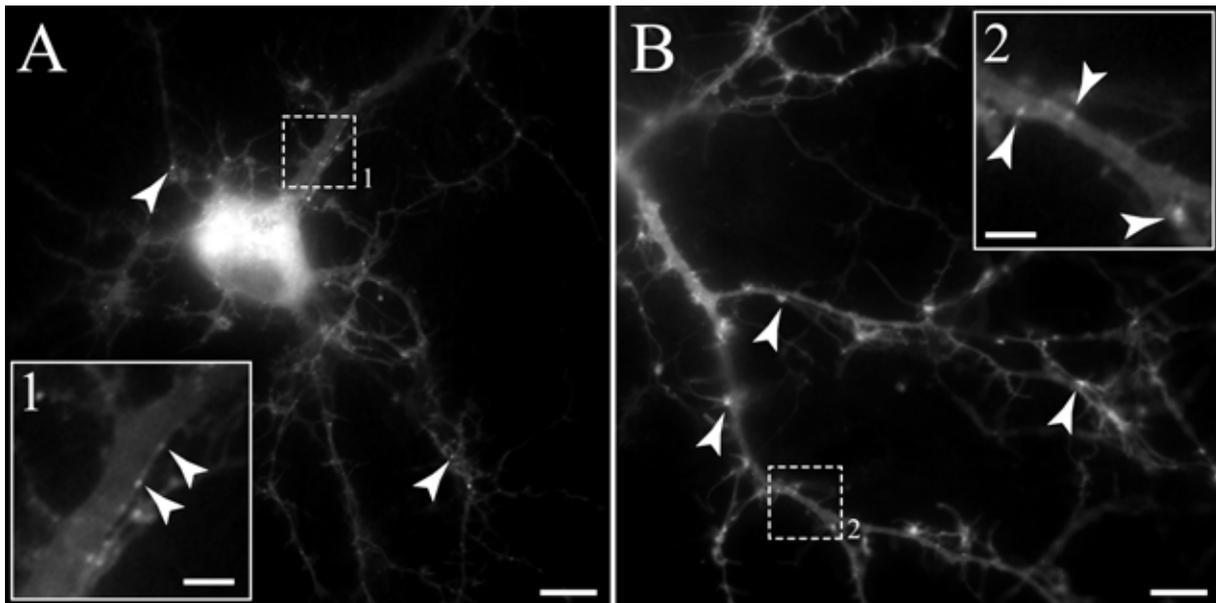


Abbildung 35: Analyse des Oberflächensignals nach 24 Stunden Thrombinapplikation an hippocampalen Neuronen. Frisch präparierte, hippocampale Neurone aus E18-Wistar-Rattenembryonen wurden zunächst für 7 Tage in LabTek™-Kammern kultiviert. Anschließend wurden die Neurone mittels einer modifizierten Kalzium-Phosphat-Präzipitation (siehe Methoden) mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A-α₁, sowie den zusätzlichen Konstrukten pRK5/GABA_A-β₂ und pRK5/GABA_A-γ₂ kotransfiziert und für weitere 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 20U Thrombin bei 37°C / 5% CO₂ für insgesamt 24 Stunden inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. (A) Ansicht der Zellkörperregion. (B) Ansicht einer peripheren Region des in (A) gezeigten Neurons. (1 und 2) zeigen jeweils vergrößerte Ausschnitte aus den jeweiligen Abbildungen. Pfeilspitzen, Anhäufung des GFP-Fluoreszenzsignals der chimären Rezeptoren an der Plasmamembran eines Neurons; Maßstabsbalken, 10µm (A, B) bzw. 2µm (1,2).

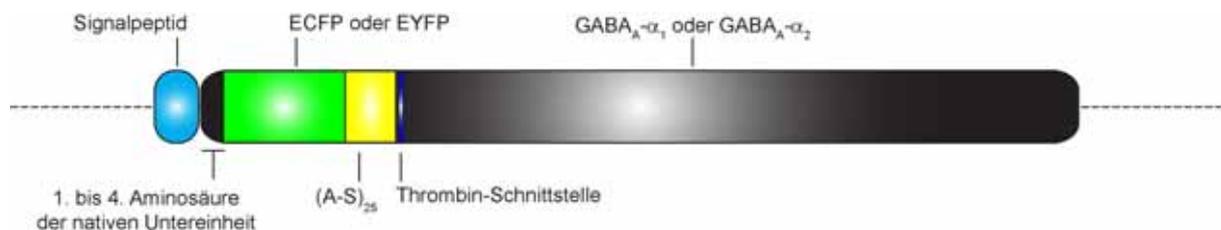


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Konstrukte pRK5/ECFP-myc-Thr-GABA_A-α₁, pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A-α₁, pRK7/ECFP-HA-Thr-GABA_A-α₂ und pRK7/ECFP-HA-Thr-GABA_A-α₂. Dargestellt ist der für das jeweilige Fusionsprotein kodierende Teil des Expressionsvektors. Farbige Kästen stellen einzelne Domänen des Fusionsproteins dar. Die ausführliche Klonierungsstrategie und die entsprechenden Vektorkarten zu diesen Konstrukten sind auf der beiliegenden CD zu finden (Ordner: Anhang, Datei: Anhang.pdf, Abschnitte A.2.2.5 bis A.2.2.9 und A.3.2.5).

7.2.7.4 Analyse von Fusionsproteinen mit einer TEV-Proteaseschnittstelle

Da bei der Verwendung der Protease Thrombin unter den bisher untersuchten Bedingungen keine Reduktion des Membransignals zu verzeichnen war, wurde eine vergleichbare Strategie mit der viralen Protease des „Tobacco-Etch“-Virus (TEV) verwendet. Das dazu verwendete Fusionsprotein enthält C-terminal von der vierten Aminosäure der nativen Untereinheit ein GFP-Molekül, gefolgt von einem aus 40

Aminosäuren bestehenden Abstandshalter und einer Schnittstelle für die TEV-Protease und für die Protease Thrombin (Abbildung 37). Zur Kontrolle der Transporteigenschaften des Konstrukts, wurde dieses in HEK293-Zellen zusammen mit den Konstrukten pRK5/GABA_A-β₂ und pRK5/GABA_A-γ₂ kotransfiziert. Die Zellen wurden anschließend für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Um den Transport dieser Fusionsproteine an die Plasmamembran nachzuweisen, wurde eine Oberflächenfärbung mit Antikörpern gegen Epitope des EYFP an nicht-permeabilisierten Zellen durchgeführt (siehe Methoden 6.2.13).

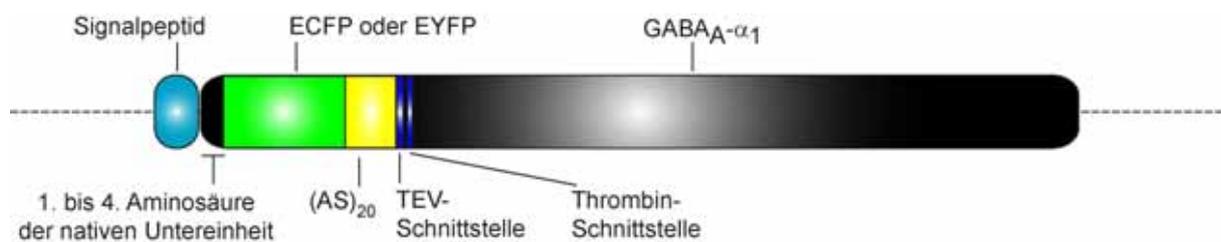


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Konstrukte pRK5/ECFPsp40-TEV-Thr(N4)-GABA_A-α₁ oder pRK5/EYFPsp40-TEV-Thr(N4)-GABA_A-α₁. Dargestellt ist der für das jeweilige Fusionsprotein kodierende Teil des Expressionsvektors. Farbige Kästen stellen einzelne Domänen des Fusionsproteins dar. Die ausführliche Klonierungsstrategie und die entsprechenden Vektorkarten zu diesen Konstrukten sind auf der beiliegenden CD zu finden (Ordner: Anhang, Datei: Anhang.pdf, Abschnitt A.2.2.10 und A.3.2.6).

Neben einer deutlichen GFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine, sind auch die durch die Oberflächenfärbung markierten Epitope des EYFP an der Plasmamembran zu erkennen (Abbildung 38B, C und D). Da die Zellen nicht permeabilisiert worden sind, wurden nur die extrazellulär liegenden EYFP-Moleküle gefärbt. Daraus lässt sich schließen, dass die klonierten Untereinheiten in die Plasmamembran inseriert worden sind (Abbildung 38A, C, D). Weiterhin wurde untersucht, ob die Verwendung einer TEV-Protease zur Reduktion des Membransignals führt. In Abbildung 39 kann man erkennen, dass das Signal nach Zugabe der TEV-Protease nur geringfügig schwächer ist (Abbildung 39B) als ohne Applikation der TEV-Protease (Abbildung 39A).

Weder die Insertion unterschiedlich langer Abstandshalter, noch die Verwendung unterschiedlicher Proteasen konnte dazu führen, dass die intensive Plasmamembranfärbung, die nach Transfektion der Konstrukte in kultivierten Zelllinien und in hippokampalen Neuronen auftrat, reduziert werden konnte. Aufgrund der sehr guten Transporteffizienz konnten die Konstrukte, die eine Thrombinschnittstelle enthalten, jedoch für die nachfolgenden Transportstudien eingesetzt werden.

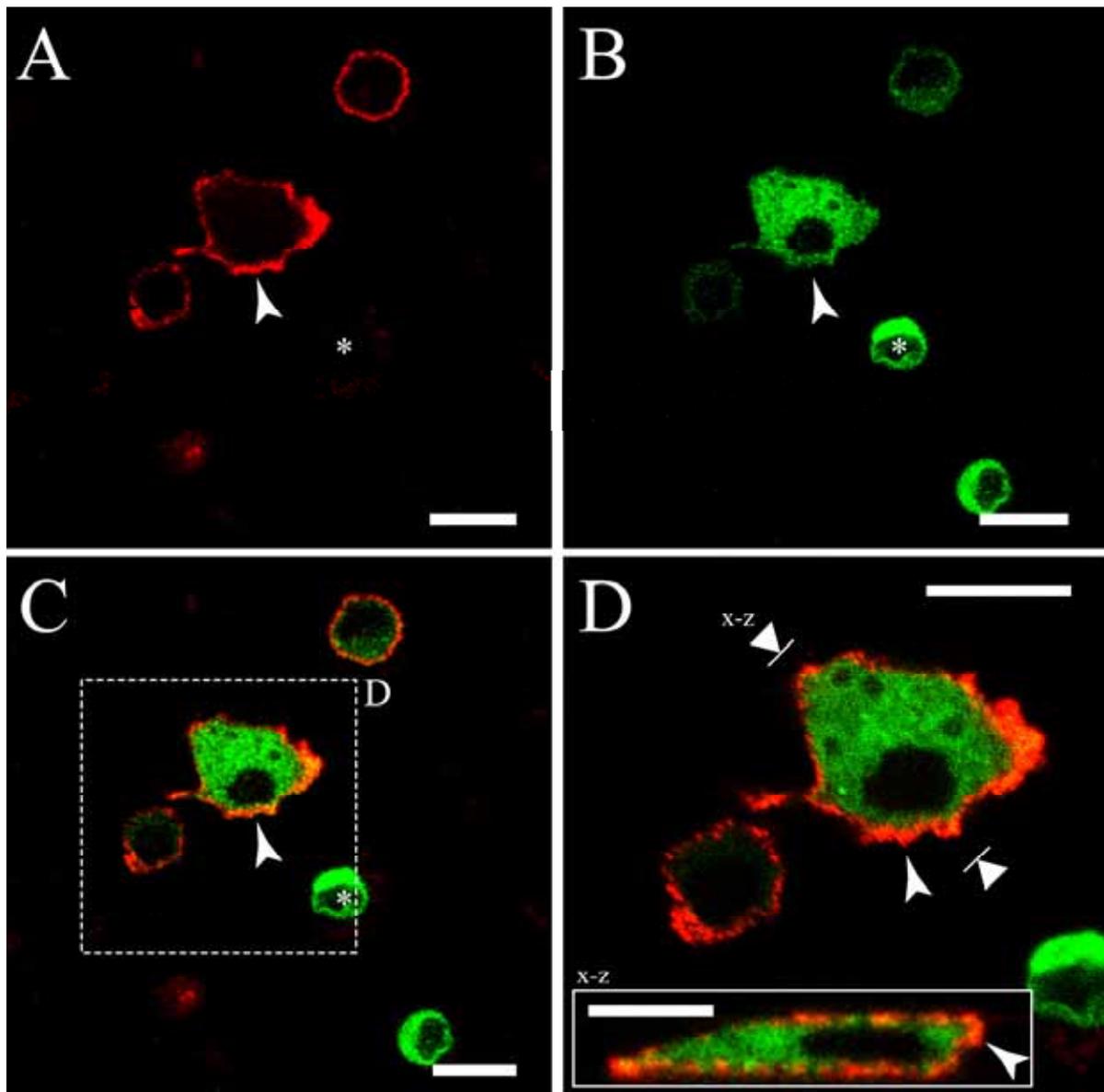


Abbildung 38: Analyse der Transporteigenschaften des Konstruktes pRK5/EYFPsp40-TEV-Thr(N4)-GABA_A- α_1 . HEK293-Zellen wurden mittels Elektroporation mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-TEV-GABA_A- α_1 sowie den Konstrukten pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert, auf Fibronectin beschichtete Deckgläschen ausplattiert und anschließend für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann auf Eis einer Immunfluoreszenzfärbung gegen das extrazelluläre EYFP-Epitop unterzogen. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Antikörper gegen EYFP und als Sekundärantikörper ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelter, polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Dargestellt ist eine konfokale Aufnahme des Antikörpersignals des extrazellulär liegenden EYFP-Moleküls der GABA_A-Rezeptor Untereinheit α_1 (A), der GFP-Fluoreszenz des EYFP-Fusionsproteins (B), sowie die Überlagerung der beiden Kanäle (C). Eine detaillierte Darstellung einer positiv transfizierten Zelle ist in (D) dargestellt. (x-z), Übereinanderlagerung von 50 konfokalen, optischen Schnitten durch eine Zelle; Pfeilspitzen, Anhäufung von Signalen an der Plasmamembran; Stern, Zelle, die kein Oberflächensignal zeigt; Maßstabsbalken, 10µm.

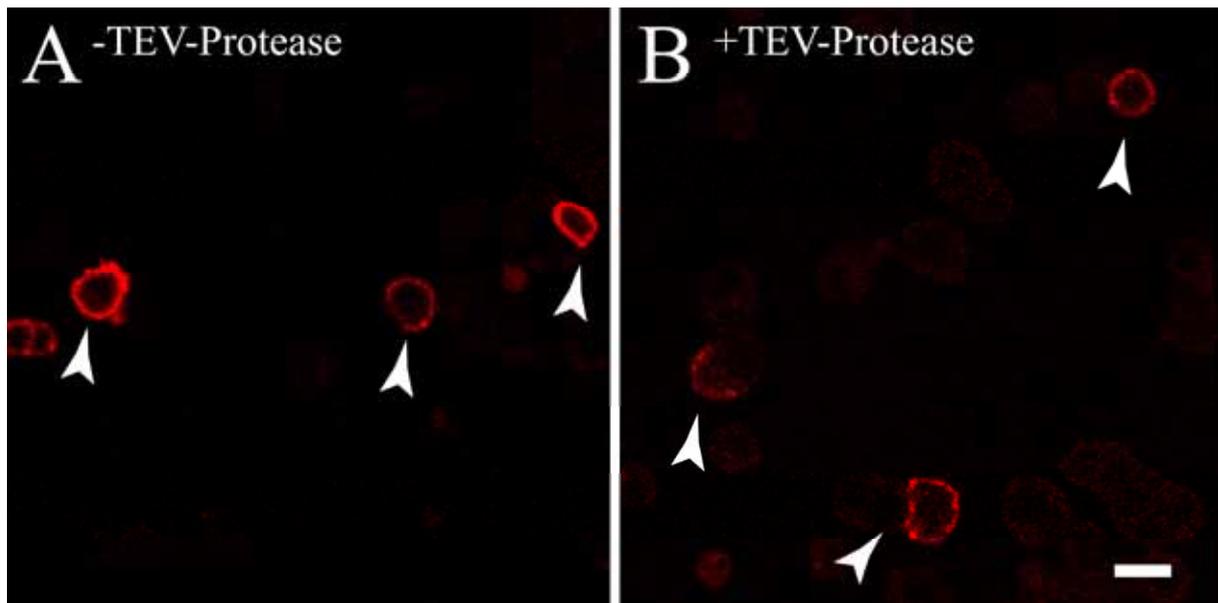


Abbildung 39: Untersuchung der Funktionalität der TEV-Proteaseschnittstelle. PC12-Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem Konstrukt pRK5/EYFPsp40-TEV-Thr(N4)-GABA_A- α_1 sowie den Konstrukten pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert, auf poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen ausplattiert und anschließend für 24h bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2h mit 10U der TEV-Protease bei 19,5°C inkubiert und danach auf Eis einer Immunfluoreszenzfärbung gegen das extrazelluläre EYFP-Molekül unterzogen. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen EYFP und als Sekundärantikörper ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelter, polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Dargestellt ist eine konfokale Aufnahme des Antikörpersignals des extrazellulär liegenden EYFP-Moleküls der GABA_A-Rezeptor Untereinheit α_1 ohne die TEV-Protease (A) sowie mit der TEV-Protease (B). Pfeilspitzen, positive Zellen (exemplarisch); Maßstabsbalken, 10 μ m.

7.2.8 Bidirektionaler Transport von GABA_A-Rezeptorchimären in hippocampalen Neuronen

Mit Hilfe der GFP-markierten GABA_A-Rezeptor Untereinheiten α_1 und α_2 sollen die Transportprozesse vom Zeitpunkt der Translation der einzelnen Untereinheiten, sowie der Assemblierung verschiedener Untereinheiten zum fertigen Rezeptor bis hin zu deren zellulären Bestimmungsorten untersucht werden. Deswegen wurden hippocampale Neurone, die 8 bis 14 Tage kultiviert wurden, mit den klonierten Konstrukten transfiziert, für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und dann mit Hilfe zeitlich hochauflösender Lebend-Zell-Videomikroskopie untersucht (Abbildung 40 und Abbildung 41). Dabei konnte beobachtet werden, dass sich Transportvesikel sowohl anterograd vom Zellsoma in die Neuriten, als auch retrograd von den Neuriten in Richtung des Zellsomas bewegen. In Abbildung 41 ist eine zeitliche Abfolge dargestellt, bei der die unterschiedliche Bewegungsrichtung zu erkennen ist. Zwischen den Zeitpunkten 0s bis 3s bewegt sich das Transportvesikel vom Zellsoma kommend in anterograder Richtung in einen Zellausläufer mit einer

Durchschnittsgeschwindigkeit von $1,58\mu\text{m/s}$ (Abbildung 41, weiße, gestrichelte Line) und stoppt in dem dargestellten Ausläufer. Dieses Vesikel verweilt für vier Sekunden an diesem Endpunkt und bewegt sich anschließend mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von $3,14\mu\text{m/s}$ in retrograder Richtung zum Zellsoma (Abbildung 41, rote gestrichelte Line). Sowohl bei der Bewegung in den Zellausläufer, als auch bei der Bewegung zurück Richtung Zellsoma bewegt sich das Vesikel auf der gleichen Bahn. Die Geschwindigkeiten von $1,58\mu\text{m/s}$, respektive $3,14\mu\text{m/s}$, als auch die Tatsache, dass sich das Vesikel auf der gleichen Bahn bewegt, sind ein Hinweis auf einen Mikrotubuli-abhängigen Transport (Grafstein et al., 1980; Brady et al., 1982; Kaether et al., 2000).

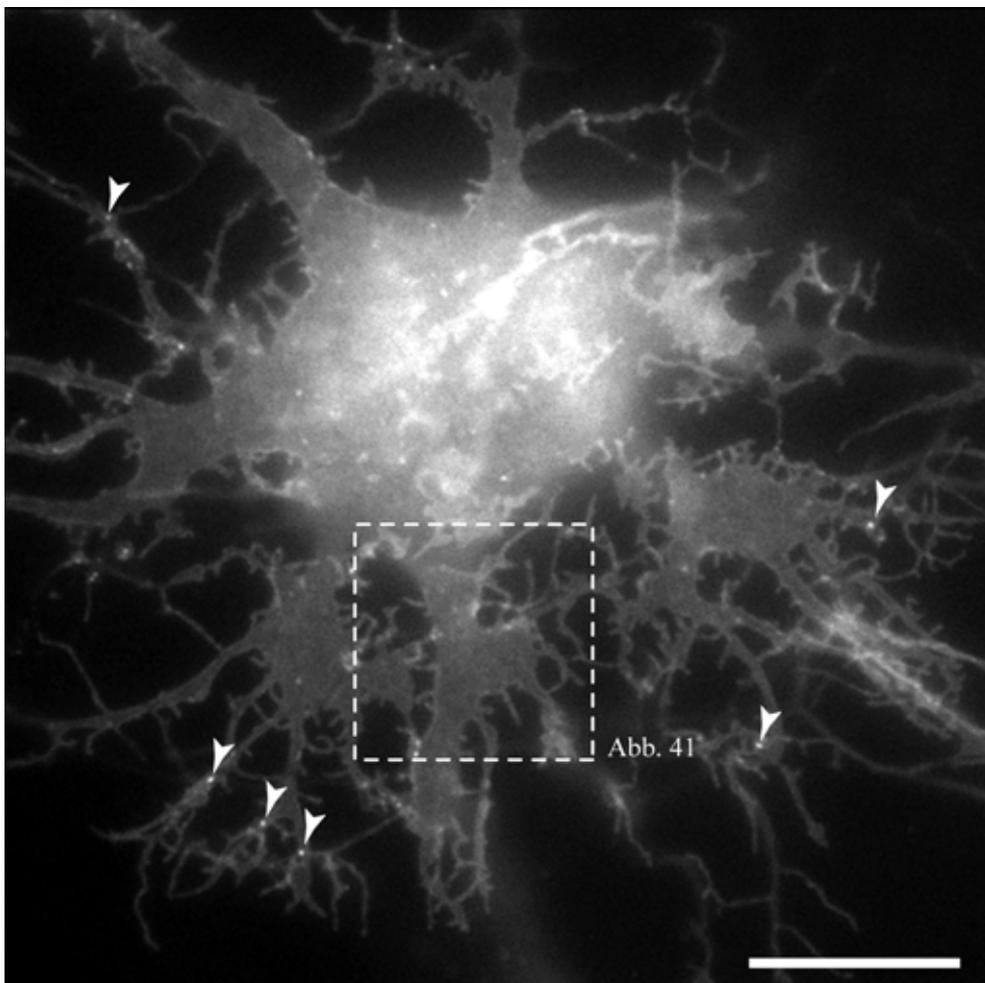


Abbildung 40: Übersichtsbild der Zellkörperregion eines Neurons (9 Tage in Kultur), das mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A- α_1 , pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert wurde. Hippokampale Neurone, die für 9 Tage in LabTek™-Kammern kultiviert wurden, wurden mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A- α_1 , pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert und für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Positiv transfizierte Neurone wurden mittels Videomikroskopie analysiert. Der Kasten verweist auf eine Abbildung, bei denen eine zeitliche Abfolge von Bildern gezeigt wird. Pfeilspitzen, Anhäufungen fluoreszenter Rezeptorchimäre; Maßstabsbalken, 10 μm

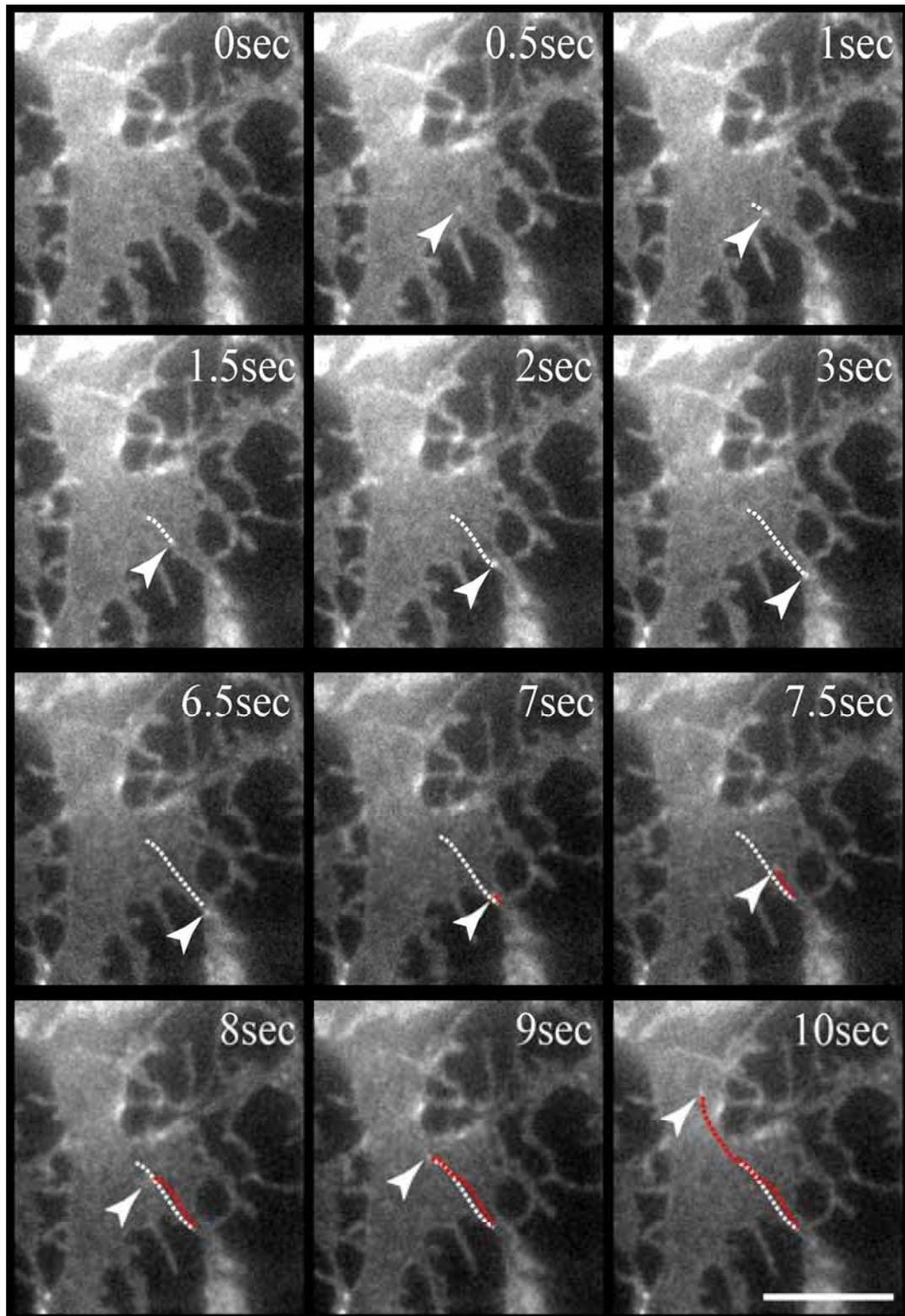


Abbildung 41: Retrograder und anterograder Transport GABA_A-Rezeptor enthaltener Vesikel. Hippokampale Neurone, die für 9 Tage in LabTek™-Kammern kultiviert wurden, wurden mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A-α₁, pRK5/GABA_A-β₂ und pRK5/GABA_A-γ₂ kotransfiziert und für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Positiv transfizierte Neurone wurden dann mittels Videomikroskopie analysiert und im Abstand von 1sec jeweils ein Bild einer Region des Neurons aufgenommen. Pfeilspitze, Lage des Vesikels; weiße gestrichelte Line, Bewegungsbahn in anterograder Richtung; rote gestrichelte Line, Bewegungsbahn in retrograder Richtung; Maßstabsbalken, 5µm. Das korrespondierende Video, welches die dargestellte Sequenz zeigt, ist als Quicktime-Video auf der beigefügten CD enthalten (Ordner Videos; Video2.mov).

7.2.9 Mobilität von GABA_A-Rezeptor-, „Clustern“ und Transportvesikeln

Um das Verhalten der GABA_A-Rezeptoren hinsichtlich ihrer Beweglichkeit zu untersuchen, wurden hippocampale Neurone mit dem Konstrukt pRK5/EYFP-GABA_A-α₁ zusammen mit den Konstrukten pRK5/GABA_A-β₂ und pRK5/GABA_A-γ₂ kotransfiziert und anschließend für 24h bei 37°C / 5% CO₂ kultiviert. Danach wurden die transfizierten Zellen, welche in LabTek™-Kammern ausplattiert worden sind, mikroskopisch untersucht. In Abbildung 43 ist ein für 9 Tage kultiviertes, transfiziertes Neuron zu erkennen. Es sind einzelne Rezeptor-, „Cluster“ zu erkennen (Abbildung 43, weiße Pfeilspitzen), die während des beobachteten Zeitraumes von insgesamt 8 Sekunden nahezu immobil sind.

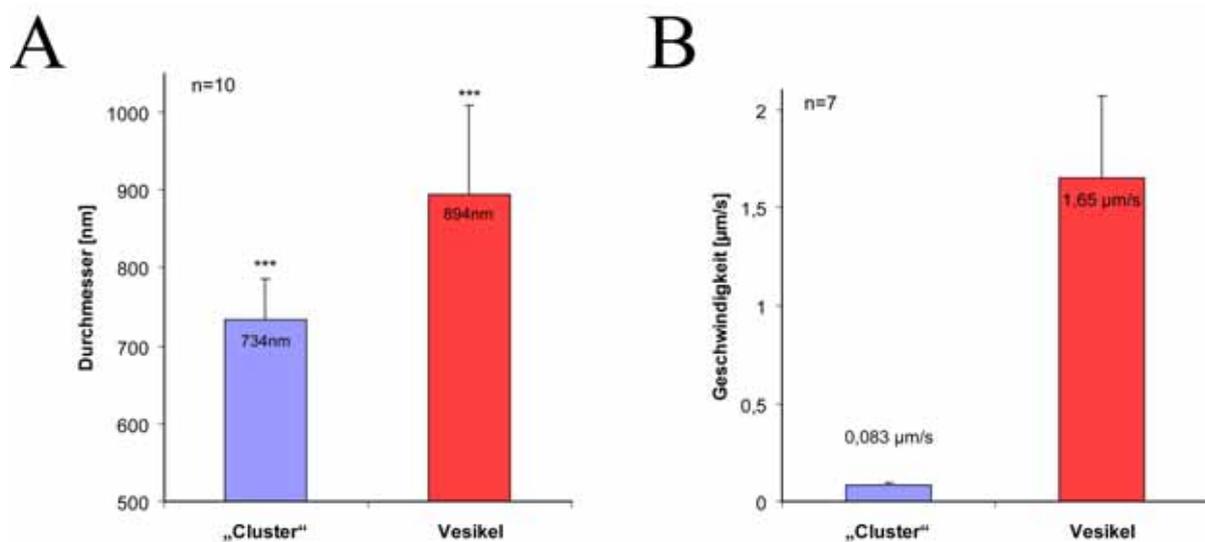


Abbildung 42 Durchmesser und Geschwindigkeiten von Rezeptor-, „Clustern“ und Transportvesikeln. (A) Der Durchmesser von Rezeptor-, „Clustern“ (blaue Säule) ist mit $734 \pm 51,06$ nm S.D. ($p < 0,003$ ungepaarter Student's t-Test) kleiner, als der Durchmesser der Transportvesikel (rote Säule, $894 \pm 114,63$ nm S.D.; $p < 0,002$ ungepaarter Student's t-Test). (B) Die gemessenen Geschwindigkeiten der Transportvesikel (rote Säule, $1,65 \pm 0,42$ µm/s S.D. ($p < 0,305$ ungepaarter Student's t-Test)) sind signifikant höher, als die durchschnittlichen Geschwindigkeiten der Rezeptor-, „Cluster“ (blaue Säule; $0,086 \pm 0,01$ µm/s S.D. ($p < 0,015$ ungepaarter Student's t-Test); $n=10$ bzw. 7 Vesikel aus insgesamt 3 unabhängigen Experimenten).

Die gemessene durchschnittliche Geschwindigkeit lag bei nur $0,086 \pm 0,01$ µm/s S.D. ($p < 0,015$, Abbildung 42). Dagegen sind GABA_A-Rezeptor enthaltene Transportvesikel, die sich in dieser Zeit in der dargestellten Bahn bewegen (Abbildung 43, roter Pfeil und gestrichelte Linie), weitaus mobiler. Diese Vesikel bewegen sich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $1,65 \pm 0,42$ µm/s S.D. ($p < 0,305$, Abbildung 42), was nahezu eine um den Faktor 190 höhere Bewegungsgeschwindigkeit, ergibt als die beobachteten Rezeptor-, „Cluster“. Beim Vergleich der Durchmesser der Transportvesikel und der stationären „Cluster“ zeigte sich, dass Transportvesikel mit einem Durchmesser von $894 \pm 114,63$ nm S.D.

($p < 0.002$, Abbildung 42) signifikant größer sind, als die beobachteten Rezeptor-, „Cluster“, bei denen ein Durchmesser von $734 \pm 51,06 \text{ nm S.D.}$ ($p < 0.003$, Abbildung 42) gemessen wurde.

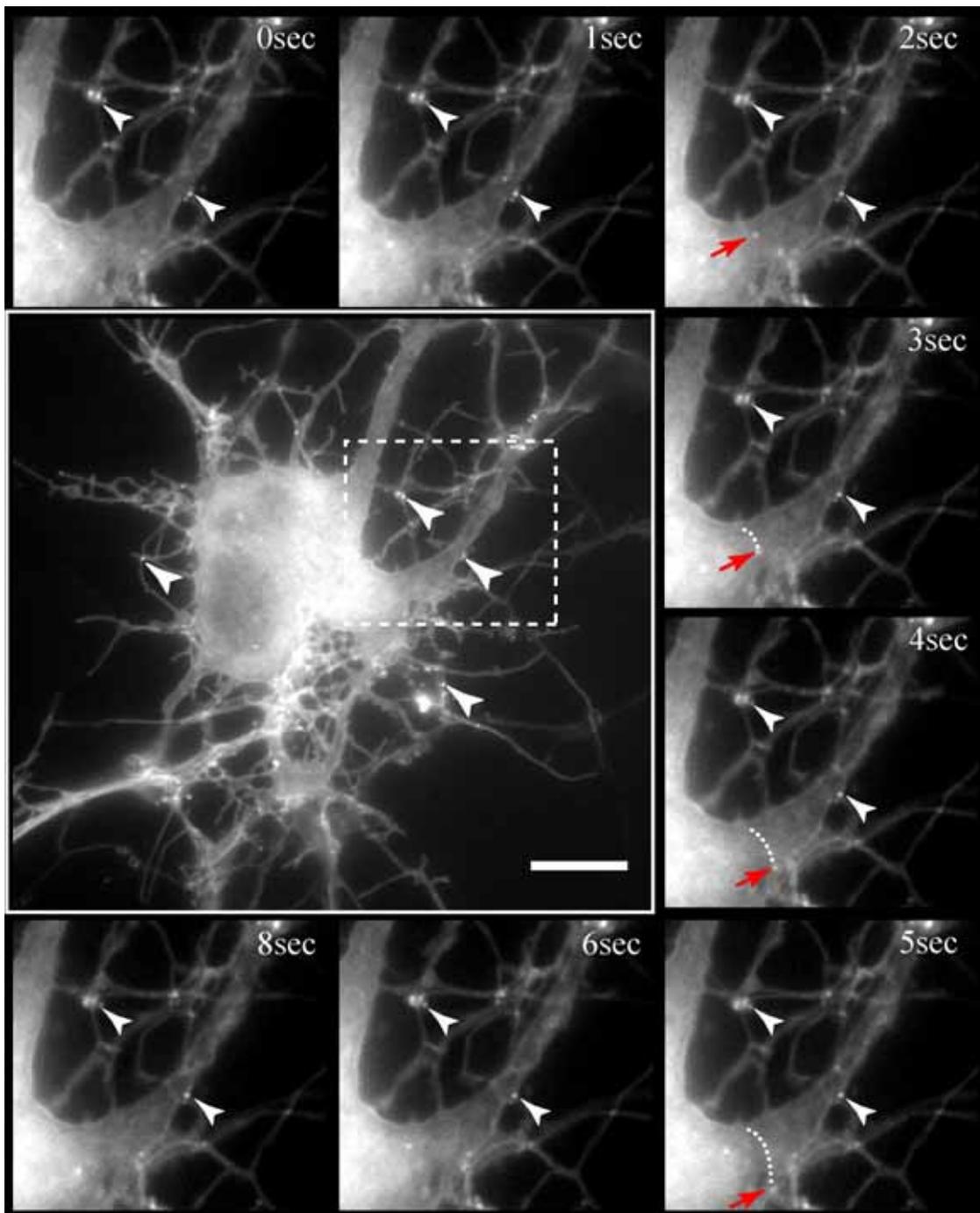


Abbildung 43: Vergleich der Mobilität von GABA_A-Rezeptor-, „Clustern“ und GABA_A-Rezeptor enthaltenen Transportvesikeln. Hippokampale Neurone, die für 9 Tage in LabTek™-Kammern kultiviert wurden, wurden mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A- α_1 , pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert und für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Positiv transfizierte Neurone wurden mittels Videomikroskopie analysiert. Dazu wurden insgesamt 50 Bilder im Abstand von 1sec aufgenommen. (A) Übersichtsbild der untersuchten Zelle. Der gestrichelte Rahmen stellt den Ausschnitt dar, der für die Untersuchung verwendet wurde. (B) Dargestellt ist eine zeitliche Abfolge eines Bildausschnittes aus (A). Gezeigt sind Bildausschnitte über einen Zeitraum von 16sec im Abstand von jeweils 2sec. Gestrichelte Linie, Bewegungspfad eines exemplarisch ausgewählten Vesikels; roter Pfeil, Transportvesikel; weiße Pfeilspitzen, Rezeptor-, „Cluster“; Maßstabsbalken, 5µm (A), 2µm (B). Das korrespondierende Video, welches die dargestellte Sequenz zeigt, ist als Quicktime-Video auf der beigegeführten CD enthalten (Ordner Videos; Video3.mov).

7.2.10 Zeitlich abhängige „Clusterbildung“ der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α_1 und α_2 in differenzierenden Neuronen

Um den Zeitpunkt der „Clusterbildung“ der beiden Untereinheiten α_1 und α_2 genauer zu bestimmen, wurden hippocampale Neurone mit den Konstrukten pRK5/EYFP-GABA_A- α_1 bzw. pRK7/EYFP-GABA_A- α_2 , sowie pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert. Diese Transfektion wurde jeweils an Tag 1 nach dem Ausplattieren der Neurone auf LabTek™-Kammern (siehe Methoden 6.2.10) durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 24 Stunden bei 37°C konnten die transfizierten Neuronen fluoreszenzmikroskopisch über mehrere Tage untersucht werden, ohne eine neue Transfektion durchführen zu müssen. Auffallend war, dass die mit den unterschiedlichen Untereinheiten transfizierten Neurone zu unterschiedlichen Zeiten „Cluster“ aufweisen (Abbildung 44). Bei Zellen, die mit Konstrukten, die für die α_1 -Untereinheit kodieren, transfiziert worden waren, war bis zum dritten Tag noch ein homogenes Signal zu beobachten (Abbildung 44A), welches sich über die ganze Zelle hinweg erstreckte. Dagegen waren bei 5 Tage alten Zellen schon erste „Cluster“ im Bereich der Zellperipherie zu erkennen (Abbildung 44C, weiße Pfeilspitzen). Zudem war zu diesem Zeitpunkt noch ein homogenes, diffuses Signal im Zellsoma und in den Ausläufern zu erkennen (Abbildung 44C). Dieses homogene Signal ändert sich bei acht Tage alten Neuronen dahingehend, dass dann eine klare Membranfärbung mit gehäuft auftretenden „Clustern“ zu beobachten war (Abbildung 44, weiße Pfeilspitzen).

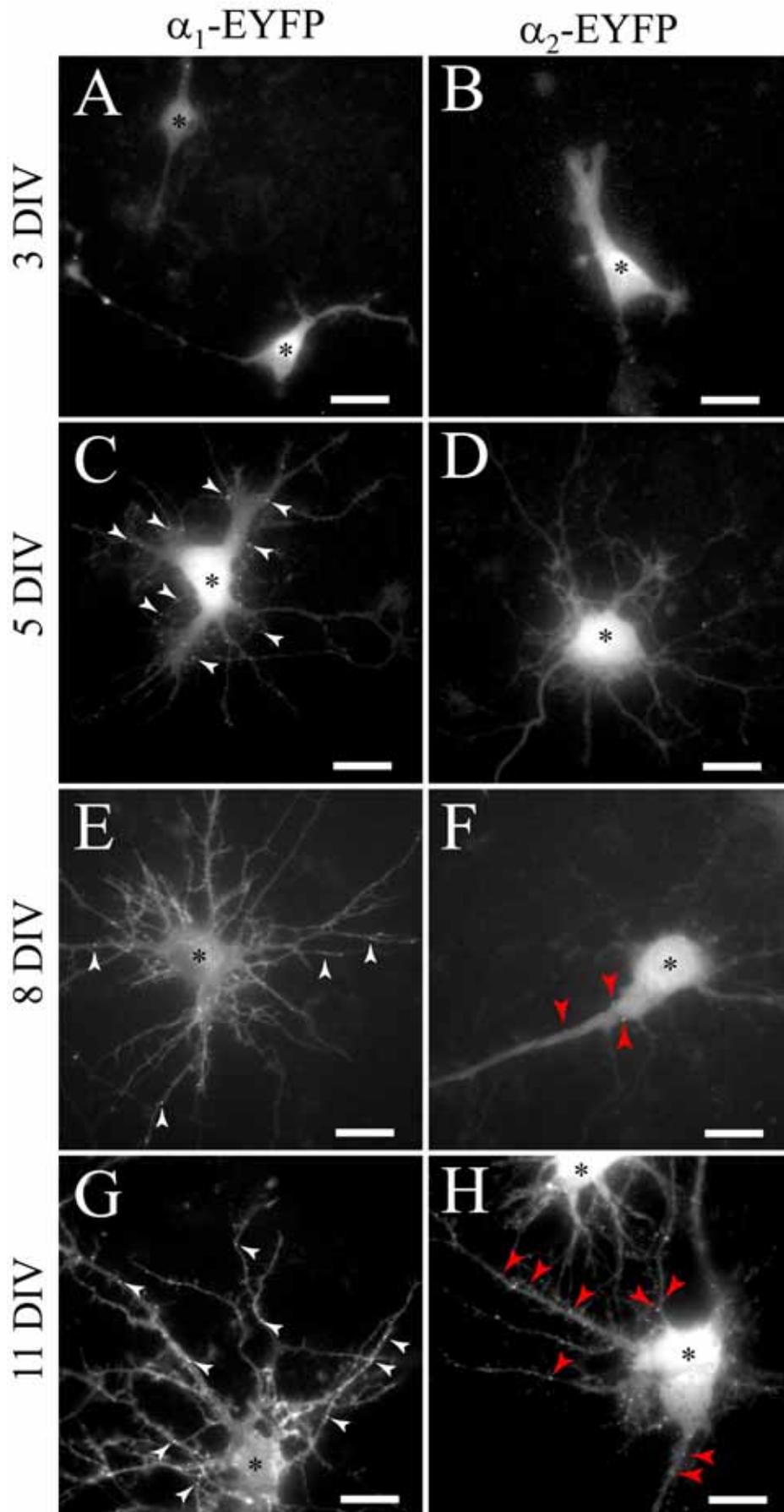


Abbildung 44: „Clusterbildung“ zu unterschiedlichen Zeiten bei den GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α_1 und α_2 . Hippokampale Neurone, die für 2 Tage in LabTek™-Kammern kultiviert wurden, wurden mittels

Kalzium-Phosphat-Präzipitation mit den Konstrukten pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A- α_1 bzw. pRK5/EYFP-myc-Thr-GABA_A- α_2 , sowie zusätzlich mit den Konstrukten pRK5/GABA_A- β_2 und pRK5/GABA_A- γ_2 kotransfiziert und für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden über einen Zeitraum von 11 Tagen beobachtet. Alle 24h Stunden wurden positive Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert und entsprechend Bilder von positiven Zellen gemacht. Während Zellen, die mit der markierten α_1 -Untereinheit transfiziert worden waren, bereits nach 5 Tagen in Kultur erste „Cluster“ zeigten“ (linke Spalte, 5DIV = 5 days in-vitro), zeigten Neurone, die mit der α_2 -Untereinheit transfiziert worden waren erst nach 8 Tagen in Kultur erste „Cluster“ an der Plasmamembran (rechte Spalte, 8DIV). Weiße Pfeilspitzen, „Cluster“ von GABA_A-Rezeptoren, die markierte α_1 -Untereinheiten enthalten; rote Pfeilspitzen, „Cluster“ von GABA_A-Rezeptoren, die markierte α_2 -Untereinheiten enthalten; Maßstabsbalken, 5 μ m.

Im Gegensatz zu Neuronen, die mit der markierten α_1 -Untereinheit transfiziert worden sind, ist das Auftreten der ersten Rezeptor-„Cluster“, die markierte α_2 -Untereinheiten enthalten, zeitlich verschoben. So sind erste „Cluster“ erst bei Neuronen zu erkennen, die 8 Tage in Kultur waren (Abbildung 44F). Während bei den mit α_1 transfizierten Neuronen diesen Alters eine klare Membranfärbung zu beobachten war (Abbildung 44E), zeigten die Neurone, die mit den α_2 -Fusionsproteinen transfiziert worden sind zu diesem Zeitpunkt noch eine diffuse Verteilung des GFP-Signals über die gesamte Zelle (Abbildung 44F). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die beiden sehr ähnlichen Untereinheiten, ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der „Clusterbildung“ aufzeigen.

8 Ergebnisteil 2

TNT-vermittelter interzellulärer Membrantransfer zwischen Astrozyten und Neuronen

Während der Analyse des Transports der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten α_1 und α_2 in hippokampalen Neuronen wurden Strukturen entdeckt, die zuvor an PC12-Zellen entdeckt und charakterisiert worden sind (Rustom et al., 2004). Bei diesen Strukturen handelt es sich um extrem dünne, langgestreckte, Membrankanäle mit einem Durchmesser von 50 – 200nm mit einer durchschnittlichen Länge von 20-100 μ m. Bezeichnet wurden diese Membrankanäle als „tunneling Nanotubes“ (TNTs). TNTs konnten bisher nur unter optimalen Zellkulturbedingungen nachgewiesen werden. Eine zu hohe Zelldichte, zu lange kultivierte Zellen oder häufiges Waschen der Zellen führt dazu, dass diese empfindlichen Strukturen zerstört werden. TNTs besitzen zudem folgende Charakteristika: sie sind im Gegensatz zu Neuriten oder Filopodien, die sich direkt auf dem Substrat befinden, zwischen zwei Zellen regelrecht aufgespannt und verlaufen größtenteils über dem Substrat (Rustom et al., 2004). Zudem verbinden TNTs zwei benachbarte Zellen über die kürzeste mögliche Distanz. Ein weiteres Charakteristikum ist die Membrankontinuität, d.h. dass bei der Verbindung zweier Zellen durch ein TNT ein durchgehender Membranfluss zwischen den Zellen herrscht (Rustom et al., 2004). Weiterhin konnte mittels immunhistochemischer Untersuchungen gezeigt werden, dass TNTs zwischen PC12-Zellen filamentöses Aktin (F-Aktin), aber keine Mikrotubuli enthalten. Es konnte beobachtet werden, dass TNTs über filopodiumartige Ausläufer entstehen und TNTs eine Funktion im aktiven Transfer von kleinen Zellorganellen, die dem endosomalen/lysosomalen System entstammen, besitzen. Außer in PC12-Zellen konnten TNTs auch zwischen nicht-neuroendokrinen Zelllinien, wie HEK293-Zellen und NRK-Zellen, aber auch bei Primärkulturen von Zellen des Nebennierenmarks der Maus, Myozyten und primär kultivierten natürlichen Killerzellen, nachgewiesen werden. Dem TNT-Modell zufolge, stellen TNTs ein neuartiges und generelles Prinzip interzellulärer Kommunikation dar, welches auf Membrankontinuität und dem selektiven Transfer von Organellen zwischen den verbundenen Zellen basiert. Als eine Struktur, die zur Zell-Zell-Kommunikation beitragen kann, sind TNTs daher auch für die neuronale Zellkultur im Rahmen dieser Arbeit interessant. Es stellt sich somit die Frage, ob ein Austausch von Membranen oder zellulären Bestandteilen zwischen Astrozyten und Neuronen über TNTs stattfindet. Weiterhin konnte von einer anderen Arbeitsgruppe ein interzellulärer Austausch von Membranproteinen beobachtet werden. Bei diesen Membranproteinen handelte es sich

um die Glukose-Transporter GLUT1 und GLUT2 (Reed et al., 2005). Auf der Annahme, dass nicht nur lösliche Proteine zwischen Zellen transferiert werden, sondern auch Membranproteine, sollte untersucht werden, ob auch zwischen primär kultivierten Astrozyten und Neuronen diese Strukturen bestehen. Weiterhin sollte analysiert werden, ob ein Transfer von endosomalen Strukturen von Astrozyten zu Neuronen stattfindet. Wenn ein interzellulärer Membrantransfer beobachtet werden kann, stellt sich weiter die Frage, ob auch möglicherweise Transmembranproteine, wie z.B. GABA_A-Rezeptoren über TNTs zwischen Astrozyten und Neuronen transferiert werden können. Ein möglicher Zweck eines solchen Austausches von GABA_A-Rezeptoren könnte sein, dass in Astrozyten eine Modifikation erfolgt und die modifizierten Rezeptoren dann über TNT-vermittelten Transfer übertragen werden.

8.1 TNTs in Kulturen neuronaler Zellen

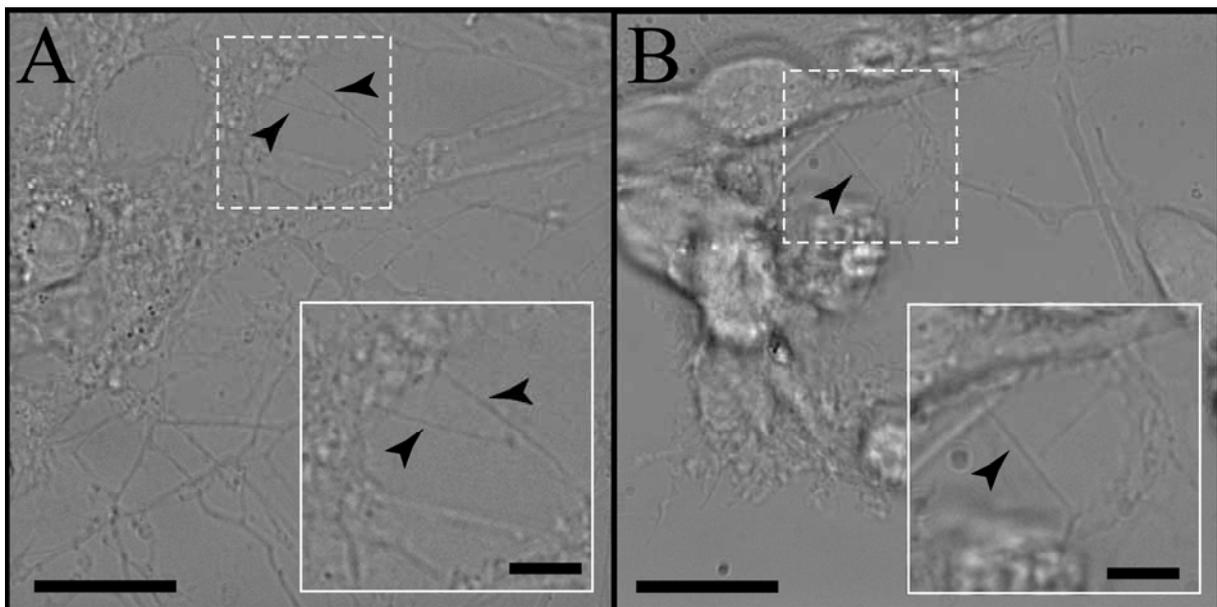


Abbildung 45: TNT-ähnliche Strukturen zwischen neuronalen Zellen. Kulturen hippocampaler Neuronen, die für 10 Tage in LabTek™-Kammern kultiviert worden sind, wurden mittels Durchlichtmikroskopie analysiert. Schwarze Pfeilspitzen, TNT-ähnliche Strukturen zwischen Neuronen; Maßstabsbalken, 5µm bzw. 2µm (Ausschnitte).

Während den Untersuchungen zu den Transporteigenschaften von GABA_A-Rezeptoren bei primär kultivierten hippocampalen Neuronen, konnten Strukturen beobachtet werden, die in ihren Charakteristika auf das Vorhandensein von TNTs bei neuronalen Kulturen deuten lassen (Abbildung 45). Diese Form der interzellulären Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen wurde so noch nicht beschrieben. Zunächst wurden diese Strukturen als neuronale

Ausläufer gedeutet. Bei näherer Untersuchung konnte jedoch festgestellt werden, dass die Strukturen ähnlich wie bei TNTs zwischen PC12-Zellen (Rustom et al., 2004) als gespannte, geradlinige Strukturen zwischen zwei benachbarten Zellen vorliegen (Abbildung 45).

8.2 TNTs: Vorläufer neuronaler Ausläufer?

Um zu untersuchen, unter welchen Bedingungen TNTs zwischen neuronalen Zellen entstehen, wurden frisch präparierte und kultivierte, hippocampale Neuronen lichtmikroskopisch untersucht. Da bekannt ist, dass TNTs meist sehr früh bei frisch ausplattierten Zellen entstehen (Rustom et al., 2004), wurden für dieses Experiment frisch präparierte Neurone verwendet. Dazu wurden jeweils 80.000 Zellen pro LabTek™-Kammer ausplattiert und anschließend für vier Stunden bei 37°C / 5% CO₂ kultiviert. Unter optimalen Bedingungen war es möglich Strukturen zu visualisieren, die morphologisch den bei PC12- und HEK293-Zellen beschriebenen TNTs entsprachen (Abbildung 46). Diese Strukturen traten kurz vor der Ausbildung einer neuronalen Verbindung der beiden beobachteten Zellen auf (Abbildung 46, weiße Pfeilspitzen). Nach der Ausbildung der Zell-Zell-Verbindung, traten in der Nähe der neu gebildeten Struktur noch weitere Strukturen auf, die ebenfalls morphologisch den TNTs sehr ähnelten (Abbildung 46, 120sec und 130sec, weiße Pfeilspitzen). Es sollte erwähnt werden, dass die hier beobachteten Strukturen zwar den bei PC12-Zellen beobachteten Strukturen ähneln und ihre Strukturmerkmale auch den TNTs bei PC12-Zellen gleichen, es jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine Marker für TNTs gibt, um eindeutig TNT-Strukturen nachweisen zu können.

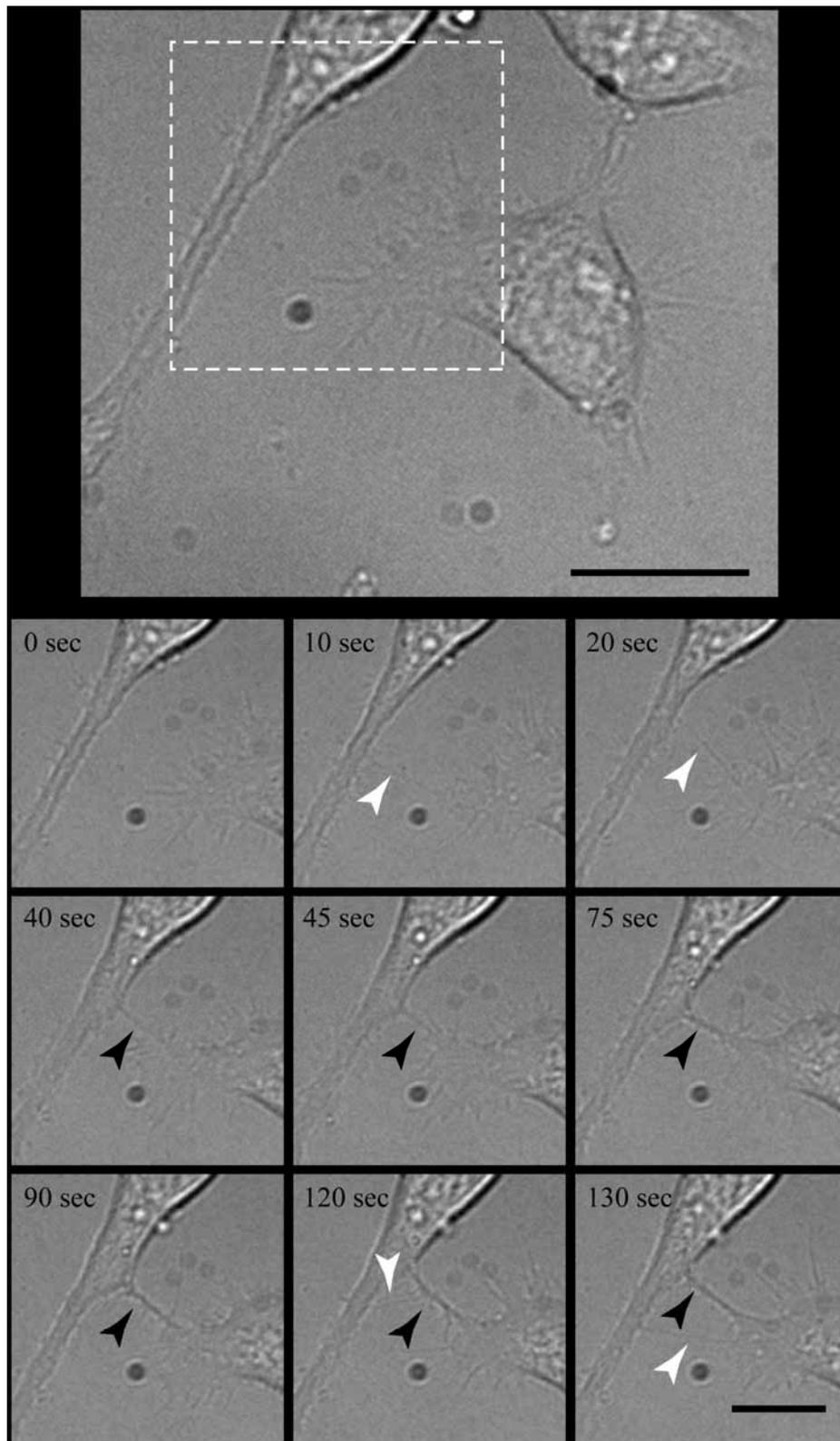


Abbildung 46: Visualisierung der Bildung von TNT-ähnlichen Strukturen zwischen Neuronen. Kulturen hippocampaler Neuronen, die für 10 Tage in LabTek™-Kammern kultiviert worden sind, wurden mittels Durchlichtmikroskopie analysiert. Hierzu wurde über einen Zeitraum von 130sec im Abstand von 1sec jeweils ein Bildausschnitt aufgenommen. Dargestellt sind verschiedene Zeitpunkte aus dieser Aufnahmesequenz. Man beachte, dass sehr dünne, zwischen zwei Zellen aufgespannt Strukturen auftauchen (10sec, weiße Pfeilspitze), die der Bildung einer neuronalen Verbindung vorangehen (40sec bis 130sec, schwarze Pfeilspitze). Schwarze Pfeilspitze, Neurit; weiße Pfeilspitze, Struktur, die der der TNTs ähnelt. Maßstabsbalken, 10µm. Das korrespondierende Video, welches die dargestellte Sequenz zeigt, ist als Quicktime-Video auf der beigefügten CD enthalten (Ordner Videos; Video4.mov).

8.3 Analyse des interzellulären Austauschs von Membrankontainern zwischen Astrozyten und Neuronen

Anhand der Zelllinie PC12 wurde gezeigt, dass Membranbestandteile über TNT-Verbindungen interzellulär übertragen werden können (Rustom et al., 2004). Deshalb stellte sich die Frage, ob diese Beobachtung auch auf höher entwickelte Zellsysteme, wie Astrozyten und Neurone, übertragen werden kann. Um dies zu untersuchen, wurden primär kultivierte Astrozyten und Neurone mit diversen Farbstoffen gefärbt. Da bei den Untersuchungen zunächst der Transfer vesikulärer Strukturen von den Astrozyten zu den Neuronen interessierte, wurden die Astrozyten mit einem lipophilen Farbstoff (DiO) gefärbt, der in die Membran der Astrozyten integriert und somit am gesamten Membranumsatz der gefärbten Astrozyten beteiligt ist. Zur visuellen Unterscheidung der Neurone von den Astrozyten wurden die Neurone zudem mit dem CellTracker[®]-Farbstoff gefärbt. Dieser Farbstoff markiert die gesamte Zelle, da er die Zellmembran passieren kann, jedoch durch den hohen Glutathiongehalt im Zytosol und den dort vorherrschenden reduzierenden Bedingungen so modifiziert wird, dass eine erneute Passage der Zellmembran nicht mehr möglich ist. Mit Hilfe dieser beiden Farbstoffe können nun die beiden separat kultivierten Zelltypen fluoreszenzmikroskopisch unterschieden werden.

Die Analyse der Daten zeigte, dass nach der Inkubationszeit, in einigen Neuronen vesikuläre Strukturen zu erkennen sind (Abbildung 47, Pfeilspitzen). Um einen ersten Anhaltspunkt zu haben, ob sich diese Strukturen auch im Inneren der Neurone befinden, wurden mehrere Bilder aus mehreren optischen Ebenen aufgenommen, und mittels Bildbearbeitungsverfahren so bearbeitet, dass eine x-z-Ansicht der untersuchten Zellen entsteht. Mit Hilfe dieser Analyse konnten diese vesikulären Strukturen auch in den verschiedenen Fokusebenen innerhalb einer Zelle nachgewiesen werden (Abbildung 47, x-z Pfeilspitzen). Ein weiterer Hinweis darauf, dass sich diese Strukturen in den Neuronen befinden, ist die Beobachtung, dass sich die vesikulären Strukturen in den Zellen bewegen. Diese Vesikel bewegen sich zudem teilweise vom Zellsoma in die Ausläufer, sowie auch von den Ausläufern in Richtung des Zellkörpers (Abbildung 48 B-M). Aufgrund der durchgeführten dreidimensionalen Untersuchung kann prinzipiell ausgeschlossen werden, dass sich die beobachteten Strukturen außerhalb der Zelle, an der Membran angeheftet, befinden. Des Weiteren kann auch oft beobachtet werden, dass bei mehreren, nebeneinander liegenden Neuronen nicht alle Neurone diese vesikulären Strukturen besitzen.

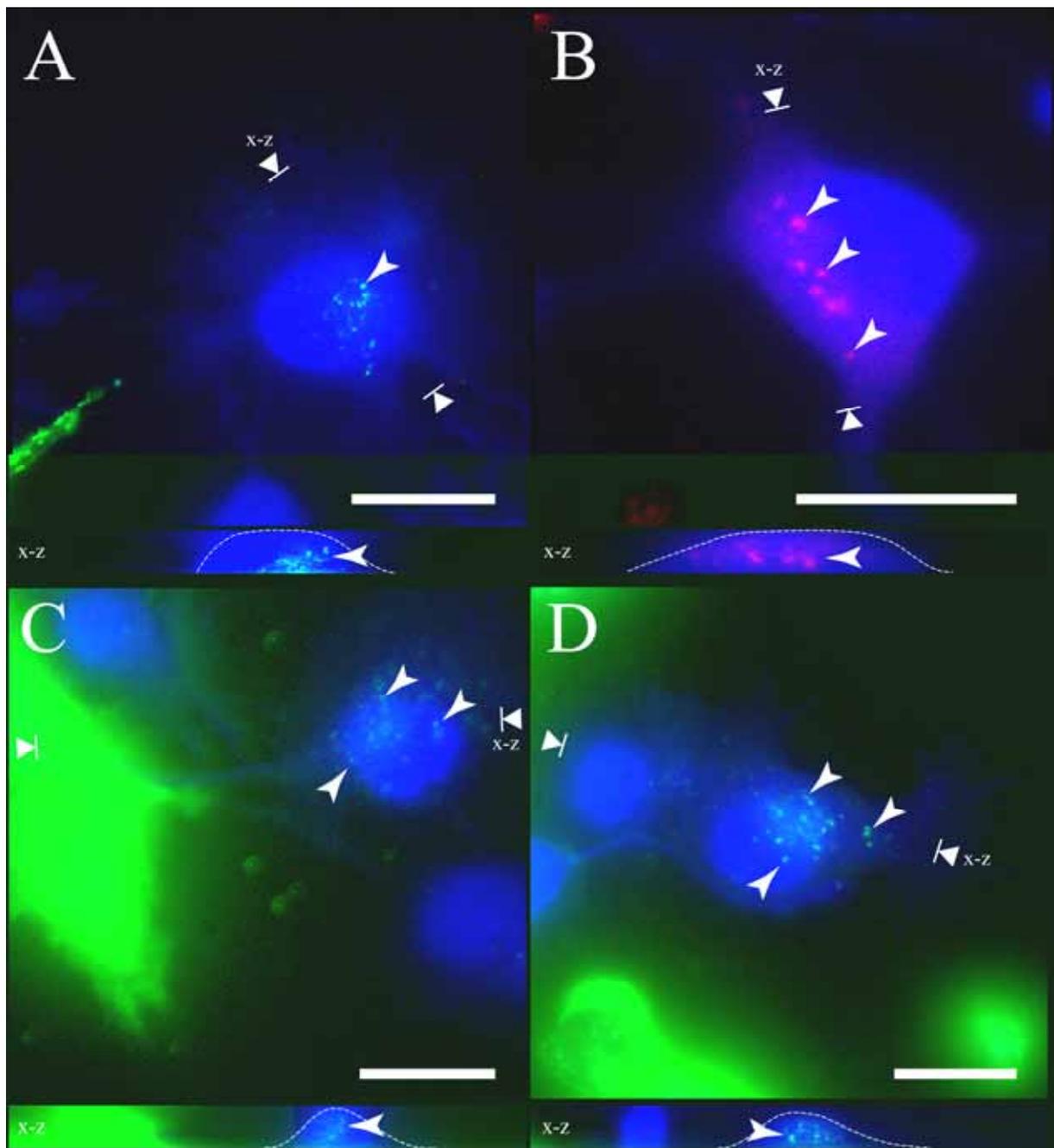


Abbildung 47: Membrantransfer zwischen Astrozyten und Neuronen. Celltracker™-blue gefärbte Neurone (blau) und DiO bzw. DiD gefärbte Astrozyten (grün bzw. rot) wurden für 24h bei 37°C / 5% CO₂ in LabTek™-Kammern kokultiviert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Von Neuronen, die grüne bzw. rote Signale enthalten, wurden jeweils 50 optische Schnitte angefertigt (x-z). Diese Schnitte sind als x-z-Ansichten dargestellt. (A-D). Man kann deutlich anhand der x-z-Schnitten erkennen, dass sich die Farbstoffpartikel im Innern der Zellen befinden. Pfeilspitzen, Beispiele von transferiertem Membranmaterial; Maßstabsbalken, 5µm. Das korrespondierende Video, welches die in x-z-Richtung aufgenommenen optischen Schnitte aus (D) zeigt, ist als Quicktime-Video auf der beigegeführten CD enthalten (Ordner Videos; Video5.mov).

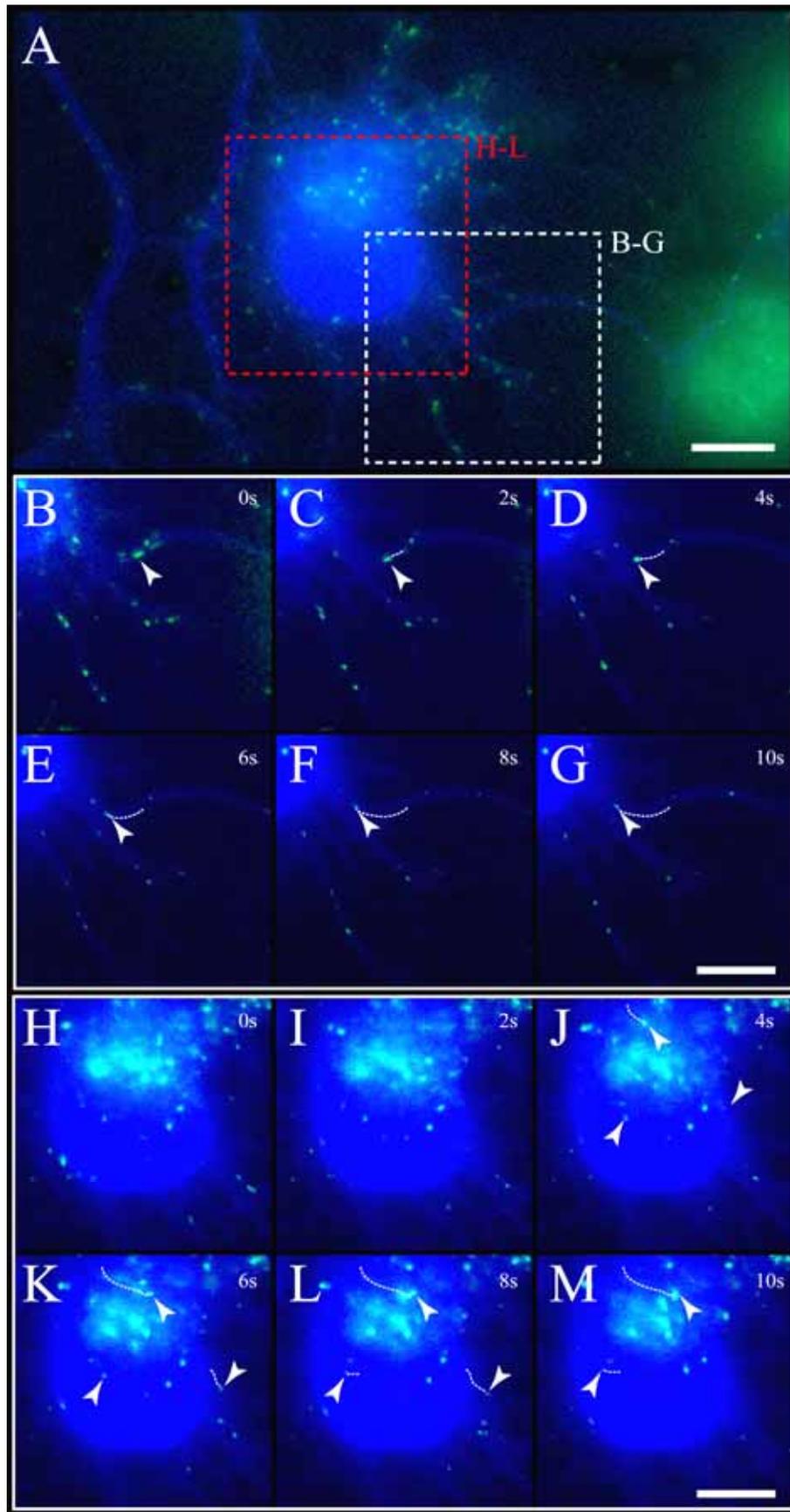


Abbildung 48: Transferierte Membranbestandteile von Astrozyten bewegen sich in Neuronen. Celltracker™-blue gefärbte Neurone (blau) und DiO gefärbte Astrozyten (grün) wurden für 24h bei 37°C / 5% CO₂ in LabTek™-Kammern kokultiviert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. (A) Übersichtsbild eines Neurons mit transferiertem Membranmaterial. (B-G) Videomikroskopische Analyse eines

Bildausschnitts aus (A). Dargestellt ist eine Bildsequenz mit einem zeitlichen Abstand von 2sec pro Bild bei der die Bewegung eines grün gefärbten Vesikels verfolgt wird. (H-M) Videomikroskopische Analyse eines weiteren Bildausschnitts aus der Zellsomaregion des Neurons aus (A). Dargestellt ist eine Bildsequenz mit einem zeitlichen Abstand von 2sec pro Bild bei der die Bewegung mehrerer gefärbter Vesikel verfolgt wird. Eine Bewegung des aufgenommenen Membranmaterials ist ein Hinweis darauf, dass sich dieses Membranmaterial im Innern der Zellen befindet. Pfeilspitzen, transferierte, vesikuläre Strukturen; gestrichelte Linie, zurückgelegte Strecke des beobachteten Vesikels; Maßstabsbalken, 5µm (A) bzw. 2µm (B-M). Das korrespondierende Video, welches die dargestellte Sequenz zeigt, ist als Quicktime-Video auf der beigefügten CD enthalten (Ordner Videos; Video6.mov).

8.4 Quantitative Analyse des interzellulären Membrantransfers unter dem Einfluss von Zytoskelettgiften

Da bei den vorangegangenen Experimenten die Frage offen blieb, ob der Farbstofftransfer über TNT-Strukturen erfolgt, wurde im Folgenden durch den Einsatz spezifischer Zytoskelettgifte diese Fragestellung quantitativ analysiert. Da bekannt ist, dass TNTs durch ein Bündel aus Aktinfasern stabilisiert werden (Rustom et al., 2004), wurden hauptsächlich Zytoskelettgifte verwendet, die F-Aktin entweder stabilisieren oder destabilisieren. Eines der Gifte, welches F-Aktin destabilisiert, ist das Gift Latrunculin B, eine Variante des Giftes der Schwammart *Lutrunculia magnifica*. Nach Applikation des Giftes zu den Zellen, sollte der Transfer, sei er denn TNT-abhängig, stark reduziert werden. Dagegen sollten Gifte wie z.B. Phalloidin, das F-Aktin-stabilisierende Gift des Weißen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, kaum eine Auswirkung auf den interzellulären Transfer von Membranfarbstoffen haben (Rustom et al., 2004). Um diese Fragestellung quantitativ zu untersuchen, wurden die Zellen, welche Membranfragmente von einer anderen Zellpopulation aufgenommen hatten, mittels einer hochsensitiven Fluoreszenz-Sortieranlage (FACS) quantifiziert. Aufgrund der Sensibilität der neuronalen Zellen, wurden zunächst Kontrollexperimente mit relativ einfach zu kultivierenden NRK-Zellen („normal-rat-kidney“-Zellen) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Kontrollexperimente sollten Aussagen darüber gewonnen werden, ob die eingesetzten Gifte Effekte auf die Quantität des Transfers ausüben. Die Zellen wurden dazu in zwei Populationen aufgeteilt. Da der Transfer der Einfachheit halber nur in eine Richtung untersucht werden sollte, wurden die Zellpopulationen mit unterschiedlichen Farbstoffen gefärbt. Die Donorpopulation, also die Population, von der Membranfragmente transferiert werden sollten, wurde mit dem lipophilen Membranfarbstoff DiD angefärbt. Die Empfängerpopulation, also die Population, die die Membranfragmente der Donorpopulation empfangen soll, wurde mit dem zytoplasmatischen Farbstoff CellTracker™-green gefärbt. Bei der Analyse des Transfers kann somit von den beiden Populationen, also einer roten, DiD

gefärbten Donorpopulation und einer grünen, Celltracker™-green gefärbten Empfängerpopulation unterschieden werden. Die genauere Vorgehensweise für die Detektion der unterschiedlichen Zellpopulationen mittels FACS-Analyse ist im Methodenteil (siehe Methoden 6.2.18) genauer beschrieben. Beide gefärbten Populationen wurden zu gleichen Anteilen zusammen ausplattiert und für insgesamt 6h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und anschließend für die Untersuchung mittels FACS vorbereitet (siehe Methoden 6.2.19). Bei Kulturen, bei denen Zytoskelettgifte appliziert wurden, wurden die Zellen zunächst für eine Stunde kokultiviert und anschließend das Gift in das Medium appliziert. Die Kulturen wurden dann für die restlichen fünf Stunden bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Da die eingesetzten Toxine bei der Inkubationstemperatur von 37°C sehr instabil sind, wurde im Abstand von jeweils 2h das Toxin neu appliziert. Als Kontrolle wurden zum einen einzeln kultivierte grün gefärbte Empfängerzellen verwendet. Zum anderen wurden erst 10s vor der Analyse die beiden Populationen (Empfänger- und Donorpopulation) vermischt und anschließend direkt detektiert.

Beim Vergleich zwischen Kontrolle (Abbildung 49A und B) und der sechsstündigen Kokultivierung der beiden Populationen (Abbildung 49C) kann man eine deutliche Erhöhung des DiD-Signals bei den untersuchten Empfängerzellen beobachten (Abbildung 49C, FL4-H / FL1-H). Latrunculin B reduzierte den Transfer von Membranmaterial von der DiD-gefärbten Donorpopulation in die Celltracker™-green gefärbte Empfängerpopulation im Vergleich zur Kokultur ohne Zytoskelettgifte deutlich. Bei Zugabe von Phalloidin wurde nahezu der Ausgangswert der Kokultur ohne Toxin-Applikation erreicht (Abbildung 49E). Nocodazol, ein Zytoskelettgift, welches destruktiv auf das Mikrotubulinetzwerk der Zelle wirkt, hat einen vergleichbaren reduzierenden Effekt auf die Signalstärke, wie Latrunculin B.

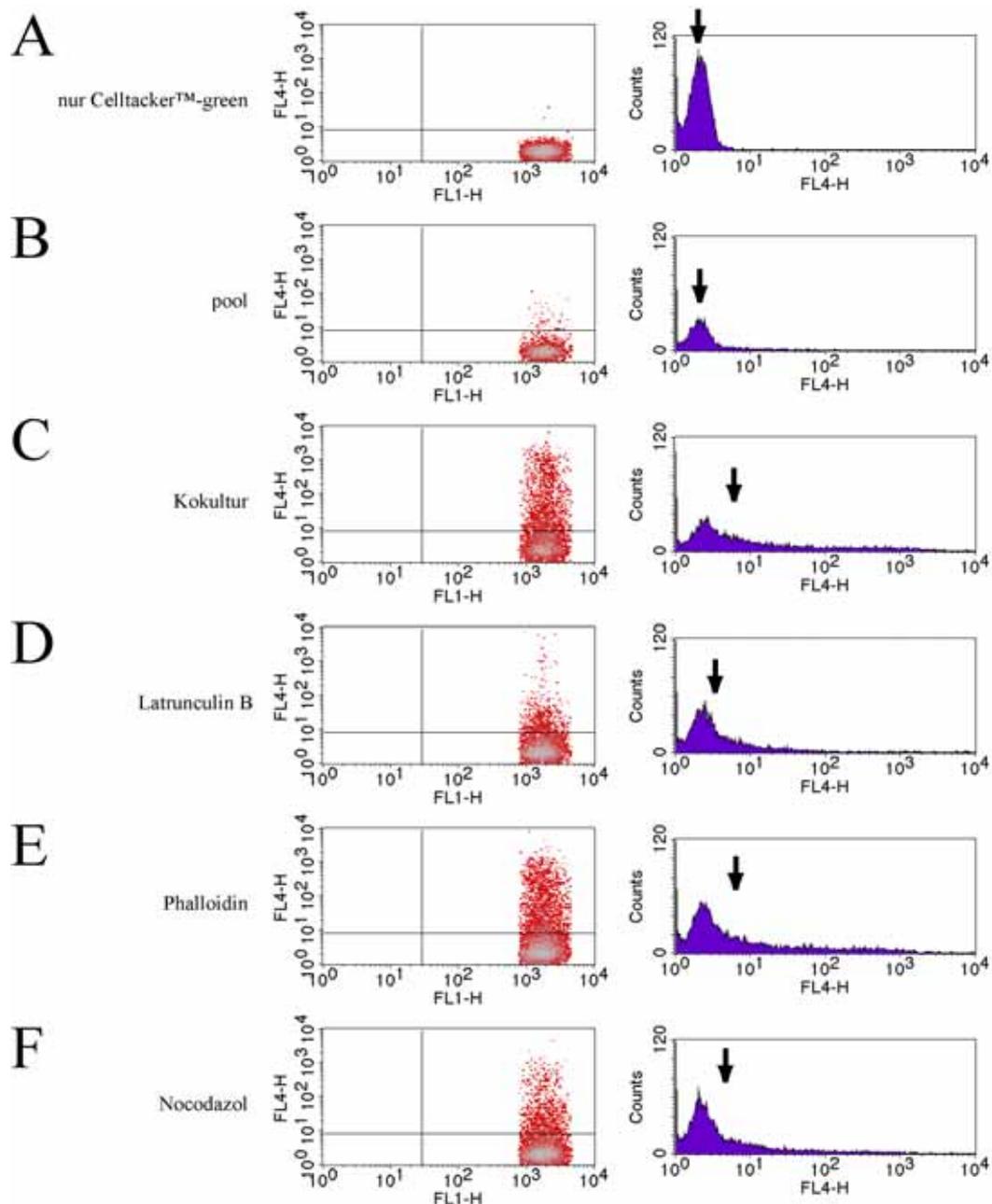


Abbildung 49: FACS-Analyse des Membrantransfers zwischen NRK-Zellen. NRK-Zellen wurden wie beschrieben gefärbt und die gefärbten Zellpopulationen wurden entweder einzeln (A,B) oder zusammen für 6h bei 37°C / 5% CO₂ kultiviert (C-F) und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Methoden 6.2.16 und 6.2.18). Zudem wurden die kokultivierten Populationen für 5h mit verschiedenen Zytoskelettdrogen behandelt. Es sind exemplarisch für das gesamte Experiment einige Diagramme der Fluoreszenzeigenschaften (FL4-H/FL1-H) sowie Histogramme (Counts/FL4-H) dargestellt, um die Auswirkungen der Zytoskelettdrogen auf die Signalverteilung zu verdeutlichen. Die Histogramme stellen die Anzahl der gemessenen Fluoreszenzintensitäten bezüglich des transferierten Farbstoffes (hier DiD) dar. Pfeil, Mittelwert der Fluoreszenzintensität.

Für eine quantitative Auswertung der Ergebnisse, wurden die Messwerte für die Fluoreszenzintensitäten des DiD-Signals in den Empfängerpopulationen verwendet. Dazu wurden die erhaltenen Messwerte der Signalintensität des DiD-Signals in den Empfängerzellen auf 100% normiert (Abbildung 50, Kokultur) und die erhaltenen Messwerte

aus den weiteren Experimenten in Relation dazu gesetzt. Da der TNT-abhängige Transfer höchstwahrscheinlich F-Aktin-abhängig verläuft, zeigten die Kokulturen nach Applikation der F-Aktin-destabilisierenden Toxine Latrunculin B und Cytochalasin D, ein Toxin des Schimmelpilzes *Helminthosporium sp.*, die größte Reduktion des Transfers auf $31,53 \pm 6,29\%$ S.E.M. ($p < 0,001$) bzw. $23,80 \pm 6,14\%$ S.E.M. ($p < 0,001$, Abbildung 50). Dagegen zeigte eine Applikation von BDM, einem Myosinmotorblocker, eine Reduktion auf $58,54 \pm 8,37\%$ S.E.M. ($p < 0,002$, Abbildung 50). Die Verwendung des Mikrotubuli-depolymerisierenden Toxins Nocodazol bewirkte eine Reduktion auf $38,10 \pm 4,52\%$ S.E.M. ($p < 0,001$, Abbildung 50), die in etwa so stark ausgeprägt ist, wie die Reduktion der F-Aktin-depolymerisierenden Gifte Latrunculin B und Cytochalasin D. Die Reduktion des Transfers auf $87,33 \pm 5,17\%$ S.E.M. ($p < 0,029$) bei Zugabe von Phalloidin zu den Kokulturen ist in etwa so gering wie die Reduktion unter Zugabe der Lösungsmittel der Drogen. So war die Wirkung auf die Reduktion des Membrantransfers von DMSO ($87,01 \pm 3,05\%$ S.E.M.; $p < 0,004$) und Ethanol (EtOH, $89,13 \pm 11,51\%$ S.E.M., $p < 0,200$) vergleichbar mit der Wirkung von Phalloidin auf den interzellulären Membrantransfer (Abbildung 50).

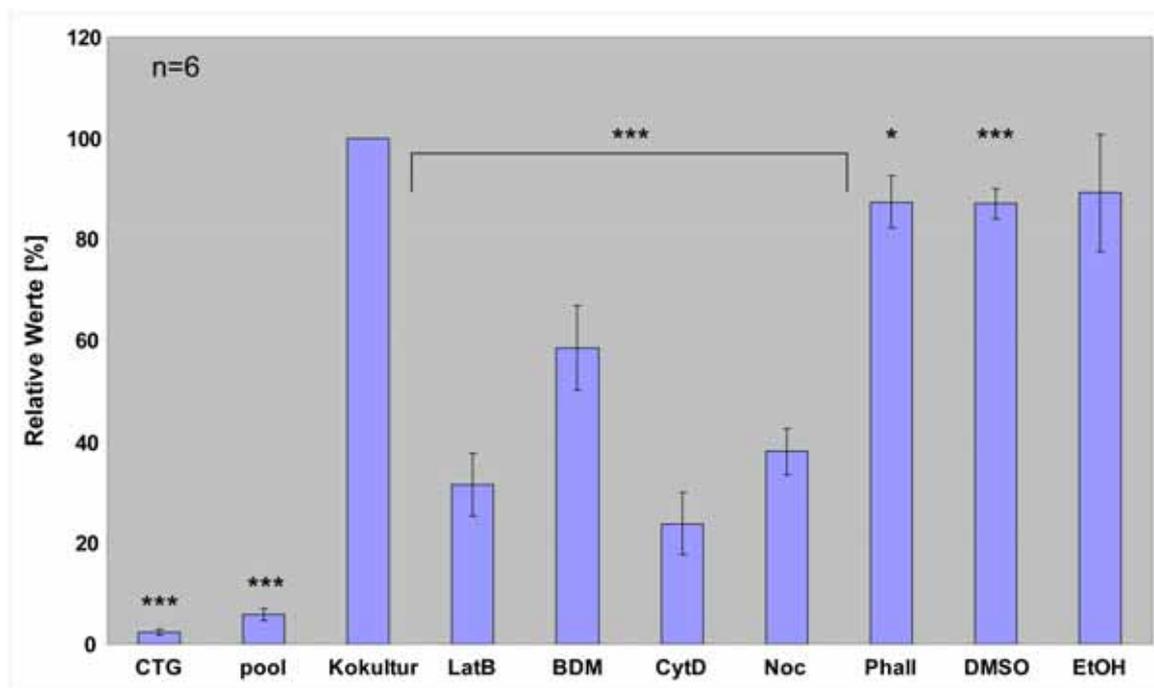


Abbildung 50: Statistische Auswertung der FACS-Analyse des Membrantransfers zwischen NRK-Zellen. Dargestellt sind die durchgeführten und ausgewerteten Experimente zur FACS-Analyse des Farbstofftransfers zwischen NRK-Zellen unter Einfluss diverser Zytoskelettgifte (Latrunculin B (**LatB**), **BDM**, Cytochalasin D (**CytD**), Nocodazol (**Noc**), Phalloidin (**Phall**)). (**CTG**), Negativkontrolle, nur Celltracker™-green gefärbte Zellen wurden gemessen; (**pool**), Negativkontrolle, Celltracker™-green- und DiD-gefärbte NRK-Zellen, die getrennt voneinander kultiviert wurden, werden für 10sec gemischt und anschließend direkt analysiert; (**Kokultur**), Positivkontrolle, Celltracker™-green- und DiD-gefärbte NRK-Zellen wurden für 6h bei 37°C / 5% CO₂ kokultiviert; (**DMSO**, **EtOH**), Kontrolle der Auswirkung der Lösungsmittel, in denen die Gifte gelöst waren. Die statistische Auswertung beruht auf insgesamt 6 unabhängig voneinander durchgeführten

Experimenten. Für die statistische Auswertung wurden die erhaltenen absoluten Werte der Fluoreszenzintensitäten bezüglich des transferierten Farbstoffes DiD relativiert. Dazu wurde der Wert der Positivkontrolle als 100% gesetzt, die verbleibenden Werte wurden dazu relativiert. ***, $p < 0,001$ (ungepaarter Student's t-Test); *, $p < 0,02$ (ungepaarter Student's t-Test).

Zusammenfassend ist erkennbar, dass bei einer Applikation von F-Aktin-depolymerisierenden Zytoskeletttoxinen der Membrantransfer abnimmt, während nach einer Applikation von F-Aktin-stabilisierenden Toxinen die Transferrate gleich bleibt. Eine Reduktion des Transfers nach Applikation des Myosinmotorblockers BDM, könnte auf einen F-Aktin-abhängigen Transfer von DiD-gefärbten Organellen zwischen NRK-Zellen hindeuten. Jedoch zeigte die Verwendung des Mikrotubuli-depolymerisierenden Zytoskelettgifts Nocodazol im Gegensatz zu den beschriebenen Ergebnissen mit PC12-Zellen (Rustom et al., 2004) ebenfalls eine Reduktion des Transfers.

8.5 Untersuchungen des interzellulären Membrantransfers zwischen Astrozyten und Neuronen mittels FACS

Die vorangegangenen Experimente mit NRK-Zellen wurden u.a. auch dafür verwendet, die notwendigen Grundeinstellungen für die FACS-Analyse festzulegen, und eine Strategie zur quantitativen Analyse des interzellulären Transfers zwischen Astrozyten und Neuronen zu entwickeln. Eine Schwierigkeit war jedoch, dass nach Ablösen der Astrozyten Zelltrümmer die Messungen verfälschen könnten. Um dies zu verhindern wurde zunächst ein System zur zusätzlichen Aufreinigung der Zellen entwickelt. Mit Hilfe von zweiprozentiger Ficoll™-Lösung war es möglich, störende Membranfragmente, die durch das Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale herrührten, abzutrennen. Die Fragmente können aufgrund ihrer Dichte während eines Zentrifugationsschrittes die viskose Lösung nicht durchdringen, während intakte Zellen die Ficoll™-Lösung sedimentieren können. In Abbildung 51 ist der Unterschied zwischen Ficoll™ aufgereinigten und nicht aufgereinigten Astrozyten, die kurz vor der Messung mit den Neuronen gemischt wurden, dargestellt. Das unspezifische Signal der Probe, die durch Ficoll™ aufgereinigt wurde, ist jedoch deutlich kleiner als die Probe, die ohne Ficoll™ zentrifugiert wurde (Abbildung 51B). Auf Grund dessen wurden alle Experimente zur FACS-Analyse bei Astrozyten/Neuronen-Kokulturen grundsätzlich einer Aufreinigung durch eine zweiprozentige Ficoll™-Lösung unterzogen. Wie schon bei der quantitativen Analyse des Membrantransfers bei NRK-Zellen mittels FACS-Analyse

beschrieben, wurden auch bei der quantitativen Analyse des Membrantransfers zwischen Astrozyten und Neuronen Zytoskelettgifte eingesetzt. Frisch präparierte Neurone aus E18-Wistar-Rattenembryonen, die als Empfängerpopulation fungieren, wurden mit Celltracker™-green gefärbt. Da der Transfer von den Astrozyten zu den Neuronen von besonderem Interesse war, wurden Astrozyten mit dem Membranfarbstoff DiD gefärbt. Als Kontrolle wurden Celltracker™-green gefärbte Neuronen ohne Astrozyten (Abbildung 51A), sowie DiD-gefärbte Astrozyten, die getrennt von den Neuronen kultiviert worden sind (Abbildung 51B), verwendet.

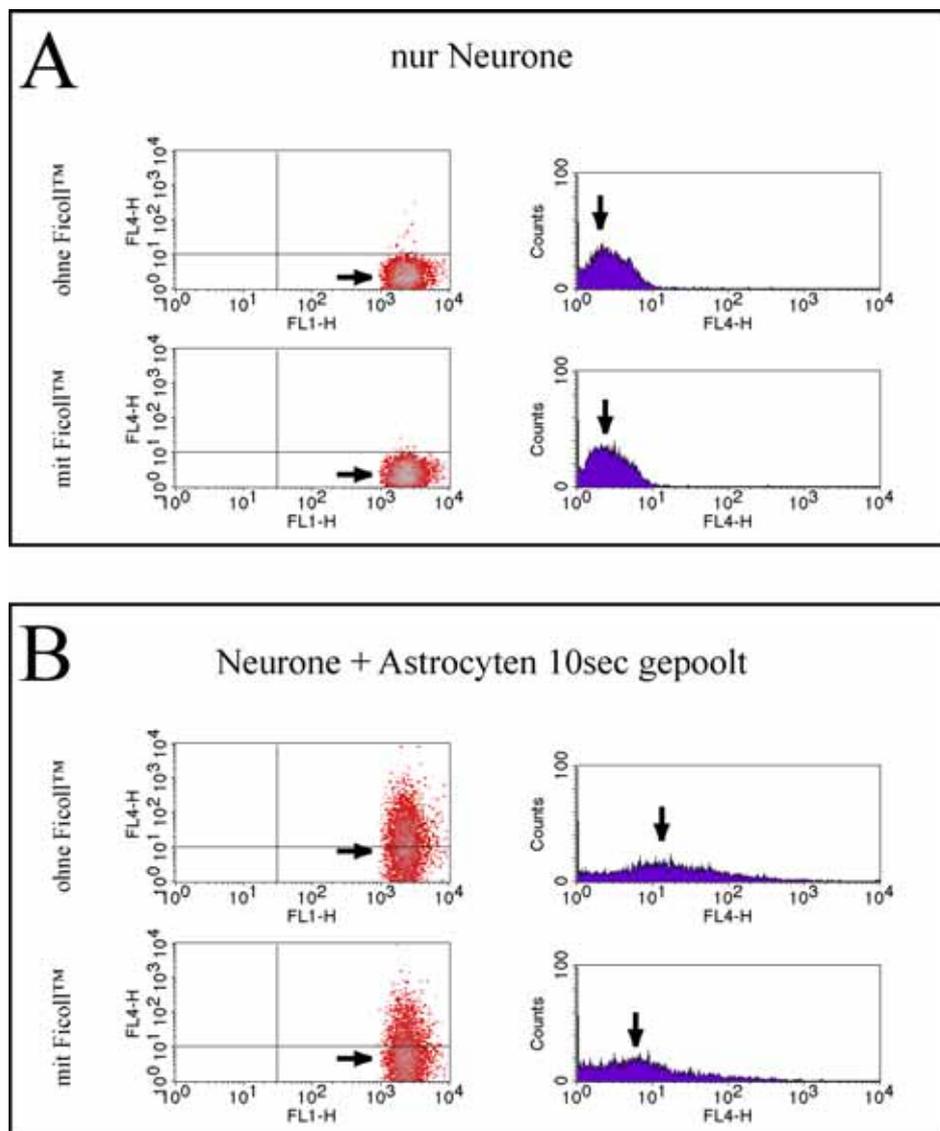


Abbildung 51: Optimierung der Reinheit der gefärbten Astrozyten/Neuronen-Kokulturen für die FACS-Analyse. Neurone wurden mit dem Farbstoff Celltracker™-green gefärbt, Astrozyten wurden mit dem Membranfarbstoff DiD gefärbt (siehe Methoden 6.2.19). Entweder wurden nur Neurone (A) oder Neurone zusammen mit Astrozyten (B) für 6h bei 37°C / 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden dann mittels Trypsin/EDTA von den Zellkulturschalen abgelöst und die abgelösten Zellen entweder direkt zentrifugiert (ohne Ficoll™) oder zunächst auf eine 2%ige Ficoll™-Lösung geschichtet und dann zentrifugiert (mit Ficoll™). Dargestellt sind die gemessenen Populationen in Abhängigkeit ihrer Fluoreszenzeigenschaften (FL4-

H/FL1-H) sowie Histogramme (Counts/FL4-H). Die Histogramme stellen die Anzahl der gemessenen Fluoreszenzintensitäten bezüglich des transferierten Farbstoffes (hier DiD) dar. Deutlich ist zu erkennen, dass eine Reinigung über eine 2%ige Ficoll™-Lösung bei Kokulturen aus Astrozyten und Neuronen erfolgreich ist (B), während bei Kulturen, die nur Neurone enthalten, keine Verbesserung zu erkennen ist. Pfeil, Mittelwert der Fluoreszenzintensität.

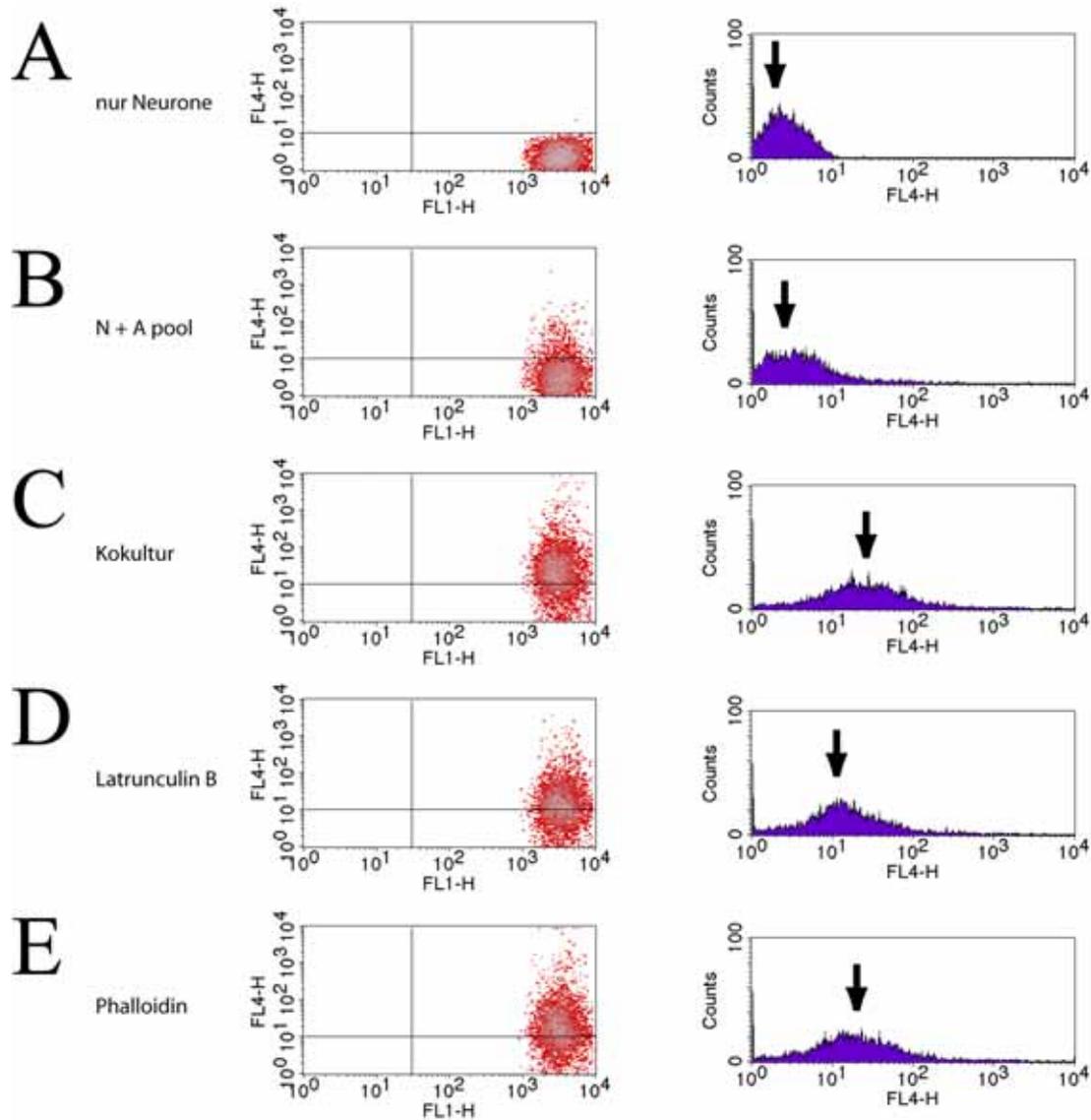


Abbildung 52: FACS-Analyse des Membrantransfers zwischen Neuronen und Astrozyten. Frisch Präparierte hippocampale Neurone und Astrozyten wurden wie beschrieben gefärbt und die gefärbten Zellpopulationen wurden entweder einzeln (A,B) oder zusammen für 6h bei 37°C / 5% CO₂ kultiviert (C-F) und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Methoden 6.2.16 und 6.2.18). Zudem wurden die kokultivierten Populationen für 5h mit verschiedenen Zytoskelettdrogen behandelt (D,E). Um die Auswirkungen der Zytoskelettdrogen auf die Signalverteilung zu verdeutlichen, sind exemplarisch für das gesamte Experiment einige Diagramme der Fluoreszenzeigenschaften (FL4-H/FL1-H) sowie Histogramme (Counts/FL4-H) dargestellt. Die Histogramme stellen die Anzahl der gemessenen Fluoreszenzintensitäten bezüglich des transferierten Farbstoffes (hier DiD) dar. Pfeil, Mittelwert der Fluoreszenzintensität.

Die beiden einzeln kultivierten Population wurden 10s vor der FACS-Analyse miteinander vermischt und direkt im Anschluss analysiert (Abbildung 52B). Nach sechsständiger Kokultur von DiD-gefärbten Astrozyten mit Celltracker™-green gefärbten Neuronen war ein deutlicher

Anstieg der Signalintensität des DiD-Signals in den Neuronen zu beobachten (Abbildung 52C). Latrunculin B bewirkte eine Reduktion der Intensität des DiD-Signals in den Celltracker™-green gefärbten Neuronen im Vergleich zu der Kokultur, bei der keine Zytoskelettgifte eingesetzt wurde (Abbildung 52D). Bei Kokulturen, zu denen Phalloidin appliziert wurde, konnte eine vergleichbare Signalstärke des DiD-Signals in den Neuronen beobachtet werden, wie sie auch bei der Kokultur ohne Zytoskelettgifte zu erkennen war (Abbildung 52E).

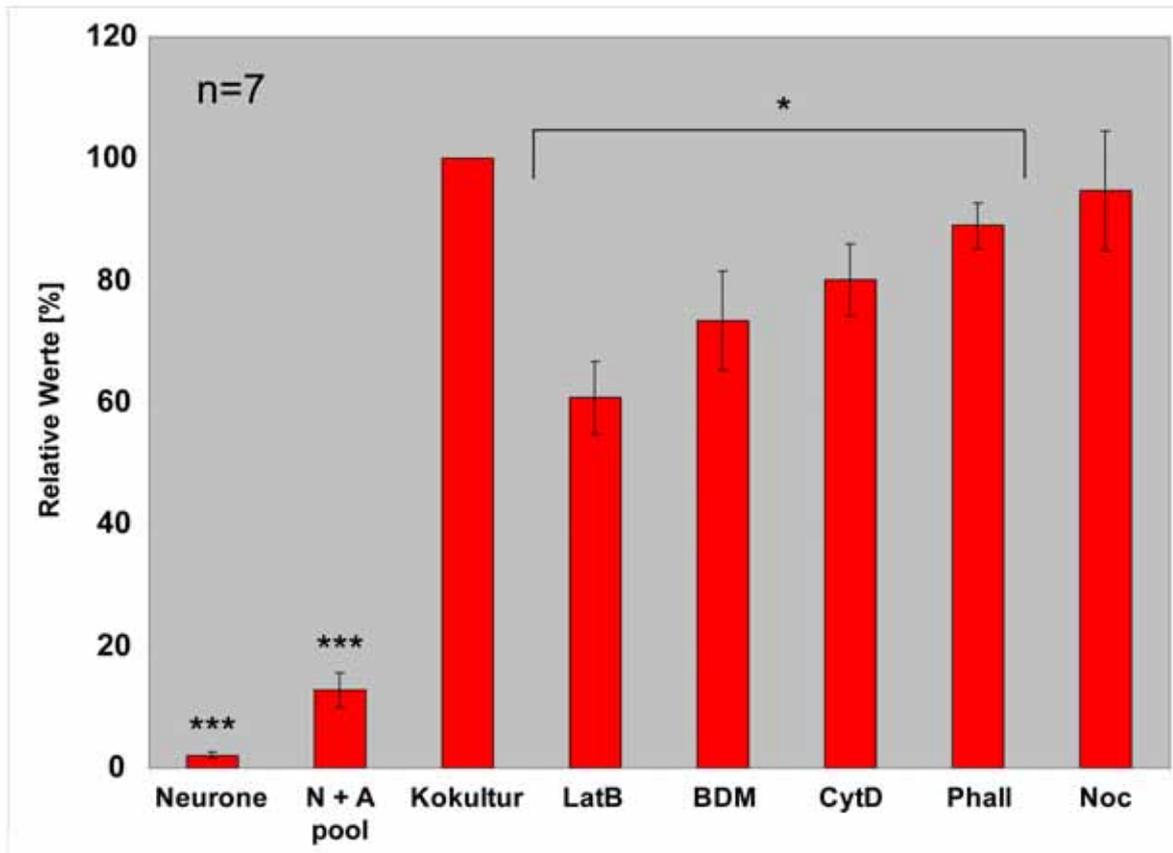


Abbildung 53: Statistische Auswertung der FACS-Analyse des Membrantransfers zwischen Neuronen und Astrozyten. Dargestellt sind die durchgeführten und ausgewerteten Experimente zur FACS-Analyse des Farbstofftransfers zwischen Celltracker™-green gefärbten Neuronen und DiD-gefärbten Astrozyten unter Einfluss diverser Zytoskelettgifte (Latrunculin B (**LatB**), **BDM**, Cytochalasin D (**CytD**), Phalloidin (**Phall**) und Nocodazol (**Noc**)). Die Kulturen wurden für 6h bei 37°C / 5% CO₂ kultiviert. Die statistische Auswertung beruht auf insgesamt 7 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Für die statistische Auswertung wurden die erhaltenen absoluten Werte der Fluoreszenzintensitäten bezüglich des transferierten Farbstoffes DiD relativiert. Dazu wurde der Wert der Positivkontrolle als 100% gesetzt, die verbleibenden Werte wurden dazu relativiert. (**Neurone**), Negativkontrolle, nur Celltracker™-green gefärbte Neurone wurden gemessen; (**N + A pool**), Negativkontrolle, Celltracker™-green-gefärbte Neurone und DiD-gefärbte Astrozyten, die getrennt voneinander kultiviert wurden, werden für 10sec gemischt und anschließend direkt analysiert; (**Kokultur**), Positivkontrolle, Celltracker™-green- und DiD-gefärbte NRK-Zellen wurden für 6h bei 37°C / 5% CO₂ kokultiviert. *, p<0,020 (ungepaarter Student's T-Test); ***, p<0,001 (ungepaarter Student's T-Test).

Die quantitative Auswertung der FACS-Analyse ergab, dass nach einer Inkubation der Kokultur von Astrozyten und Neuronen mit Latrunculin B eine Reduktion des Transfers auf $60,73 \pm 5,35\%$ S.E.M. ($p<0,001$) im Vergleich zu der Positivkontrolle („Kokultur“) zu

verzeichnen war (Abbildung 53). Cytochalasin D hatte dagegen einen geringeren Effekt und bewirkte nur eine Reduktion der DiD-Signalstärke auf $80,09 \pm 5,34\%$ S.E.M. ($p < 0,015$, Abbildung 53). Die Verwendung des Myosinmotorblockers BDM bewirkte eine Reduktion des DiD-Signals auf $73,35 \pm 8,14\%$ S.E.M. ($p < 0,020$, Abbildung 53). Somit ist der Effekt auf die Transferrate bei Applikation von BDM größer, als der von Cytochalasin D. Eine Applikation von Phalloidin hatte nur eine geringe Reduktion auf $89,00 \pm 3,77\%$ S.E.M. ($p < 0,017$) zur Folge, während Nocodazol, welches Mikrotubuli bei NRK-Zellen eine starke Reduktion des Transfers verursachte (siehe Abbildung 50), die Transferrate auf lediglich $94,75 \pm 9,74\%$ S.E.M. reduzierte ($p < 0,320$, Abbildung 53).

Zusammenfassend verdeutlichen die Daten, dass der gemessene Transfer zwischen Astrozyten und Neurone eine Abhängigkeit von F-Aktin zeigt. Mikrotubulidepolymerisierende Drogen, wie z.B. Nocodazol haben bei diesen Kokulturen keinen signifikanten Effekt auf den Transfer.

8.6 Analyse der Endozytosegeschwindigkeit von Plasmamembranen in Gegenwart von Phalloidin bei NRK-Zellen

Da bei den vorangegangenen Experimenten eine Übertragung von Membranbestandteilen über Exo- bzw. Endozytosevorgänge nicht ausgeschlossen werden konnte und Phalloidin bei den vorangegangenen Experimenten einen Einfluss auf die Transferrate hatte, sollte untersucht werden, ob Phalloidin eine Endozytose verlangsamt oder sogar vollständig blockiert. Hierzu wurden NRK-Zellen auf LabTek™-Kammern ausplattiert und anschließend mit dem Membranfarbstoff WGA-green gefärbt. Zum einen wurden die Zellen ohne den Zusatz von Phalloidin und zum anderen nach Zusatz von Phalloidin über den Zeitraum von einer Stunde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass über einen Zeitraum von einer Stunde die unbehandelten Zellen eine höhere Endozytoserate der Plasmamembran hatten (Abbildung 54). Im Gegensatz dazu wiesen Zellen, die mit Phalloidin inkubiert wurden, eine reduzierte Endozytoserate der Plasmamembran auf (Abbildung 54). Ein Vergleich des endozytierten Signals zu dem Signal, welches sich noch nach 50 Minuten an der Zelloberfläche befindet, zeigte deutlich, dass die Zelle, die mit Phalloidin behandelt worden ist, nach 50 Minuten noch eine Membranfärbung

aufwies (Abbildung 55E-H). Im Gegensatz dazu, konnte bei Zellen, die ohne Phalloidin inkubiert wurden, nahezu keine Membranfärbung nachgewiesen werden (Abbildung 55A-D).

Betrachtet man den Quotienten aus Membransignal zu intrazellulärem Signal

$$C_{\text{phal}} = \frac{S_{\text{Mem}}}{S_{\text{Endo}}} \quad | \quad S_{\text{Mem}} = \text{Membransignal}; S_{\text{Endo}} = \text{intrazelluläres Signal}$$

über die Zeit, so lässt sich feststellen, dass eine schnellere Abnahme des Quotienten C_{phal} bei den Kontrollzellen, als bei Zellen, die mit Phalloidin behandelt wurden, vorliegt (Abbildung 56). $C_{\text{phal}} = 1$ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Menge des intrazellulären Signals der des Membransignals entspricht. In Abbildung 56 ist der Verlauf der Abnahme des Koeffizienten grafisch dargestellt. Hierbei ist ein Koeffizient von $C_{\text{phal}} = 1$ bei Zellen ohne Phalloidin bereits nach 24,8min erreicht, während dieser Wert bei Zellen mit Phalloidin erst nach fast der doppelten Zeit (47,21min) unterschritten wird.

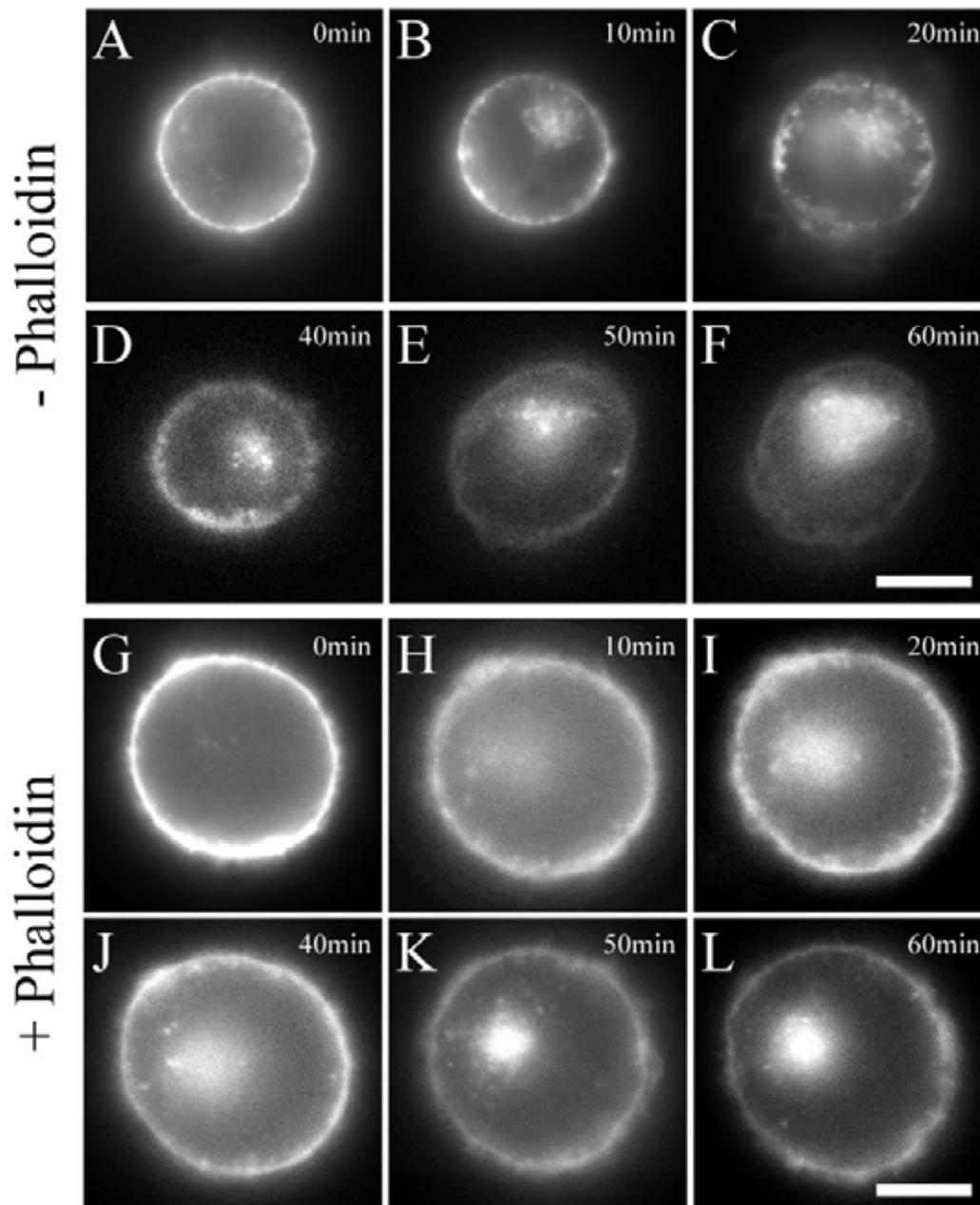


Abbildung 54: Phalloidin bewirkt eine langsamere Endozytose von Membranmaterial bei NRK-Zellen. NRK-Zellen wurden auf LabTek™-Kammern ausplattiert und für 30min in HEK-/NRK-Zellkulturmedium bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde dann entweder gegen frisches HEK-/NRK-Zellkulturmedium ohne Phalloidin (A-F) oder gegen HEK-/NRK-Zellkulturmedium mit 5µM Phalloidin (G-L) ausgetauscht und die Zellen für weitere 30min bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Zur Membranfärbung wurden die Zellen mit WGA-green in HEK-/NRK-Zellkulturmedium auf Eis für 5min inkubiert. Die Färbelösung wurde danach gegen HEK-/NRK-Zellkulturmedium ohne Phalloidin (A-F) bzw. mit 5µM Phalloidin (G-L) ausgetauscht und bei 37°C / 5% CO₂ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dargestellt sind Aufnahmen, die in einem Abstand von 10min über einen Zeitraum von 60min von jeweils der gleichen Zelle angefertigt wurden. Maßstabsbalken, 10µm.

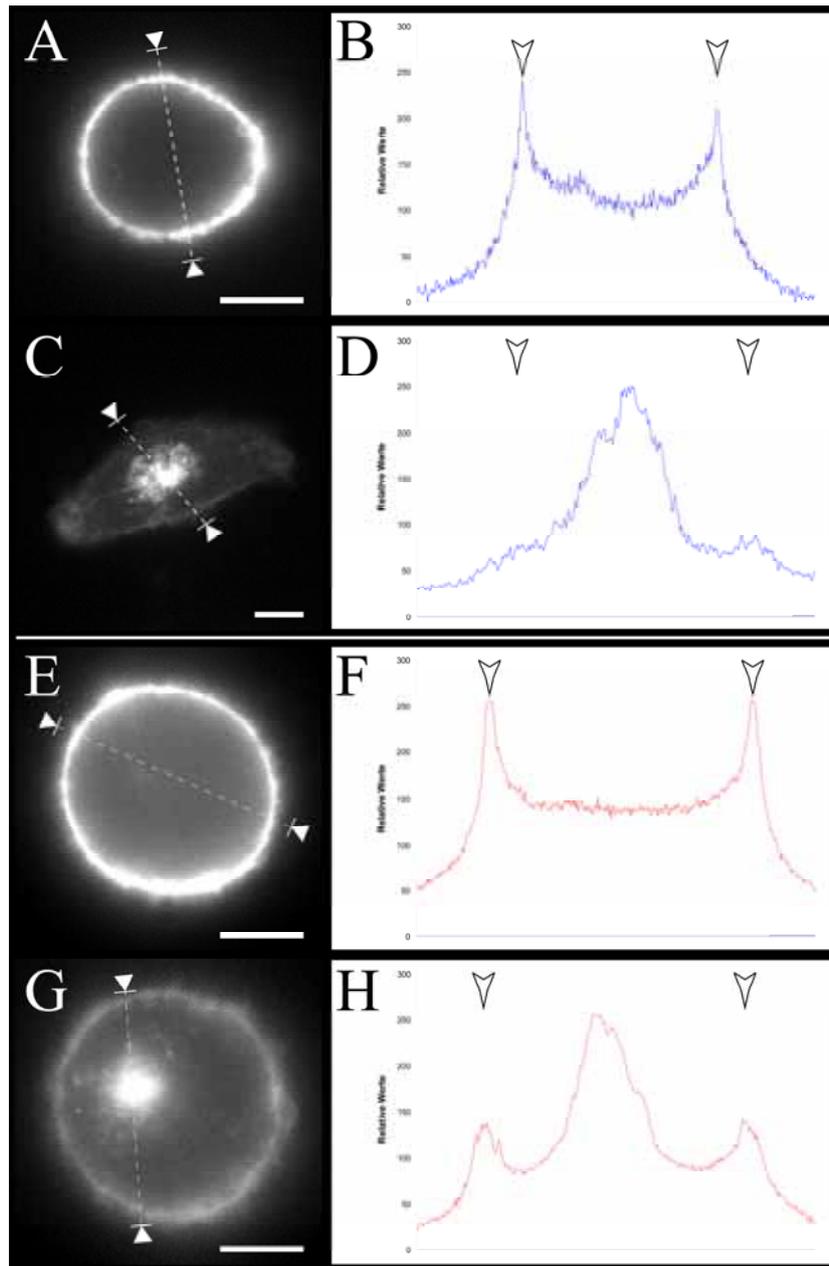


Abbildung 55: Phalloidin bewirkt eine langsamere Endozytose von Membranmaterial bei NRK-Zellen. NRK-Zellen wurden auf LabTek™-Kammern ausplattiert und für 30min in HEK-/NRK-Zellkulturmedium bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde dann entweder gegen frisches HEK-/NRK-Zellkulturmedium ohne Phalloidin (A,C) oder gegen HEK-/NRK-Zellkulturmedium mit 5µM Phalloidin (E,G) ausgetauscht und die Zellen für weitere 30min bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit WGA-green in HEK-/NRK-Zellkulturmedium auf Eis für 5min inkubiert. Die Färbelösung wurde danach gegen HEK-/NRK-Zellkulturmedium ohne Phalloidin (A,C) bzw. mit 5µM Phalloidin (E,G) ausgetauscht und bei 37°C / 5% CO₂ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dargestellt ist jeweils eine Aufnahme zu Beginn des Experiments (A,E), sowie nach 50min (C,G). Entlang der gestrichelten Linien wurden Profile der Fluoreszenzintensität erstellt (B,D,F,H). Deutlich ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität der Plasmamembran bei den Kontrollzellen zu erkennen (B,D, Pfeilspitzen). Dagegen kann bei Zellen, die mit Phalloidin behandelt wurden, nach 50min noch ein Membransignal detektiert werden (F,H, Pfeilspitzen). Maßstabsbalken, 10µm.

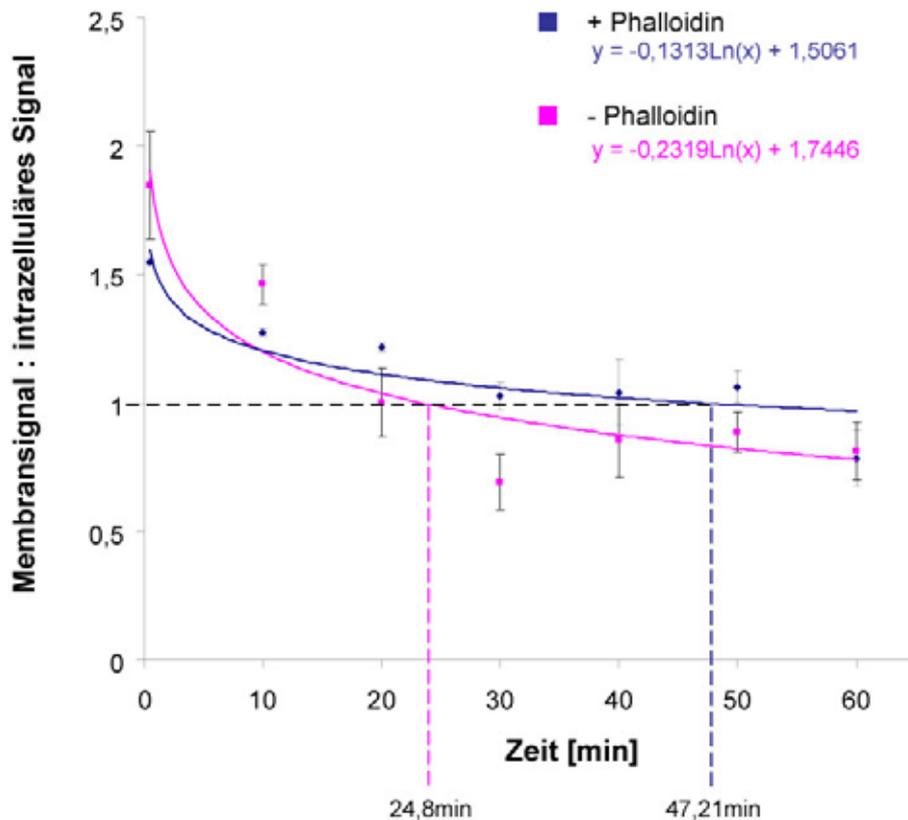


Abbildung 56: Zeitabhängige Endozytoserate bei NRK-Zellen nach Phalloidin-Applikation. NRK-Zellen wurden auf LabTek™-Kammern ausplattiert und für 30min in HEK-/NRK-Zellkulturmedium bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde dann entweder gegen frisches HEK-/NRK-Zellkulturmedium ohne Phalloidin (rosa Kurve) oder gegen HEK-/NRK-Zellkulturmedium mit 5µM Phalloidin (blaue Kurve) ausgetauscht und die Zellen für weiter 30min bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit WGA-green in HEK-/NRK-Zellkulturmedium auf Eis für 5min inkubiert. Die Färbelösung wurde danach gegen HEK-/NRK-Zellkulturmedium ohne Phalloidin (rosa Kurve) bzw. mit 5µM Phalloidin (blaue Kurve) ausgetauscht und bei 37°C / 5% CO₂ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In Abständen von jeweils 5min wurde von derselben Zelle ein Bild aufgenommen und die Fluoreszenzintensitäten der Plasmamembran und des intrazellulären Signals relativiert und grafisch dargestellt. Es ist erkennbar, dass bei Zellen, die mit Phalloidin behandelt wurden, das Verhältnis Membransignal/intrazelluläres Signal langsamer abnimmt.

8.7 Anwendung nanostrukturierter Oberflächen zur Analyse von TNTs in Kokulturen von Astrozyten und Neuronen

Eine Schwierigkeit bei der Untersuchung von TNTs zwischen Astrozyten und Neuronen war, dass die verschiedenen Zelltypen sich meist in sehr enger Nachbarschaft zueinander befanden. Aufgrund des geringen Abstands der Zellen zueinander war es daher nur sehr schwer möglich, TNTs zu visualisieren. Zudem führte die hohe Mobilität der Astrozyten häufig zu einem Überwachsen der Neurone durch die Astrozyten. Zur besseren Untersuchung von TNT Strukturen zwischen kultivierten hippocampalen Neuronen und Astrozyten wurden daher speziell behandelte Glasflächen in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr.

Spatz (Institut für Physikalische Chemie, Heidelberg) entwickelt. Dazu wurde auf ultrareine Glasoberflächen eine Matrize bestehend aus kreisförmigen Goldflächen mit definiertem Durchmesser aufgetragen, die in definierten Abständen verteilt sind. Mit Hilfe solcher Matrizen, bei der jede einzelne Goldfläche als eine Art Mikro-Zellkulturschale dienen soll, wurde es ermöglicht, dass Zellen in bestimmten Abständen kultiviert werden konnten. Weiterhin sollten diese Oberflächen eine Einschränkung der Wuchsrichtung der Neuriten ermöglichen. Um die optimalen Bedingungen für eine Kultivierung von Astrozyten und Neuronen zu ermitteln, wurden die Goldflächen in unterschiedlicher Größe und in verschiedenen Abständen auf die Glasflächen aufgebracht (Abbildung 12).

Die Goldflächen konnten außerdem mit verschiedenen chemischen Komponenten kovalent gekoppelt werden. So können z.B. unterschiedliche funktionelle Gruppen von Proteinen der extrazellulären Matrix (z.B. von Laminin) mit den Goldflächen gekoppelt werden. Um eine Kopplung von funktionellen Gruppen an die Goldflächen durchführen zu können, bedarf es eines chemischen Verbindungsstückes zwischen Goldfläche und funktioneller Gruppe. Ein solches Verbindungsstück wird auch als „Linker“ bezeichnet. Als „Linker“ wurde in der vorliegenden Arbeit eine 11-Mercaptoundecansäure verwendet (siehe Abbildung 11A). Die 11-Mercaptoundecansäure besitzt eine Thiolgruppe (-SH), über die eine stabile Verbindung mit Gold-Atomen eingegangen werden kann (Abbildung 11D) und eine funktionelle Gruppe, wie z.B. eine Karbonsäure (-COOH) oder eine Aminogruppe (-NH₂). Je nach Applikation können somit Matrizen hergestellt werden, die entweder eine Karbonsäure oder eine Aminogruppe als funktionelle Gruppe tragen und somit eher positive oder eher negative Ladungen tragen. Man bezeichnet diese Flächen, an die kovalent funktionelle Gruppen gebunden wurden auch als funktionalisierte Flächen. In Abbildung 11D ist der Aufbau dieser Oberflächen in einem Querschnitt schematisch dargestellt.

8.7.1 Optimierung der selektiven Adhäsion neuronaler Zellen durch Variation des Durchmessers der Goldflächen

Um eine optimale vereinzelte Kultur von hippokampalen Neuronen und Astrozyten auf diesen Oberflächen zu erreichen, wurden unterschiedliche Kultivierungsbedingungen, wie Zellzahl, Inkubationszeit und unterschiedliche funktionelle Gruppen getestet. Die Größe der Goldflächen wurde an den durchschnittlichen Durchmesser der Zellsomata der Neurone angepasst (Abbildung 57) und daher auf 9,5µm bestimmt. Diese Größe erwies sich als

optimale Größe für die späteren fluoreszenzmikroskopischen Versuche, da so die Zellmembran und damit die Ansatzstellen der TNTs gerade über die Enden der Goldflächen hinausragen (Abbildung 57). Die Glasoberfläche zwischen den Punkten wurde zusätzlich mit Wasserstoffplasma ultrastrukturell gereinigt, um eine unspezifische Adhäsion der zu untersuchenden Zellen zu vermeiden.

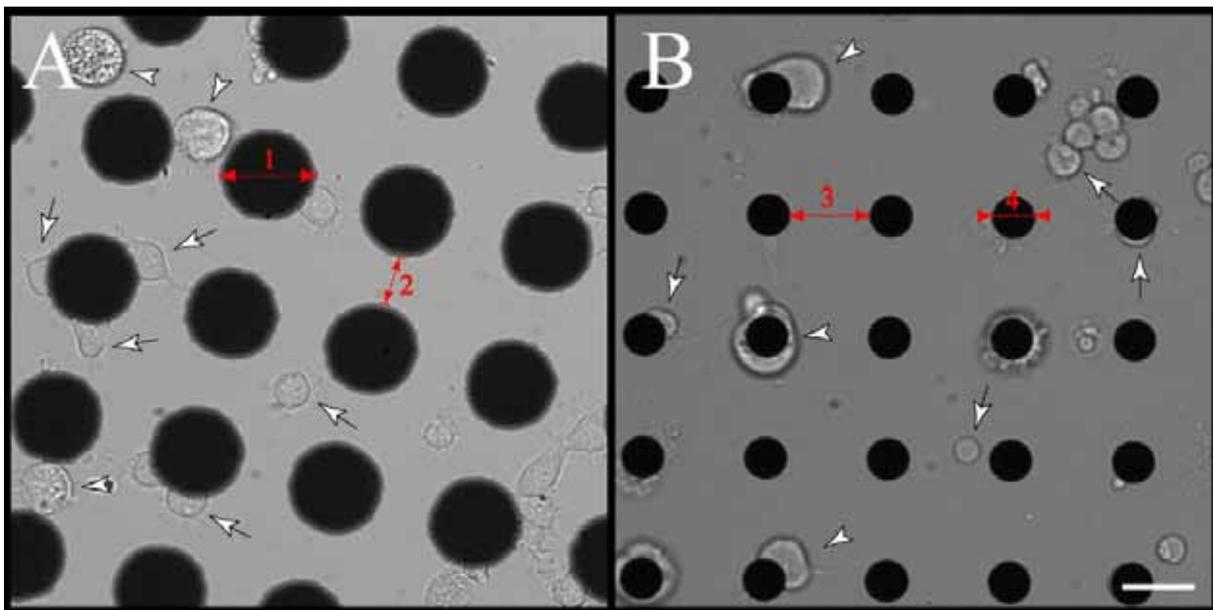


Abbildung 57: Effekte unterschiedlicher Punktgrößen auf die Vereinzeln neuronaler Zellen. Frisch präparierte hippocampale Neurone (200.000 in 200µl) und Astrozyten (100.000 in 200µl) wurden auf verschiedene Matrizen ausplattiert und für 2h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und anschließend mikroskopisch analysiert. Zum einen wurde eine Matrize verwendet, bei der die Goldflächen einen Durchmesser von 30µm (A, 1) und einen Abstand von 15µm (A, 2) besitzen, und zum anderen eine Matrize mit Goldflächen mit 9,5µm Durchmesser (B, 4) und einem Abstand von 20µm (B, 3). Pfeilspitzen, Astrozyten; Pfeile, Neurone. Maßstabsbalken, 20µm.

8.7.2 Optimierung der selektiven Adhäsion neuronaler Zellen durch verschiedene Liganden

Zur Untersuchung, welche Funktionalisierung der Goldflächen eine optimale Adhäsion der Zellen ermöglicht, wurden die Goldflächen mit verschiedenen funktionellen Gruppen gekoppelt. Dazu wurden verschiedene Derivate der 11-Mercaptoundecansäure verwendet. Die Derivate unterschieden sich jeweils in ihrer funktionellen Gruppe (Karbonsäure, Aminogruppe oder zyklisches Tripeptid (Arg-Gly-Asp, R-G-D)). Das RGD-Motiv ist ein in Fibronectin und Laminin vorkommendes Bindemotiv für Integrine, im Speziellen für Integrin $\alpha_5\beta_1$. Somit stellt das RGD-Motiv eine natürliche Bindestelle zur Anheftung der ausplattierten

Zellen dar. Weiterhin wurde Laminin, ein Protein der extrazellulären Matrix als vierte Möglichkeit der Funktionalisierung untersucht.

Zunächst wurden Goldflächen entweder mit einer Karbonsäure oder mit einer Aminogruppe funktionalisiert. Diese beiden Varianten zur Funktionalisierung wurden verwendet, da eine Karbonsäure bei dem physiologischen pH-Wert von 7,4 eine negative Ladung trägt ($-\text{COO}^-$), aber im Gegensatz dazu eine Aminogruppe eine positive Ladung ($-\text{NH}_3^+$) unter physiologischen Bedingungen trägt. Während bei Goldflächen, die mit einer Karbonsäure funktionalisiert wurden, die Zellen nur sehr selten direkt auf einer der Goldflächen adherierten (Abbildung 58A und B), war die Adhäsion der Astrozyten und Neurone auf Flächen, die mit Aminogruppen funktionalisiert waren, sehr viel besser (Abbildung 58C und D). Eine Funktionalisierung der Goldflächen mit dem Tripeptid RGD führte nicht zu der gewünschten geordneten Adhäsion der ausplattierten Zellen. Vielmehr bewirkte das RGD-Motiv ein vermehrtes Auswachsen der Astrozyten auch über die Zwischenräume der Goldflächen hinweg. Dies führte des Weiteren zu einer ungeordneten Verteilung der Neurone, da diese bevorzugt auf Astrozyten adherierten (Abbildung 58E und F). Mit dem Protein Laminin gekoppelte Goldflächen zeigten keine optimale Adhäsion der Zellen. Vielmehr waren auch hier die Zellen zwischen den Flächen angeordnet (Abbildung 59), was, ähnlich wie bei RGD-funktionalisierten Oberflächen, zu einer zufälligen Verteilung der Zellen führte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Funktionalisierung der Goldflächen mit einer Aminogruppe die optimalste Lösung zur Kultivierung von Astrozyten und Neuronen auf den Oberflächen darstellt.

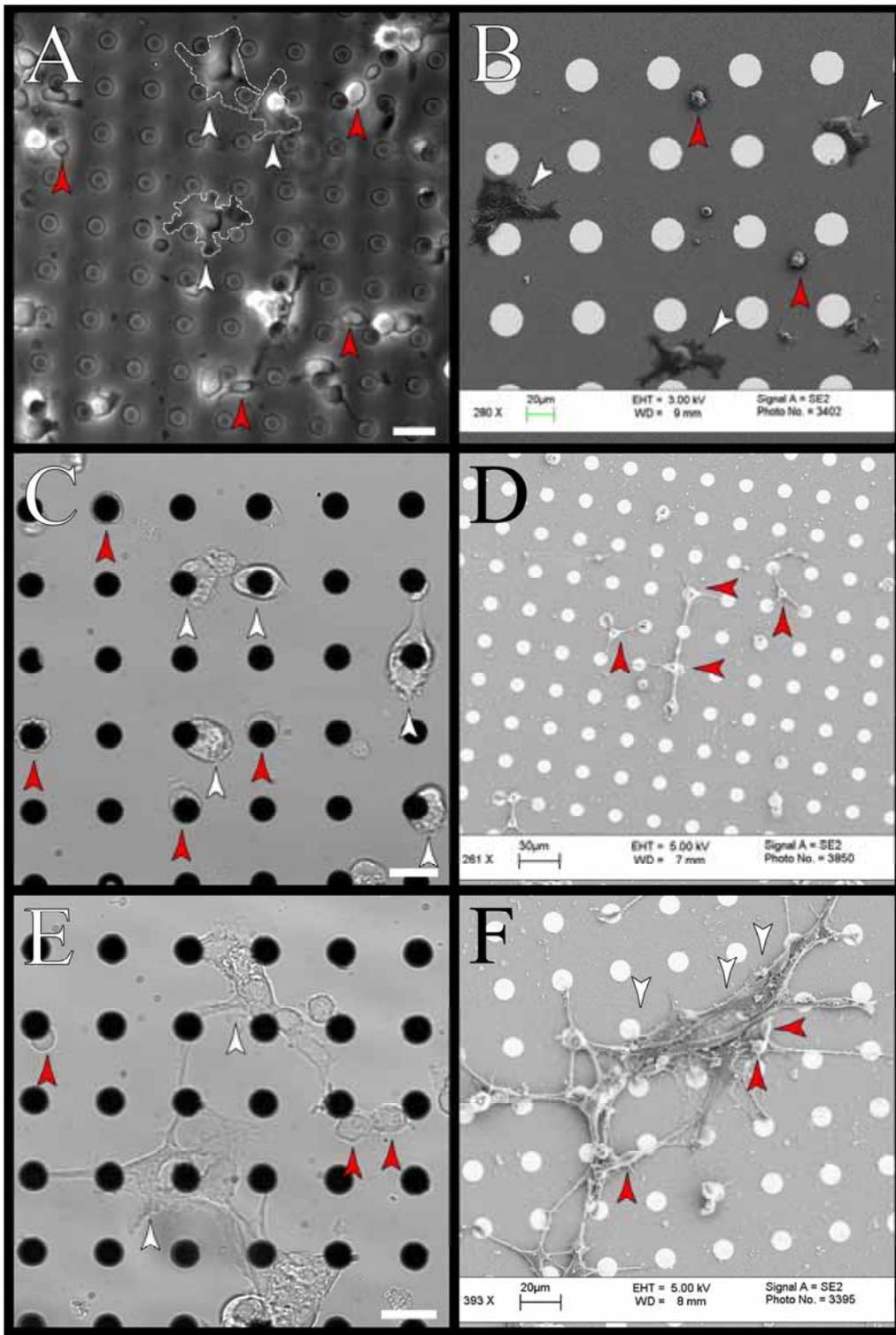


Abbildung 58: Effekte verschiedener Liganden auf die Attraktivität der Goldflächen für neuronale Zellen. Frisch präparierte hippocampale Neurone (200.000 in 200µl) und Astrozyten (100.000 in 200µl) wurden auf Matrizen ausplattiert und für 2h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und anschließend lichtmikroskopisch analysiert (A,C,E). Für die rasterelektronenmikroskopische Analyse (B,D,F) wurden die Zellen nach 3h Inkubation bei 37°C / 5% CO₂ mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert, entwässert und mit Kohlenstoff bedampft. Die Goldflächen haben einen Durchmesser von 9,5µm und einen Abstand voneinander von 20µm. Die Goldflächen wurden zuvor entweder mit einer 11-Mercaptoundecansäure (A,B), 11-Aminoundecan-1-thiol (C,D) oder c(RGDfK)-thiol (E,F) beschichtet (=funktionalisiert). Weiße Pfeilspitzen, Astrozyten; rote Pfeilspitzen, hippocampale Neurone. Maßstabsbalken, 20µm (A,C,E) oder entsprechend der Beschriftung (B,D,F).

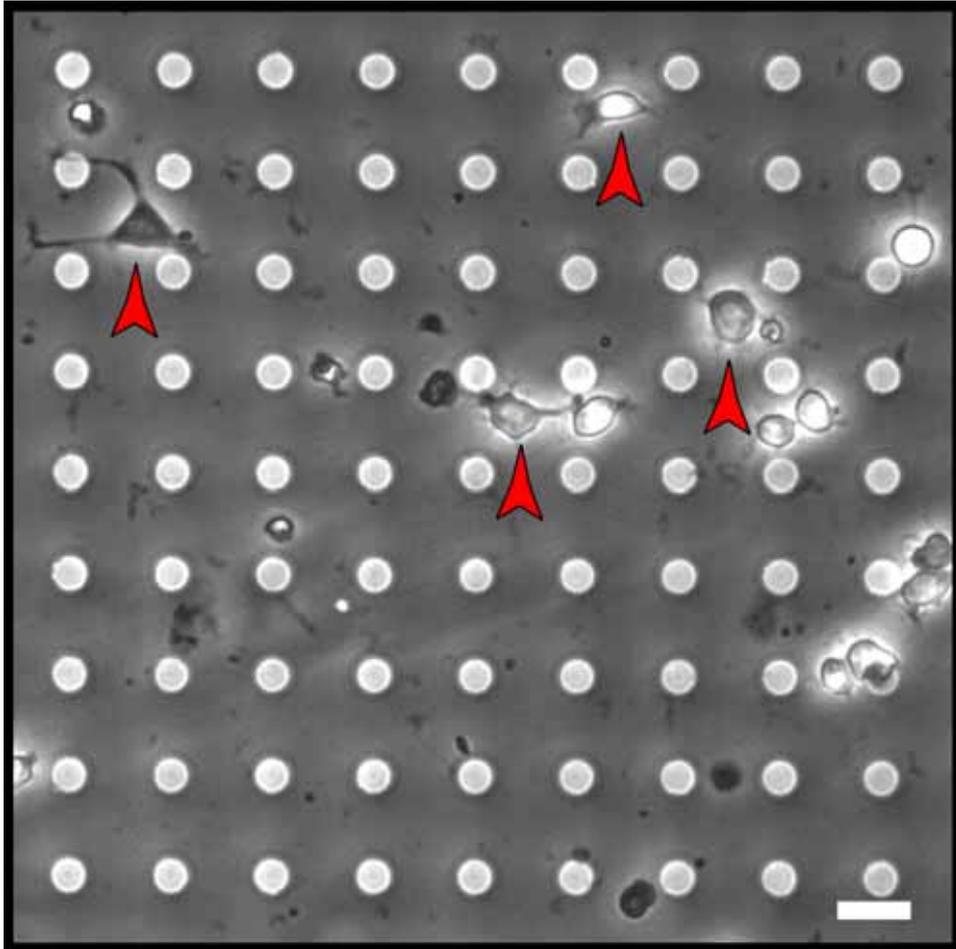


Abbildung 59: Mit Laminin funktionalisierte Goldflächen. Frisch präparierte hippocampale Neurone (200.000 in 200 μ l) wurden auf Matrizen ausplattiert und für 2h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und anschließend lichtmikroskopisch analysiert. Die Goldflächen haben einen Durchmesser von 9,5 μ m und einen Abstand von 20 μ m. Die Goldflächen wurden zuvor entweder mit Laminin beschichtet (=funktionalisiert). Man beachte, dass die Neurone nur in den Bereichen zwischen den Goldflächen zu finden sind (rote Pfeilspitzen). Maßstabsbalken, 20 μ m.

8.7.3 Optimierung der selektiven Adhäsion neuronaler Zellen durch Variation des Abstandes der Goldflächen

Um den optimalen Abstand der Flächen für eine Astrozyten/Neuronen-Kokultur zu etablieren, wurden verschiedene Punktabstände untersucht. Hierzu wurden Glasplättchen verwendet, die in vier Felder unterteilt waren. Jedes Feld bestand aus Goldflächen, die unterschiedliche definierte Abstände voneinander aufwiesen (Abbildung 60). Die untersuchten Abstände waren 35 μ m, 30 μ m, 25 μ m und 20 μ m. Die Goldflächen waren für dieses Experiment mit 11-Aminoundecan-1-thiol (siehe Abbildung 11B) kovalent gekoppelt. Die Untersuchung zeigte, dass bei einem Punktabstand von 35 μ m keine geordnete Anordnung der Neuronen und Astrozyten auf den einzelnen Goldflächen beobachtet werden konnte (Abbildung 60).

Außerdem liegen die Zellen häufig zwischen den Punkten (Abbildung 60A, weiße Pfeilspitzen). Bei einem Abstand der Flächen von $30\mu\text{m}$, war kein Unterschied im Vergleich zu dem $35\mu\text{m}$ -Abstand festzustellen (vergleiche Abbildung 60A und B, weiße Pfeilspitzen).

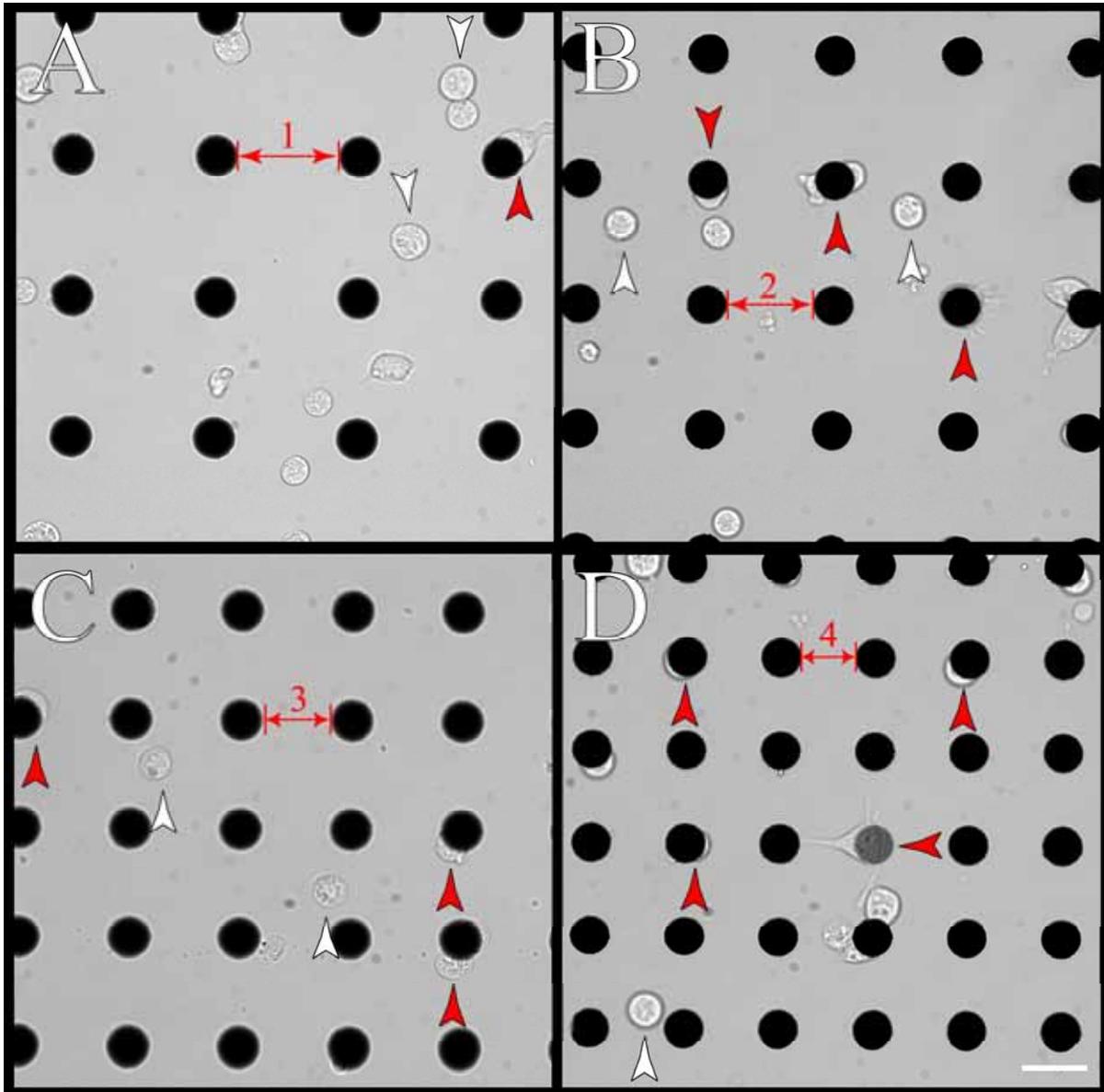


Abbildung 60: Goldflächen ($\varnothing 9.5\mu\text{m}$) mit unterschiedlichen Abständen. Frisch präparierte hippocampale Neurone (300.000 in $200\mu\text{l}$) wurden auf Matrizen mit unterschiedlichem Abstand der Goldflächen ausplattiert und für 2h bei $37^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ inkubiert und anschließend lichtmikroskopisch analysiert. Die Goldflächen hatten einen Abstand von $35\mu\text{m}$ (A, 1), $30\mu\text{m}$ (B, 2), $25\mu\text{m}$ (C, 3) bzw. $20\mu\text{m}$ (D, 4). Die Goldflächen wurden zuvor mit 11-Aminoundecan-1-thiol beschichtet (=funktionalisiert). Man beachte, dass bei einer Verringerung des Abstandes der Goldflächen die Affinität der Zellen zu den Flächen deutlich zunimmt (A-D, rote Pfeilspitzen). Weiße Pfeilspitzen, Neurone, die neben den Goldflächen adhärten; rote Pfeilspitzen, Neurone, die auf den Goldflächen adhärten. Maßstabsbalken, $20\mu\text{m}$.

Bei einer weiteren Reduzierung des Punktabstandes auf $25\mu\text{m}$ adhärten eine deutlich erhöhte Anzahl der Zellen auf den Punkten. (Abbildung 60C, rote Pfeilspitzen). Auffallend war zudem, dass die Zellen zentral auf den Punkten adhärten. Bei einer weiteren

Reduzierung des Abstandes der Goldflächen auf 20µm konnte keine Erhöhung der Spezifität der Zellen zu den funktionalisierten Goldflächen beobachtet werden (Abbildung 60D, rote Pfeilspitzen). Schlussendlich stellte sich aufgrund der vorangegangenen Experimente ein Punktabstand von 20µm bei einer Punktgröße von 9,5µm für die Matrizen als Optimum für die nachfolgenden Experimente dar.

8.7.4 Optimierung der selektiven Adhäsion neuronaler Zellen durch Variation der Zellzahl

Um die Abhängigkeit der Anheftung der Zellen von der eingesetzten Zellzahl zu untersuchen, wurden Gold-Matrizen mit den zuvor ermittelten optimalen Werten hergestellt. Auf diese Oberflächen wurden dann unterschiedliche Zelldichten ausplattiert und für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Auswertung. Folgende Zelldichten wurden verwendet: 300.000, 350.000, 400.000 und 450.000 Zellen. Zelldichten von 400.000 und 450.000 Zellen führten dazu, dass sich die Zellen in „Clustern“ anhäufen und somit die Affinität zu den Goldflächen verloren geht (Abbildung 61C und D). Zudem konnte die hohe Zelldichte zu einer Art Brückenbildung zwischen den Punkten führen, was schlussendlich die Spezifität der Adhäsion der Zellen an die Goldflächen verringerte (Abbildung 61C und D, weiße Pfeile). Bei Zelldichten zwischen 300.000 und 350.000 Zellen pro Glasoberfläche konnte wieder eine hohe Affinität zu den Goldflächen beobachtet werden (Abbildung 61A und B). Bei einer Kokultur von Neuronen und Astrozyten wurde die Zelldichte aufgrund der Größenunterschiede der beiden Zellarten auf das Verhältnis 2:1 (Neurone : Astrozyten) festgelegt.

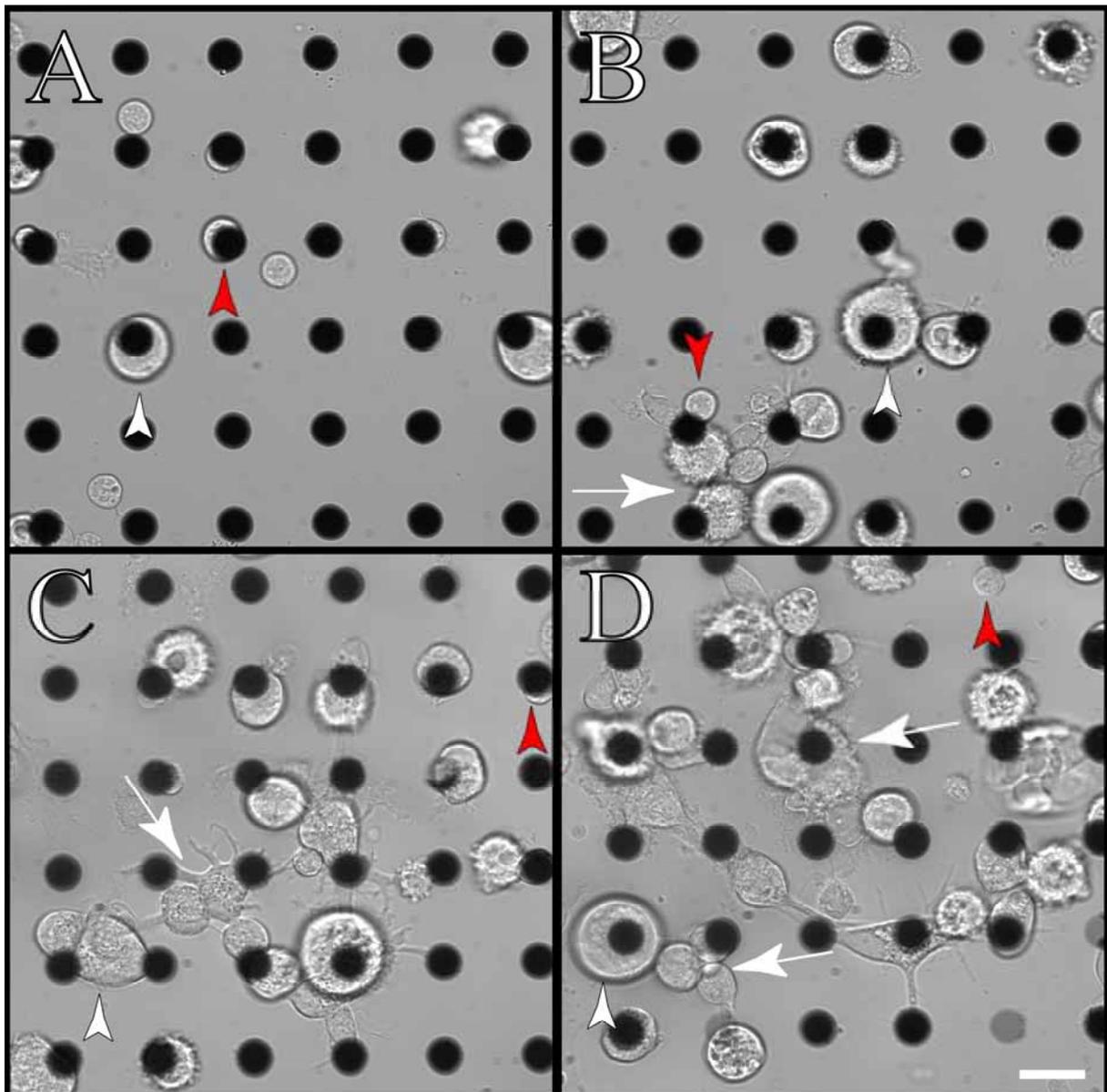


Abbildung 61: Effekte unterschiedlicher Zellzahlen auf die homogene Verteilung neuronaler Zellen auf funktionalisierten Oberflächen. Frisch präparierte hippocampale Neurone und Astrozyten wurden auf Matrizen ausplattiert, bei denen die Goldflächen (\varnothing 9,5 μ m, 20 μ m Abstand) mit 11-Aminoundecan-1-thiol funktionalisiert waren, und für 2h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und anschließend lichtmikroskopisch analysiert. Zur Optimierung der Gesamtzellzahl wurden insgesamt 300.000 Zellen (A), 350.000 Zellen (B), 400.000 Zellen (C) oder 450.000 Zellen (D) ausplattiert. Neuronen und Astrozyten wurden im Verhältnis 2:1 ausplattiert. Man beachte, dass schon bei einer Erhöhung der Gesamtzellzahl von 300.000 Zellen auf 350.000 Zellen, die Affinität der Zellen zu den Goldflächen abnimmt und Zellanhäufungen zwischen den Goldflächen vermehrt auftauchen (B, Pfeil). Rote Pfeilspitzen, Neurone; weiße Pfeilspitzen, Astrozyten; weiße Pfeile, Zellanhäufungen zwischen den Goldflächen. Maßstabsbalken, 20 μ m.

8.7.5 Analyse neuronaler Zellen auf funktionalisierten Goldflächen und Analyse der optimalen Kultivierungsdauer

Um die Langzeiteffekte der Kultivierung von Neuronen und Astrozyten auf mikrostrukturierten Oberflächen zu untersuchen, wurden jeweils 100.000 Astrozyten und 200.000 Neurone auf einer Matrize, bestehend aus Goldflächen mit einer Punktgröße von $9,5\mu\text{m}$ und einem Punktabstand von $20\mu\text{m}$, ausplattiert. Die Zellen wurden dann für 4h bzw. 24h bei 37°C inkubiert und anschließend lichtmikroskopisch sowie elektronenmikroskopisch untersucht. Beide Zelltypen sind nach vier Stunden Inkubation bei 37°C zum Großteil an den Goldflächen zentral angeheftet (Abbildung 62A und B) und konnten nur anhand ihrer Größe unterschieden werden (Abbildung 62A). Die Neurone besitzen nach 4h kaum die für diesen Zelltyp typischen Ausläufer und besitzen ein kugelförmiges Aussehen. Der Durchmesser der Neuronenzellkörpers beträgt ca. $11\mu\text{m}$. Nach einer Inkubationszeit von 4h besitzen Astrozyten ebenfalls ein kugelige Struktur und einen Zellkörperdurchmesser von ca. $16\mu\text{m}$ (Abbildung 62A). Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit haben beide Zelltypen ihre typische Zellmorphologie entwickelt. Die Neurone besitzen nun die typischen Neuriten, die über die Goldflächen gewachsen sind (Abbildung 62C und D). Man kann erkennen, dass die Neuriten in gewissem Maße koordiniert auswachsen und die Goldflächen als Anheftungspunkte verwenden (Abbildung 62C und D).

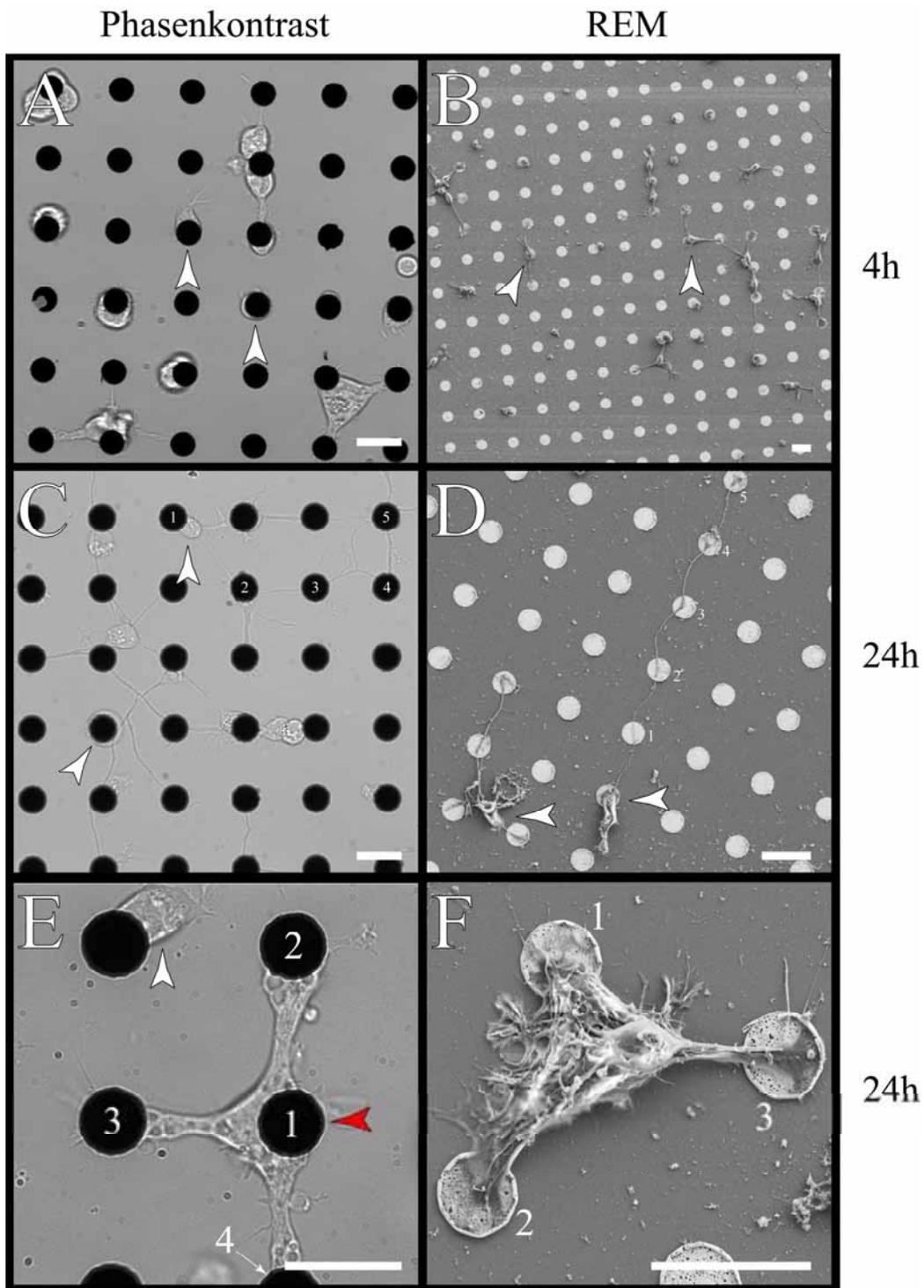


Abbildung 62: Langzeiteffekte bei der Kultivierung neuronaler Zellen auf funktionalisierten Oberflächen. Frisch präparierte hippocampale Neurone (200.000 in 200 μ l) und Astrozyten (100.000 in 200 μ l) wurden auf Matrizen mit funktionalisierten Goldflächen ausplattiert und für 4h (A,B) bzw. 24h (C-F) bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und anschließend lichtmikroskopisch (A,C,E) analysiert. Die Goldflächen (\varnothing 9,5 μ m, 20 μ m Abstand) wurden mit 11-Aminoundecan-1-thiol funktionalisiert. Für die rasterelektronenmikroskopische Analyse (B,D,F) wurden die Zellen nach 4h (B) bzw. 24h (D,F) Inkubation bei 37°C / 5% CO₂ mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert, entwässert und mit Kohlenstoff bedampft. Während die Zellen nach 4h Inkubation noch eine runde Gestalt mit kurzen Ausläufern aufwiesen (A,B, weiße Pfeilspitzen), konnten nach 24h neuronale Ausläufer, die sich über mehrere Goldflächen erstrecken beobachtet werden (C-F). Auch Astrozyten erstreckten sich über mehrere Goldflächen (E 1-4 und F 1-3). Weiße Pfeilspitzen, Neurone; rote Pfeilspitzen, Astrozyten. Maßstabsbalken, 20 μ m.

Des Weiteren kann man nach einer Kultivierung von 24h bei den Astrozyten erkennen, dass sie sich abgeflacht haben und sich teilweise über mehrere Punkte erstrecken (Abbildung 62E und F). Es war zu beobachten, dass die Kontaktfläche des Astrozyten mit der Glasoberfläche so klein wie möglich gehalten wird, während die Goldfläche ausgefüllt wird (Abbildung 62E 1-2-3-4). Eine Kultivierung von Astrozyten und Neuronen über mehrere Stunden ermöglichte es, die Kulturen in Hinblick auf die Bildung von TNTs und den TNT-vermittelten Membrantransfer zu untersuchen. Interessant war auch die Beobachtung, dass Neurone teilweise in direkter Verbindung zu den Astrozyten vorkommen. So konnten häufig Astrozyten beobachtet werden, die sich über mehrere Goldflächen erstreckten, auf denen sich ebenfalls auch Neurone befanden (Abbildung 63).

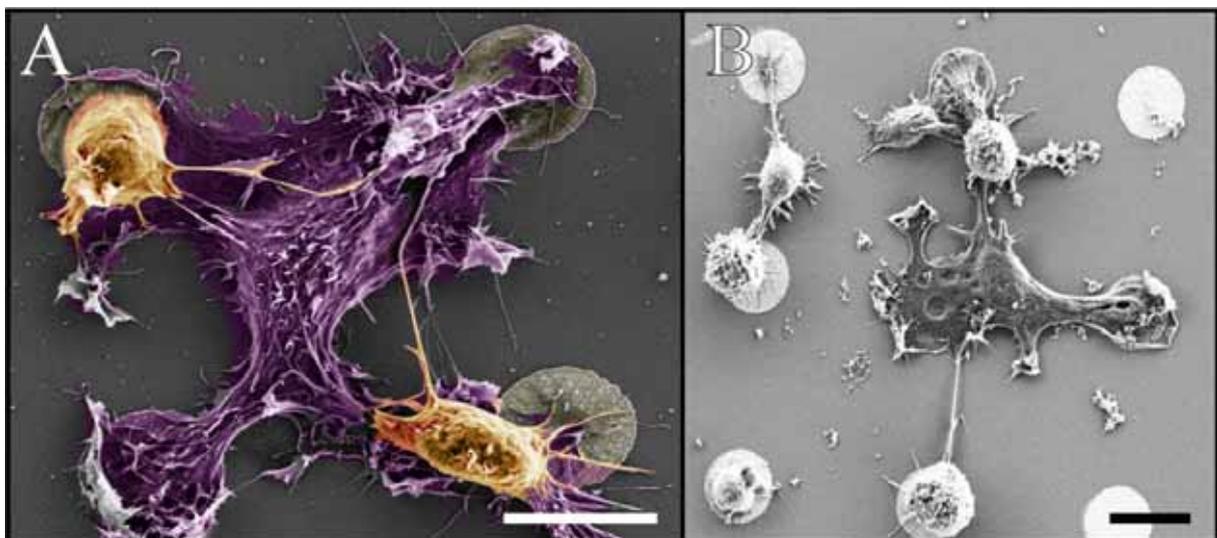


Abbildung 63: Verhalten von Neuronen und Astrozyten während der Kultivierung auf funktionalisierten Oberflächen. Frisch präparierte hippocampale Neurone (200.000 in 200 μ l) und Astrozyten (100.000 in 200 μ l) wurden auf Matrizen mit funktionalisierten Goldflächen ausplattiert und für 24h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und anschließend elektronenmikroskopisch analysiert. Für die rasterelektronenmikroskopische Analyse wurden die Zellen nach 24h Inkubation bei 37°C / 5% CO₂ mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert, entwässert und mit Kohlenstoff bedampft. Die Goldflächen (\varnothing 9,5 μ m, 20 μ m Abstand) wurden mit 11-Aminoundecan-1-thiol funktionalisiert. Bei Kokulturen von hippocampalen Neuronen und Astrozyten kann es vorkommen, dass Neurone (A, orange Zellen) auf den Astrozyten (A, violette Zelle) liegen. Die Astrozyten erstrecken sich über mehrere Goldflächen.

Mit Hilfe der ermittelten Parameter zur Kultivierung von Neuronen und Astrozyten auf funktionalisierten Goldmatrizen war es nun möglich, die beiden Zelltypen, die in einer gesteuerten Anordnung vorlagen, hinsichtlich der Ausbildung von TNTs zu untersuchen. Hierzu wurden Neurone und Astrozyten auf den vorbereiteten Oberflächen ausplattiert und für mindestens 4h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Weizenkeim-Agglutinin (WGA), welches spezifisch Proteoglykane an der Plasmamembran anfärbt, die Zellmembran markiert und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

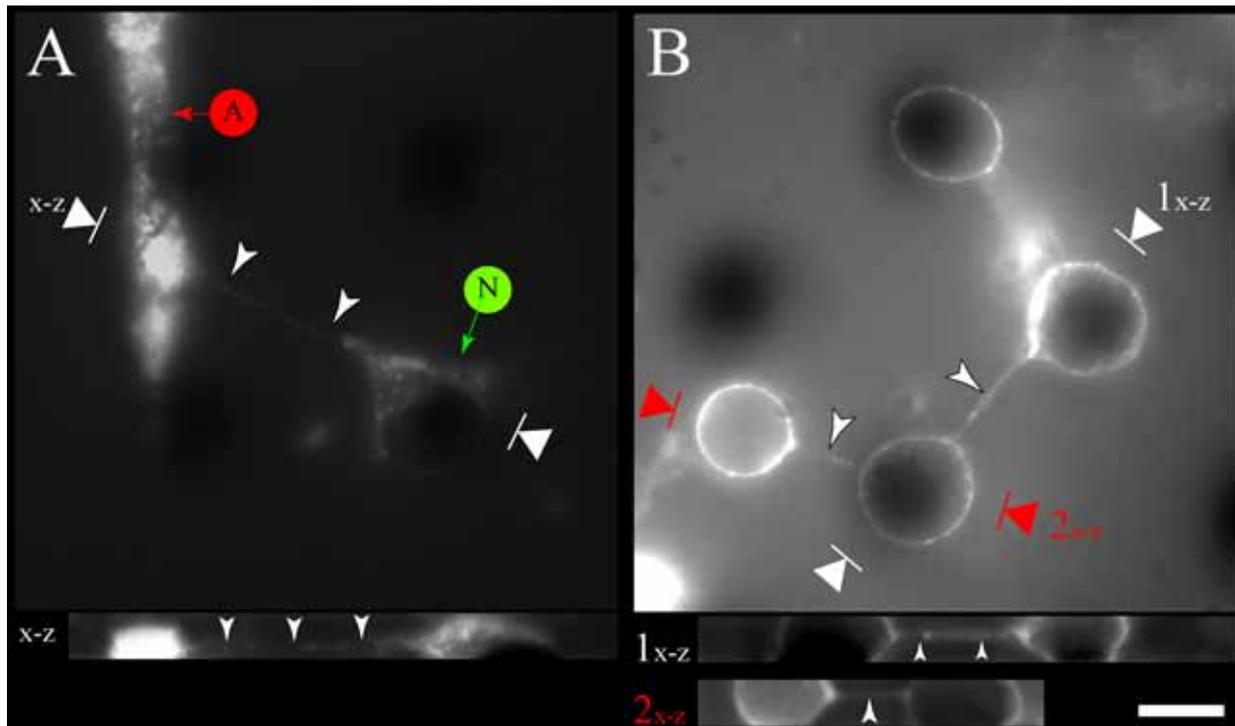


Abbildung 64: TNTs zwischen neuronalen Zellen auf funktionalisierten Oberflächen. Frisch präparierte hippocampale Neurone (200.000 in 200 μ l) und Astrozyten (100.000 in 200 μ l) wurden auf Matrizen mit funktionalisierten Goldflächen ausplattiert und für 4h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Die Goldflächen (\varnothing 9.5 μ m, 20 μ m Abstand) wurden mit 11-Aminoundecan-1-thiol funktionalisiert. Zur Untersuchung von TNT-Strukturen zwischen den einzelnen Zelltypen, wurden die Zellmembranen mit fluoreszenzmarkiertem WGA angefärbt. Die Zellen wurden direkt im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch analysiert, wobei jeweils 50 Fokusebenen aufgenommen wurden und zu einem Bildstapel verarbeitet worden sind (x-z). (A) Zwischen einem Astrozytenausläufer („A“) und einem Neuron („N“) ist ein TNT aufgespannt (Pfeilspitzen). Deutlich zu erkennen ist zudem, dass das TNT über dem Substrat zwischen den Zellen aufgespannt ist (x-z, Pfeilspitzen). (B) Gezeigt ist ein Netzwerk von Neuronen, die über TNTs verbunden sind (Pfeilspitzen). Auch hier konnte gezeigt werden, dass die TNTs über dem Substrat zwischen den Zellen aufgespannt sind. Maßstabsbalken, 10 μ m. Ein zu Bild (B) korrespondierendes Video, welches die eine Sequenz von optischen Schnitten zeigt, ist als Quicktime-Video auf der beigefügten CD enthalten (Ordner Videos; Video7.mov).

In Abbildung 64 kann man erkennen, dass eine Färbung mit WGA zu einer deutlichen Färbung der Plasmamembran führt. Aufgrund des definierten Abstands der unterschiedlichen Zelltypen kann man deutlich einzelne Verbindungen zwischen den beiden Zelltypen erkennen, die charakteristische Eigenschaften von TNTs aufweisen (Abbildung 64). Zum einen zeigen sie das aufgespannte Erscheinungsbild von TNTs, zum anderen sind diese Strukturen deutlich über dem Substrat aufgespannt. Zudem spannen sich diese Strukturen zwischen den Punkten des geringsten Abstandes auf (Abbildung 7B). Da die Zellen durch die Vorgabe des Abstandes durch die funktionalisierten Goldflächen auf bestimmte Punkte fixiert waren, konnten geordnete TNT-Netzwerke beobachtet werden (Abbildung 64B). Es ist zu erkennen, dass drei der vier Neurone auf den Goldflächen adhärten und durch TNTs vernetzt sind (Abbildung 64B, Pfeilspitzen). Außerdem konnten TNT-Strukturen zwischen Astrozyten und Neuronen visualisiert werden (Abbildung 64A). Deutlich zu erkennen ist ein

durch die WGA-Färbung grün gefärbtes Filopodium eines Astrozyten, das mittels eines TNT mit einem benachbarten Neuron verbunden ist (Abbildung 64A, Pfeilspitzen).

8.7.6 REM-Analyse von TNTs zwischen neuronalen Zellen auf funktionalisierten Oberflächen

Folgende Punkte erschwerten die Visualisierung von TNT-Strukturen. Erstens war es aufgrund der unterschiedlichen Membranzusammensetzung der verschiedenen untersuchten Zelltypen (Neurone und Astrozyten) nicht möglich, TNTs in gleicher Stärke anzufärben. Vermutlich spielt auch die Membranzusammensetzung der Zellen, von denen die TNT-Struktur gebildet worden ist eine Rolle. Zweitens fiel auf, dass Neurone, trotz gleicher eingesetzter Konzentration an WGA grundsätzlich eine geringere Membranfärbung als Astrozyten aufwiesen. Daher wurde zur weiteren Analyse der TNTs bei neuronalen Kulturen auf funktionalisierten Goldflächen eine Analyse mit einem hochauflösenden Raster-Elektronenmikroskop (REM) (in Kollaboration mit Marcus Patrick Abel und Sabine Rinck-Jahnke, AG Prof. Dr. Spatz, Physikalische Chemie, Heidelberg) durchgeführt. Bei der Analyse der Kokulturen, die auf funktionalisierten Goldflächen ausplattiert worden sind, konnten diverse TNT-Strukturen nachgewiesen werden. Außerdem war es möglich, die Anfangs- und Endpunkte eines TNTs zwischen Astrozyten und Neuronen genauer zu untersuchen.

In Abbildung 65 ist eine TNT Struktur zu erkennen, die ein Neuron und das Filopodium eines Astrozyten miteinander verbindet (Abbildung 65A und B, Pfeilspitzen). Mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 150nm entspricht diese Struktur dem gängigen TNT-Modell (Rustom et al., 2004). Zudem befindet sich diese Struktur über dem Substrat und ist zwischen den Zellen aufgespannt. Besonders interessant ist zudem, dass die pyramidale Form der Anfangs- und Endpunkte des TNTs einen Hinweis darauf gibt, dass die Membran eine direkte Verbindung zu der Zellmembran herstellt (Abbildung 65C und D, Pfeilspitzen). Im Gegensatz zu der Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie, ermöglichte die REM-Analyse eine genauere Darstellung der einzelnen Strukturen.

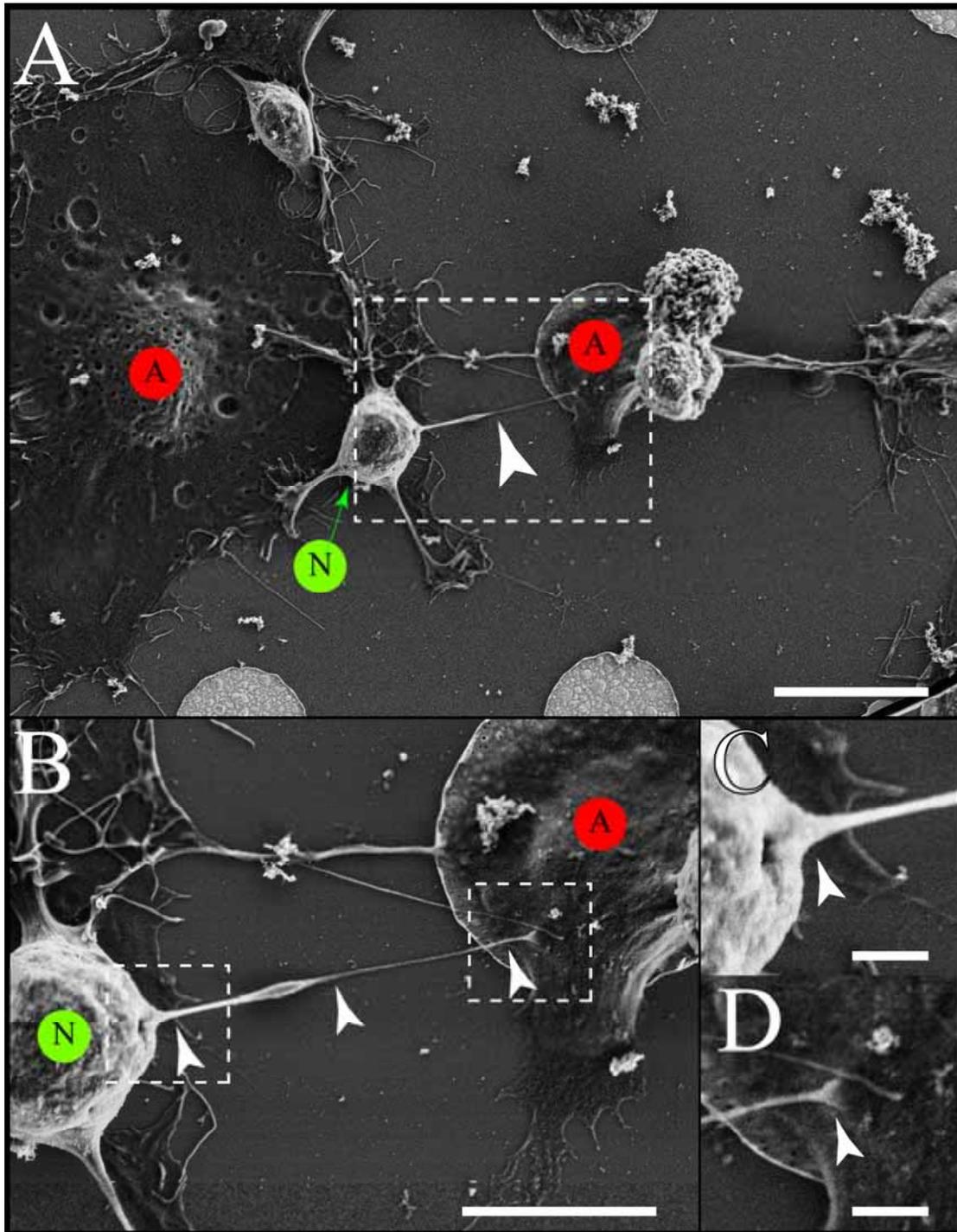


Abbildung 65: REM-Aufnahme von TNTs zwischen Astrozyten und Neuronen. Frisch präparierte hippocampale Neurone (200.000 in 200 μ l) und Astrozyten (100.000 in 200 μ l) wurden auf Matrizen mit funktionalisierten Goldflächen ausplattiert und für 4h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und anschließend für die rasterelektronenmikroskopische Analyse mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert, entwässert und mit Kohlenstoff bedampft. Die Goldflächen (\varnothing 9,5 μ m, 20 μ m Abstand) wurden mit 11-Aminoundecan-1-thiol funktionalisiert. Deutlich zu erkennen ist hier eine TNT-Struktur (A,B, Pfeilspitzen), welche sich von einem Neuron („N“) zu einem Astrozyten („A“) spannt. Bei genauerer Betrachtung der Ansatzpunkte des TNTs an den jeweiligen Zellen fällt auf, dass die Zellmembran in die TNT-Struktur fließend übergeht (C,D, Pfeilspitzen). Diese Beobachtung deckt sich mit den bei PC12-Zellen beobachteten TNTs (Rustom et al., 2004). Maßstabsbalken, 10 μ m (A), 5 μ m (B), 1 μ m (C,D).

8.7.7 Analyse langer TNT-ähnlicher Strukturen zwischen neuronalen Zellen auf funktionalisierten Goldflächen

Bei der Untersuchung von Astrozyten/Neuronen-Kokulturen mittels REM sind häufig Strukturen zu erkennen, deren Länge den Durchmesser eines Astrozyten häufig um ein Vielfaches übersteigt und die auch schon zuvor bei PC12-Zellkulturen beobachtet wurden (Abbildung 66A, Pfeilspitzen). Diese Strukturen sind, verglichen mit typischen TNTs, sehr viel länger und erreichen Längen von bis zu 500µm. Mit Hilfe von REM-Aufnahmen von Astrozyten/Neuronen-Kokulturen, die auf funktionalisierten Goldflächen kultiviert wurden, konnten solche TNT-ähnliche Strukturen beobachtet werden. Diese Strukturen überspannen mehrere Zellen, ohne eine direkte Verbindung mit diesen einzugehen (Abbildung 66C und D). Da solche Strukturen aufgrund ihrer Länge sehr empfindlich auf Scherkräfte, sowie Licht reagieren, blieben sie vermutlich bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung weitgehend unentdeckt. Die Fixierungsart, die bei der REM-Analyse eingesetzt wurde, könnte einige dieser Strukturen jedoch weitgehend stabilisiert haben, sodass diese während der Analyse beobachtet werden konnten.

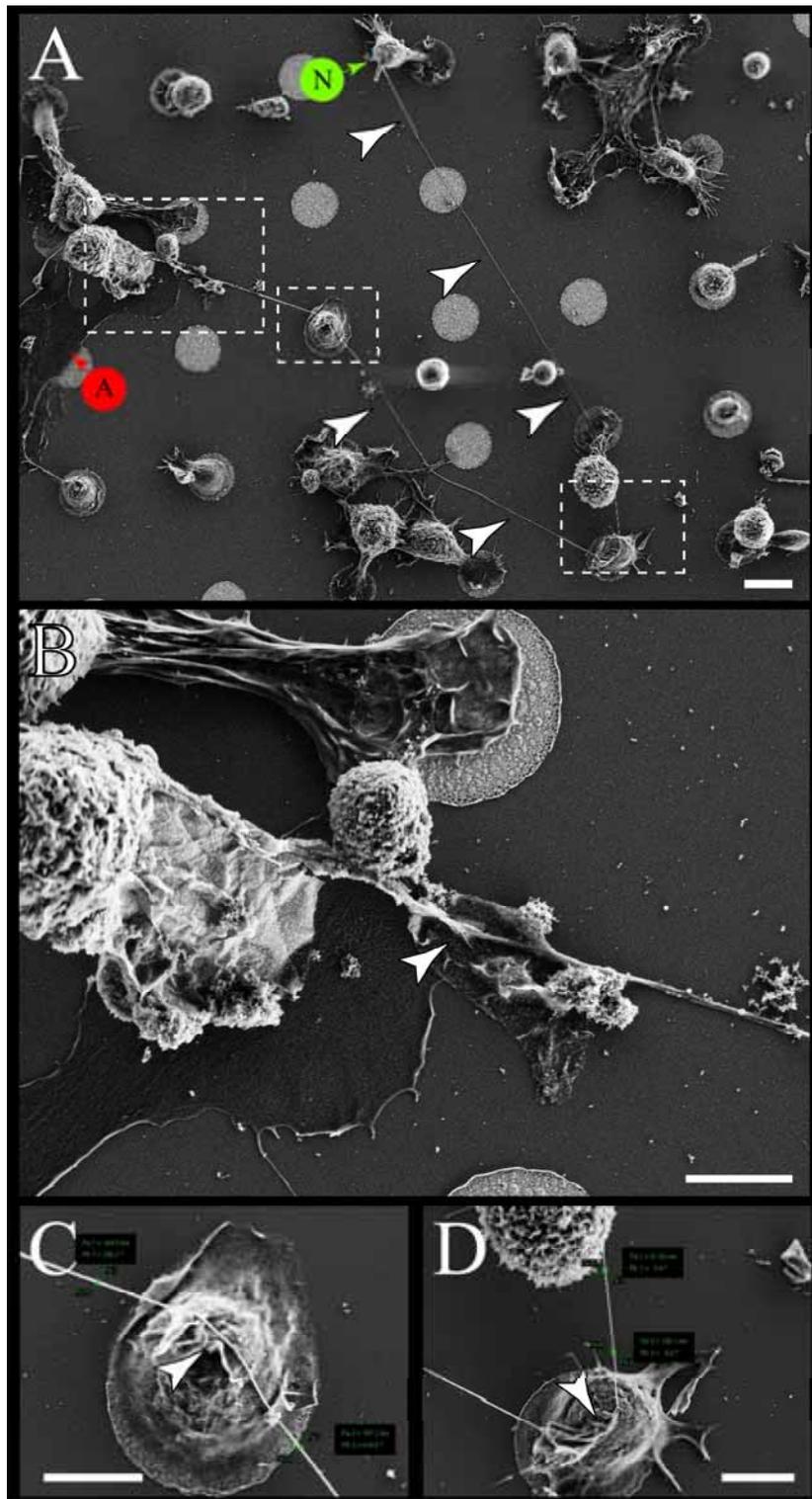


Abbildung 66: Sehr lange TNTs zwischen neuronalen Zellen. Frisch präparierte hippocampale Neurone (200.000 in 200 μ l) und Astrozyten (100.000 in 200 μ l) wurden auf Matrizen mit funktionalisierten Goldflächen ausplattiert und für 4h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert und anschließend für die rasterelektronenmikroskopische Analyse mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert, entwässert und mit Kohlenstoff bedampft. Die Goldflächen (\varnothing 9,5 μ m, 20 μ m Abstand) wurden mit 11-Aminoundecan-1-thiol funktionalisiert. Bei der Kokultur von Astrozyten und hippocampalen Neuronen auf funktionalisierten Goldflächen sind des Öfteren sehr lange, dünne Strukturen zu erkennen, die strukturell den TNTs ähneln (A, Pfeilspitzen). Entgegen den häufig beobachteten, zwischen 1 und 20 μ m langen TNTs sind die hier beobachteten Strukturen teilweise bis zu 180 μ m lang (A, Pfeilspitzen). Auch scheinen diese Strukturen nur selektiv mit Zellen eine Verbindung einzugehen, da sie häufig über Zellkörper hinweg gespannt sind (C,D, Pfeilspitze). Maßstabsbalken, 10 μ m (A), 5 μ m (B-D).

9 Diskussion

9.1 Untersuchungen zum Transport und zur differentiellen Verteilung der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten α_1 und α_2

Zoltan Nusser und Mitarbeiter konnten anhand elektronenmikroskopischer Studien an hippokampalen Pyramidalzellen ein unterschiedliches Verteilungsmuster der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α_1 und α_2 zeigen (Nusser et al., 1996a). Da diese beiden Untereinheiten der gleichen Untereinheitenklasse angehören und daher auch strukturell sehr ähnlich sind, stellte sich die Frage, welche Mechanismen und Faktoren für die Ausbildung des beobachteten Verteilungsmusters verantwortlich sind. Eine Möglichkeit zur Untersuchung der differentiellen Verteilung war, GFP-Fusionsproteine zu erstellen, mit deren Hilfe in vivo die Bildung von „Rezeptorclustern“ und der Transport in Vesikeln analysiert werden konnte.

9.1.1 Expression und Transport von α_1 - und α_2 -Fusionsproteinen

Orlando F. Bueno und Mitarbeiter zeigten 1998 in ihrer Publikation, dass die am C-Terminus mit EGFP fusionierte α_1 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors nach der Expression in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* an der Plasmamembran lokalisiert ist (Bueno et al., 1998). Zudem wiesen jene Rezeptoren, die diese GFP-markierte Untereinheit enthielten, nur unwesentliche Abweichungen der Öffnungs- und Durchlasscharakteristika des Chlorid-Kanals von denen der Wildtyp-Rezeptoren auf (Bueno et al., 1998). Auch ihr Transportverhalten war mit dem der Wildtyp-Rezeptoren vergleichbar (Bueno et al., 1998). Für die im Zuge dieser Arbeit hergestellten, am C-Terminus mit GFP fusionierten Untereinheiten, konnte im Gegensatz zu den von Orlando F. Bueno und Mitarbeitern untersuchten α_1 -Fusionsproteinen, keine GFP-Fluoreszenz nach Expression in PC12- oder HEK293-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 7.1.1). Mutationen in der kodierenden Region der jeweiligen Untereinheit, die durch die PCR-Amplifizierung entstanden sein könnten, konnten in Anbetracht der Sequenzierungsergebnisse ausgeschlossen werden (siehe CD – Anhang\Anhang.pdf Abschnitt A.2.1). Der Verlust der GFP-Fluoreszenz könnte daher durch den kurzen Abstand zwischen der Untereinheit und dem inserierten GFP-Molekül herrühren, wodurch die Ausbildung der Zylinderstruktur des GFP-Moleküls behindert sein

könnte. Bestärkt wird diese Vermutung dadurch, dass nach der Insertion zusätzlicher Aminosäuren zwischen GFP-Molekül und dem Rest der Untereinheit, die GFP-Fusionsproteine wieder für die Emission der GFP-Fluoreszenz anregbar waren. Die über die Expression der modifizierten Konstrukte in HEK293-Zellen beobachteten, punktförmigen Strukturen und deren charakteristisches Bewegungsmuster deuten auf Vesikel hin, die fluoreszente Rezeptor-Untereinheiten transportieren. Der ineffiziente Transport der GFP-Fusionsproteine an die Plasmamembran und das zudem detektierbare retikuläre und perinukleäre Signal könnte durch Probleme bei der Faltung der Fusionsproteine verursacht werden. Die missgefalteten Rezeptor-Untereinheiten werden mutmaßlich im ER zurückgehalten, was die hohe Fluoreszenzintensität im Bereich des ERs erklären würde. Ähnliche Beobachtungen wurden bei GFP-markierten γ_2 -Untereinheiten gemacht, bei denen eine vergleichbare Retention im Bereich des ERs zu beobachten war (Kittler et al., 2000).

Im Gegensatz zu den C-terminal markierten Untereinheiten zeigten die N-terminal markierten α_1 - und α_2 -Untereinheiten einen effizienteren Transport zur Plasmamembran. Das verwendete Zellsystem hatte hier keinen Einfluss auf die Transporteffizienz. Sowohl in HEK293-Zellen als auch in hippokampalen Neuronen konnten die N-terminalen Untereinheiten an der Plasmamembran der jeweiligen Zellen nachgewiesen werden (siehe Abschnitte 7.2.1, 7.2.2 und 7.2.3). Diese Beobachtung deckt sich mit Experimenten, die mit N-terminal GFP-markierten γ_2 -Untereinheiten durchgeführt wurden. Diese Untereinheiten zeigten im Vergleich zu γ_2 -Untereinheiten, die am C-Terminus mit GFP fusioniert wurden, eine deutlich erhöhte Stabilität und einen verstärkten Transport an die Plasmamembran (Kittler et al., 2000).

Aufgrund der vorhandenen Fluoreszenzeigenschaft der N-terminal markierten Fusionsproteine und ihrer Eigenschaft, funktionelle Rezeptoren zu bilden (siehe Abschnitte 7.2.4 und 7.2.5), konnten die Fusionsproteine für *in vivo* Transportstudien eingesetzt werden. Dabei wurden die Transporteigenschaften der GFP-Fusionsproteine durch transiente Expression in HEK293- bzw. PC12-Zellen untersucht und mikroskopisch analysiert. Mit diesen einfach zu kultivierenden Zelllinien konnten schnelle und effiziente Analysen zum Transport der Untereinheiten an die Plasmamembran durchgeführt werden. Der deutlich effizientere Transport, welcher nach der Koexpression von wt- β_2 - und wt- γ_2 -Untereinheiten mit den klonierten N-terminal markierten Fusionsproteinen beobachtet werden konnte, führte dazu, dass sich die Rezeptoren an der Plasmamembran zu sichtbaren „Clustern“ formierten.

Kolokalisationsstudien zwischen immunzytochemisch nachgewiesenen „Clustern“ und der GFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine zeigten, dass sich die beiden Signale in hohem Maße überlagerten. Ferner ähnelte dieses Muster dem Expressionsmuster von exprimierten wt-GABA_A-Rezeptoren in HEK293-Zellen (Connolly et al., 1996a). Insofern kann davon ausgegangen werden, dass die klonierten ECFP- bzw. EYFP-markierten Untereinheiten mit den wt-Untereinheiten vergleichbare Assemblierungs- und Transporteigenschaften aufweisen. Die Tatsache, dass auch in kultivierten hippocampalen Neuronen Rezeptor-„Cluster“ nachgewiesen werden konnten (siehe Abschnitt 7.2.3) zeigt, dass die Akkumulation der Rezeptorchimären an der Plasmamembran nicht auf einzelne Zelllinien begrenzt ist. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die Akkumulation der chimären Rezeptoren an der Plasmamembran zu „Clustern“ typisch für die Entwicklung synaptischer Verbindungen ist (Kneussel et al., 2000a).

Ein Problem im Zusammenhang mit der Visualisierung von Transportvesikeln war die intensive Färbung der Plasmamembran durch die dort vorkommende hohe Konzentration der Rezeptorchimären. Diese hohe Intensität der GFP-Fluoreszenz beeinträchtigte die Analyse der Transportwege von Transportvesikeln dahingehend, dass die Vesikel vergleichsweise schwach fluoreszent waren und somit das Signal der Plasmamembran das der Vesikel regelrecht überstrahlte. Um eine Untersuchung der Transportvesikel durchführen zu können, sollte das Oberflächenfluoreszenzsignal der Fusionsproteine enzymatisch mittels der Proteasen Thrombin oder TEV-Protease entfernt werden. Zu diesem Zweck, wurden die N-terminal markierten Untereinheiten durch eine zusätzliche Proteaseschnittstelle so modifiziert, dass das im extrazellulären Milieu befindliche GFP-Molekül der Fusionsproteine enzymatisch abgespalten werden kann. Ein weiterer Vorteil dieser Modifikation besteht darin, dass somit neue Insertionsstellen, an denen die GABA_A-Rezeptoren in die Plasmamembran integriert werden, analysiert werden können. Trotz unterschiedlicher verwendeter Proteaseschnittstellen war eine Proteolyse nicht möglich. Zur Minimierung einer eventuellen sterischen Inhibierung der Proteasen wurde ein 50 Aminosäuren langer Abstandshalter zwischen dem GFP-Molekül und der Proteaseschnittstelle eingefügt. Eine solche Modifikation führte auch nicht zu einem Verlust der Fluoreszenz an der Plasmamembran nach der Applikation der Proteasen. Dieses Ergebnis ist insofern verwunderlich, da bei Glyzin-Rezeptoren, die wie GABA_A-Rezeptoren ein Mitglied der „Cys-Loop“-Familie sind, folglich strukturell ähnlich aufgebaut sind, mit einer vergleichbaren Klonierungsstrategie erfolgreich die Proteaseschnittstelle für Thrombin eingesetzt wurde (Rosenberg et al., 2001). Eine Erklärung für das Ausbleiben der

Proteolyse im Falle der GABA_A- α -Untereinheiten ist vermutlich in der dreidimensionalen Struktur des extrazellulären N-terminalen Endes der Untereinheiten zu suchen. Beispielsweise könnte diese strukturellen Gegebenheiten bewirken, dass die Proteaseschnittstellen in pentameren GABA_A-Rezeptoren unzugänglich, aber bei Glyzin-Rezeptoren für die Proteasen dagegen zugänglich sind. Da die dreidimensionale Struktur des N-Terminus der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten noch nicht aufgeklärt wurde, bleiben diese Schlussfolgerungen allerdings spekulativ.

9.1.2 Funktionelle Charakterisierung von GABA_A-Rezeptorchimären

Da nur pentamere GABA_A-Rezeptoren an die Plasmamembran transportiert werden (Connolly et al., 1996a; Connolly et al., 1996b; Whiting, 1999; Kittler et al., 2002), ist der beobachtete Einbau der Rezeptorchimären in die Plasmamembran (siehe Abschnitte 7.2.2, 7.2.3 und 7.2.6) ein Hinweis darauf, dass die Untereinheiten trotz der fusionierten GFP-Moleküle pentamerisieren können. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass pentamere Rezeptorchimären mittels eines Saccharose-Dichte-Gradienten nachgewiesen werden konnten (siehe Abschnitt 7.2.4). Ein für die isolierten Rezeptorchimäre gemessener Sedimentationskoeffizient von 8,7S entspricht dem von pentameren wt-GABA_A-Rezeptoren, die unter vergleichbaren Bedingungen aufgereinigt und aufgetrennt wurden (Klausberger et al., 2001). Daher ist davon auszugehen, dass die Fusion von GFP-Farbvarianten an die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α_1 bzw. α_2 keine negativen Einflüsse auf die Oligomerisierung der Untereinheiten zu pentameren Rezeptoren ausübt.

Wie bereits erwähnt, ist für den effizienten Transport der GABA_A-Rezeptorchimären zur Plasmamembran die Pentamerisierung der Fusionsproteine ein notwendiger Vorgang. Diese ist jedoch keine Garantie dafür, dass die Rezeptorchimären auch aktive Chlorid-Kanäle bilden (Whiting, 1999; Bowery et al., 2002). Die Funktion der chimären Rezeptoren wurde daher mittels elektrophysiologischen Untersuchungen zum Chlorid-Einstrom nach Applikation von Agonisten (GABA) untersucht. Jedoch war eine Reduktion des Chlorid-Einstroms bei den chimären Rezeptoren gegenüber wt-Rezeptoren zu beobachten. Auffällig war, dass Rezeptoren, die eine markierte α_1 -Untereinheit enthalten, eine geringere Reduktion des Chlorid-Einstroms zeigten, als Rezeptoren, die eine markierte α_2 -Untereinheit enthalten. Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe zeigen, dass bei Verwendung einer N-terminal

GFP-markierten γ_2 -Untereinheit nur eine geringe Reduktion des Chlorid-Einstroms zu beobachten war (Kittler et al., 2000). Dabei gilt zu beachten, dass die dort untersuchten Rezeptoren nur eine einzige GFP-markierte Untereinheit, nämlich die GFP-markierte γ_2 -Untereinheit enthalten (Kittler et al., 2000). Da ein Rezeptor neben einer γ - und zwei β -Untereinheiten auch zwei α -Untereinheiten enthält, folgt, dass die während dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren jeweils zwei markierte α -Untereinheiten enthalten. Durch zwei markierte Untereinheiten pro Rezeptor könnte daher eine verstärkte sterische Inhibierung des Chlorid-Kanals durch die ECFP- bzw. EYFP-Moleküle erfolgen. Trotz der reduzierten Aktivität der chimären Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass chimäre GABA_A-Rezeptoren, die die markierten Untereinheiten enthalten, funktionelle Chlorid-Kanäle darstellen und für die Untersuchung der Transportwege von GABA_A-Rezeptoren geeignet sind.

9.1.3 Räumliche und zeitliche Verteilungsmuster von α_1 - und α_2 -GFP-Fusionsproteinen

9.1.3.1 Differentielle subzelluläre Verteilung der α_1 - und α_2 -Untereinheiten

Zoltan Nusser und Kollegen zeigten 1996 anhand elektronenmikroskopischer Studien an Ultradünnschnitten der Hippokampusregion adulter Ratten, dass „Cluster“ der endogenen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α_1 und α_2 eine differentielle Verteilung in Pyramidalzellen aufwiesen (Nusser et al., 1996a). Die α_1 -Untereinheiten waren an postsynaptischen Domänen über die gesamte Region des Zellsomas und der Dendriten nachzuweisen, während die α_2 -Untereinheiten nur in einigen postsynaptischen Domänen des somatodendritischen Bereichs sowie des Axonhügels nachzuweisen waren (Nusser et al., 1996a). In Übereinstimmung mit dieser Studie konnte während dieser Arbeit gezeigt werden, dass GFP-markierte α_1 - und α_2 -Untereinheiten auch in kultivierten, hippokampalen Neuronen unterschiedliche Verteilungsmuster zeigen. Daraus folgt, dass die Information der differentiellen Verteilung auf zellulärer Ebene vorliegt und nicht primär von äußeren Faktoren (z.B. synaptische Verknüpfungen), wie sie beispielsweise verstärkt in zellulären Netzwerken in neuronalen Geweben vorkommen, abhängt. Diese Folgerung wird durch Beobachtungen unterstützt, wonach auch eine differentielle Verteilung der Untereinheiten γ_2 und δ zu beobachten war (Nusser et al., 1996a). Während γ_2 -Untereinheiten gehäuft an postsynaptischen Domänen zu finden waren, kamen δ -Untereinheiten nahezu immer nur an extrasynaptischen Domänen vor

(Nusser et al., 1996a). Aber auch die Präsenz einer γ_2 -Untereinheit hat nicht automatisch zur Folge, dass ein Rezeptor postsynaptisch verankert wird. Dadurch, dass die γ_2 -Untereinheit, abhängig von den zusätzlichen Untereinheiten eines Rezeptors, zu unterschiedlichen Membrankompartimenten gesteuert werden kann, wird die Komplexität der Steuerung der verschiedenen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten noch weiter erhöht. In hippokampalen Pyramidalzellen sind GABA_A-Rezeptoren mit der Untereinheitenkombination $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ am Axonhügel angereichert (Nusser et al., 1996a). Rezeptoren der Kombination $\alpha_5\beta_2\gamma_2$ liegen dagegen extrasynaptisch vor (Brünig et al., 2002b). Vermutlich hängt die Steuerung der GABA_A-Rezeptoren an unterschiedliche Membrandomänen also nicht alleine von einer einzelnen Untereinheit ab. Vielmehr ist eine differentielle Verteilung sowohl von der Untereinheitenzusammensetzung eines Rezeptors abhängig, als auch von der Interaktion der einzelnen Untereinheiten mit verschiedenen Proteinen. Beispiele für interagierende Proteine sind z.B. Phosphatasen, die den Phosphorylierungsgrad der Untereinheiten und somit möglicherweise deren Transportverhalten steuern (Kanematsu et al., 2002b).

Die Beobachtung, dass die unterschiedlichen Subtypen der Rezeptorchimären kaum kolokalisierten, macht deutlich, dass eine gesteuerte differentielle Akkumulation der Fusionsproteine an unterschiedliche Domänen der Plasmamembran erfolgen muss. Die Untersuchungen zu den Expressionsmustern der klonierten Fusionsproteine verdeutlichten zudem, dass die beiden Untereinheiten auch differentielle Verteilungsmuster zeigten. Im Unterschied zu den Beobachtungen von Zoltan Nusser und Mitarbeitern (Nusser et al., 1996a) war jedoch eine explizite Anreicherung der exprimierten α_2 -Fusionsproteine am Axonhügel nicht zu beobachten. Im Gegensatz zu den hier verwendeten Primärkulturen, die keine der im Gewebe zusätzlich vorkommenden Zelltypen wie Astrozyten und Mikrogliazellen enthalten, bewirken in nativen neuronalen Geweben unzählige Faktoren eine gezielte Steuerung der Verteilung von Rezeptoren. Äußere Faktoren, wie z.B. die Anzahl synaptischer Verbindungen, aber auch unterschiedliche interagierende Zelltypen (Astrozyten, Korbzellen etc.) steuern die Differenzierung der Neurone *in vivo* und beeinflussen daher auch die Steuerung der differentiellen Verteilung unterschiedlicher Rezeptor-Untereinheiten (Yuste et al., 2004).

Proteine, denen eine bedeutende Funktion in der Bildung der Rezeptor-„Cluster“ zugesprochen wird, sind beispielsweise Gephyrin (Essrich et al., 1998; Brünig et al., 2002a; Brünig et al., 2002b; Christie et al., 2002) und GABARAP (Kneussel et al., 2000a; Nymann-

Andersen et al., 2002a). Gephyrin agiert vermutlich als eine Art Schlüsselmolekül hinsichtlich der Organisation der Zusammensetzung an inhibitorischen Synapsen (Kneussel et al., 2000a; Moss et al., 2001). Trotzdem spielt Gephyrin wahrscheinlich keine direkte Rolle bei der Steuerung der differentiellen Verteilung und der zeitlich versetzt ablaufenden „Clusterbildung“ der Untereinheiten α_1 und α_2 an der postsynaptischen Membran. Untersuchungen mit Hilfe genetischer Deletionen oder „antisense“-Experimente zur Stummschaltung von Gephyrin zeigten eine dramatische Störung „Clusterbildung“ und des zielgerichteten Transports der γ_2 -Untereinheit an die Synapse (Essrich et al., 1998; Kneussel et al., 1999a). Es wird vermutet, dass Gephyrin eher zur Verankerung der Rezeptoren an der postsynaptischen Membran dient, als zur Steuerung des Transports bzw. „Clusterbildung“, da viele Rezeptor-Subtypen eine γ_2 -Untereinheit enthalten. GABARAP, ein Protein, welches sowohl monomeres Tubulin als auch Mikrotubuli binden kann (Coyle et al., 2002; Nymann-Andersen et al., 2002a), wurde erstmals mit Hilfe von „Zwei-Hybrid-Screenings“ mit γ_2 -Untereinheiten als Köder identifiziert (Wang et al., 1999; Nymann-Andersen et al., 2002b). GABARAP bindet bevorzugt an die intrazelluläre TM3-TM4-Schleife der γ_2 -Untereinheit und hat somit die Fähigkeit, die γ_2 -Untereinheit mit Mikrotubuli zu verankern (Chen et al., 2000; Wang et al., 2000; Coyle et al., 2002). So konnte beispielsweise durch Überexpression von GABARAP und GABA_A-Rezeptoren in Säugerzelllinien gezeigt werden, dass eine vermehrte „Clusterbildung“ der Rezeptoren stattfand (Chen et al., 2000). GABARAP konnte zudem in geringen Konzentrationen an GABAergen Synapsen nachgewiesen werden. Vorwiegend ist GABARAP jedoch an intrazellulären Membrankompartimenten, wie z.B. in den äußeren Regionen des Golgi-Stapels und an subsynaptischen tubulo-vesikulären Kompartimenten lokalisiert (Kittler et al., 2001). Eine direkte Interaktion von GABARAP mit den Untereinheiten α_1 und α_2 konnte jedoch bis heute nicht gezeigt werden. Vielmehr interagiert GABARAP mit PRIP-1 („phospholipase-C-related catalytically inactive protein-1“) (Kanematsu et al., 2002b). PRIP-1 selbst agiert als ein Adaptor für die katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase 1c (PP1c) und hält diese in einer inaktiven Form (Kanematsu et al., 2002a). PP1c wirkt ihrerseits der Proteinkinase A (PKA)-vermittelten Phosphorylierung der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten β_2/β_3 entgegen und verstärkt somit die Oberflächenexpression der GABA_A-Rezeptoren (Kanematsu et al., 2002a; Terunuma et al., 2002). Somit kann GABARAP neben einer Interaktion mit der γ_2 -Untereinheit durch eine Regulation von PRIP-1 und somit durch den Phosphorylierungsgrad der β_2/β_3 -Untereinheiten den Transport der GABA_A-Rezeptoren steuern. Ähnlicherweise könnte GABARAP auch mit weiteren, bisher nicht bekannten, Proteinen interagieren, die ähnlich wie PRIP-1 spezifisch

die α_1 und α_2 -Untereinheiten phosphorylieren. In Folge dessen würden α_1 und α_2 zu unterschiedlichen Membrandomänen gesteuert werden.

Das ursprünglich angenommene Konzept, dass GABA_A-Rezeptoren – wie auch andere Rezeptoren der „Cys-Loop“-Familie – über einzelne, spezifisch interagierende Proteine an die Membrandomänen verankert werden (Kirsch et al., 1993; Kirsch et al., 1995; Huebsch et al., 2003), ist so direkt nicht mehr haltbar. Diese Erkenntnis löste in den letzten Jahren eine verstärkte Suche nach Proteinen aus, die an die TM3-TM4-Schleife binden können (Wang et al., 1999; Keller et al., 2004). Jedoch konnten bisher keine direkten Kandidaten identifiziert werden. Lediglich das Protein Radixin ist entdeckt worden, das für die Verankerung der α_5 -Untereinheit an das Aktin-Zytoskelett verantwortlich ist (Loebrich et al., 2006).

9.1.3.2 Zeitlicher Verlauf der „Clusterbildung“ von GABA_A-Rezeptorchimären

Neben der Beobachtung, dass „Cluster“ von α_1 - und α_2 -GFP-Fusionsproteinen an unterschiedlichen Domänen der Plasmamembran der Neurone zu beobachten waren (siehe Abschnitt 7.2.6), zeigten sich auch zeitliche Unterschiede bezüglich ihrer Bildung in kultivierten hippokampalen Neuronen (siehe Abschnitt 7.2.10). Catherine Croft Swanwick und Mitarbeiter konnten anhand immunzytochemischer Untersuchungen der endogen exprimierten Rezeptoruntereinheiten auch eine zeitlich differentielle Akkumulation u.a. von α_1 - und α_2 -Untereinheiten an kultivierten hippokampalen Neuronen beschreiben (Swanwick et al., 2006). Im Unterschied zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, waren nach C. C. Swanwick die endogen exprimierten α_2 -Untereinheiten zuerst (nach 7 Tagen in Kultur) in „Clustern“ an diskreten Plasmamembrandomänen zu finden. Erst bei 14 Tage alten Neuronen konnten erste „Cluster“ der α_1 -Untereinheit festgestellt werden. Während Swanwick und Mitarbeiter jedoch endogen exprimierte Untereinheiten untersuchten, wurden in der vorliegenden Arbeit exogene Untereinheiten untersucht. Von endogen exprimierten Untereinheiten ist bekannt, dass deren Expression in differenzierenden Neuronen einer entwicklungsabhängigen Steuerung unterliegt (Killisch et al., 1991; Wisden et al., 1992). Bei den von Swanwick und Mitarbeitern veröffentlichten Ergebnissen spielen zwei Parameter bei der „Clusterbildung“ von GABA_A-Rezeptor-Subtypen wohl eine entscheidende Rolle. Erstens, die vom Differenzierungsgrad der kultivierten Neuronen gesteuerte Expression der untersuchten Untereinheiten und zweitens Faktoren, die die Akkumulierung und den

Transport der Rezeptorsubtypen steuern. Solche Faktoren können beispielsweise Proteinkinasen und Phosphatasen sein. Auch Gephyrin und GABARAP könnten den Zeitpunkt der „Clusterbildung“ steuern.

9.1.3.3 *Mutmaßliche Determinanten für die räumliche und zeitliche Verteilung der Rezeptorsubtypen*

Aufgrund der offensichtlich gesteuerten Verteilung der einzelnen GABA_A-Rezeptor-Subtypen in einem differenzierenden Neuron stellt sich die Frage, wo die Information für die zeitlich abhängige Akkumulation kodiert ist. Es ist bekannt, dass die zytoplasmatische Schleife zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4 (TM3-TM4-Schleife) der γ_2 -Untereinheit für die Verankerung des GABA_A-Rezeptors an der postsynaptischen Membran verantwortlich ist (Essrich et al., 1998). Vor allem die Proteine Gephyrin und GABARAP spielen bei der Verankerung an das Mikrotubulinetzwerk der Neurone und bei dem Transport der Rezeptorsubtypen eine große Rolle (Brünig et al., 2002a; Christie et al., 2002).

Die TM3-TM4-Schleife könnte darüber hinaus auch eine Rolle bei der differentiellen Verteilung sowie der zeitlich differentiellen Akkumulation der α -Untereinheiten spielen. Über „Zwei-Hybrid-Screenings“ wäre es möglich, solche Proteine zu finden, die an die TM3-TM4-Schleife binden und selektiv den Transport der dazu gehörenden Untereinheiten beeinflussen. Allerdings konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Faktoren identifiziert werden, die selektiv mit der Schleifenregion der jeweiligen Untereinheiten interagieren. Interessant ist weiterhin die Tatsache, dass die Proteinsequenz der TM3-TM4-Schleifen von α_1 und α_2 nur eine Homologie von 60,5% aufweisen (

Abbildung 67). Dies, und die Beobachtungen, dass die beiden Untereinheiten eine differentielle Verteilung in hippokampalen Pyramidalzellen und eine zeitlich abhängige „Clusterbildung“ in hippokampalen Primärkulturen von Neuronen ausweisen, könnten auf eine Kodierung des Rekrutierungssignals in der Schleifenregion hindeuten.

Neben einer Verankerungsfunktion, könnte die TM3-TM4-Schleife auch eine bedeutende Funktion in der Steuerung der Anzahl der GABA_A-Rezeptoren an der Plasmamembran ausüben. Die Stärke inhibitorischer synaptischer Ströme korreliert direkt mit der Anzahl der synaptischen GABA_A-Rezeptoren. (Otis et al., 1994; Nusser et al., 1997; Nusser et al., 1998a). Bei Untersuchungen von *cmyc*-markierten γ_2 -Untereinheiten, bei denen die TM3-

TM4-Schleife gegen die von δ -Untereinheiten ausgetauscht wurde, konnte gezeigt werden, dass Rezeptoren, die die mutierte γ_2 -Untereinheit enthalten, nicht mehr an der postsynaptischen Membran akkumuliert waren (Christie et al., 2006). Die so modifizierten Rezeptoren zeigten eine vergleichbare Verteilung, wie sie bei δ -Untereinheiten zu beobachten war. GABA_A-Rezeptoren, die δ -Untereinheiten enthalten, liegen gehäuft an der extrasynaptischen Membran vor (Nusser et al., 1998b).

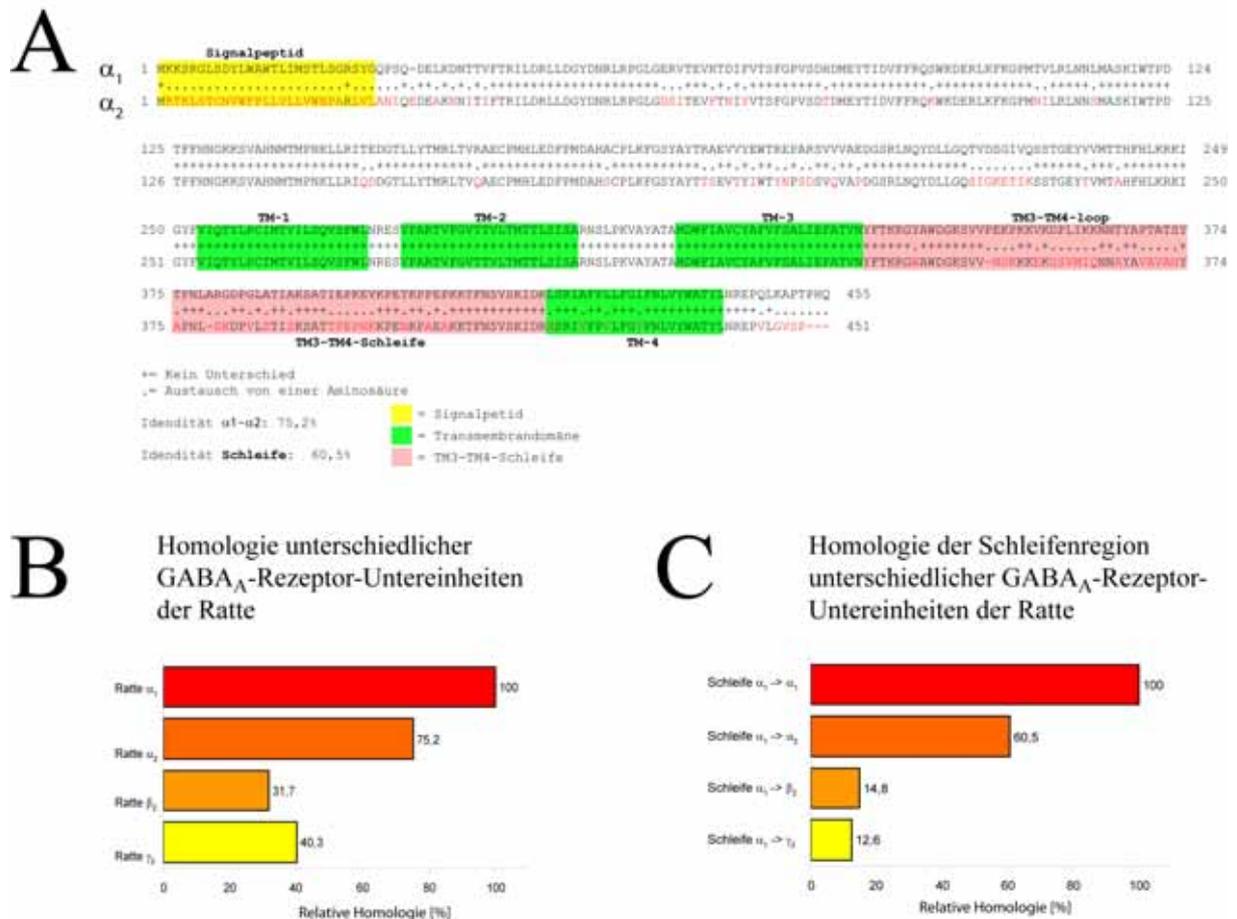


Abbildung 67: Vergleich des Homologiegrades der α_1 - und α_2 -Untereinheit. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen der α_1 - und der α_2 -Untereinheit fällt auf, dass im Bereich der TM3-TM4-Schleife (rosa Balken) sehr viele Unterschiede zu erkennen sind (A). Die Auswertung des Sequenzvergleiches von verschiedenen Untereinheiten ergab, dass die Untereinheiten α_1 und α_2 eine Gesamthomologie von 75,2% aufweisen (B, Ratte α_1 , Ratte α_2), wobei der Großteil der Sequenzunterschiede auf die nur zu 60,5% homologe TM3-TM4-Region zurückzuführen ist (C, loop $\alpha_1 \rightarrow \alpha_2$). Untereinheiten anderer Isoform-Klassen (β_2 , γ_2) zeigten noch deutlichere Homologieunterschiede im Vergleich zur α_1 -Untereinheit (B, C).

9.1.3.4 Dynamik von GABA_A-Rezeptoren

Mit Hilfe der während dieser Arbeit erstellten GFP-Fusionsproteine konnten unterschiedliche Strukturen visualisiert werden, die sich sowohl in dynamischer Hinsicht als auch hinsichtlich ihrer Größe deutlich voneinander unterschieden. Die geringe Mobilität ist im Einklang mit einer Studie von Yury Bogdanov und Mitarbeitern, nach der die Bildung von GABA_A-Rezeptor-„Clustern“ an der postsynaptischen Membran durch eine Rekrutierung von extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren erfolgt (Bogdanov et al., 2006). Studien derselben Arbeitsgruppe zeigten zudem, dass extrasynaptisch vorliegende Rezeptoren eine hohe laterale Mobilität aufweisen. Die Rate der lateralen Mobilität extrasynaptischer Rezeptoren reduzierte sich jedoch, sobald die Rezeptoren an die postsynaptische Membran rekrutiert wurden (Jacob et al., 2005). Die geringe Mobilität der Rezeptorchimären ist daher ein Hinweis auf eine mögliche Verankerung an der postsynaptischen Membran. Die geringe Mobilität und die Tatsache, dass sich die beobachteten Strukturen an der Plasmamembran befinden, deuten darauf hin, dass es sich dabei um „Cluster“ von Rezeptorchimären handelt.

Im Gegensatz zu Rezeptor-„Clustern“ waren vesikuläre Strukturen, die vermutlich fluoreszente GABA_A-Rezeptoren beinhalten, deutlich mobiler. Die Geschwindigkeiten dieser Vesikel lagen zwischen 1,65 und 3,14 μm/s, was auf einen Mikrotubuli-abhängigen Transport hindeutet. Auffällig war außerdem, dass die Fluoreszenzintensität der Vesikel stark variierte. Dies könnte auf unterschiedliche Subtypen von Vesikeln hindeuten, wie z.B. sekretorische oder endosomale Vesikel. Der in unterschiedlichen Vesikeltypen differierende pH-Wert könnte möglicherweise die Fluoreszenzeigenschaft der GFP-Varianten verändern, was die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten erklären könnte.

Aufgrund der markierten Untereinheiten konnten chimäre Rezeptoren über längere Zeitabschnitte fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Eine Beobachtung war, dass die an der Plasmamembran befindlichen Rezeptor-„Cluster“ eine sehr geringe Mobilität aufwiesen. Sowohl bei Rezeptoren, die die α₁-Untereinheiten enthalten, als auch bei Rezeptoren, die die α₂-Untereinheit enthalten, war dies zu beobachten. Auffällig war, dass sich die gebildeten Rezeptor-„Cluster“ über den beobachteten Zeitraum im Gegensatz zu den intrazellulären Vesikeln kaum bewegen, was ein Hinweis darauf ist, dass es sich bei diesen Strukturen um Rezeptor-„Cluster“ handelt, die an der Plasmamembran verankert sind.

9.2 Interzellulärer Membrantransfer zwischen Astrozyten und Neuronen

9.2.1 TNT-abhängige Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen?

Es ist bekannt, dass Neurone mit umliegenden Gliazellen, im Speziellen mit Astrozyten, metabolisch gekoppelt sind. Astrozyten versorgen Neurone mit Cholesterin (Goritz et al., 2002; Pfrieger, 2003) oder nehmen den von den Synapsen ausgeschütteten Neurotransmitter auf (Sonnewald et al., 1997) und sind so maßgeblich für die schnelle Reduktion der Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt verantwortlich. Neben rein physiologischen Funktionen, wie das Aufnehmen von Glukose aus dem Blut, das Transformieren von Glukose zu Glykogen und dessen anschließender Speicherung, rücken Astrozyten seit kurzem, aufgrund ihrer interzellulären Kommunikation mit Neuronen, in den Blickpunkt des Interesses. So wurde beschrieben, dass Astrozyten über „Gap Junctions“ miteinander vernetzt sind und sich Signale in Form von Kalziumwellen über viele Astrozytenzellkörper ausbreiten können (Cornell-Bell et al., 1990; Cotecchia et al., 1990; Cornell-Bell et al., 1991). Weiterhin konnten auch Neurotransmitterrezeptoren, wie Glutamat- und GABA_A-Rezeptoren in Astrozyten nachgewiesen werden (Fraser et al., 1994; Farb et al., 1995). Da die Neurotransmitterrezeptoren von den Astrozyten selbst exprimiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass Astrozyten neben der Speicherung und gesteuerten Abgabe von Metaboliten auch mit neuronalen Zellen über Neurotransmitterrezeptoren kommunizieren. In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass eine Aktivierung der Glutamat-Rezeptoren zu einem Anstieg der Kalzium-Konzentration führte, die sich wellenartig über „Gap Junctions“ auf andere Astrozyten übertrug (Cornell-Bell et al., 1991).

Eine interessante Beobachtung während der Analyse der Transporteigenschaften der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten α_1 und α_2 bei hippokampalen Neuronen war, dass bei Kulturen, die aufgrund unsauberer Präparation der Hippokampi eine hohe Anzahl an Astrozyten aufwiesen, beiden Zelltypen durch ultradünne Membranstrukturen verbunden waren. Die beobachteten Strukturen hatten große Ähnlichkeit mit den für kultivierten PC12-Zellen beschriebenen „tunneling nanotubes“ (TNTs) (Rustom et al., 2004). Besonders die Tatsache, dass diese Strukturen mit einem Durchmesser von 50-200nm meist am kürzesten Abstand zweier Zellen über dem Substrat aufgespannt waren, deutet darauf hin, dass es sich um TNT-ähnliche Strukturen handeln könnte. Für TNTs bei PC12-Zellen wurde beschrieben,

dass kleine endosomale Zellorganellen unidirektional zwischen den Zellen transferiert werden (Rustom et al., 2004). Es stellt sich somit die spannende Frage, ob Astrozyten auch TNT-abhängig mit Neuronen kommunizieren können.

9.2.2 Untersuchungen zum TNT-abhängigen interzellulären Membrantransfer

Anhand von Experimenten mit DiD- bzw. DiI-gefärbten Organellen konnte gezeigt werden, dass diese Organellen von Astrozyten zu Neuronen transferiert werden können. Eine direkte Abhängigkeit des Transfers von den beobachteten TNT-ähnlichen Strukturen konnte jedoch nicht gezeigt werden. Aufgrund der Kultivierungsbedingungen war es zunächst nicht möglich, TNT-ähnliche Membrankanäle zwischen Zellen, die Transfer zeigten, zu visualisieren. Besonders die in großer Anzahl auftretenden, vielfach verzweigten Neuriten erschwerten die Analyse von TNT-ähnlichen Membrankanälen enorm. Um einen Anhaltspunkt für die TNT-Abhängigkeit des Membrantransfers zu bekommen, wurde der Transfer in Gegenwart von Zytoskelettdrogen quantitativ mittels FACS zunächst anhand einfach zu kultivierenden NRK-Zellen und schließlich, nach Optimierung der Versuchsbedingungen, an Kokulturen von Astrozyten und Neuronen untersucht.

9.2.2.1 NRK-Zellen

Bei Kontrollversuchen mit NRK-Zellen, die auch TNT-ähnliche Strukturen bilden konnten (Rustom et al., 2004), konnte mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden, dass sich das Ausmaß der Transferraten in Gegenwart von Zytoskelettdrogen veränderte. Bei der Verwendung F-Aktin-depolymerisierender Drogen, wie beispielsweise Latrunculin B und Cytochalasin D, konnte eine Abnahme der Transferrate beobachtet werden. Dies ist auch konform mit dem TNT-Modell bei PC12-Zellen, nach dem TNTs durch ein zentrales F-Aktinbündel stabilisiert werden (Rustom et al., 2004). Die Zugabe von F-Aktin-depolymerisierenden Drogen könnte sowohl eine Destabilisierung der Membrankanäle als auch eine Ausschaltung des aktiven Transports zur Folge haben, was beides zu einer Reduktion der Transferrate führen würde. Im Gegensatz zu F-Aktin-destabilisierenden Drogen hatten F-Aktin-stabilisierende Drogen, wie z.B. Phalloidin, keinen Effekt auf den interzellulären Transfer. NRK-Zellen zeigten auch nach Applikation Mikrotubuli-destabilisierender Drogen eine Reduktion des interzellulären Transfers von DiD-gefärbten Organellen. Dies verwunderte zunächst, da Immunfluoreszenzuntersuchungen von

Zytoskelettkomponenten in TNTs bei PC12-Zellen zeigten, dass diese TNTs keine Mikrotubuli enthalten (Rustom et al., 2004). Die Mikrotubuliabhängigkeit des interzellulären Membrantransfers bei NRK-Zellen könnte zwei mögliche Ursachen haben. Einerseits ist es vorstellbar, dass TNTs, die von unterschiedlichen Zelltypen stammen, auch eine differierende Zytoskelettausstattung besitzen. Andererseits ist eine Mikrotubuliabhängigkeit des interzellulären Membrantransfers bei NRK-Zellen auch so zu erklären, dass Organellen Mikrotubuli-abhängig in den Bereich des TNT-Ursprungs transportiert und von dort F-Aktin-abhängig durch das TNT transportiert werden. Es ist deshalb nicht zwingend, dass ein TNT-abhängiger Transfer von Organellen nur über F-Aktin verläuft. Eine gute Evidenz für einen Mikrotubuli-abhängigen Transfer über Membranröhren ist durch den Transfer viraler RNA durch die Plasmodesmata gegeben. Die virale vRNA des *Tabac-Mosaik-Virus* (TMV) beispielsweise, verbreitet sich von einer Pflanzenzelle zur nächsten über Plasmodesmata. Die Verbreitung ist von einem sogenannten „*Movement-Protein*“ (MP) abhängig (Kragler et al., 2003; Ashby et al., 2006), welches als ein stabilisierendes Protein für Mikrotubuli fungiert, da es mit Mikrotubuli assoziieren kann (Ashby et al., 2006). Ein interzellulärer Transfer der vRNA erfolgt zwar nicht direkt über Mikrotubuli (Ashby et al., 2006), ist aber abhängig von der Präsenz des MP und damit auch von der Präsenz der Mikrotubuli. Vorstellbar ist deshalb, dass auch der Mikrotubuli-abhängige Transfer bei NRK-Zellen in ähnlicher Weise von Proteinen abhängt, die selbst nicht für den Transfer verantwortlich sind. Membranstrukturen könnten so über Mikrotubuli in den Bereich des TNTs aktiv transportiert werden und schließlich F-Aktin-abhängig zur Empfängerzelle transferiert werden.

Erst kürzlich wurde zudem von Björn Önfelt und Mitarbeitern beschrieben, dass zwei unterschiedliche Arten von TNTs bei humanen Makrophagen vorkommen, die sich in Ihrer Struktur und Zusammensetzung sehr unterscheiden. Die erste Variante beschreibt die charakteristische TNT-Struktur, die sich durch interzelluläre, aufgespannte sehr dünne (50-200nm) Membrankanäle auszeichnet, deren Stabilität durch ein internes F-Aktin-Bündel gesichert wird (Önfelt et al., 2006). Neben dieser hatten Önfelt und Mitarbeiter noch eine weitere Variante beschrieben, die jedoch einen viel größeren Durchmesser besitzt ($>0,7\mu\text{m}$) und zudem zusätzlich zu F-Aktin noch Mikrotubuli besitzt (Önfelt et al., 2006). Neben strukturellen Unterschieden zeigten die beiden Varianten auch funktionelle Unterschiede. Während die dünne Variante neben der Übertragung von kleinen Membranstrukturen auch für die Übertragung von Kalzium-Signalen verantwortlich ist (Önfelt et al., 2006), konnte bei der dicken Variante eine Übertragung von Mitochondrien und den verschiedensten intrazellulären

Vesikeltypen, einschließlich späten Endosomen und Lysosomen, gezeigt werden (Onfelt et al., 2006). Onfelt und Mitarbeiter zeigten auch, dass die Applikation von Nocodazol den Transfer zum Erliegen bringt (Onfelt et al., 2006). Somit wäre dies eine Erklärung dafür, dass Nocodazol eine Reduktion des Transfers zwischen NRK-Zellen verursacht. Die Tatsache, dass PC12-Zellen keine Reduktion des Transfers nach Nocodazol-Applikation zeigen, deutet darauf hin, dass verschiedene Zelltypen unterschiedliche TNT-Varianten ausbilden.

9.2.2.2 *Astrozyten und Neurone*

Bei Kokulturen zwischen Astrozyten und Neuronen konnte beobachtet werden, dass F-Aktin-destabilisierende Drogen wie Latrunculin B und Cytochalasin D, wie bei NRK-Zellen, eine Reduktion des interzellulären Transfers von DiD- bzw. DiO-Organellen bewirkten. Phalloidin zeigte ebenfalls keinen messbaren Effekt auf die Transferrate. Im Gegensatz zu der bei NRK-Zellen beobachteten Reduktion des Transfers nach Zugabe von Nocodazol, hatte diese Droge bei Kokulturen von Astrozyten und Neuronen keinen Einfluss auf die Transferrate. Ein Mikrotubuli-abhängiger Transfer von Organellen ist somit unwahrscheinlich. Anhand dieser Ergebnisse verstärkt sich die schon in Abschnitt 9.2.2.1 geäußerte Vermutung, dass abhängig von den untersuchten Zelltypen, unterschiedliche TNT-Varianten zu einem interzellulären Transfer führen könnten (Onfelt et al., 2006).

Die Beobachtungen, dass der Transfer bei NRK-Zellen, als auch bei Astrozyten und Neuronen F-Aktin-abhängig ist, deckt sich mit den Beobachtungen, dass TNTs F-Aktin enthalten (Rustom et al., 2004). Die erhaltenen Daten sind deshalb mit dem TNT-Modell konsistent. Eine direkte Korrelation von gemessenem Transfer mit dem Auftreten von TNT-Strukturen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Der Grund dafür war vor allem die große Komplexität der Morphologie der Neuronen-/Astrozyten-Kokultur. Besonders die unüberschaubar große Oberfläche der Neuronen verhinderte eine gezielte Korrelation von TNT-Strukturen mit dem beobachteten Transfer von gefärbten Organellen. Auszuschließen ist deshalb nicht, dass Endo-/Exozytoseprozesse den TNT-vermittelten Transfer überlagern, da diese Prozesse ebenso vom F-Aktin-Zytoskelle abhangig sind (Brodsky et al., 2001; Samaj et al., 2004).

9.2.2.3 Grenzen der FACS-Analyse

Problematisch war bei der Untersuchung des TNT-abhängigen Membrantransfers zwischen Neuronen und Astrozyten immer wieder, dass nicht direkt adressiert werden konnte, ob der beobachtete Transfer mit identifizierbaren TNT-Verbindungen korreliert. Die Analyse mittels FACS schließt alleine schon von dem experimentellen Ansatz her eine direkte Korrelation zwischen dem Auftreten von TNT-Strukturen und Membrantransfer aus, da die Zellen während des experimentellen Ablaufs starken Scherkräften ausgesetzt werden und daher vorhandene TNT-Strukturen zwangsläufig zerstört werden. Auch mit den angewandten mikroskopischen Methoden war kein direkter Nachweis des TNT-vermittelten, interzellulären Transfers von Vesikel oder Membranen möglich. Eine mikroskopische Analyse der gesamten Neuronenoberfläche ist mit einer entsprechenden Vergrößerung und Auflösung nur sehr eingeschränkt möglich. Daraus folgt, dass kaum ausgeschlossen werden kann, dass der Transfer auch über andere Mechanismen erfolgt. Durch die verzweigte Morphologie der Neurone und durch die dadurch sehr häufig auftretenden Verbindungen mit anderen Neuronen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass innerhalb dieser Verbindungen auch nicht-visualisierbare TNT-Strukturen bestehen, über die ein Transfer erfolgen könnte. Durch viele Verzweigungen besitzt ein Neuron zudem eine sehr große Oberfläche, über die mittels Endo-/Exozytosemechanismen eine interzelluläre Übertragung erfolgen kann. Eine solche Möglichkeit wäre beispielsweise ein Transfer mittels Exosomen bzw. Argosomen (Greco et al., 2001; They et al., 2002). Bei Exosomen und Argosomen handelt es sich um Membranvesikel die von Zellen exozytiert werden und von Empfängerzellen endozytiert werden können und die gesteuerte Übertragung von Morphogenen vermitteln (Greco et al., 2001; They et al., 2002). Auch eine unspezifische Endozytose von gefärbtem Membranmaterial, welches z.B. von apoptotischen oder zerstörten Zellen herrührt, kann durch die große Membranoberfläche der Neuronen nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl zwischen Astrozyten und Neuronen nicht eindeutig nachweisbar war, dass TNT-Strukturen mit Membrantransfer korrelieren, zeichnet sich gegenwärtig ab, dass TNTs ein System zur interzellulären Kommunikation darstellen, welches für viele Zellsysteme nachgewiesen werden konnte. So konnten beispielsweise zwischen Kardiomyozyten und epithelialen Vorläuferzellen TNTs visualisiert (Koyanagi et al., 2005) und ein interzellulärer Transfer von Mitochondrien beobachtet werden (Koyanagi et al., 2005). Auch wurde zwischen dendritischen Zellen und Monozyten, die zu den Immunzellen gehören, ein Informationsaustausch durch Kalzium-Signale über TNTs beobachtet (Watkins et al., 2005).

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass TNTs zwischen vielen verschiedenen Zelltypen gebildet werden und daher wahrscheinlich ein generelles System zum interzellulären Informations- bzw. Proteinaustausch sind. Aufgrund dessen wäre es verwunderlich, wenn diese Strukturen nicht zwischen Astrozyten und Neuronen auftreten würden.

9.2.3 Anwendung von mikrostrukturierten Oberflächen zur Analyse von TNT-Verbindungen

Aufgrund der morphologischen Komplexität von Neuronen und Astrozyten konnten zwischen diesen Zelltypen TNT-Strukturen nur unter erschwerten Bedingungen visualisiert werden. Deswegen wurden mikrostrukturierte Oberflächen entwickelt, mit deren Hilfe eine geordnete Kultivierung von Astrozyten und Neuronen in definierten Abständen ermöglicht wurde. Weiterhin konnte mittels dieser Oberflächen verhindert werden, dass die beiden Zelltypen großflächige Membrankontakte ausbildeten. Dadurch wurde ermöglicht, dass TNT-ähnliche Strukturen zwischen den Zelltypen fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden konnten. Dennoch können diese Oberflächen nur bestimmte Zeit genutzt werden. Bei Kultivierungszeiträumen zwischen 0 – 6 Stunden ist eine Untersuchung der TNT-Bildung sehr gut möglich. Bei späteren Zeiträumen bedingt die eingeschränkte Substratfläche der Goldflächen, dass die kultivierten Zellen mehr und mehr apoptotischen Prozessen unterliegen.

Im Gegensatz zu typischen TNTs konnte mittels rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen auch eine besondere Form von TNTs nachgewiesen werden. Diese besondere Form von TNTs kann eine Länge von mehr als 150µm erreichen und wurde ebenfalls schon bei PC12-Zellen beobachtet (Rustom et al., 2004). Diese TNTs sind insofern atypisch, da sie die Zellen nicht über die kürzeste Strecke verbinden. Warum diese Strukturen nicht mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken visualisiert werden konnten ist nicht bekannt. Möglicherweise besitzen diese atypischen TNTs eine andere Membranzusammensetzung, die eine effiziente Anfärbung mit fluoreszenzmarkiertem Weizenkeimagglutinin ausschließt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe mikrostrukturierter Oberflächen zur geordneten Kultivierung neuronaler Kokulturen, grundlegende Analysen zur Bildung von TNT-Strukturen und zum interzellulären Transfer von Organellen vereinfacht werden.

9.2.4 Vor- und Nachteile mikrostrukturierter Oberflächen

Die Analyse von TNT-Strukturen bei neuronalen Zellen ist aufgrund der Morphologie der Zellen mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Besonders die langen auswachsenden Neuriten der Neurone verhindern ein schnelles Auffinden von TNTs und eine eindeutige Identifikation der TNTs gegenüber sehr dünnen Neuriten und Filopodien. Besonders durch die flache Morphologie der Neurone ist eine Unterscheidung zwischen Filopodien und TNTs teilweise nicht möglich, da sowohl TNTs als auch Filopodien das Substrat berühren. Die Untersuchung an sehr jungen Zellen ist ebenfalls eingeschränkt, da besonders Astrozyten eine hohe Mobilität aufweisen und zu den Neuronen wandern können und diese schließlich umschließen. Um diese Probleme zu minimieren, wurden spezielle Goldoberflächen entwickelt, mit deren Hilfe Neurone und Astrozyten in definierten Abständen kultiviert werden können. Durch die begrenzte Auflagefläche flachen die Zellen nicht ab, sondern ähneln über längere Zeitabschnitte den rundlichen PC12-Zellen (Klon #251), für die TNTs als erstes beschrieben worden sind. Die kugelige Zellmorphologie vereinfacht die Analyse der TNT-Bildung deutlich. Wahrscheinlich ist dies auch der Grund, weshalb ein Auswachsen der Zellen sehr beschränkt ist. Daher sterben die Zellen meist nach 2 Tagen ab, was eine Langzeituntersuchung der Bildung von TNTs verhindert. Dennoch erlaubt dieses System eine Analyse der TNT-Bildung zu frühen Kultivierungszeitpunkten. Ferner vereinfachen die funktionalisierten Oberflächen die Analyse eines TNT-abhängigen Transfers zwischen neuronalen Zellen. Außerdem ist es möglich, eine direkte Korrelation zwischen Transfer und dem Vorhandensein eines TNTs zu untersuchen. In Zukunft könnten solche funktionalisierten Oberflächen den Weg zur Isolierung einzelner TNTs bei verschiedensten Zellsystemen ebnen und somit die Möglichkeit eröffnen, die molekularen Bestandteile von TNTs genauer zu untersuchen. Ferner könnten auch grundlegende Fragen über TNT-vermittelten Transfer untersucht werden und vielleicht auch die Art der Komponenten bestimmt werden, die transferiert werden.

10 Publikationen

Oliver Schlicker, Bettina Schupp, Georg Köhr and Hans-Hermann Gerdes. Transport of GABA_A receptor subtypes in developing hippocampal neurons. *Posterpräsentation, SFB488-Begutachtung*, 2002.

Rudolf R, Kogel T, Kuznetsov SA, Salm T, **Schlicker O**, Hellwig A, Hammer JA, 3rd, Gerdes HH. Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 7):1339-48.

Die genannten Publikationen sind auf der beiliegenden CD (Ordner: eigene Publikationen) als PDF-Dateien zu finden und können mit dem Programm Adobe® AcrobatReader (Ordner: Programme/AcrobatReader) angeschaut und ausgedruckt werden.

11 Literatur

Publikationen, die mit einem Stern (*) gekennzeichnet sind, waren von besonderem Interesse und sind auf der beiliegenden CD (Ordner: Literatur) als PDF-Dateien zu finden und können mit dem Programm Adobe® AcrobatReader (Ordner: Programme/AcrobatReader) angeschaut und ausgedruckt werden.

Adkins CE, Pillai GV, Kerby J, Bonnert TP, Haldon C, McKernan RM, Gonzalez JE, Oades K, Whiting PJ, Simpson PB. $\alpha 4\beta 3\delta$ GABAA Receptors Characterized by Fluorescence Resonance Energy Transfer-derived Measurements of Membrane Potential. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276; 2001:38934-38939.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molekularbiologie der Zelle*; 1999 VCH, Viernheim).

Aldrich RW. Potassium channels. Mixing and matching. *Nature*. 1990;345(6275):475-6.

Allison DW, Chervin AS, Gelfand VI, Craig AM. Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *J Neurosci*. 2000;20(12):4545-54.

Armstrong CM. Voltage-dependent ion channels and their gating. *Physiol Rev*. 1992;72(4 Suppl):S5-13.

Ashby J, Boutant E, Seemanpillai M, Sambade A, Ritzenthaler C, Heinlein M. Tobacco mosaic virus movement protein functions as a structural microtubule-associated protein. *J Virol*. 2006;80(17):8329-44.

Baer K, Essrich C, Benson JA, Benke D, Bluethmann H, Fritschy JM, Lüscher B. Postsynaptic clustering of γ -aminobutyric acid type a receptors by the $\gamma 3$ subunit in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 96; 1999:12860-12865.

Baluska F, Hlavacka A, Volkmann D, Menzel D. Getting connected: actin-based cell-to-cell channels in plants and animals. *Trends Cell Biol*. 2004;14(8):404-8.

Banker G, Goslin K. Developments in neuronal cell culture. *Nature*. 1988;336(6195):185-6.

Baude A, Sequier JM, McKernan RM, Olivier KR, Somogyi P. Differential subcellular distribution of the alpha 6 subunit versus the alpha 1 and beta 2/3 subunits of the GABAA/benzodiazepine receptor complex in granule cells of the cerebellar cortex. *Neuroscience*. 1992;51(4):739-48.

Bedford FK, Kittler JT, Muller E, Thomas P, Uren JM, Merlo D, Wisden W, Triller A, Smart TG, Moss SJ. GABA(A) receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1. *Nat Neurosci*. 2001;4(9):908-16.

- Bogdanov Y, Michels G, Armstrong-Gold C, Haydon PG, Lindstrom J, Pangalos M, Moss SJ.** Synaptic GABA(A) receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *Embo J.* 2006;25(18):4381-4389.
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ.** International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):247-64.
- Brady ST, Lasek RJ, Allen RD.** Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science.* 1982;218(4577):1129-31.
- Brejč K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK.** Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature.* 2001;411(6835):269-76.
- Brickley SG, Cull-Candy SG, Farrant M.** Single-channel properties of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *J Neurosci.* 1999;19(8):2960-73.
- Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE.** Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:517-68.
- Brünig I, Scotti E, Sidler C, Fritschy JM.** Intact sorting, targeting, and clustering of γ -aminobutyric acid A receptor subtypes in hippocampal neurons in vitro. *Journal of Comparative Neurology.* Vol. 443; 2002a:43-55.
- Brünig I, Suter A, Knuesel I, Lüscher B, Fritschy JM.** GABAergic terminals are required for postsynaptic clustering of dystrophin but not of GABA(A) receptors and gephyrin. *J Neurosci.* 2002b;22(12):4805-13.
- Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H.** Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(23):13644-9.
- Bueno OF, Robinson LC, Alvarez-Hernandez X, Leidenheimer NJ.** Functional characterization and visualization of a GABAA receptor-GFP chimera expressed in *Xenopus* oocytes. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;59(2):165-77.
- Catterall WA.** Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev.* 1992;72(4 Suppl):S15-48.
- Chang JY.** Thrombin specificity. Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate. *Eur J Biochem.* 1985;151(2):217-24.
- Chebib M, Johnston GA.** The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26(11):937-40.
- Chen L, Wang H, Vicini S, Olsen RW.** The gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(21):11557-62.

- Christie SB, Li RW, Miralles CP, Riquelme R, Yang BY, Charych E, Wendou Y, Daniels SB, Cantino ME, De Blas AL.** Synaptic and extrasynaptic GABAA receptor and gephyrin clusters. *Prog Brain Res.* 2002;136:157-80.
- Christie SB, Li RW, Miralles CP, Yang BY, De Blas AL.** Clustered and non-clustered GABAA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2006;31(1):1-14.
- Connolly CN, Krishek BJ, McDonald BJ, Smart TG, Moss SJ.** Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem.* 1996a;271(1):89-96.
- Connolly CN, Wafford KA.** The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans.* 2004;32(Pt3):529-34.
- Connolly CN, Wooltorton JR, Smart TG, Moss SJ.** Subcellular localization of gamma-aminobutyric acid type A receptors is determined by receptor beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996b;93(18):9899-904.
- Connor JX, Boileau AJ, Czajkowski C.** A GABAA receptor alpha1 subunit tagged with green fluorescent protein requires a beta subunit for functional surface expression. *J Biol Chem.* 1998;273(44):28906-11.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM.** Ca²⁺ waves in astrocytes. *Cell Calcium.* 1991;12(2-3):185-204.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ.** Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science.* 1990;247(4941):470-3.
- Cotecchia S, Kobilka BK, Daniel KW, Nolan RD, Lapetina EY, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW.** Multiple second messenger pathways of alpha-adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *J Biol Chem.* 1990;265(1):63-9.
- Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR, Nikolov DB.** Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron.* 2002;33(1):63-74.
- Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Blüthmann H, Möhler H, Rudolph U.** Trace fear conditioning involves hippocampal $\alpha 5$ GABAA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Vol. 99; 2002:8980-8985.
- Danglot L, Triller A, Bessis A.** Association of gephyrin with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors varies during development in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2003;23(2):264-78.
- Deane CM, Lummis SC.** The role and predicted propensity of conserved proline residues in the 5-HT₃ receptor. *J Biol Chem.* 2001;276(41):37962-6.
- Dumoulin A, Levi S, Riveau B, Gasnier B, Triller A.** Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. *Eur J Neurosci.* 2000;12(11):3883-92.
- Erickson JW, Cerione RA.** Multiple roles for Cdc42 in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(2):153-7.

Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Lüschner B. Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the $\gamma 2$ subunit and gephyrin. *Nature Neuroscience*. Vol. 1; 1998:563-571.

Farb CR, Aoki C, Ledoux JE. Differential localization of NMDA and AMPA receptor subunits in the lateral and basal nuclei of the amygdala: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*. 1995;362(1):86-108.

Feng G, Tintrup H, Kirsch J, Nichol MC, Kuhse J, Betz H, Sanes JR. Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science*. 1998;282(5392):1321-4.

Fischer F, Kneussel M, Tintrup H, Haverkamp S, Rauen T, Betz H, Wassle H. Reduced synaptic clustering of GABA and glycine receptors in the retina of the gephyrin null mutant mouse. *J Comp Neurol*. 2000;427(4):634-48.

Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicar BA. Astrocytic GABA receptors. *Glia*. 1994;11(2):83-93.

Fritschy JM, Johnson DK, Mohler H, Rudolph U. Independent assembly and subcellular targeting of GABA(A)-receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons in vivo. *Neurosci Lett*. 1998;249(2-3):99-102.

Fritschy JM, Mohler H. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol*. 1995;359(1):154-94.

Gibson. *Cambridge, England*. 1984.

Goetze B, Grunewald B, Baldassa S, Kiebler M. Chemically controlled formation of a DNA/calcium phosphate coprecipitate: application for transfection of mature hippocampal neurons. *J Neurobiol*. 2004;60(4):517-25.

Goritz C, Mauch DH, Nagler K, Pfrieder FW. Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair. *J Physiol Paris*. 2002;96(3-4):257-63.

Grafstein B, Forman DS. Intracellular transport in neurons. *Physiol Rev*. 1980;60(4):1167-283.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977;36(1):59-74.

Greco V, Hannus M, Eaton S. Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell*. 2001;106(5):633-45.

Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166(4):557-80.

Hanus C, Vannier C, Triller A. Intracellular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate. *J Neurosci*. 2004;24(5):1119-28.

- Heumann R, Kachel V, Thoenen H.** Relationship between NGF-mediated volume increase and "priming effect" in fast and slow reacting clones of PC12 pheochromocytoma cells. Role of cAMP. *Exp Cell Res.* 1983;145(1):179-90.
- Hevers W, Luddens H.** The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol.* 1998;18(1):35-86.
- Hodgkin AL.** The Conduction of the Nervous Impulse. *University Press, Liverpool.* 1964.
- Hosie AM, Dunne EL, Harvey RJ, Smart TG.** Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nat Neurosci.* 2003;6(4):362-9.
- Huebsch KA, Maimone MM.** Rapsyn-mediated clustering of acetylcholine receptor subunits requires the major cytoplasmic loop of the receptor subunits. *J Neurobiol.* 2003;54(3):486-501.
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SGN.** Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nature Neuroscience.* 2000;3(7):661-669.
- Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, Saliba RS, Kittler JT, Haydon PG, Moss SJ.** Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors. *J Neurosci.* 2005;25(45):10469-78.
- Jin P, Walther D, Zhang J, Rowe-Teeter C, Fu GK.** Serine 171, a conserved residue in the gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor gamma2 subunit, mediates subunit interaction and cell surface localization. *J Biol Chem.* 2004;279(14):14179-83.
- Jones A, Korpi ER, McKernan RM, Pelz R, Nusser Z, Makkela R, Mellor JR, Pollard S, Bahn S, Stephenson FA, Randall AD, Sieghart W, Somogyi P, Smith AJH, Wisden W.** Ligand-gated ion channel subunit partnerships: GABA(A) receptor $\gamma 6$ subunit gene inactivation inhibits γ subunit expression. *Journal of Neuroscience.* 1997;17(4):1350-1362.
- Kaether C, Skehel P, Dotti CG.** Axonal membrane proteins are transported in distinct carriers: a two-color video microscopy study in cultured hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.* 2000;11(4):1213-24.
- Kanematsu T, Hirata M.** The analysis of protein-protein interaction with special reference to PRIP-1. *Folia Pharmacologica Japonica.* 2002a;119(4):241-246.
- Kanematsu T, Jang IS, Yamaguchi T, Nagahama H, Yoshimura K, Hidaka K, Matsuda M, Takeuchi H, Misumi Y, Nakayama K, Yamamoto T, Akaike N, Hirata M, Nakayama KI.** Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABAA receptor function. *EMBO Journal.* 2002b;21(5):1004-1011.
- Kantlehner M, Schaffner P, Finsinger D, Meyer J, Jonczyk A, Diefenbach B, Nies B, Holzemann G, Goodman SL, Kessler H.** Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem.* 2000;1(2):107-14.

- Kapust RB, Tozser J, Fox JD, Anderson DE, Cherry S, Copeland TD, Waugh DS.** Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng.* 2001;14(12):993-1000.
- Kapust RB, Waugh DS.** Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease. *Protein Expr Purif.* 2000;19(2):312-8.
- Keller CA, Yuan X, Panzanelli P, Martin ML, Alldred M, Sassoè-Pognetto M, Lüscher B.** The $\gamma 2$ subunit of GABAA receptors is a substrate for palmitoylation by GODZ. *Journal of Neuroscience.* Vol. 24; 2004:5881-5891.
- Kennedy MB.** Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science.* 2000;290(5492):750-754.
- Keynes RD.** Ion channels in the nerve-cell membrane. *Sci Am.* 1979;240(3):126-32, 134-5.
- Killisch I, Dotti CG, Laurie DJ, Luddens H, Seeburg PH.** Expression patterns of GABAA receptor subtypes in developing hippocampal neurons. *Neuron.* 1991;7(6):927-36.
- Kins S, Betz H, Kirsch J.** Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nature Neuroscience.* 2000;3(1):22-29.
- Kirsch J.** Assembly of signaling machinery at the postsynaptic membrane. *Current Opinion in Neurobiology.* 1999;9(3):329-335.
- Kirsch J, Betz H.** The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *Journal of Neuroscience.* 1995;15(6):4148-4156.
- Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H.** The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *Journal of Biological Chemistry.* 1991;266(33):22242-22245.
- Kirsch J, Malosio ML, Wolters I, Betz H.** Distribution of gephyrin transcripts in the adult and developing rat brain. *European Journal of Neuroscience.* 1993;5(9):1109-1117.
- Kittler JT, McAinsh K, Moss SJ.** Mechanisms of GABAA receptor assembly and trafficking: implications for the modulation of inhibitory neurotransmission. *Mol Neurobiol.* 2002;26(2-3):251-68.
- Kittler JT, Rostaing P, Schiavo G, Fritschy JM, Olsen R, Triller A, Moss SJ.** The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Mol Cell Neurosci.* 2001;18(1):13-25.
- Kittler JT, Wang J, Connolly CN, Vicini S, Smart TG, Moss SJ.** Analysis of GABAA receptor assembly in mammalian cell lines and hippocampal neurons using gamma 2 subunit green fluorescent protein chimeras. *Mol Cell Neurosci.* 2000;16(4):440-52.
- Klausberger T, Ehya N, Fuchs K, Fuchs T, Ebert V, Sarto I, Sieghart W.** Detection and binding properties of GABA(A) receptor assembly intermediates. *J Biol Chem.* 2001;276(19):16024-32.

- Klausberger T, Roberts JDB, Somogyi P.** Cell Type- and Input-Specific Differences in the Number and Subtypes of Synaptic GABA_A Receptors in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(7):2513-2521.
- Kleijnen MF, Shih AH, Zhou P, Kumar S, Soccio RE, Kedersha NL, Gill G, Howley PM.** The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Molecular Cell*. 2000;6(2):409-419.
- Kneussel M, Betz H.** Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol*. 2000a;525 Pt 1:1-9.
- Kneussel M, Brandstätter JH, Laube B, Stahl S, Müller U, Betz H.** Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *Journal of Neuroscience*. 1999a;19(21):9289-9297.
- Kneussel M, Brandstätter JH, Gasnier B, Feng G, Sanes JR, Betz H.** Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABA_A receptor subtypes. *Molecular and Cellular Neuroscience*. Vol. 17; 2001:973-982.
- Kneussel M, Brandstätter JH, Laube B, Stahl S, Müller U, Betz H.** Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *Journal of Neuroscience*. Vol. 19; 1999b:9289-9297.
- Kneussel M, Haverkamp S, Fuhrmann JC, Wang H, Wässle H, Olsen RW, Betz H.** The γ -aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 97; 2000b:8594-8599.
- Kneussel M, Hermann A, Kirsch J, Betz H.** Hydrophobic interactions mediate binding of the glycine receptor beta-subunit to gephyrin. *J Neurochem*. 1999c;72(3):1323-6.
- Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S.** Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res*. 2005;96(10):1039-41.
- Kragler F, Curin M, Trutnyeva K, Gansch A, Waigmann E.** MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement protein. *Plant Physiol*. 2003;132(4):1870-83.
- Kunkel TA, Bebenek K, McClary J.** Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA. *Methods Enzymol*. 1991;204:125-39.
- Kunkel TA, Roberts JD, Zakour RA.** Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol*. 1987;154:367-82.
- Lévi S, Logan SM, Tovar KR, Craig AM.** Gephyrin Is Critical for Glycine Receptor Clustering but Not for the Formation of Functional GABAergic Synapses in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience*. Vol. 24; 2004:207-217.
- Levitan IB, Kaczmarck, K.L.** The Neuron: Cell and Molecular Biology. *Oxford University Press, Oxford*. 1994.

- Lin YF, Browning MD, Dudek EM, Macdonald RL.** Protein kinase C enhances recombinant bovine $\alpha 1\beta 1\gamma 2L$ GABA(A) receptor whole-cell currents expressed in L929 fibroblasts. *Neuron*. Vol. 13; 1994:1421-1431.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J.** *Molecular Biology of the Cell*. WH Freeman Publishers. 2003;5th Edition.
- Loebrich S, Bähring R, Katsuno T, Tsukita S, Kneussel M.** Activated radixin is essential for GABAA receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton. *Embo J*. 2006;25(5):987-99.
- Lüscher B, Keller CA.** Ubiquitination, proteasomes and GABAA receptors. *Nature Cell Biology*. 2001;3(10).
- Maccaferri G, Roberts JDB, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P.** Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *Journal of Physiology*. 2000;524(1):91-116.
- Maitra R, Reynolds JN.** Subunit dependent modulation of GABAA receptor function by neuroactive steroids. *Brain Res*. 1999;819(1-2):75-82.
- Marshall J, Molloy R, Moss GW, Howe JR, Hughes TE.** The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron*. 1995;14(2):211-5.
- Megias M, Emri Z, Freund TF, Gulyás AI.** Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*. Vol. 102; 2001:527-540.
- Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D.** Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor β subunit. *Neuron*. Vol. 15; 1995:563-572.
- Miles R, Tóth K, Gulyás AI, Hájos N, Freund TF.** Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*. Vol. 16; 1996:815-823.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N.** Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*. 2003;423(6943):949-55.
- Moss SJ, Smart TG.** Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(4):240-50.
- Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA.** Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem*. 1994;62(2):815-8.
- Nusser Z, Cull-Candy S, Farrant M.** Differences in synaptic GABA(A) receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron*. 1997;19(3):697-709.
- Nusser Z, Ha?jost N, Somogyi P, Mody I.** Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature*. 1998a;395(6698):172-177.
- * **Nusser Z, Sieghart W, Benke D, Fritschy JM, Somogyi P.** Differential synaptic localization of two major gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha subunits on hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996a;93(21):11939-44.

- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P.** Segregation of different GABA(A) receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience*. 1998b;18(5):1693-1703.
- Nusser Z, Sieghart W, Stephenson FA, Somogyi P.** The alpha 6 subunit of the GABAA receptor is concentrated in both inhibitory and excitatory synapses on cerebellar granule cells. *J Neurosci*. 1996b;16(1):103-14.
- Nyíri G, Freund TF, Somogyi P.** Input-dependent synaptic targeting of $\alpha 2$ -subunit-containing GABAA receptors in synapses of hippocampal pyramidal cells of the rat. *European Journal of Neuroscience*. Vol. 13; 2001:428-442.
- Nymann-Andersen J, Wang H, Chen L, Kittler JT, Moss SJ, Olsen RW.** Subunit specificity and interaction domain between GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) and GABA(A) receptors. *J Neurochem*. 2002a;80(5):815-23.
- Nymann-Andersen J, Wang H, Olsen RW.** Biochemical identification of the binding domain in the GABAA receptor-associated protein (GABARAP) mediating dimer formation. *Neuropharmacology*. 2002b;43(4):476-481.
- O'Connor V, Augustine GJ, Betz H.** Synaptic vesicle exocytosis: molecules and models. *Cell*. 1994;76(5):785-7.
- Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, Purbhoo MA, Sowinski S, Hume AN, Seabra MC, Neil MA, French PM, Davis DM.** Structurally Distinct Membrane Nanotubes between Human Macrophages Support Long-Distance Vesicular Traffic or Surfing of Bacteria. *J Immunol*. 2006;177(12):8476-83.
- Onfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K, Davis DM.** Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol*. 2004;173(3):1511-3.
- Otis TS, De Koninck Y, Mody I.** Lasting potentiation of inhibition is associated with an increased number of γ -aminobutyric acid type A receptors activated during miniature inhibitory postsynaptic currents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 91; 1994:7698-7702.
- Pearce RA.** Physiological evidence for two distinct GABAA responses in rat hippocampus. *Neuron*. 1993;10(2):189-200.
- Pfeiffer P, Graham D, Betz H.** Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(16):9389-9393.
- Pfriefer FW.** Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays*. 2003;25(1):72-8.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G.** GABA(A) receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*. 2000;101(4):815-850.
- Ramirez-Weber FA, Kornberg TB.** Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in Drosophila imaginal discs. *Cell*. 1999;97(5):599-607.

- Rao A, Cha EM, Craig AM.** Mismatched appositions of presynaptic and postsynaptic components in isolated hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*. 2000;20(22):8344-8353.
- Reed BC, Cefalu C, Bellaire BH, Cardelli JA, Louis T, Salamon J, Bloecher MA, Bunn RC.** GLUT1CBP(TIP2/GIPC1) interactions with GLUT1 and myosin VI: evidence supporting an adapter function for GLUT1CBP. *Mol Biol Cell*. 2005;16(9):4183-201.
- Reeves DC, Sayed MF, Chau PL, Price KL, Lummis SC.** Prediction of 5-HT₃ receptor agonist-binding residues using homology modeling. *Biophys J*. 2003;84(4):2338-44.
- Reid T, Bathorn A, Ahmadian MR, Collard JG.** Identification and characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(47):33587-33593.
- Rosenberg M, Meier J, Triller A, Vannier C.** Dynamics of glycine receptor insertion in the neuronal plasma membrane. *J Neurosci*. 2001;21(14):5036-44.
- Rustom A, Gerlich D, Rudolf R, Heinemann C, Eils R, Gerdes HH.** Analysis of fast dynamic processes in living cells: high-resolution and high-speed dual-color imaging combined with automated image analysis. *Biotechniques*. 2000;28(4):722-8, 730.
- * **Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH.** Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 2004;303(5660):1007-10.
- Samaj J, Baluska F, Voigt B, Schlicht M, Volkmann D, Menzel D.** Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol*. 2004;135(3):1150-61.
- Sambrook M, E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1989.
- Sassoè-Pognetto M, Panzanelli P, Sieghart W, Fritschy JM.** Colocalization of multiple GABA(A) receptor subtypes with gephyrin at postsynaptic sites. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 420; 2000:481-498.
- Schweizer C, Balsiger S, Bluethmann H, Mansuy IM, Fritschy JM, Mohler H, Lüschner B.** The $\gamma 2$ subunit of GABA_A receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Molecular and Cellular Neuroscience*. Vol. 24; 2003:442-450.
- Seeburg PH, Wisden W, Verdoorn TA, Pritchett DB, Werner P, Herb A, Luddens H, Sprengel R, Sakmann B.** The GABA_A receptor family: molecular and functional diversity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1990;55:29-40.
- Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Höger H, Adamiker D.** Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochemistry International*. Vol. 34; 1999:379-385.
- Sonnwald U, Westergaard N, Schousboe A.** Glutamate transport and metabolism in astrocytes. Vol. 21; 1997:56-63.
- Srinivasan S, Nichols CJ, Lawless GM, Olsen RW, Tobin AJ.** Two invariant tryptophans on the alpha1 subunit define domains necessary for GABA(A) receptor assembly. *J Biol Chem*. 1999;274(38):26633-8.

- Studler B, Fritschy JM, Brüning I.** GABAergic and glutamatergic terminals differentially influence the organization of GABAergic synapses in rat cerebellar granule cells in vitro. *Neuroscience*. Vol. 114; 2002:123-133.
- Swanwick CC, Murthy NR, Mtchedlishvili Z, Sieghart W, Kapur J.** Development of gamma-aminobutyric acidergic synapses in cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol*. 2006;495(5):497-510.
- Terunuma M, Kanematsu T, Hirata M.** Modulation of GABA(A) receptors by PKA phosphorylation in mice hippocampal neurons through PLC-related catalytically inactive protein: PRIP-1. *Program No. 434.8. 2002 Abstract Viewer/Itinerary Planner*. 2002.
- They C, Zitvogel L, Amigorena S.** Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(8):569-79.
- Thomas P, Almers W.** Exocytosis and its control at the synapse. *Curr Opin Neurobiol*. 1992;2(3):308-11.
- Thomson AM, Bannister AP, Hughes DI, Pawelzik H.** Differential sensitivity to Zolpidem of IPSPs activated by morphologically identified CA1 interneurons in slices of rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 2000;12(2):425-436.
- Van Zundert B, Alvarez FJ, Tapia JC, Yeh HH, Diaz E, Aguayo LG.** Developmental-Dependent Action of Microtubule Depolymerization on the Function and Structure of Synaptic Glycine Receptor Clusters in Spinal Neurons. *Journal of Neurophysiology*. 2004;91(2):1036-1049.
- Vautrin J, Schaffner AE, Barker JL.** Fast presynaptic GABAA receptor-mediated Cl⁻ conductance in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol*. 1994;479 (Pt 1):53-63.
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW.** GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature*. 1999;397(6714):69-72.
- Wang H, Olsen RW.** Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAP-GABA(A) receptor interaction. *Journal of Neurochemistry*. 2000;75(2):644-655.
- Watkins SC, Salter RD.** Functional Connectivity between Immune Cells Mediated by Tunneling Nanotubes. *Immunity*. 2005;23(3):309-318.
- Wessel D, Flugge UI.** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*. 1984;138(1):141-3.
- Whiting PJ.** The GABA-A receptor gene family: New targets for therapeutic intervention. *Neurochemistry International*. 1999;34(5):387-390.
- Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, Seeburg PH.** The distribution of 13 GABA(A) receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *Journal of Neuroscience*. 1992;12(3):1040-1062.
- Wu AL, Wang J, Zheleznyak A, Brownt EJ.** Ubiquitin-related proteins regulate interaction of vimentin intermediate filaments with the plasma membrane. *Molecular Cell*. 1999;4(4):619-625.

Ymer S, Schofield PR, Shivers BD, Pritchett DB, Luddens H, Kohler M, Werner P, Sontheimer H, Kettenmann H, Seeburg PH. Molecular studies of the GABAA receptor. *J Protein Chem.* 1989;8(3):352-5.

Yuste R, Bonhoeffer T. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(1):24-34.

Zhang SJ, Jackson MB. GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings. *Science.* 1993;259(5094):531-4.

Zimmer H, Riese S, Regnier-Vigouroux A. Functional characterization of mannose receptor expressed by immunocompetent mouse microglia. *Glia.* 2003;42(1):89-100.

12 Abkürzungen

Ø	Durchmesser, Durchschnitt
(v/v)	Volumen-Volumen-Verhältnis
(w/v)	Gewicht-Volumen-Verhältnis
°C	Grad Celsius
µ	Mikro (10^{-6})
3D	dreidimensionaler/es
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
A	Ampère
AIS	„axon initial segment“
AMBA	Akrylamid-Bisakrylamid
Amp	Ampizilin
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isooxylpropionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BBS	BES-gepufferte Salzlösung
BDM	2,3-Butandion-monoxin
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bzw.	beziehungsweise
Cam	Chloramphenikol
CCD	„charge-coupled device“
cDNA	„copy“ DNA
CMV	Zytomegalovirus
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	„Dulbecco's modified eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat

E18	Embryonaltag 18
ECFP	„enhanced cyan fluorescent protein“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EYFP	„enhanced yellow fluorescent protein“
F	Farad
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
F-Aktin	filamentöses Aktin
f-GFP	farnilysiertes GFP
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	„forward scatter“
g	Gramm
g	Gravitationskonstante ($g = 9,81\text{m/s}^2$)
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABARAP	GABA _A -Rezeptor assoziiertes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid austauschfaktor
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde/n
HEK	„human embryonic kidney“
hPEM-2	„human posterior end mark“-2
HS	Pferdeserum
IAP	Apoptose-inhibierendes Protein
k	Kilo (10^3)
Kan	Kanamycin
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
min	Minute/n
n	Nano (10^{-9})
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NRK	„new rat kidney“
NSF	N-Ethylmaleimid sensitiver Faktor

p	Piko (10^{-12})
PANX	Pannexin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	„personal computer“
PC12	Pheochromocytoma Zelllinie 12
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Pyrococcus furiosum</i>
Plic-1	„protein linking IAP to the cytoskeleton“-1
PNK	Polynukleotidkinase
PSD	„post synaptic density“
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
SaSo	„salt solution“
SDS	Natriumdodekylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde/n
SSC	„side scatter“
ssDNA	„single-stranded“ DNA, Einzelstrang-DNA
TBE	Transferpuffer
TE	Tris / EDTA
Tet	Tetrazyklin
TEV	„tobacco etch virus“
TFB	Transformationspuffer
TM	Transmembrandomäne
TNT	„tunneling nanotube“
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TRP	Transientes Rezeptorpotential
U	„units“
usw.	und so weiter
V	Volt
vRNA	virale RNA
z.B.	zum Beispiel

13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hans-Hermann Gerdes für die Betreuung der Promotion sowie Prof. Dr. Klaus Unsicker für die Übernahme des Koreferats. Danken möchte ich allen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben: Dr. Amin Rustom für die Hilfestellung beim TNT-Thema, Marcus Patrick Abel für die Zusammenarbeit bei den funktionalisierten Oberflächen und im Besonderen Sigrid Riese für die tolle Arbeitsatmosphäre und so „manche“ süße (und salzige) Überraschung. Auch möchte ich den ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe danken, die es trotz allem Betteln vorgezogen haben, ins kalte, verregnete und düstere ;-) Bergen (Norwegen) auszuwandern: Tanja Kögel, Tilo Eichler, Margarethe Bittins, Steffen Gurke und Petra Vogelsang. Danken möchte ich auch Dr. Georg Köhr und Dr. Bettina Schupp für die Zusammenarbeit bei den Elektrophysiologieexperimenten. Prof. Dr. Hannah Monyer und allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs 791 möchte ich für die tolle Zeit und die Möglichkeit, viele neue Leute und Methoden kennen zu lernen, danken. Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hilmar Bading und Dr. Otto Bräunling die mich in der letzten Phase meiner Dissertation wirklich sehr unterstützt haben.

„Last, but not least“

möchte ich mich ganz, ganz herzlich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Rita und Berthold Schlicker, meiner Schwester Stefanie Schneider und dem liebsten Menschen auf Erden, Jennifer Strube, für die unendlich große Unterstützung, die ich während der letzten Phase dieser Dissertation sehr gebraucht habe, bedanken.

14 Anhang

14.1 Klonierungsstrategien und Sequenzanalysen (auf CD; Ordner: Anhang, Anhang.pdf)

Die Klonierungsstrategien zur Erstellung der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte und die entsprechenden Sequenzanalysen sind aufgrund ihrer Quantität und zur Erhaltung der besseren Übersicht auf der beigelegten CD (Ordner: Anhang) in der Datei „Anhang.pdf“ zu finden. Diese Daten können mit Hilfe des Programms Adobe[®] AcrobatReader (Ordner: Programme/AcrobatReader) angeschaut und/oder ausgedruckt werden.

14.2 Originalvektoren

14.2.1 pRK5 / GABA_A- α_1

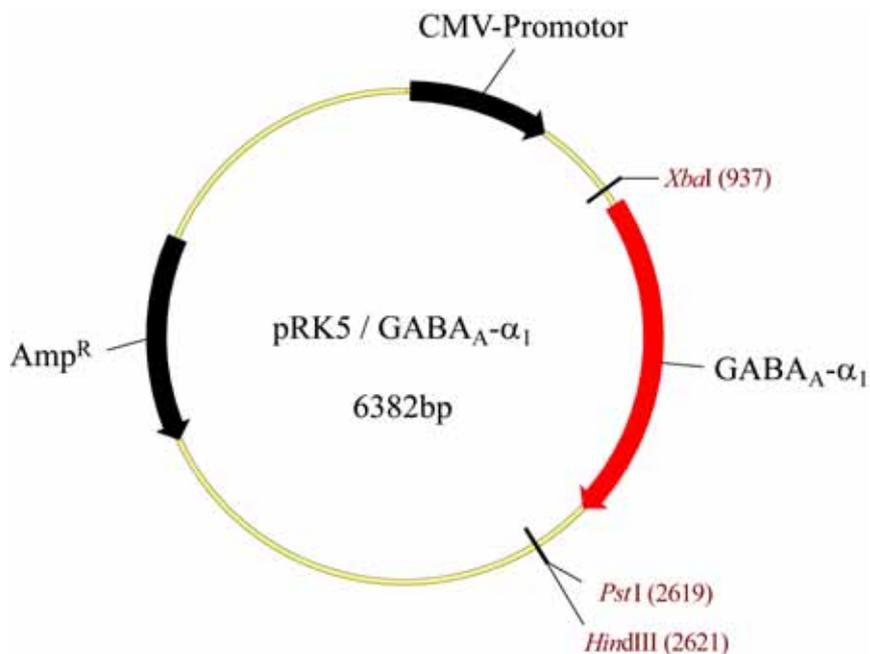


Abbildung 68: Vektorkarte von pRK5/GABA_A- α_1 . Das hier dargestellte Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Seeburg, MPI für medizinische Forschung, zur Verfügung gestellt.

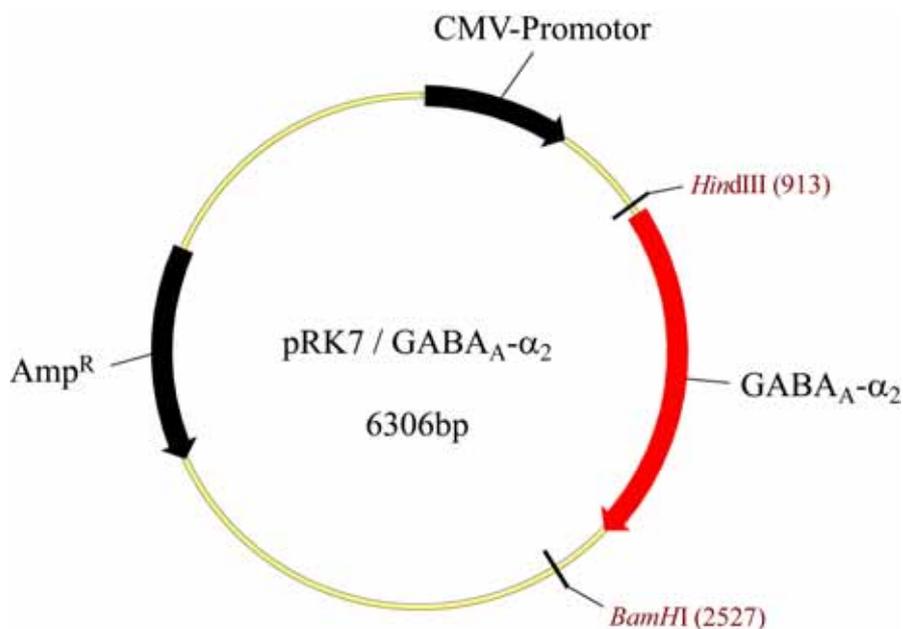
14.2.2 pRK7 / GABA_A- α_2 

Abbildung 69: Vektorkarte von pRK7/GABA_A- α_2 . Das hier dargestellte Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Seeburg, MPI für medizinische Forschung, zur Verfügung gestellt.

14.2.3 pECFP-N1

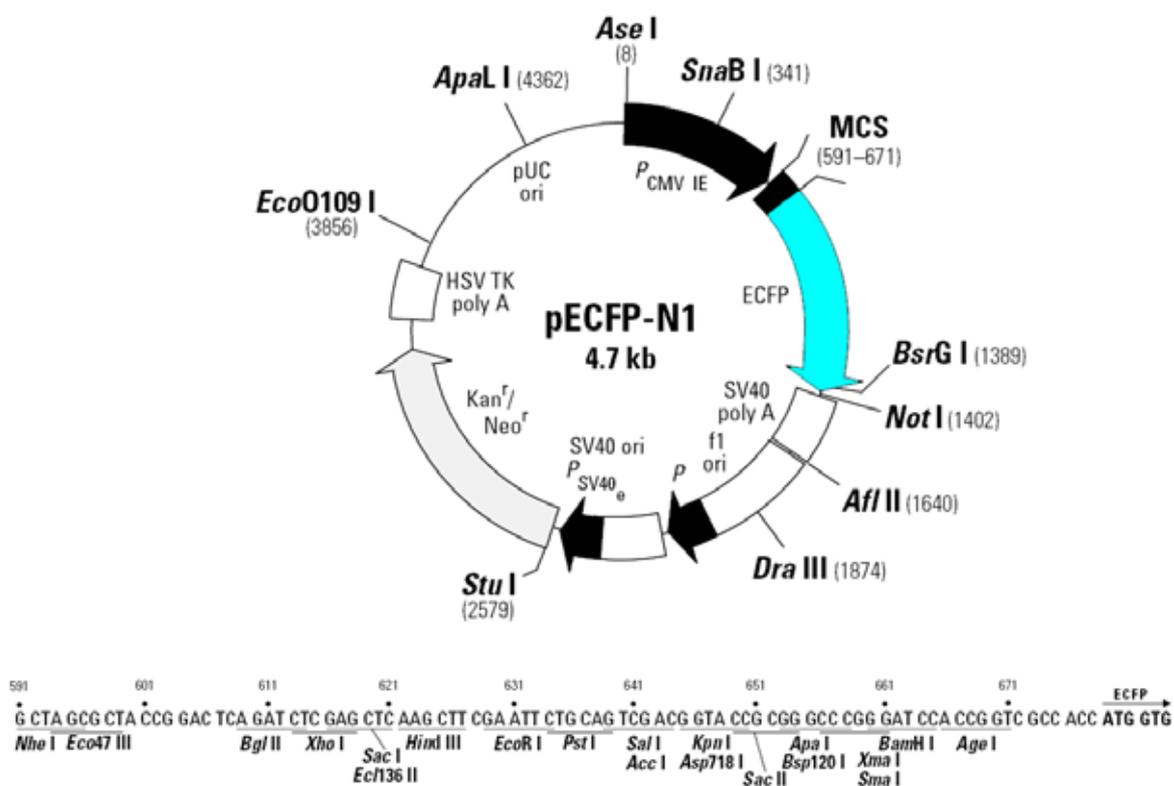


Abbildung 70: Vektorinformation von pECFP-N1. www.clontech.com, modifiziert.

14.2.4 pEYFP-N1

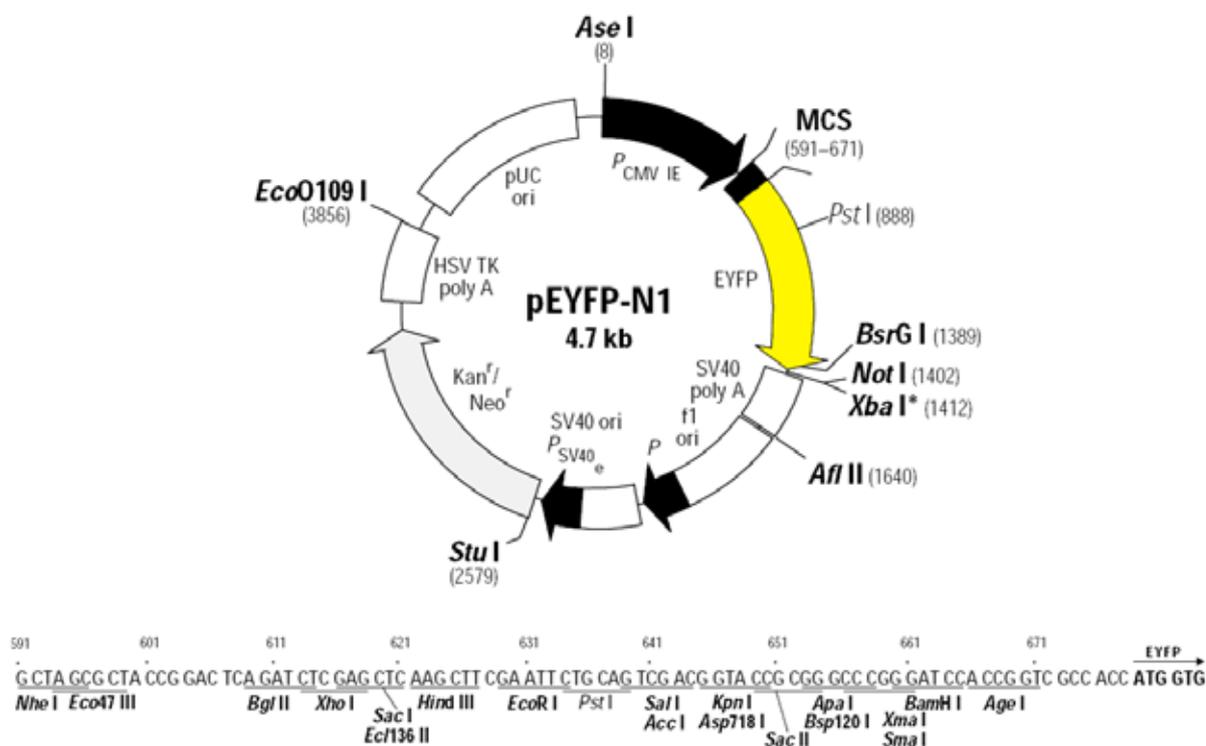


Abbildung 71: Vektorinformation von pEYFP-N1. www.clontech.com, modifiziert.

14.2.5 pcDNA3.1/myc-HIS A(+)

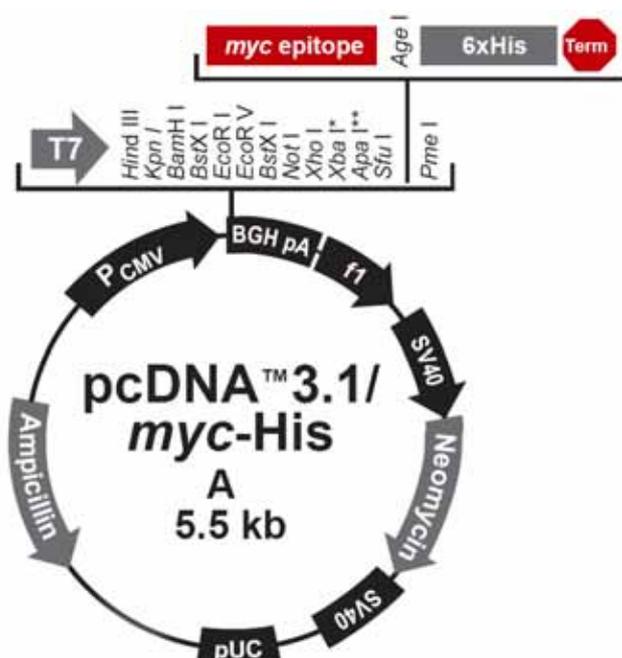


Abbildung 72: Vektorinformation von pcDNA3.1/myc-HIS A (+). www.invitrogen.com, modifiziert.

14.3 Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Csy	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glyzin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleuzin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leuzin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

schwarz = neutrale Aminosäuren

grün = Aminosäuren mit ungeladenen, polaren Resten

blau = basische Aminosäuren

rot = saure Aminosäuren