

Untersuchungen über die Bindungseigenschaften des peripheren Membranproteins Gephyrin

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in
Frankfurt am Main

von
Achim Hermann
aus Stuttgart

Frankfurt, 2002

DF1

1.1.1.1 für Irina und Tüdel

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan :

Gutachter :

Datum der Disputation :

Ich danke Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes und die Betreuung der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft, sowie für die Gestaltung des wissenschaftlichen und persönlichen Rahmens. Die Arbeit am MPI war lehrreich und hat viel Freude gemacht.

Herrn Prof. Dr. Kirsch danke ich für die Betreuung auch über die Grenzen des MPI hinweg.
Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Betreuung der Arbeit im Fachbereich

Außerdem möchte ich danken:

Der Gephyringruppe für Diskussion, Anregung und Kollegialität, insbesondere Achim Kirsch für die anfängliche Betreuung, Matthias Kneussel für viel Unterstützung, Jens Fuhrmann für die wissenschaftliche Anregung, die Hilfe bei Y2H und die dazu gehörigen Klone, Yannick Großkreuz für viel Anregung und Spaß, Masa für viel Erfahrungen, Eva Evers für die Hilfe bei den Neuronen, Stefan für unermüdliche Diskussionen, Dagmar für viel praktisches und ganz besonders danke ich Ina Bartnik für die feste zuverlässige Säule, die sie dem Labor gegeben hat.

Und weiterhin danke ich:

Meinem großen Freund Klaus, für Unaufzählbares, Jörg und Brigitte für viel Freundschaft, Rat und Tat und viel Ungewöhnliches, Tina Kartmann für Freundschaft und viel menschliches. Danke, Tüdel und Irina. Ganz besonders danke ich Conny, für ihr Herz, ihre Kraft und Unermüdlichkeit.

Ich danke Silke Fuchs für die vielen Fliegen und Hilfe im Hintergrund, Beate Rohm für heißeredete Köpfe, Michaela für wilde Auseinandersetzungen, Angelika für schönes und lustiges, außerdem Anja und Nicole für die Hilfe bei der Zellkultur.

Bertram danke ich für die vermittelt Sicherheit, Ossama für die Ruhe trotz Hektik, Roberto für die Gelassenheit im Chaos, Jose für die Lockerheit bei allem und Andreas für die klaglose Übernahme von Wochenenddiensten.

Matthias Stanke ist zu danken für Gebräutes und Schwäbisches, Maren für kulinarische Spezialitäten und Holger fürs Hessische. Jussuf sei gedankt für den Schutz vor Bombenangriffen und nächtliche Fürsorge. Ich danke Carolin für das Gute im Umgang und den Rohrsers und Singers für kameradschaftlichen Ausgleichssport. Ich danke Barbara für hohen Einsatz mit viel Gewinn.

Allen sei gedankt, die mich während meiner Arbeit begleitet haben.

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Entdeckung der Synapsen, ein historischer Überblick	1
1.2 Die synaptische Signalübertragung	1
1.2.1 Die elektrischen Synapsen	1
1.2.2 Die chemischen Synapsen	1
1.3 Die postsynaptische Membran der neuromuskuläre Endplatte	2
1.4 Exzitatorische postsynaptische Membranspezialisierungen	5
1.5 Inhibitorische postsynaptische Membranspezialisierungen	9
1.6 ZIELSETZUNG	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Materialien	16
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	16
2.1.2 Lösungen und Medien	16
2.1.2.1 Häufig verwendete Lösungen:	16
2.1.2.2 Größenmarker für Elektrophorese	16
2.1.2.3 Nährmedien für Bakterien:	17
2.1.2.4 Nährmedien für Helfekulturen	17
2.1.2.5 Nährmedien für die Zellkultur eukaryontischer Zellen	18
2.1.3 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme	18
2.1.3.1 Baktereinstämme	18
2.1.3.2 Hefestamm	18
2.1.3.3 Eukaryotische Zelllinien	18
2.1.4 Antikörper	18
2.1.4.1 Primäre Antikörper	18
2.1.4.2 Sekundäre Antikörper	19
2.1.5 Vektoren	19
2.1.6 Oligonukleotide	20
Bezeichnung	20
Sequenz	20
Verwendung	20
2.2 Methoden	22
2.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	22
2.2.1.1 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen	22
2.2.1.2 Passagieren von Zellen	23
2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl	23
2.2.1.4 Transfektion von adhärenenten HEK 293 Zellen	23
2.2.1.5 Präparation von spinalen Rückenmarksneuronen	24
2.2.1.6 Transfektion von Primärkulturen des Rückenmarks	24
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	24
2.2.2.1 Kultivierung von Bakterien	24

2.2.2.2 Herstellung von kompetenten Bakterien für die Hitzeschocktransformation	25
2.2.2.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter Zellen	25
2.2.2.4 Hitzeschocktransformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	25
2.2.2.5 Annealing von DNA	25
2.2.2.6 Reinigung von Nukleinsäuren in wäßriger Lösung	26
2.2.2.7 Lagerung von Nukleinsäuren	26
2.2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	27
2.2.2.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
2.2.2.10 Dephosphorylierung von DNA	27
2.2.2.11 Phosphorylierung von DNA	27
2.2.2.12 Ligation von DNA	27
2.2.2.13 Trennung von DNA in Agarosegelen	28
2.2.2.14 Elution von DNA aus Agarosegelen	28
2.2.2.15 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab	28
2.2.2.16 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativem Maßstab	28
2.2.2.17 Sequenzierung von DNA	29
2.2.2.18 Polymerase-Kettenreaktion	29
2.2.2.19 PCR-Mutagenese	29
2.2.2.20 Klonierung von PCR-Fragmenten	30
2.2.2.21 Extraktion von RNA	30
2.2.2.22 Reverse Transkription von RNA	30
2.2.2.23 Zwei-Hybrid-System	30
2.2.3 Biochemische Methoden	30
2.2.3.1 Herstellung von Zellysaten aus Zellkulturen	30
2.2.3.2 Herstellung von Zellysaten aus Organen	31
2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.2.3.4 Immunpräzipitation	31
2.2.3.5 Wessel-Flügge-Fällung von Proteinen	31
2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	31
2.2.3.7 Coomassie-Brillantblau-Färbung von Proteinen	32
2.2.3.8 Proteinaufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen	32
2.2.3.9 Kosedimentation von Proteinen mit Tubulin	33
2.2.4 Immunologische Methoden	33
2.2.4.1 Immunoblotanalyse von Proteinen	33
2.2.4.2 Immunfärbung	34
2.2.4.2 Computerprogramme	34
3. ERGEBNISSE	35
3.1 Kartierung der Bindungsstelle Gephyrins für den GlyR	35
3.1.1 Gephyrin P1 bindet an GST- β 49 Fusionsprotein	35
3.1.2 Affinitätsaufreinigung von Gephyrin	37
3.1.3 Der N-Terminus Gephyrins bildet die Bindungsstelle für den GlyR	38
3.2 Aufreinigung verschiedener Gephyrin-Varianten	46
3.4 Anreicherung von Komplexen aus GlyR, Gephyrin und Collybistin	50
3.5 Der C-Terminus von Gephyrin bindet an Mikrotubuli	52

3.3 Das Epitop des Antikörpers mAb5 liegt in Exon 8	56
3.6 Identifikation einer Autoaggregationsdomäne Gephyrins	59
3.7 Expression der GlyR-Bindungsstelle Gephyrins in Neuronen	74
4. DISKUSSION	78
4.1 Kartierung der Gephyrin-Bindungsdomäne für den GlyR	78
4.2 In unterschiedlichen Organen werden verschiedene Gephyrin-Varianten exprimiert	80
4.3 Anreicherung von GlyR Komplexen mit GST-b 49	82
4.4 Gephyrin bindet Mikrotubuli ohne die Map2/Tau-homologe Region	83
4.5 Die Epitopspezifität des Antikörpers mAb5	84
4.6 Die Autoaggregationsdomänen Gephyrins	85
4.7 Expression der GlyR-Bindungsstelle Gephyrins in Neuronen	89
5. LITERATUR	91
6. ZUSAMMENFASSUNG	110
7. ABKÜRZUNGEN	112

1. Einleitung

1.1 Die Entdeckung der Synapsen, ein historischer Überblick

Im Altertum wurden Nerven als Gänge angesehen, die eine vom Gehirn sezernierte Flüssigkeit in die Peripherie weiterleiten. Die zelluläre Struktur des Nervensystems wurde erst im Zuge der sich entwickelnden Zellenlehre (Schleiden, 1842; Schwann, 1839) erkannt. Golgi (1885) ermöglichte durch seine Färbemethode eine detaillierte Beschreibung von Neuronen und deren Kontaktstellen („Synapsen“, Sherrington um 1900). Dies führte schließlich zur Neuronentheorie, wonach Neurone die fundamentale Übertragungseinheit im Nervensystem sind. Heute ist klar, daß über 10^{15} Synapsen die etwa 10^{12} Nervenzellen des menschlichen Gehirns verschalten. Erst vor etwa fünfzig Jahren wurde deutlich, daß der synaptischen Übertragung zwei unterschiedliche Mechanismen, ein elektrischer und ein chemischer, zugrunde liegen. Mit der Entwicklung molekularbiologischer und biochemischer Methoden im Laufe der letzten Jahrzehnte konnten erstmals einzelne Bestandteile von Synapsen identifiziert und charakterisiert werden. So konnte 1981/82 der Glyzin-Rezeptor (GlyR) von Pfeiffer et al. (1982) als erster Neurotransmitter-Rezeptor des zentralen Nervensystems (ZNS) aufgereinigt werden.

1.2 Die synaptische Signalübertragung

1.2.1 Die elektrischen Synapsen

Die Poren von Gap Junctions, sog. Connexone, verbinden an elektrischen Synapsen das Zytoplasma zweier Nervenzellen und ermöglichen so einen bidirektionalen Ionenstrom und den Austausch von Signalmolekülen. Bei Weiterleitung eines Aktionspotentials permeieren Ionen von der prä- in die postsynaptische Zelle und führen dort fast verzögerungsfrei zu einer Depolarisation, auch unterschwellige Signale werden weitergeleitet. Dies entspricht der passiven Leitung von lokalen unterschweligen Signalen des Axons und wird daher als elektrotone Übertragung bezeichnet (Furshpan und Potter, 1957, 1959). So können elektrisch gekoppelte Motoneurone schnell und synchron Signale übertragen.

1.2.2 Die chemischen Synapsen

Die häufigste Form der Signalübertragung im Nervensystem ist die chemische. Ein präsynaptisches Aktionspotential führt dabei zur Freisetzung eines Botenstoffes, des Neurotransmitters, aus Vesikeln der Präsynapse. Dieser diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Für die schnelle Übertragung sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, sog. ionotrope Neurotransmitter-Rezeptoren, verant-

wortlich. Sie depolarisieren oder hyperpolarisieren die Zelle je nach Ionenselektivität und lösen so ein exzitatorisches oder inhibitorisches Potential aus. An der postsynaptischen Membran liegen diese Rezeptoren aggregiert, als „Cluster“, vor. Metabotrope Neurotransmitter-Rezeptoren wirken dagegen langsamer und indirekt über intrazelluläre Signalkaskaden auf Ionenkanäle ein und haben meist eine modulierende Funktion. Die Signalübertragung an chemischen Synapsen ist unidirektional, die synaptische Zeitverzögerung erheblich; es können vielfältige Regulationsprozesse stattfinden.

Anfänglich angelegte synaptische Kontakte können ortsgerecht und stabil sein, in manchen Regionen des Nervensystems werden sie aber zeitlebens in starkem Maße umarrangiert oder eliminiert. Die Effizienz einer Synapse hängt von der präzisen topographischen Gegenüberstellung und funktionellen Abstimmung der prä- und postsynaptischen Membrankomponenten ab. Die Ausbildung von bis zu 10^5 Synapsen erfordert daher hochpräzise Kommunikation zwischen innervierender und nachgeschalteter Zelle. Hierzu sind fein abgestimmte Regulationsmechanismen bei der Ausbildung und Stabilisierung der postsynaptischen Membranspezialisierungen nötig. Dies ist eine der Grundlagen für ein hohes Maß an Plastizität innerhalb eines neuronalen Netzwerks.

Im Folgenden werden die wichtigsten Forschungsarbeiten über die Organisation von postsynaptischen Membranen und die Aggregation von Neurotransmitter-Rezeptoren und deren funktioneller Relevanz zusammengefasst:

1.3 Die postsynaptische Membran der neuromuskuläre Endplatte

Die meisten Untersuchungen über postsynaptische Membranspezialisierungen wurden an der neuromuskuläre Endplatte (NMJ) des Skelettmuskels durchgeführt. Sie ist damit ein wichtiges Modellsystem für alle postsynaptischen Membranen. Auf weniger als 0,1 % der Plasmamembran sind ca. 95 % der membranständigen Acetylcholinrezeptoren (AChR) konzentriert (Fertuck und Salpeter, 1974). Zu dieser Konzentrierung kommt es erst im Laufe der Innervierung von Muskelfasern durch Motoneurone (Apel und Merlie, 1995). Sobald der Wachstumskegel eines Motoneurons auf einen neu formierten Myotubus trifft, beginnt die synaptische Übertragung. Im Laufe einer Woche bildet sich dann eine Synapse aus. Deren stereotype Lage wird wahrscheinlich durch die koordinierte Wachstumsbewegung von Muskel und Nerv bestimmt (Bennett und Pettigrew, 1976).

Ein Schlüsselereignis bei der Formierung der postsynaptischen Membranspezialisierung ist die Umverteilung bzw. Konzentrierung von AChR, das sog. Clustering. Die Anreicherung der von den Myotuben exprimierten AChR-Untereinheiten an der Synapse wird vom Motoneuron über drei Signale gesteuert:

Zum einen führt die Sekretion von Neuregulinen aus dem Motoneuron nach deren Interaktion mit den Rezeptoren Erb2/3/4 zu einer Signalkaskade über Ras/MAP-Kinasen bzw.

über Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PIP3-Kinasen) zu einer Induktion der AChR-Genexpression in synapsennahen Kernen der multinukleären Myotuben (Falls et al., 1993; Jo et al., 1995; Sanes, 1997; Simon et al., 1992; Altiok et al., 1995; Lemke, 1996; Si et al., 1996; Tansay et al., 1996).

Das zweite Signal ist Acetylcholin (ACh). Dieses aktiviert den AChR und generiert damit einen spannungs- und kalziumabhängiges Signal, das zur Inhibition von AChR-Genexpression in synapsenfernen Kernen führt: Eine Denervierung der Muskelfasern oder eine pharmakologische Blockade der AChR führt zu einer Erhöhung der AChR-Genexpression in synapsenfernen Kernen (Berg und Hall, 1975, Merlie et al., 1984).

Schließlich wird die Akkumulation von membranständigem AChR durch neuronal exprimiertes Agrin initiiert (McMahan, 1990; Burgess et al., 1999). Dieses Heparansulfat-Proteoglykan wird von Motoneuronen in die Basallamina des synaptischen Spalts sezerniert (Reis et al., 1992) und spielt eine Schlüsselrolle bei der Organisation der postsynaptischen Spezialisierung (McMahan, 1990). So zeigen Agrin-defiziente Mäuse eine erhebliche Reduktion von AChR-Aggregaten an postsynaptischen Membranen (Gautam et al., 1996), Agrin alleine kann die Aggregation von AChR in kultivierten Myotuben auslösen (Campanelli et al., 1991; Tsim et al., 1992). Hierfür sind die globulären Domänen in der C-terminalen Region von Agrin essentiell (Cornish et al., 1999).

Als Agrin-Rezeptor auf der postsynaptischen Membran gilt eine muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK). So weisen MuSK-defiziente Mäuse erhebliche Defekte der postsynaptischen Spezialisierung, ähnlich den Agrin-defizienten, auf (DeChiara et al., 1996). Ausserdem konnte gezeigt werden, daß Agrin die Phosphorylierung von MuSK und der β -Untereinheit des AchR in Myotuben induzieren kann (Glass et al., 1996; Wallace et al., 1991; Fuhrer und Hall, 1996; Apel et al., 1997). Allerdings konnte bislang noch keine direkte Interaktion zwischen Agrin und MuSK nachgewiesen werden. Daher geht man von weiteren, noch unbekanntem signaltransduzierenden Faktoren aus (Colledge und Froehner, 1998).

Die Phosphorylierung von MuSK ist essentiell für die Aggregation des AChR (Watty et al., 2000; Herbst und Burden, 2000), bei der die extrazelluläre Region von MuSK eine wichtige Rolle spielt (Apel et al., 1997). Das intrazelluläre Substrat von MuSK ist eine Src-Kinase (Fuhrer und Hall, 1996; Glass et al., 1997; Fuhrer et al., 1997), die an den AChR bindet und diesen phosphoryliert. Dies ist offensichtlich weniger für die Verankerung des Rezeptors an der Synapse, als für die Stabilisierung der Rezeptoraggregate notwendig (Mayer et al., 1998; Mohamad und Swope, 1999; Mohamed et al., 2001; Smith et al., 2001).

Bei der Agrin-vermittelten Aggregation des AChR sind noch weitere Faktoren beteiligt. Dazu gehören Laminin oder $\alpha 7\beta 1$ Integrin, ebenso wie die Neuramidase, Cdc42, die Agrin-abhängige Aktivierung der kleinen G-Proteine Rac (Westen et al., 2000) und erhöhte Kalziumkonzentrationen (Parkhomovsky et al., 2000 a/b; Grow et al., 1999; Grow et al., 2000; Burkin et al., 1998; Burkin et al., 2000). Allerdings kann unabhängig von Agrin und MuSK

ein Mechanismus postuliert werden, bei dem Laminin und α -Dystroglycan die Aggregation von AChR vermitteln (Montanaro et al., 1998; Sugiyama et al., 1997).

Ein weiteres an der Agrin-vermittelten AChR-Aggregation beteiligtes Protein ist Rapsyn. Es ist ein peripheres Membranprotein, das direkt an die große intrazelluläre Domäne der β -Untereinheit des AChR bindet und den Rezeptor an der postsynaptischen Membran stabilisiert (Burden et al., 1983; Maimone und Engk, 1999; Wang, et al., 1999). Hierfür stellt die Zink-Finger-Domäne von Rapsyn eine wichtige Bindungsregion dar (Bezakova und Bloch, 1998). In nicht-muskulären Zellen wurde gezeigt, daß Rapsyn die laterale Umverteilung von AChR in Mikroaggregate an der Zelloberfläche induziert (Froehner et al., 1990; Phillips et al., 1991). Die mutmaßliche Funktion von Rapsyn als Ankerprotein steht im Einklang mit den Erkenntnissen aus Rapsyn-defizienten Mäusen. Bei diesen finden sich keine AChR-Aggregate mehr an der neuromuskulären Endplatte; auch andere Komponenten der postsynaptischen Membranspezialisierung, wie Utrophin, Dystroglycan und Erb-Kinasen, sind nicht mehr akkumuliert (Gautam et al., 1995). Allerdings sind bei diesen Mäusen weiterhin MuSK und verschiedene präsynaptische Komponenten synaptisch lokalisiert. Unterstützt wird diese Beobachtung durch Studien von Gautam et al. (1999), die zeigten, daß Rapsyn nachgeschaltet von MuSK bei der AChR-Aggregation agiert. Rapsyn ist offensichtlich verantwortlich für die Verankerung des AChR über den Dystroglycan-Proteinkomplex mit dem Aktin-Zytoskelett (Fuhrer et al., 1999; Glass und Yancopoulos, 1997).

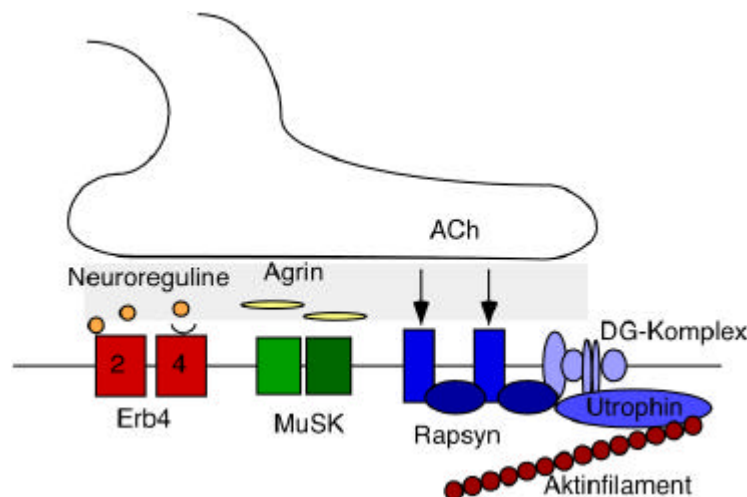


Abb. 1 Schematische Darstellung des Proteinkomplexes an der neuromuskulären Endplatte.

Dargestellt sind die wichtigsten Komponenten der postsynaptischen Membran an der Neuromuskulären Endplatte. Sezerniertes Agrin und Neureguline induzieren über die Aktivierung eines unbekanntes Agrin-Rezeptors und MuSK bzw. Erb4-Rezeptoren die Aggregation des AChR. U.a. über den Dystroglycan-Komplex mit Utrophin wird der Cluster am Zytoskelett verankert. Aus Gründen der Übersicht wurde auf weitere Details verzichtet.

Neuere Arbeiten zeigen allerdings, daß Myotuben ohne Innervation von Motoneuronen und ohne Expression von neuralem Agrin in frühen embryonalen Stadien immer noch in der Lage sind kleinere AChR-Aggregate zu bilden. Auch eine synapsennahe Expression von AChR-mRNA konnte beobachtet werden. MuSK- und Rapsyn defiziente Muskeln konnten aber diese AChR-Cluster nicht mehr ausbilden (Lin et al., 2001; Yang et al., 2001). Offensichtlich ist die Bildung dieser kleinen Aggregate zwar von Agrin unabhängig, MuSK und Rapsyn werden aber benötigt.

Bei der Aggregation des AChR entsteht also zunächst über eine Interaktion mit der Basallamina eine Matrix aus MuSK und anderen postsynaptischen Faktoren, die anschliessend Rapsyn bindet, welches dann die bereits in der Membran vorliegenden AChR rekrutiert und am Zytoskelett verankert (Apel et al., 1997). Das Clustering wird an dieser Synapse also durch Rapsyn vermittelt.

1.4 Exzitatorische postsynaptische Membranspezialisierungen

Glutamat ist der wichtigste erregende Transmitter im ZNS. Dessen Rezeptoren (GluRs) werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt, die ionotropen (iGluR) und die metabotropen (mGluR) Glutamatrezeptoren. Charakteristisch für erstere sind vier Membrandomänen und ein langer extrazellulärer N-Terminus, der für die Ligandenbindung verantwortlich ist (Wo und Oswald, 1995). Aufgrund pharmakologischer Eigenschaften werden iGluRs in drei Klassen unterteilt, die NMDA-Rezeptoren (**N-Methyl-D-Aspartat**) mit seinen NR1 und NR2-Untereinheiten, die AMPA-Rezeptoren (**α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolpropionica-**cid) mit den Untereinheiten GluR1-4 und die Kainat-Rezeptoren (Hollmann und Heinemann, 1995). Die Übertragung an exzitatorischen Synapsen wird primär von NMDA- und AMPA-Rezeptoren bewerkstelligt, die meist gemeinsam in einer gemischten postsynaptischen Dichte (PSD) vorliegen.

Bei der Entstehung dieser Synapsen spielt neuronale Aktivität eine große Rolle (Craig et al., 1998). Auch extrazelluläre Faktoren konnten identifiziert werden. Diese sind u.a. neuronal activity-regulated pentraxin, (Narp) und Neuroligine. Narp autoaggregiert und ist in der Lage, AMPA-Rezeptoren zu clustern (O'Brien et al., 1999). Möglicherweise wird Narp sekretiert, um die AMPA-Rezeptordichte zu erhöhen (Craig und Boudin, 2001). Neuroligine sind nach Sekretion in der Lage, eine präsynaptische Differenzierung vorgeschalteter Neurone zu induzieren (Scheiffele et al., 2000). Ob diese Faktoren die Synaptogenese exzitatorischer Synapsen einleiten, ist indes noch nicht geklärt. Über den Verlauf der Genese glutamaterger Synapsen liegen nur *in vitro* Daten vor. Demnach erscheinen die ersten NMDAR-Cluster in hippocampalen Kulturen erstmals nach zwei bis fünf Tagen *in vitro* und sind extrasynaptisch. Im Laufe von zwölf Tagen bilden sich die direkt am Dendriten lokalisierten Schaftsynapsen und erst nach drei Wochen Synapsen auf dornartigen Protuberantien des Dendriten (Dornen-

synapsen). AMPA-Rezeptoren liegen zunächst diffus in der Plasmamembran verteilt vor, Clustering, wie an reifen Synapsen *in vivo*, beginnt hier an Dornen schon nach neun bis zwölf Tagen. Typische gemischte Cluster bilden sich also erst nach etwa drei Wochen *in vitro*. Dies deutet auf unterschiedliche Mechanismen beim Transport und Clustering von AMPA- und NMDA-Rezeptoren hin (Rao, et al., 1998; Yakumi, et al., 1999; Lee und Sheng, 2000).

Die gereifte Postsynapse ist auf dem Dorn lokalisiert. Nahe der Membran befindet sich eine proteindichte Region, die postsynaptische Dichte (PSD). Diese wird aus den Neurotransmitter-Rezeptoren mit den Molekülen des Clusters sowie schwächer assoziierten Proteinen gebildet. An dieser Synapse sind die AMPA-Rezeptoren an der schnellen Übertragung beteiligt. Erst bei wiederholter Stimulation und in Anwesenheit von Glutamat und Glyzin werden vermehrt die spannungs- und ligandengesteuerten NMDA-Rezeptoren aktiviert, die damit eine späte Phase zum exzitatorischen postsynaptischen Potential (EPSC) beisteuern. Bei einer vorausgehenden Depolarisation wird dabei ein Mg^{2+} -Molekül, welches den Kanal des NMDA-Rezeptors im Ruhezustand blockiert, durch elektrostatische Abstoßung aus dem Kanal entfernt, der dann permeabel für Ca^{2+} , Na^{+} und K^{+} ist. Durch das einströmende Ca^{2+} werden verschiedene Second-messenger-Kaskaden aktiviert, die in Prozesse der synaptischen Plastizität, wie Langzeitdepression (LTD) oder Langzeitpotenzierung (LTP) involviert sind. Diese wiederum sind in übergeordnete Prozesse wie Lernen und Gedächtnis einbezogen und bedingen auch eine Reorganisation der PSD. Organisation und Rearrangierung der PSD sind also aktivitätsabhängig.

Proteomische Analysen konnten zeigen, daß die PSD sehr viele Faktoren enthält (Husi et al., 2000; Wakionis, et al., 2000). Eine zentrale Rolle bei Synaptogenese und der Bildung des Clustergerüsts wie auch bei Signaltransduktionsprozessen und Reorganisation spielen dabei Proteine, die eine (PDZ) Domäne (PSD-95/SAP-90, Disc-large, ZO-1) aufweisen (Kennedy, 1997; Hsueh und Sheng, 1998; Garner et al., 2000). Das namensgebende Protein PSD-95 ist eine membranassoziierte Guanylatkinase (MAGUK). Es umfaßt wie alle Proteine dieser Familie mehrere PDZ-Domänen und ferner zwei weitere Protein-Protein Interaktionsdomänen: eine Src-Homologie-3 (SH3) und eine Guanylatkinase- (GK) Domäne (Cho et al., 1992; Kistner et al., 1993 Stefan). Diese Domänen spielen eine wichtige Rolle bei dem Erhalt der strukturellen Integrität des Clusters, der Synaptogenese, bei Signaltransduktion und der Reorganisation der PSD.

Mitglieder der MAGUK-Familie sind strukturelle Bestandteile des Clusters: PDZ-Proteine wie PSD-95, SAP-97 und Chapsyn110/PSD-93 binden an eine konservierte Domäne im distalen Ende der NR2-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (Leonard et al., 1998; Kornau et al. 1995; Kim et al., 1996; Niethammer et al., 1996; Cabral et al., 1996; Doyle et al., 1996). Der Verlust dieser Funktion führt zu einer verringerten Stabilität der NMDA-Rezeptoren an der Synapse. Die Bindung von PSD-95 über GKAP (Guanylate kinase-associated protein; Kim et al., 1997; Takeuchi et al., 1997) an einen Rezeptor-übergreifenden Proteinkomplex,

den Shank-Komplex (Naisbitt et al., 1999), und die Verbindung der NR1-Untereinheit des Rezeptors mit F-Actin über Actinin (Allison et al., 1999) verknüpfen den NMDA-Rezeptor stabil an der Synapse (Tomia et al., 2001). Über Shank werden auch mGluRs an der Synapse immobilisiert (Naisbitt et al., 1999; Übersicht in Sheng und Pak, 2000). Zudem könnte PSD-95 NMDA-Rezeptoren indirekt, über das Mikrotubuli-assoziierte Protein CRIPT, an das Zytoskelett binden (siehe auch Abb. 2). Die Fähigkeit von PSD-95 zur Autoaggregation wird als wichtig für das Clustering der NMDA-Rezeptoren an der Membran angesehen (Shin et al., 2000). Allerdings haben Mausmutanten mit Deletionen in der NR2-Untereinheit, die zum Verlust der Bindungsfähigkeit an PSD-95 führen, und PSD-95 defiziente Mäuse keine signifikanten oder nur schwache Beeinträchtigungen der NMDA-Rezeptor-Aggregation zur Folge (Sprengel et al., 1998; Mori et al., 1998; Migaud et al., 1998). Die Gerüstfunktionen dieser Proteine können offenbar von anderen Faktoren übernommen werden.

Auch für eine Rolle von PSD-95 bei der Synaptogenese gibt es Hinweise. So wird PSD-95 in hippocampalen Neuronen zeitlich vor den NMDA-Rezeptoren an der Synapse angereichert (Rao et al., 1998) und ist in der Lage, in nicht-neuronalen Zellen das Clustern von heterooligomeren NMDA-Rezeptoren in Mikroaggregaten zu induzieren (Kim et al., 1998; Hsueh et al., 1997). Eine Überexpression von PSD-95 in hippocampalen Neuronen führt zur schnelleren Reifung exzitatorischer Synapsen (Husseini et al., 2000).

PSD-95 könnte sogar an der korrekten Apposition von Post- und Präsynapse involviert sein, indem es an postsynaptische Neureguline bindet, die wiederum an präsynaptische Neurexine binden (Ire et al., 1997; Scheiffele et al., 2000). Allerdings kann bei PSD-95 defizienten Mäusen keine abnormale synaptische Entwicklung beobachtet werden. Offensichtlich kann dessen Funktion von anderen Faktoren kompensiert werden.

Eine weitere Rolle kommt PSD-95 bei Prozessen der Signaltransduktion zu. So konnte gezeigt werden, daß PSD-95 über die Bindung an die Stickoxid-Synthase (NOS; Brenman et al., 1996; Jaffrey et al., 1998) die Aktivierung des Calmodulin-abhängigen Enzyms nach Ca^{2+} -Einstrom durch den NMDA-Rezeptor verstärkt (Sattler et al., 1999). Auf diese Weise ist PSD-95 in die Signaltransduktion involviert, die durch den Einstrom von Ca^{2+} nach Aktivierung des Rezeptors zu LTD bzw LTP führen. Diese Signalkaskaden schließen darüber hinaus Ras-GTPasen (Chen et al., 1998; Kim et al., 1998) ebenso ein wie die Ca^{++} -Calmodulin-abhängige Kinase II (Miller und Kennedy, 1985). Unterstützt wird diese Sichtweise durch die Analyse von PSD-95-defizienten Mäusen, die verstärkte LTP und keine LTD mehr aufweisen (Migaud et al., 1998). Die detaillierten Zusammenhänge sind allerdings noch nicht geklärt.

Über das PDZ-Domänen haltige Membranprotein Stargazin ist PSD-95 direkt mit AMPA-Rezeptoren der gleichen Synapse verbunden. Bei der Induktion von LTP werden diese exozytiert, wodurch die AMPA-Rezeptordichte in der Membran ansteigt. Bei Induktion von LTD dagegen werden sie endozytiert und können daraufhin abgebaut oder reinseriert werden. Beide Mechanismen sind von der Aktivierung der AMPA-Rezeptoren und der

synaptischen Ca^{2+} -Konzentration abhängig. Synapsen, die nur noch NMDA- und keine AMPA-Rezeptoren mehr enthalten, sind ohne Aktivität, ‚stille Synapsen‘. Bei Induktion von LTP können dort wieder AMPA-Rezeptoren durch Exozytose eingebaut werden. Die Halbwertszeiten dieser beiden Rezeptorklassen an der Synapse unterscheiden sich wesentlich: Im Gegensatz zu NMDA-Rezeptoren sind AMPA-Rezeptoren eine hochdynamische Komponente der PSD (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995; Durand et al., 1996; Malenka und Nicoll, 1999; Lüscher et al., 1999; Beattie et al., 2000; Ehlers, 2000; Lin et al., 2000; Malinow et al., 2000). Dies bedingt eine Reorganisation der komplexen postsynaptischen Dichte (Carroll et al., 2001). Auch hieran sind Proteine beteiligt, die PDZ-Domänen beinhalten.

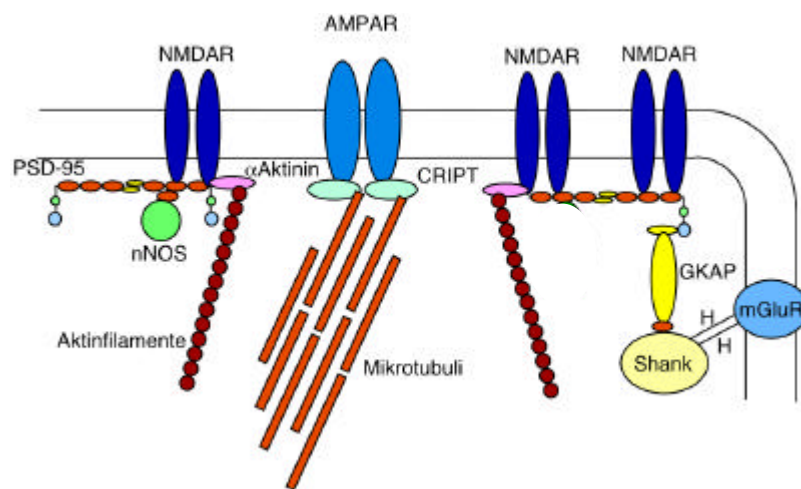


Abb. 2: Schematische Darstellung des Proteinkomplexes um den NMDA-Rezeptor.

Dargestellt ist der Proteinkomplex an der exzitatorischen Synapse mit NMDA-, AMPA- und mGlu-Rezeptor. Der NMDAR wird über PSD-95 und GKAP an den Shank-Proteinkomplex verankert. Zudem kann der NMDAR auch über α -Aktinin an Aktinfilamente des Zytoskeletts verbunden werden. Über PSD-95 interagiert er mit Proteinen der Signaltransduktion (z.B. nNOS). Der AMPAR bindet über CRIPT direkt an Mikrotubuli. Metabotrope Glutamaterezeptoren (mGluR) als Rezeptoren mit überwiegend modulativer Funktion, sind über Shank an die PSD gekoppelt. Auf weitere Details wurde aus Übersichtsgründen verzichtet.

Die meisten AMPA-Rezeptoren besitzen mindestens eine GluR1- und eine GluR2-Untereinheit. Der Rezeptor ist mit seiner GluR1-Untereinheit über SAP-97, einer MAGUK, in der PSD verhaftet, mit seiner GluR2-Untereinheit über die Multi-PDZ-Proteine GRIP/ABP und PICK1 (Leonard et al., 1998; Dong et al., 1997; Srivastava et al., 1998; Xia et al., 1999). Diese Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei Endo- und Exozytose des Rezeptors und damit bei der Entstehung von LTD und LTP. Die Mechanismen unterscheiden sich in den untersuchten Zelltypen. Zur Endozytose bei LTD ist in jedem Falle eine Phosphorylierung des Rezeptors und eine Erhöhung der synaptischen Ca^{2+} -Konzentration notwendig, vermittelt unter

anderem über den NMDA-Rezeptor. Auch hierbei spielen PDZ-Proteine eine entscheidende Rolle (Hayashi et al., 2000; Beattie et al., 2000; Ehlers et al., 2000). Zur Exozytose bei Induktion von LTP ist eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch Aktivierung des NMDA-Rezeptors oder des AMPA-Rezeptors notwendig. Wichtige signaltransduzierende Faktoren sind hier die Calcium-Calmodulin-Kinase II (CaMKII), die Proteinkinase C (PKC) und SAP-97 (Daw et al., 2000; Shi et al., 1999; Hayashi et al., 2000).

In der postsynaptischen Dichte von exzitatorischen Synapsen finden sich sehr viele Proteine deren Domänen, z.B. PDZ, GK oder SH3-Domänen, sowohl an der Stabilisierung der Rezeptoren, als auch an Synaptogenese und Signaltransduktion in vielfachen Prozessen beteiligt sind. Von zentraler Bedeutung sind diese Domänen bei der Reorganisation der PSD im Verlauf der Induktion von LTD und LTP. Damit sind sie direkt in übergeordnete cerebrale Prozesse wie Lernen und Gedächtnis involviert.

1.5 Inhibitorische postsynaptische Membranspezialisierungen

Die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS sind γ -Amino-Buttersäure (GABA) und Glyzin. GABAerge Synapsen finden sich im gesamten ZNS, glyzinerge jedoch vor allem im Hirnstamm und Rückenmark (Malosio et al., 1991). Glyzin- (GlyR) und GABA_A -Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle und sind aus einem gemeinsamen Vorläufer mit dem AChR entstanden (Betz et al., 1990). Sie haben vier Transmembrandomänen (TM) und eine große intrazelluläre Schlaufe zwischen TM drei und vier (Grenningloh et al., 1987).

Der Glyzinrezeptor ist ein Cl⁻-Ionenkanal, der sich aus zwei homologen Untereinheiten, der α -Untereinheit (48 kDa) und der β -Untereinheit (58 kDa), im Verhältnis 3:2 zu einem pentameren Komplex zusammensetzt (Pfeiffer et al., 1982; Langosch et al., 1988). Vier verschiedene α -Untereinheiten ($\alpha 1-4$) und eine β -Untereinheit sind bekannt (Grenningloh et al., 1987, 1990; Kuhse et al., 1990; Matzenbach et al., 1994), deren Diversität durch alternatives Spleißen erhöht wird (Malosio et al., 1991a; Kuhse et al., 1991). Im Laufe der Ontogenese verändert sich die Zusammensetzung des GlyR. Dabei wird die pränatal exprimierte $\alpha 2$ -Untereinheit postnatal je nach Hirnregion durch $\alpha 1$ bzw. $\alpha 3$ ersetzt. Die GlyR β -Untereinheit wird dagegen ab frühen embryonalen Stadien exprimiert und ist im Gegensatz zu den verschiedenen α -Untereinheiten im gesamten ZNS verbreitet (Malosio et al., 1991b). Es wird eine Komplexierung mit anderen Rezeptoren vermutet (Kuhse et al., 1995). Ähnlich wie bei exzitatorischen Synapsen sind die Rezeptoren auch hier an der postsynaptischen Membran aggregiert. Dies hat offensichtlich einen Einfluß auf die Affinität des Rezeptors (Taleb und Betz, 1994)

Die α - und β -Untereinheiten weisen auch funktionelle Unterschiede auf. Während die α -Untereinheit die Bindungsstelle für den Liganden trägt (Schmieden et al., 1989), kommen der β -Untereinheit strukturelle Funktionen zu, welche die Kanaleigenschaften (Pribilla et al., 1992), die Assemblierung (Kuhse et al., 1993) und die Verankerung am subsynaptischen Zytoskelett (Meyer et al., 1995) betreffen.

Bei der Aufreinigung des GlyR am immobilisierten Antagonisten Strychnin wurde Gephyrin, ein peripheres Membranprotein von 93 kDa, mit aufgereinigt (Pfeiffer et al., 1982; Schmitt et al., 1987). Biochemische und immunhistochemische Untersuchungen zeigten dessen Lokalisierung in der postsynaptischen Membran der glyzinerger Synapse (Schmitt et al., 1987; Triller et al., 1985; Triller et al., 1987). Die Untersuchung des Gens von Gephyrin führte zur Entdeckung von bislang 31 Exons, die in hohem Maße alternativem Spleißen unterliegen (Prior et al., 1991; Heck et al., 1997; Meyer et al., 2000; Ramming et al., 2000). Wahrscheinlich sind bislang noch nicht alle Exons dieses Gens entdeckt.

Anhand biochemischer Bindungs- und heterologer Expressionsstudien konnte die GlyR β -Untereinheit als Bindungspartner der im ZNS hochexprimierten Gephyrin-Spleißvariante P1 identifiziert werden (Kirsch et al., 1995; Mayer et al., 1995). Dabei bewirkt die Koexpression von Gephyrin P1 in humanen embryonalen Nierenzellen eine Umverteilung von heterooligomeren GlyRs, die spezifisch in großen intrazellulären gephyrinreichen Aggregaten akkumulieren, ähnlich wie dies bei der Koexpression von PSD-95 und NMDA-Rezeptor beobachtet werden kann. Ebenso konnte gezeigt werden, daß ein chimärer NMDA-Rezeptor, der die Kernregion des Gephyrin-Bindemotives enthält, ebenfalls mit Gephyrin P1 koakkumuliert (Kins et al., 1999). Auch *in vitro* translatiertes Gephyrin zeigt sich in der Lage, an die GlyR-Bindungsstelle zu binden (Meier et al., 2000). Bindungsstudien konnten die Bindungsstelle auf einen Bereich von 49 Aminosäuren innerhalb der großen intrazellulären Schlaufe zwischen den TM 3 und TM4 der β -Untereinheit des GlyR eingrenzen (Mayer et al., 1995). Für die Bindung sind hydrophobe Aminosäurereste verantwortlich (Kneussel et al., 1999). Durch immobilisiertes Strychnin wird mit dem GlyR und Gephyrin auch Tubulin aufgereinigt (Kirsch et al., 1991). Biochemische Untersuchungen zeigten, daß Gephyrin positiv kooperativ mit hoher Affinität an polymerisiertes Tubulin bindet (Kirsch et al., 1991). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Gephyrin über die Bindung an die β -Untereinheit und an Mikrotubuli den GlyR mit dem Zytoskelett verankert.

Wichtige Erkenntnisse über die Synaptogenese glyzinerger Verschaltungen lieferten Untersuchungen von Primärkulturen aus dem Rückenmark embryonaler Ratten. Nach etwa sieben Tagen in Kultur werden glyzinerge Synapsen ausgebildet. Sowohl Gephyrin als auch GlyR werden dabei an postsynaptischen Spezialisierungen akkumuliert (Nicola et al., 1992; Kirsch et al., 1993). Die synaptische Aggregation von Gephyrin geht der von GlyR zeitlich voraus (Kirsch et al., 1993; Bechade et al., 1996). Möglicherweise bildet Gephyrin eine Bindematrix, an der später der GlyR akkumuliert. Eine Verminderung der Zahl der Gephyrinmo-

leküle in der Zelle durch Zugabe von spezifischen antisense-Oligonukleotiden hatte eine Reduktion der Anzahl von GlyR-Aggregaten zur Folge (Kirsch et al., 1993). Offensichtlich ist Gephyrin für die Ausbildung glyzinerger postsynaptischer Membranspezialisierungen erforderlich. Behandlung dieser Kulturen mit Demecolzin oder Cytochalasin D zur Auflösung des Aktin- bzw. Microtubuli-Zytoskeletts hatte drastische Veränderungen in der Anzahl und Morphologie postsynaptischer Gephyrin-GlyR Culster zur Folge. Mikrotubuli und Aktinfilamente sind somit für die Aggregation des GlyR von wesentlicher Bedeutung (Kirsch und Betz 1995). Durch die Zugabe von Strychnin ebenso wie durch die Zugabe von spezifischen Blockern von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen kann die synaptische Aggregation von GlyR inhibiert werden (Kirsch und Betz, 1998; Lévi et al., 1998). Die Akkumulation von GlyR an der Postsynapse ist also aktivitätsabhängig. In Kulturen spinaler Neurone von Gephyrin-defizienten Mausmutanten konnte zwar GlyR in der Membran nachgewiesen werden; dieser aggregiert aber nicht an der Synapse, sondern liegt in sog. Mikroclustern in der Membran vor (Feng et al., 1998).

Diese Ergebnisse legen nahe, daß Gephyrin eine Schlüsselrolle in der Ontogenese glyzinerger Synapsen zukommt, indem es aktivitätsabhängig die Aggregation des GlyR und dessen Verankerung am Zytoskelett vermittelt (Kirsch und Kröger, 1996).

Über die weitere Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte glyzinerger Synapsen sind in den letzten Jahren einige Arbeiten veröffentlicht worden. In diesem Zusammenhang sind vor allem Faktoren und Domänen interessant, die ähnlich wie bei exzitatorischen Synapsen Bindungen und Signaltransduktion vermitteln. So konnten zusätzliche Proteine als Bindungspartner für Gephyrin identifiziert werden: Raft1 (**rapamycin and FKB12 target protein**) ist in Prozesse involviert, welche die Translation von mRNA kontrollieren (Sabatini et al., 1999). Da GlyR α 1-mRNA an der Synapse lokalisiert ist, kann spekuliert werden, ob eine lokale Translation dieser Untereinheit unter Beteiligung der Bindung von Raft1 an Gephyrin reguliert wird. Durch Affinitätsaufreinigung konnte die Bindung eines weiteren Proteins an Gephyrin, Profilin, nachgewiesen werden (Mammoto et al., 1998). Profilin kann an Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) binden und stimuliert die Umsetzung von G-Aktin in filamentöses Aktin (Finkel et al. 1994). Zudem nimmt man an, daß Profilin bei Endozytose und Vesikelrecycling beteiligt ist. Ob Profilin bei der Aggregation des GlyR über die Organisation des Aktin-Zytoskeletts bzw. in Prozesse des Gephyrin oder GlyR-,Turnovers' involviert ist, läßt sich derzeit nur spekulieren.

Durch einen Zwei-Hybrid-Screen konnte ein weiteres Gephyrin-Bindeprotein gefunden werden: Collybistin I und II (Kins et al., 2000) Collybistin ist ein GDP/GTP-Exchange Factor (GEF), der kleine G-Proteine der Rho-Familie aktiviert. Das Protein beinhaltet eine charakteristische dbl-Homologie (DH) - und eine Pleckstrin-Homologie (PH) - Domäne. Die Spleißvariante Collybistin II weist zusätzlich eine Src-Homologie 3 (SH3)- Domäne auf (Kins et al., 2000). Das humane Homolog von Collybistin, hPEM-2, aktiviert die GTPase Cdc42, die ein

Schlüsselfaktor bei der Organisation des Aktinzytoskelettes ist (Reid et al., 1999). Das hirnspezifische Collybistin wird nur in postmitotischen Neuronen exprimiert (Kneussel et al., 2001) und rekrutiert Gephyrin zu submembranen Mikroaggregaten nach heterologer Expression in HEK-Zellen (Kins et al., 2000). Über eine mögliche Rekrutierung von Cdc42 über Gephyrin und Collybistin an die Synapse könnten wichtige Regulationsprozesse gesteuert werden. Diese mögen die Organisation des Aktinzytoskeletts ebenso einschließen wie eine Regulation der Gentranskription nach Aktivierung des Rezeptors.

Möglicherweise bildet Gephyrin aktivitätsabhängig Aggregationskerne in der postsynaptischen Membran aus, an denen GlyRs aggregieren und somit einen Cluster bilden. Über die Bindung von Collybistin könnte eine Aktivierung von Cdc42 eingeleitet werden, die dann eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zur Folge hat. Hierbei könnte Profilin einen Beitrag leisten. Über diesen Signaltransduktionsweg könnte der Rezeptorcluster schließlich durch direkte oder indirekte Bindung von Aktin an Gephyrin mit dem Aktin-Zytoskelett vernetzt werden.

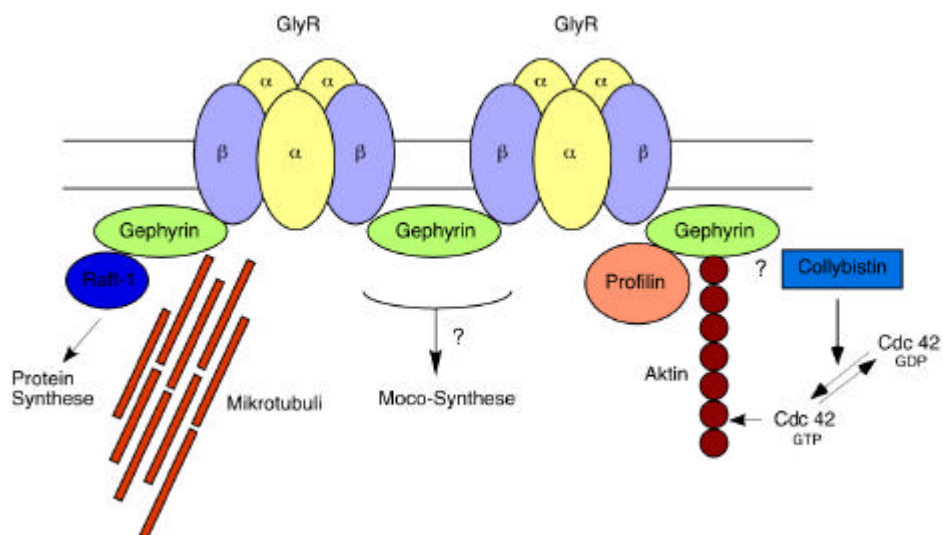


Abb. 3: Schematische Darstellung des Clusters an der glyzineren inhibitorischen Synapse.

Dargestellt ist der Proteinkomplex um den GlyR, der über Gephyrin an Mikrotubuli verknüpft ist. Auch an Aktinfilamente bindet Gephyrin, möglicherweise über ein Adaptorprotein. Über die Bindung Gephyrins an Raft1 könnte die Proteinbiosynthese beeinflusst werden. Die Bindung an Profilin könnte die Organisation des Aktin-Zytoskeletts beeinflussen. Collybistin beeinflusst über Cdc42 möglicherweise ebenfalls das Zytoskelett. Auf weitere Details ist aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet worden.

Die Expression Gephyrins ist nicht auf das ZNS beschränkt. Offensichtlich wird Gephyrin ubiquitär exprimiert. Einige Regionen des Gephyrin-Genes weisen Homologien zu anderen Proteinen auf. Sequenzhomologien zu bekannten Bindungsdomänen wie z.B. PDZ oder SH3, wie sie an exzitatorischen Synapsen vorkommen, liegen jedoch nicht vor. Allein eine

schwache Homologie zur Mikrotubuli-Bindungsstelle von Tau und Map2 (Microtubuli associated protein) konnte in Exon 14 gefunden werden (Ramming et al., 2000). Der N- und der C-terminale Abschnitt Gephyrins sind homolog zu Proteinen von *E.coli* (MogA, MoeA), *Drosophila* (Cinnamon) und *Arabidopsis* (Cnx1), die in die Synthese des Molybdän-Kofaktors (MoCo) involviert sind. MoCo ist die prosthetische Gruppe der meisten Molybdo-Enzyme, welche von mindestens sechs Genprodukten synthetisiert wird (für eine Übersicht siehe Reiss, 2000). MogA, ebenso wie Gephyrin ist dabei offensichtlich für die Insertion des Molybdates in das Pterin-Gerüst verantwortlich (Stallmeyer, et al., 1999; Hasona et al., 1989). Humane MoCo-Defizienz ist eine seltene angeborene Krankheit, die durch den Verlust der Aktivität der Sulfit- Xanthin und Aldehyd-Oxidase gekennzeichnet ist, aber auch neurologische Abnormalitäten wie Wachstumsverzögerung des Hirnes und Anfälle mit sich zieht. Da keine Therapie verfügbar ist, sterben die Patienten meist neonatal (Rajagopalan und Johnson, 1992). Der N-terminale Teil Gephyrins ist in der Lage in MogA-defizienten *Arabidopsis* die MogA-Funktion zu komplementieren (Stallmeyer et al., 1999). Gephyrin-defiziente Mäuse zeigen keine Aktivität der Molybdo-Enzyme mehr (Feng et al., 98).

Bei Gephyrins zeigt sich also eine ungewöhnliche Dualität der Funktionen. Zum einen als synaptisches Protein mit zentraler Bedeutung und zum anderen als Faktor, der in einen biochemischen Syntheseweg involviert ist.

Eine synaptische Funktion erfüllt Gephyrin aber auch in dem neben dem GlyR wichtigsten zentralnervösen inhibitorischen System: es befindet sich an postsynaptischen Membranen GABA_A-erger Synapsen.

GABA-Rezeptoren werden aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften in die Klassen A, B und C eingeteilt (Borman, J., 2000). GABA_A-Rezeptoren wiederum können sieben Familien mit zahlreichen Untereinheiten (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, sowie die δ , ϵ , θ und π) zugeordnet werden (Rabow et al., 1996; Davis et al., 1997; Hedblom & Kirkness, 1997; Bonnert, T., 1999). Sie zeigen weitgefächerte räumliche und zeitliche Verbreitung im ZNS. Viele Neurone exprimieren verschiedene GABA_A-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Laurie et al., 1992; Fritschy & Mohler 1995). Wahrscheinlich bestehen die meisten Rezeptoren aus $2\alpha:2\beta:1\gamma$. Die Funktionen der anderen Untereinheiten sind noch nicht bekannt, sie sind relativ selten exprimiert. Die Bedeutung dieser Diversität ist unbekannt, möglicherweise spielen funktionelle Unterschiede eine Rolle (Moss et al., 2001).

Gephyrin und GABA_A-Rezeptoren kolokalisieren in verschiedenen Hirnregionen wie Rückenmark, Retina oder Bulbus olfactorius (Cabot et al., 1995; Sassoe-Pogneto et al., 1995; Sassoe und Fritschy, 2000). Dabei interagiert Gephyrin mit α 2, β 2/3, γ 2 Rezeptorsubtypen. Mäuse, die keine γ 2-Untereinheit haben, zeigen eine Reduktion der GABA_A-Cluster. Allerdings kann diese die γ 3-Untereinheit in einigen Fällen kompensieren. Eine Blockade der Translation von Gephyrin mit spezifischen Oligonukleotiden hat einen ähnlichen Effekt wie

der Verlust der $\gamma 2$ -Untereinheit. So zeigen hippocampale Kulturen von Gephyrin^{-/-}-Mäusen weniger als 3 % GABA_A-Rezeptoren des $\alpha 2/\gamma 2$ - Subtyps (Essrich et al., 1998; Kneussel et al., 1999). Interessanterweise sind in organotypischen Kulturen der Retina von Gephyrin-defizienten Mäusen GABA_A-Rezeptor Cluster nur um etwa 50 % reduziert (Fischer et al., 2000). Dies deutet auf Gephyrin-unabhängige Mechanismen der Aggregation für bestimmte Subtypen hin. Zudem konnte gezeigt werden, daß die Auflösung von Mikrofilamenten und Mikrotubuli keinen Einfluß auf die Aggregation von GABA_A-Rezeptoren hat (Kirsch & Betz 1995; Allison et al., 2000). Glyzinerge und GABAerge Synapsen sind also unterschiedlich aufgebaut (s.u.). Bislang konnte keine Bindung von Gephyrin an GABA_A-Rezeptoren gezeigt werden. Möglicherweise bindet Gephyrin über ein Adaptorprotein an den Rezeptor. Bei einem Zwei-Hybrid-Screen mit der $\gamma 2$ -Untereinheit konnte GABARAP (GABA-Rezeptor Associated Protein) gefunden werden. GABARAP ist mit Vesikeln des Endosoms assoziiert und spielt eine Rolle bei der konstitutiven Internalisierung und Exozytose von GABA_A-Rezeptoren (Moss und Smart, 2001). Dieses Protein ist ebenfalls in der Lage, an Gephyrin zu binden. Allerdings unterscheidet sich seine subzelluläre Verteilung von der Gephyrins; als Verbindungsprotein im postsynaptischen Rezeptorkomplex kommt somit GABARAP nicht in Frage (Sagiv et al., 2000; Legesse-Miller et al., 2000; Kneussel et al., 2000).

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass Gephyrin also auch für die synaptische Aggregation von Subtypen des GABA_A-Rezeptors wichtig ist, welche die sehr häufige $\gamma 2$ -Untereinheit tragen. Wie Gephyrin diese Funktion an der GABA_Aergen Synapse vermittelt; obwohl es nicht nachweisbar mit GABA_A-R Untereinheiten interagiert, ist noch unbekannt.

Gephyrin ist also ein Protein mit mehreren Funktionen, das essentielle Aufgaben an glyzinergen und GABA_Aergen Synapsen sowie bei der Synthese des Molybdän-Kofaktors hat. Kenntnisse über die Regionen und Domänen Gephyrins, die die Bindung der oben beschriebenen Proteine und die enzymatischen Funktionen Gephyrins vermitteln, sind für das Verständniss der Bildung inhibitorischer postsynaptischer Membranspezialisierungen unerlässlich.

1.6 Zielsetzung

Ionotrope Neurotransmitter-Rezeptoren liegen an der postsynaptischen Membran der Synapse als Aggregate vor. Diese sind für die synaptische Funktion unerlässlich. Beim Rearrangieren oder Eliminieren von Synapsen werden diese Aggregate neu formiert bzw. aufgelöst. Entstehung und Dynamik von Rezeptoraggregaten an postsynaptischen Membranen sind für Prozesse der synaptischen Plastizität wie LTD oder LTP und somit auch für cerebrale Prozesse wie Lernen und Gedächtnis von großer Bedeutung.

Für die Aggregation der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren, der Glyzin- und der meisten Subtypen der GABA_A-Rezeptoren, ist das 93 kDa-Protein Gephyrin nötig. Dieses bindet offenbar indirekt an GABA_A-Rezeptoren, jedoch direkt an GlyR. Die Funktion von Gephyrin ist für die Genese und Aufrechterhaltung dieser postsynaptischen Membranspezialisierungen unerlässlich. Gephyrin zeigt eine signifikante Homologie zu den Mikrotubuli-Bindungsdomänen von Tau und Map2. Des Weiteren hat Gephyrin homologe Regionen zu Proteinen, die in die Synthese des Molybdän-Kofaktors involviert sind. Darüber hinaus ist keine Domäne bekannt, die in einem direkten Zusammenhang mit den Funktionen Gephyrins an der Synapse stehen.

Ziel dieser Arbeit war, die Domänenorganisation von Gephyrin zu analysieren und insbesondere Bindungsstellen zu suchen, die im Zusammenhang mit der Funktion Gephyrins an der Synapse stehen. Dabei stand die Identifizierung der Bindestelle für den GlyR und die Autoaggregationsdomäne im Vordergrund. Auch die vermutete Bindungsstelle für Mikrotubuli war zu untersuchen. Es sollte ebenso geklärt werden, ob verschiedene Varianten Gephyrins existieren, die an den GlyR binden und sich mit weiteren Proteinen aus dem GlyR-Komplex anreichern lassen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders erwähnt, wurden sämtliche Chemikalien von den folgenden Firmen im Reinheitsgrad p.A. erworben: Difco, Gibco, BRL, Riedel-de-Haen, Roth, Serva, Sigma. Restriktionsendonukleasen und deren Aufbewahrungs- und Reaktionspuffer stammen, falls nicht anders angegeben, von Roche Molecular Biochemicals.

2.1.2 Lösungen und Medien

Zur Herstellung von Lösungen und Medien wurde deionisiertes Wasser (Milli-Q-Water-System, Millipore) benutzt. pH-Werte wurden in der Regel mit NaOH oder HCL eingestellt. Standardlösungen für die Molekularbiologie sowie für die Biochemie wurden im allgemeinen nach Sambrook et al. (1989) angesetzt. Zur Sterilisierung wurden die Lösungen entweder sterilfiltriert oder für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

2.1.2.1 Häufig verwendete Lösungen:

10 x TBE	1 M Tris/HCL, pH 8.0, 890 mM Borsäure, 25 mM EDTA
TE	10 M Tris/HCL, pH 7.5, 1 mM EDTA
TBS	24.8 mM Tris/HCL, pH 7.5, 138 mM NaCl, 5 mM KCl
Puffer 1	50 mM Tris/HCL, pH 8.0, 10 mM EDTA
Puffer 2	0.2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS
Puffer 3	3 M NaAc, pH 5.8
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (v/v/v) 25:24:1
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.4 mM KH ₂ PO ₄
1 x SDS-Probenpuffer	62.5 mM Tris/HCL, pH 6.8, 2 % SDS (w/v), 10 % Glycerin (w/v) 5 % β-Mercaptoethanol (w/v), 0.025 % Bromphenolblau (w/v)
10 x SDS-Laufpuffer	0.25 M Tris/HCL, 1.92 M Glyzin, 1 % SDS (w/v)

2.1.2.2 Größenmarker für Elektrophorese

DNA-Größenmarker: 1 kb und 0.1 kb DNA-Leitern (Gibco BRL)

Protein-Größenmarker: High, Low und Wide Molecular Weight Marker (Sigma), Seeblue (Invitrogen), Benchmark (Novogene)

2.1.2.3 Nährmedien für Bakterien:

LB-Medium 1 % Bacto Trypton (Difco) (w/v), 0.5 % Hefeextrakt (Difco) (w/v),
1 % NaCL (w/v).
LB-Agar 1 l LB-Medium, 1,5 % Bacto Agar (Difco) (w/v).
Ampizillin 100 µg/ml (Roche Molecular Biochemicals)
Kanamyzinsulfat 50 µg/ml (Boehringer Mannheim)

2.1.2.4 Nährmedien für Helfekulturen

YPD-Vollmedium 20 g Peptone (Difco), 10 g Hefeextrakt ad 950 ml H₂O, pH 5.8;
nach Autoklavieren 50 ml 40 % sterile Glukoselsg. (w/v) zugeben.
YPD-Agar Wie YPD, jedoch mit 18 g Bacto-Agar (difco) pro Liter.
SD-Medium 6.7 g Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (Difco) ad 750 ml
H₂O, pH 5.8, nach dem Autoklavieren 100 ml 10 x Dropoutlsg,
50 ml 40 % Glukoselsg (w/v), 25 ml 1 M 3-Amino-1,2,4-triazol (3-
AT) und je nach Bedarf 10 ml 100 x Stammlsg. von Histidin, Leu-
cin, oder Tryptophan zur Selektion zugeben und mit H₂O auf 1 l
Volumen auffüllen.
SD-Agar Wie SD-Medium mit 20 g/l Bacto Agar.
10 x Dropoutlsg. 200 mg/l L-Adenin
200 mg/l L-Arginin
200 mg/l L-Isoleucin
200 mg/l L-Lysin
200 mg/l L-Methionin
200 mg/l L-Phenylalanin
200 mg/l L-Threonin
200 mg/l L-Tyrosin
200 mg/l L-Uracil
Stammlsg. 100 x Leuzin 10 g/l L-Leuzin
100 x Tryptophan 2 g/l L-Tryprophan
100 x Histidin 2 g/l L-Histidin

2.1.2.5 Nährmedien für die Zellkultur eukaryontischer Zellen

Minimum Essential Medium (MEM), Gibco, versetzt mit Antibiotika (Pen/Strep) und 10 % fötalem Kälberserum (FCS; v/v), das zuvor bei 56 °C hitzeinaktiviert wurde.

Neurobasal-Medium, Gibco, zur Kultur primärer neuronaler Zellkulturen. Einfriermedium: (50 % FCS/20 % DMSO; v/v).

2.1.3 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme

2.1.3.1 Baktereinstämme

XL1-blue (Stratagene)

E.coli B21(DE3) (Novagen)

2.1.3.2 Hefestamm

Y190 (Flick und Johnston, 1990)

2.1.3.3 Eukaryotische Zelllinien

HEK293 humane embryonale Nierenzelllinie

Primäre Zellen aus Rückenmark

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Referenz
anti Geph	Gephyrin (C-Terminus) (m)	1:100 (IF) 1:500 (IB)	Transduction Labs
anti- α Tubulin	anti- α Tubulin (Mono-/Polymer) (m)	1:100 (IF) 1:500 (IB)	Sigma
anti Flag M2	Flag-Epitop (m)	1:300 (IF) 1:500 (IB)	Sigma
anti HA	Epitop aus Hämagglutinin (rb)	1:200 (IF) 1:500 (IB)	Santa Cruz Biotech
anti VSV	Epitop aus dem Hüllprotein des Vesicular Stomatitis Virus (m)	1:300 (IF) 1:500 (IB)	Boehringer Mannheim
anti PIN	PIN (rb)	1:100 (IF) 1:500 (IB)	Transduction Labs

antiGFP	Green Fluorescent Protein (rb)	1:1000 (IF) 1:500 (IB)	Living Colours
mAb5a	Gephyrin n-Terminus (m)	1:100 (IF)	Pfeiffer et al., 1984
mAb2b	α 1-Untereinheit des GlyR (m)	1:100 (IF)	Pfeiffer et al., 1984
mAb4a	GlyR, alle UE (m)	1:100 (IF)	Pfeiffer et al., 1984

(m) Maus; (rb) Kaninchen; (g) Ziege; (IF) Immunfärbung; (IB) Immunoblot

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Spezifität	Konjugat	Verdünnung	Referenz
Ziege anti-m IgG	Cy2	1:500 (IF)	Dianova
Ziege anti -rb IgG	Cy2	1:500 (IF)	Dianova
Ziege anti -m IgG	Cy3	1:500 (IF)	Dianova
Ziege anti -rb IgG	Cy3	1:500 (IF)	Dianova
Ziege anti -m IgG	FITC	1:500 (IF)	Dianova
Ziege anti -rb IgG	FITC	1:500 (IF)	Dianova
Ziege anti -gp IgG	FITC	1:500 (IF)	Dianova
Ziege anti -m IgG	Alexa	1:1000 (IF)	Dianova
Ziege anti -rb IgG	Alexa	1:1000 (IF)	Dianova
Ziege anti -gp IgG	Alexa	1:1000 (IF)	Dianova
Esel anti -g IgG	Alexa	1:1000 (IF)	Dianova
Ziege anti -m IgG	Peroxidase	1:5000 (IB)	Dianova
Ziege anti -rb IgG	Peroxidase	1:5000 (IB)	Dianova

(m) Maus; (rb) Kaninchen; (g) Ziege; (IF) Immunfärbung; (IB) Immunoblot

2.1.5 Vektoren

Vektor	Verwendung	Referenz
pBluescript KS II	Klonierungen	Stratagene
pCDNA 3	Expression von Proteinen	Invitrogen
pCR2	Ligation	Invitrogen
pCis2	Expression von Proteinen	Sontheimer et al, 1989
pEGFP-C/N-1/2/3	Expression von Proteinen	Clonetech
pGilda	Expression in Hefe	Clonetech
pJKL9	Expression in Hefen	Clonetech

2.1.6 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech HPLC- oder HPSF gereinigt und lyophilisiert bezogen.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
P1 G110 480s	gggtgggactatatcagcaata	PCR/Sequenzierung von Gephyrin
P1 545as seq	tggagtgacatctctgtggtg	
P1 800s	gttcatactgccagctctacc	
P1 1170s	ctccatcatttctctgtggtg	
P1 1570s	ccttgatcaagatgtgtatgca	
P1/1601	tgaagtgcgaattctgtggtc	
P1/1724as	tgacacctacagttgcaagg	
P1/1876s	caggaacatggttaccacaac	
P1 1947s seq	ccagatgacttactcaatgccttg	
P1 2195s seq	tgcaacctcttgtgtgacc	
P1 G126	aatgcccgacaagtgatgcg	
3'dH10 X stop	ctggagtcactactcagtgggcagatgaactgaaagcattc	Fragmentierung und Mutagenese von Gephyrin
5'dH10 H Rbs atg X	acgtacaagcttccaccatggcgctcagccttccccaccacctctctttctc	
5'dHdP H Rbs atg X	acgtacaagcttccaccatggcgctcagcagacagaagacaaaaggagttcag	
5'P1 H/E Coil	acgtaaagcttgaattcggccaccatggcccagttcatactgccagctctacctc	
3'P1 Sal Coil	tacgtgtcgactaaatcttcaagttcatcatgcacctc	
5'P1 Hind/Eco	acgtaaagcttgaattcattgcgctggaaaacatggcgacc	
5'P1 H/E Exon4	acgtaaagcttgaattcggccaccatgttgggtgggactatatcagcatac	
5'P1 H/E Exon6	acgtaaagcttgaattcgtgataattaacctgcctggtagc	
3'P1 Sal Exon3	tacgtgtcgaccaaagaaggatcctggacgagatc	
3'P1 Sal Exon5	tacgtgtcgacctctggagtgacatctctgtggtgc	
3'P1 Sal Exon7	tacgtgtcgacgaactgaaagcattctctgagatcc	
3'P1 Sal Exon1	tacgtgtcgactgtgaggactccgacacggatttg	
5'P1 Hind Exon 2 C1	acgtaaagcttgcactcagaactatgagttttctc	
5'P1-597/2	acgtaaagcttccaccatgggatccgaattcgactatctcaagcaggtgctggacatc	
5'bam VSV2 eco	gacacctactgatatcgaatgaaccgctgggtaagg	
3'bam VSV2 eco	aattccttaccaggcgggttcatttcgatcatcagtgtag	
5'P1-695	acgtaaagcttccaccatgggatccgaattcatgagcagccgtctgat	
5'P1-633	acgtaaagcttccaccatgggatccgaattcacctgcaacctctttgt	
3'P1-695 Kpn	cgtacctcagtcacatcaggtaccctgattacctgtactctgggc	
3'P1-695 Eco	cgtacctcagtcacatcagaattctgattacctgtactctgggc	
3'P1 Eco	tacgtctcagtcacatcagaattctagccgtccgatgacctgacgtc	
5'P1 L not	acgtaaagcttccaccatggcgccgcacctgtagcaagaaggatctcag	

3'P1 L kpn	tacgtctcgagtcacaggtacctgagcaaggactgccccattccatc	
3'P1 MogA kpn	tacgtctcgagtcacaggtaccaatggcatgaggtagagctggcag	
5'VSV	ggcctacactgatatgaaatgaaccgctgggtaagac	
3'VSV	ggccgtctaaccagggcgggtcatttcgatatcagtga	
5'P1 Moe not	acgtaaagcttccaccatggcggccgccgatggaatggggcgagtccttctcaa	
P1 2194 BstXI sense	gtcacctgcaacctcttgggtaccactgccctggaaaatgcagggtatcttggatcc	
P1 2194 BstXI anti	ggatccaagatacctcattttccaggggcagtggtacaacaagagggttcaggtgac	
3'P1 mut blob 2	catgctcatcagacggctgctcatcctggtagtgcaaaaataattttc	
5'P1 mut blob	gaaaaattattttgcactaccagggtgagcagccgtctgatgagcatg	
5'P1not	acgtaaagcttggcgtggaaacatggcggccgccaccagggaatgatcctcacaac	
3'P1kpn	tacgtctcgagtcacaggtacctagccgtccgatgacatgacgic	
5'P1ecor1/not	acgtaaagcttccaccatggcggccgccggtgctgatgcagtagtgcaagttgaag	
3'geV/kpn	tacgtctcgagtcacaggtaccagcttgaccagatttcgacttc	
5'P1nco/not	acgtaaagcttccaccatggcggccgccactatctcaagcaggtgctggacatc	
3'P1nco/kpn	tacgtctcgagtcacaggtaccgtccagcactgcttgagatagtcct	
3'P1Flag	cagtctcgagctattactgtcatcgtcgtcctttagtctagccgtccgatgacatgacgtcc	
P1 5' 2dMTB	cagcttcttgcacacaccagtagatataccaaggtggc	
P1dECO1	gatcactcgagttatcattgcaccagaattcgacttc	
P1dHIND2	gatcactcgagttatcaattccctgttgacataacggc	
P1dPVU2	gatcactcgagttatcagaccacagctgatacagga	
P1ecoVas	agtcactcgagttatcagatactacagcactgtgactggc	
P1ncoIas	agtcactcgagttatcactttcccccatggatacac	
P1bstxIas	agtcactcgagttatcactgattacctgtactctggg	
3'1/2anti	agtcactcgagttatcatagccgtccgatgacatgac	
3'dM anti	agtcactcgagttatcaaatggcatgaggtagagctg	
P1dPFanti	cttgcacgtcgtcctttagtcaagttcatcatgcacctcc	
P1dPFsense	gactacaaggacgacgatgacaagcagacagaagacaaaggag	
5'P1/2	acgtaaagcttggcgtggaaacatggcgaccga	
3'1P1dE12	gccaccttgggtatctactgggtgtggacaagaagctg	
5'2P1dE12	cagcttcttccaacaccgtagatataccaaggtggc	
3'2P1dE12	ccttttgccaaaacacactc	
3'1P1dP	ctcctttgtcttctgtctgctcaagttcatcatgcacctcc	
5'2P1dP	ggaggtgatgatgaactgagcagacagaagacaaaggag	
5'Profilin 2 EcoRI	gtacaagcttccaccatggaattegcgggtggaacgcctacatcgac	Klonierung von Profilin
3'Profilin HA	ctagcctcgagtcacagggctagegtaatccggaacatcgtatgggtagtagtgg- gaacgccgcaggtgaga	
3'Profilin	gtagcctcgagcgggtgggggaaggacagatgagg	
P1 536-576 sense	cagggtttgaccacgagatgtcactccagag	Klonierung des
P1 739-768 sense	cagttcatactgccagctctacctcatgcc	Exons C1

P1 739-768 anti	ggcatgaggtagagctggcagatgaactg		
P1 1035-1006 anti	ctgaacgccagcagaaatgatggagtctgg		
C4 rat anti	ctcagatacactataggtatgagcagagg		
C3 rat anti	agaccagggatggctgccatgattgcc		
P1 567-536 anti	ctggagtgcacatctcgtggtgcaaaccctg		
1C1 1-25 rat sense	gcactcagaactatgagtttcttc		
2C1 1-32 rat sense	gcactcagaactatgagtttcttcttagtcc		
3C1 1-39 rat sense	gcactcagaactatgagtttcttcttagtctgcttcc		
4'C1 rat -15/+15	gctggagtctcacaggcactcagaactatg		
5'hind VSV eco	agctccaccatggcatacactgatatcgaatgaaccgctgggtaagg		Generierung von Oligos
3'hind VSV eco	aattcctaccagggcggttcatttcgatatcagtgatgccatgggtga		
5'hind HA eco	agctccaccatggcataccatacagatgttccggattacgctagcctcg		
3'hind HA eco	aattcgaggctagcgtaatccggaacatcgtatgggtatgccatgggtga		
5'bam HA eco	gatcctaccatacagatgttccggattacgctagcctcg		
3'bam HA eco	aattcgaggctagcgtaatccggaacatcgtatgggtag		
5'bam VSV eco	gatcctacactgatatcgaatgaaccgctgggtaagg		
3'bam VSV eco	aattcctaccagggcggttcatttcgatatcagtgtag		
5'KpnI-6His-XhoI	ccaccatcaccatcaccattgatgac		
3'KpnI-6His-XhoI	tcgagtcacatgatggtgatggtgatgggtggtac		
bFlagxb anti	gatctctcgagctattactgtcatcgtcgtctttagtgcg		
bFlagxb sense	gatccgactacaaggacgacgatgacaagtaatagctcgaga		

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Kultivierung höherer Zellen wurde unter sterilen Bedingungen an speziellen Sterilarbeitsplätzen durchgeführt. Darüber hinaus wurden ausschließlich gammabestrahlte Kunststoffmaterialien und sterilisierte Lösungen und Medien verwendet. HEK293-Zellen wurden in MEM-Medium (Gibco) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5 % (v/v) CO₂ / Luft-Gemisch bei 37 °C in einem Brutschrank kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die adhärent wachsenden Zellen passagiert.

2.2.1.1 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen werden in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden Zellpopulationen 10 min bei 1500 g pelletiert, in einem kleinen Volumen aus kaltem MEM mit 50 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) aufgenommen und in vorgekühlte Einfrierröhrchen

gegeben ($2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen/0,5 ml FCS). Nach vorsichtiger Zugabe des gleichen Volumens kalten Einfriermediums (50 % FCS/20 % DMSO; v/v) und schnellem Einfrieren bei -70°C für 24 h wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen zu rekultivieren, wurden die Zellen mittels lauwarmem Wasser aufgetaut. Die Bewahrung eines Eisrestes in den Röhrchen garantierte dabei eine Temperatur um den Gefrierpunkt und schützte die Zellen vor stärkerem Einfluß des bei Raumtemperatur (RT) toxischen Einfriermediums. Der Röhrcheninhalt wurde schnell in 10 ml PBS überführt, suspendiert und 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt und die Zellzahl bestimmt.

2.2.1.2 Passagieren von Zellen

Zellen wurden nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte, im allgemeinen alle zwei bis drei Tage, im Verhältnis 1 : 5 bis 1 : 15 mit frischem Kulturmedium verdünnt.

Die Ablösung adhärenter Zellen vom Gefäßboden erfolgte durch vierminütiges Einwirken von Trypsin-EDTA (Gibco) bei 37°C nach vorherigem Waschen mit PBS. Diese Behandlung wurde durch Abklopfen der Zellen unterstützt und durch Waschen mit PBS beendet. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 1500 g werden $1-2 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung von Zellzahl und Lebendzellzahl wurde einer frisch suspendierten Kultur ein Aliquot entnommen und im Verhältnis 1 : 2 mit 0,2 % Trypanblau (w/v) verdünnt. Dieser Farbstoff lagert sich an Proteinstrukturen des Zytoplasmas an. Da er lediglich durch zerstörte Membranen in Zellen eindringen kann, markiert er nicht mehr lebensfähige Zellen der Suspension. Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Die Zahl ungefärbter Zellen über einem aus 16 Kleinquadraten bestehenden Großquadrat der Kammer wurde mit Kammer- und Verdünnungsfaktor multipliziert und ergab die Lebendzellzahl je ml Kultur.

2.2.1.4 Transfektion von adhärenenten HEK 293 Zellen

Zur Transfektion von adhärenenten HEK 293 Zellen wurden diese auf Fibronectin (Roche Molecular Biochemicals) beschichtete Deckgläschen so umgesetzt, daß sie am nächsten Tag zu 30 bis 50 % konfluent waren. In einem sterilen Röhrchen wurden 75 μl H_2O mit wechselnden Mengen Plasmid-DNA, 25 μl CaCl_2 und 100 μl 2 x BBS gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit $\text{PSA}+\text{Ca}^{2+}$ gewaschen. Die DNA-Lsg. wurde anschließend mit 800 μl frischem Medium verdünnt und auf zwei Deckgläschen verteilt. Es folgte eine Inkubation bei 3 % CO_2 unter ansonsten unveränderten Bedingungen für 4 bis 24 h im Brutschrank. Danach wurden die Zellen gewaschen und frisches Medium zugegeben.

2.2.1.5 Präparation von spinalen Rückenmarksneuronen

Embryos einer Ratte wurden am Tag E14 entnommen und in PBS gelegt. Das Rückenmark wurde unter dem Binokular freigelegt, herauspräpariert, in PBS+Glukose (33 mM) gelegt und anschließend in kleine Stücke geschnitten. Nach dreimaligem Triturieren setzten sich größere Fragmente ab, wonach der milchige Überstand mit den Zellen abgenommen wurde. Nach nochmaligem Triturieren wurden die Überstände vermischt, der Ansatz für 8 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 5 ml Medium (Neurobasal, Gibco) resuspendiert und die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt ($X \times 4 \times 5 \times 10^4 = \text{Gesamtzellzahl}$). Die erwartete Zellzahl betrug $0,7-1 \times 10^5$ Zellen pro Rückenmark. Sodann wurde auf eine Zellzahl von 4×10^5 Zellen eingestellt und 300 μl pro Schale (in einer 24-Schalen-Platte) ausplattiert. Die Kultivierung kann zwei Wochen bei 5 % CO_2 , 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit ohne Mediumwechsel erfolgen.

2.2.1.6 Transfektion von Primärkulturen des Rückenmarks

In einem Ansatz werden 1 μl DNA-Lsg. (maximal 1 μg DNA), 4 μl CaCl_2 und 15 μl 2 x BBS gemischt und auf 30 μl H_2O aufgefüllt. Das Medium in der Kulturschale wurde vorsichtig abgenommen, die Hälfte (400 μl) bei 37 °C aufbewahrt, die andere Hälfte mit frischem Medium versetzt, mit der DNA-Lsg. vermischt und auf die Zellen gegeben. Nach 1 bis 8 h wurde das Transfektionsmedium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit einer Mischung (1:1) aus aufbewahrt und frischem Medium überschichtet. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten im Brutschrank wurden die Zellen geerntet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien fand unter weitgehend sterilen Bedingungen statt. Die E. coli-Stämme wurden auf LB-Agar-Platten bei 37 °C angezogen. Für die Aufzucht plasmidtragender Stämme wurden entsprechende Selektionsmedien verwendet, für Flüssigkulturen wurde LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und sechs Stunden bzw. über Nacht im Schüttelinkubator bei 220 UpM und 37 °C inkubiert. Bakterienkolonien wurden auf Agarplatten bis zu einer Woche bei 4 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Glyzerinkulturen bei -80 °C aufbewahrt. Dazu wurde Glycerin bis zur Endkonzentration von 50 % (v/v) zu einer Übernachtskultur gegeben und diese eingefroren. Um eine Kultur aus einer Glyzerinkultur anzuimpfen wurde etwas tiefgefrorenes Material mit einem sterilen Glasstab entnommen, in ein geeignetes Volumen Flüssigmedium überführt und bei 37 °C über Nacht unter schütteln inkubiert.

2.2.2.2 Herstellung von kompetenten Bakterien für die Hitzeschocktransformation

Eine 1000 ml-Bakterienkultur in exponentieller Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6-0,7$) wurde im Eisbad 30 min abgekühlt und durch Zentrifugation bei 4000 g für 10 min bei 4 °C sedimentiert, anschließend mit 20 ml eiskaltem 100 mM $CaCl_2$ gewaschen, erneut sedimentiert (4000 g, 4 °C, 5 min), in 10 ml 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4000 g für 5 min bei 4 °C wurde das Bakteriensediment in 2,5 ml 100 mM $CaCl_2$ /15 % Glycerin (v/v 4 °C) aufgenommen und die Zellsuspension in 100 µl-Portionen in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Nach Schockgefrieren bei -196 °C wurden die Bakterien bei -70 °C gelagert.

2.2.2.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter Zellen

Eine 1000 ml Bakterienkultur in exponentieller Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6-0,7$) wurde nach 30 min Abkühlens auf Eis bei 5000 x g bei 4 °C für 15 min sedimentiert, in 500 ml sterilem Eiswasser resuspendiert und erneut, wie zuvor, pelletiert. Dies wurde wiederholt und die Zellen jeweils in 250 ml Eiswasser bzw. in 50 ml und schließlich 5 ml Eiswasser mit 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und darauffolgend in 50 µl-Portionen verteilt. Nach Schockgefrieren bei -196 °C wurden diese bei -70 °C gelagert.

2.2.2.4 Hitzeschocktransformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Man ließ 100 µl kompetente Bakterien auf Eis auftauen, mischte diese mit bis zu 500 ng ungespaltener Plasmid-DNA bzw. mit 10 µl eines Ligationsansatzes und inkubierte 30 min auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s auf 42 °C erwärmt und wieder auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurde die Bakteriensuspension 1 h bei 37 °C inkubiert. Bei der Transformation mit ungespaltenem Plasmid strich man 50 µl des Ansatzes auf einer Selektions-LB-Agarplatte aus. Im Falle der Transformation mit ligierter Plasmid-DNA wurden die Bakterien zunächst durch Zentrifugation bei 4000 g, für 5 min sedimentiert, 800 µl des Überstandes wurde verworfen, die Bakterien im verbliebenen Medium resuspendiert und der gesamte Transformationsansatz auf einem Selektionsagar ausgestrichen. Die Agarplatte wurde für 12 bis 16 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.5 Annealing von DNA

Komplementäre einzelsträngige DNA-Moleküle und solche mit glatten Enden können sich zu doppelsträngiger DNA zusammenfügen („Annealing“).

Dazu wurden in einem Ansatz von 100 µl jeweils 20 µg Einzelstrang-DNA in Gegenwart von Annealing-Puffer für 2 min auf 95 °C erhitzt und anschließend für 10 min auf 65 °C inkubiert. Darauffolgend wurde die DNA bei RT auf 37 °C abgekühlt, wiederum für 10 min inkubiert und nach weiteren 10 min bei RT bei -20 °C gelagert.

2.2.2.6 Reinigung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung

Zur Reinigung wurde die DNA entweder gefällt oder elektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA eluiert.

Bei der Fällung kommt es nach Zugabe von Alkohol zu einer wässrigen Nukleinsäurelsg. in Gegenwart hoher Konzentrationen von monovalenten Kationen zu einer Aggregation und Präzipitation der Nukleinsäuremoleküle. Nukleotide und Salze bleiben dagegen in Lösung (Meyers et al., 1976).

Ethanol-fällung:

Zur Fällung der DNA aus einer wässrigen Lösung wurde diese mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. 100 % Ethanol (RT) versetzt, gemischt und 30 min bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Die Präzipitation erfolgte durch 15 min Zentrifugieren (15000 g). Der Niederschlag wurde mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren an der Luft oder im Vakuumtrockner getrocknet, woraufhin das DNA-Pellet in einem geeigneten Volumen H_2O bzw. Puffer aufgenommen wurde.

Isopropanol-fällung:

Die Fällung kann mit 1 Vol. Isopropanol anstelle von 2,5 Vol. Ethanol durchgeführt werden. Der Anteil präzipitierter DNA als auch der kopräzipitierten Salze und Verunreinigungen ist hierbei jedoch höher.

Fällung von kleinen DNA-Molekülen:

Zur Fällung von Oligonukleotiden einer Größe von 15 bis etwa 80 bp setzte man der Lösung 1 Vol. 4 M NH_4 -Acetat, 4 Vol 100 % Ethanol sowie 10-15 μg tRNA oder Glykogen zu. Die Fällung erfolgte binnen 10 min bei RT und die Präzipitation durch 20 minütige Zentrifugation bei 15000 g. Nach Waschen des Pellets in 70 % (v/v) Ethanol und Trocknen an der Luft oder im Vakuumtrockner wurde die DNA in einem geeigneten Volumen H_2O aufgenommen und konnte über ein Gel gereinigt oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Phenolextraktion:

Mit der Phenolextraktion werden Proteine aus der DNA-Lsg entfernt.

Der Ansatz der DNA-Lösung wurde auf 300 μl vergrößert und mit 1 Vol. Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (50 : 49 : 1) versetzt. Nach Mischung wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 15000 g für 5 min getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und gefällt

2.2.2.7 Lagerung von Nukleinsäuren

Bis zu einer Länge von 50 kb fand die dauerhafte Lagerung in H_2O bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ statt. größere Moleküle wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgehoben.

2.2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Eine ungefähre Bestimmung der Nukleinsäuremenge ist durch Abschätzung der Intensität der Bandenfärbung durch Vergleich mit den Banden einer Eichreihe bekannter Konzentrationen in einem Agarosegel möglich.

Eine exakte Messung der Konzentration wurde durch eine photometrische Messung vorgenommen. Hierzu wurde die Extinktion eines Ansatzes von 1 ml, bestehend aus einer DNA-Lösung (10 %; v/v) in H₂O, bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektrophotometer gemessen. Aus dem Quotienten E_{260}/E_{280} läßt sich auf die Reinheit der Nukleinsäurelösung rückschließen. Ist der Wert kleiner als 1,8, muß nochmals gereinigt werden.

2.2.2.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA läßt sich mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen an spezifischen Sequenzen spalten. Die Spaltung wurde in der vom Hersteller angegebenen Pufferlösung in 20-40 µl Volumen durchgeführt. In der Regel wurden 2 µg DNA und 1-5 Enzymeinheiten (U) pro Spaltung zum Reaktionsansatz zugegeben und bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur 1 h inkubiert. Darauf folgend konnte die DNA entweder modifiziert oder in einem Gel geeigneter Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt werden.

2.2.2.10 Dephosphorylierung von DNA

Die Entfernung der endständigen 5'-Phosphatgruppe dient zur Vermeidung der intramolekularen Ligation von linearisierten Plasmidvektoren. Dazu wurden 20 µl einer Restriktionsreaktion mit 2,4 µl zehnfach konzentriertem Phosphatasepuffer und 1,6 µl alkalischer Phosphatase aus Schrimps versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.11 Phosphorylierung von DNA

Um synthetische Oligonukleotide zur Ligation vorzubereiten, werden die endständigen 5'-Nukleotidreste phosphoryliert. In der Regel wurde dabei 2 µg DNA in 17 µl H₂O aufgenommen, 2 µl zehnfach konzentrierter Puffer und 1 µl T4-Polynukleotidkinase hinzugefügt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.12 Ligation von DNA

DNA-Moleküle mit glatten oder komplementären, kohäsiven Enden können durch eine Ligation zusammengefügt werden.

Die in einer Ligationsreaktion eingesetzten DNA-Fragmente wurden über ein Gel oder chromatographisch gereinigt. Die eluierte DNA wurde direkt, ohne weitere Behandlung zur Ligation eingesetzt, indem 10 µl Fragmentlösung in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 3 µl Vektorlösung in Gegenwart von einfachem Ligasepuffer und einer Enzymeinheit T4-DNA-Ligase 1 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert wurde.

2.2.2.13 Trennung von DNA in Agarosegelen

Lineare DNA-Moleküle können im präparativen Agarosegel (1 x TAE oder TBE) ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Wenn parallel dazu ein Größenstandard (Marker) aufgetragen wird, kann die Größe der zu untersuchenden DNA ermittelt werden.

Die jeweilige Menge Agarose wurde im entsprechenden Puffer erhitzt und nach Abkühlung auf ca. 55 °C Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,05 mg/ml hinzugefügt. Das Gel wurde in einen waagerechten Gelschlitten gegossen und zur Formung der Taschen ein Kamm eingesetzt. Die Einzelansätze wurden mit jeweils 0,1 Vol. Ladepuffer (10 x) versehen, in die Geltaschen pipettiert und 1-12 h bei 2-8 V/cm aufgetrennt. Die durch interkaliertes Ethidiumbromid sichtbar gemachte DNA wurde unter UV-Licht (315 nm) fotografiert. Mit spezieller Agarose (low-melting-point agarose) können bei einer Agarosekonzentration von bis zu 3 % Moleküle von 20 bp bis 100 bp Größe getrennt werden.

2.2.2.14 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung der DNA aus Agarosegelen wurden die Banden unter UV-Licht ausgeschnitten, das Gelstück mindestens 10 min in H₂O gelegt und danach in ein zur Hälfte mit Plastikwolle gefülltes, unten durchbohrtes 0,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieses stellte man in ein 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß. Durch Zentrifugation bei 3000 g für 10 min gelangte die zu isolierende DNA in das untere Reaktionsgefäß, während die Agarose durch die Plastikwolle zurückgehalten wurde. Die auf diese Weise isolierte DNA wurde direkt zur Ligation eingesetzt.

2.2.2.15 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

(Nach Birnboim und Doly 1979)

Mit Plasmiden transformierte Bakterien wurden von der Agarplatte in Kulturröhrchen mit 2 ml Selektionsmedium angeimpft und 6 - 20 h bei 37 °C im Inkubator geschüttelt. Man überführte 1,5 ml der Kulturen in Eppendorf-Reaktionsgefäße und sedimentierte die Bakterien durch Zentrifugation bei 11000 g für 30 s. Nachdem der Überstand verworfen und die Bakterien in 100 µl Puffer 1 resuspendiert waren, gab man 200 µl frisch angesetzten Puffers 2 dazu und mischte vorsichtig. Für 5 min wurden die Bakterien auf 4 °C oder RT lysiert. Im Anschluß wurde 150 µl Puffer 3 dazugegeben und nach vorsichtigem Mischen für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die chromosomale DNA und die löslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 15000 g abgetrennt, der Überstand mit Phenol wie oben beschrieben extrahiert und nach dem Trocknen in 50 µl H₂O in Gegenwart von 200 ng/µl RNase A gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.16 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativem Maßstab

Die Isolierung von größeren Mengen DNA erfolgte mit Hilfe eines chromatographischen Verfahrens. Die zu präparierende DNA wurde dabei mit Hilfe von Ionenbindungen an

eine Matrix in einer Säule gebunden und konnte anschließend gereinigt und eluiert werden. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers (Quiagen) verfahren.

2.2.2.17 Sequenzierung von DNA

Die Ermittlung einer DNA-Sequenz erfolgte nach der Didesoxy-Kettenterminations-Methode (Sanger et al., 1977). Die DNA-Sequenzierungen wurden mit dem automatischen Sequenziergerät (Applied Biosystems 373A DNA Sequencer) unter der Verwendung eines geeigneten Sequencer Kits (Dyedeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer) durchgeführt. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Analyse der Sequenzen erfolgte in der Regel mit Hilfe den Programmen MacVector, DNA-Star oder DNA-Strider.

2.2.2.18 Polymerase-Kettenreaktion

Die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerase wird als Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) bezeichnet (Saiki et al., 1988). Standardreaktionen wurden mit dem „Thermo Cycler“ (Perkin Elmer) durchgeführt. Dazu wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl 100 ng Template-DNA, jeweils 10 pmol Primer (sense und antisense), dNTPs (je 1 mM), 1 x PCR-Puffer (Gibco) und 5 U Taq-DNA-Polymerase (Gibco) eingesetzt. Vor den zyklischen Schritten wurde eine initiale Denaturierung durchgeführt. Darauffolgend wurden Denaturierung, Hybridisierung und Elongation 15 bis 30 mal wiederholt und abschließend eine finale Elongation von 10 min durchgeführt. Sämtliche Parameter wurden den jeweiligen Notwendigkeiten angepasst.

2.2.2.19 PCR-Mutagenese

Zur Insertion endständiger oder interner Mutationen wurden grundsätzlich zwei Strategien angewandt.

Zur Insertion endständiger Mutationen wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 25 bis 72 b benutzt. Deren Sequenz wurde so gewählt, daß der 3'-gelegene Bereich mit der Ausgangs-DNA hybridisieren konnte und der 5'-Bereich z.B. für ein spezielles Epitop kodierte oder eine ribosomale Bindungsstelle oder Restriktionsschnittstellen beinhaltete. Die amplifizierte DNA wurde schließlich in entsprechende Vektoren kloniert.

Zur Deletion von DNA-Abschnitten innerhalb eines Moleküls wurden zwei PCR-Schritte durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die 5'- und 3'- gelegenen Bereiche der zu deletierenden Region so amplifiziert, daß diese Region genau zwischen dem 3'- Primer des 5'- gelegenen Bereichs bzw. 5'- Primer des 3'-gelegenen Bereichs lagen. Diese beiden Primer waren in einem überhängenden Bereich von mindestens 18 b komplementär zueinander. Die erhaltenen DNA-Amplifikate wurden über ein Agarosegel gereinigt und jeweils ein Teil davon als Ausgangs-DNA für den zweiten PCR-Schritt gemischt. Dabei wurde mit den äußeren 5'-und 3'-Primern eine weitere Kettenreaktion durchgeführt, die zu einem Molekül führte, welches zwar die Deletion trägt, ansonsten aber der wt-DNA entsprach.

2.2.2.20 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel herausgeschnitten, isoliert, i.d.R. gespalten und in Zielvektoren ligiert. Alternativ dazu wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines „PCR-Purification Kits“ (Quiagen) aufgereinigt, der Thymidinrest-Überhang durch eine DNA-Polymerisationsreaktion aufgefüllt, nochmals gereinigt und in die Ligationsreaktion eingesetzt.

2.2.2.21 Extraktion von RNA

Die Extraktion von RNA wurde mit dem Quiagen RNeasy-Kit durchgeführt. Sämtlichen Lösungen wurde DEPC zugesetzt, Gelkammern, Käbme etc wurden mit Formamid behandelt. Bei der Lyse von Zellen wie auch bei der Extraktion wurde im wesentlichen nach den Angaben des Herstellers verfahren. Anschließend wurde nach Zusatz von DNase und 10 x Puffer während einer Stunde bei 37 °C die DNA verdaut, die RNA nochmals mit dem oben genannten Kit gereinigt und zur reversen Transkription eingesetzt.

2.2.2.22 Reverse Transkription von RNA

Die reverse Transkription wurde mit dem RT-PCR Kit (Stratagene) bewerkstelligt. Zwischen 8 und 10 µg RNA wurden mit 300 ng Primer vermischt und für 5 min bei 65 °C inkubiert um diesen Ansatz zum Anlagern der Moleküle binnen 10 min auf RT abkühlen zu lassen. Nach Zugabe von 10 x Puffer, Ribonuklease-Hemmer, 10 mM dNTPs (f.c.) und der Reversen Transkriptase wurde bei 37 °C während 1 h die cDNA transkribiert und danach die RNA durch Kochen bei 95 °C für 5 min degradiert.

2.2.2.23 Zwei-Hybrid-System

Das Zwei-Hybrid-System erlaubt die Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in einem auxotrophen Hefestamm. Dieses Verfahren beruht auf der funktionellen Komplementierung des Transkriptionsfaktors GAL4, der mit einem Köderprotein fusioniert ist. Das Zielprotein ist mit einer fehlenden Untereinheit von Gal4 fusioniert. Kommt es zu einer Bindung, wird Gal4 aktiv. Er aktiviert zwei Reportergene: das β -Galaktosidase- und das His3-Gen. Die β -Galaktosidaseaktivität kann durch einen enzymatischen Test nachgewiesen werden. Die Produktion von His3 führt zum Verlust der Auxotrophie des Hefeklons gegenüber Histidin. Auf diese Weise kann die Interaktion zweier Proteine nachgewiesen werden.

Bei der Anwendung des Zwei-Hybrid-Systems wurde, soweit nicht anders angegeben, nach dem Protokoll der Firma Clontech vorgegangen.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zellysaten aus Zellkulturen

Transfizierte oder untransfizierte Zellen wurden lysiert, indem ein Lysepuffer unterschiedlicher Zusammensetzung mit 1 % (v/v) Triton-X-100 oder NP-40 versetzt und auf die

Zellen gegeben wurde. Nach einer Lyse von 2 bis 30 min bei 4 °C wurde der Debris während 5 min bei 2000 g, dann die groben membranösen Anteile bei 15000 g binnen 30 min pelletiert und verworfen. Der Überstand wurde direkt verwendet oder bei -196 °C schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.3.2 Herstellung von Zellysaten aus Organen

Die Organe wurden nach den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes entnommen und sofort bei -196 °C schockgefroren. Sofort oder nach einer Lagerung bei -70 °C wurden sie unter Verwendung eines Homogenisators (Polytron) in Lysepuffer homogenisiert. Debris und grobe membranöse Anteile wurden durch zwei Zentrifugationsschritte bei 2000 g für 5 min und bei 15000 g für 30 min abgetrennt. Der verbleibende Überstand wurde sofort dem Experiment zugeführt oder bei -196 °C schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Durch ein Bradford-Assay (Biorad) wurde die Messung der Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve vorgenommen. In Löcher einer Mikrotiter-Assay-Platte wurde je 1 µl der Protein-Standardlösungen mit Konzentrationen zwischen 0,05 und 1 µg/µl, bzw. 1 µl der zu messenden Proteinlösung pipettiert. Den Löchern wurden jeweils 9 µl H₂O und 190 µl BioRad-Färbesubstanz zugegeben, wonach die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm im ELISA- Messgerät (Pharmacia) bestimmt und ausgewertet werden konnte.

2.2.3.4 Immunpräzipitation

500 µl Zellextrakt oder Organextrakt wurden mit 10 µl anti-HA-Antikörper (Santa Cruz) versetzt und für 4 h bei 4 °C über Kopf geschüttelt. Dann folgte eine Zugabe von 10 µl Sepharose A (Pierce) und eine weitere Inkubation bei 4 °C über Kopf, diesmal über Nacht. Anschließend wurde 3 x 5 min gewaschen und sowohl die Sepharosekügelchen als auch Auszüge aus den Waschschritten in Probenpuffer aufgenommen und auf Nitrozellulose überführt.

2.2.3.5 Wessel-Flügge-Fällung von Proteinen

Aus wässriger Lösung können Proteine mit der Wessel-Flügge-Fällung konzentriert werden. Dazu werden pro 100 µl Lösung 400 µl Methanol und nach kräftigem Schütteln 100 µl Chloroform zugesetzt. Nach abermaligem Schütteln werden 300 µl H₂O zugegeben, wiederum geschüttelt und die Phasen bei 15000 g binnen 5 min in der Zentrifuge getrennt. Die obere Phase wird verworfen, der unteren 300 µl Methanol zugesetzt und geschüttelt. Das Präzipitat wurde in einem weiteren Zentrifugationsschritt (wie oben) pelletiert, an der Luft getrocknet und entweder in Probenpuffer aufgenommen oder bei -70 °C gelagert.

2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Proteine wurden grundsätzlich mit Hilfe diskontinuierlicher SDS-PAGE-Gele (Laemmli, 1970) analysiert. Dabei wurden sie zunächst in einem niederprozentigen Sammel-

gel fokussiert und in einem sich direkt anschließenden, höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Trenngellösung [6 - 12 % (g/v) Acrylamid; 0,16 - 0,32 % (g/v) N,N-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % (g/v) SDS; 0,1 % (g/v) APS; 0,05 % TEMED (v/v)] wurde zwischen zwei, durch 1,5 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Überschichten mit Isopropanol ließ man das Gel in vertikaler Lage polymerisieren. Nach erfolgter Polymerisation entfernte man das Isopropanol und goß die Sammelgellösung [4 % (g/v) Acrylamid; 0,1 % (g/v) N,N-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % (g/v) SDS; 0,1 % (g/v) APS; 0,1 % TEMED (v/v)] direkt auf das Trenngel. Nach Einsetzen eines entsprechenden Taschenformers ließ man das Sammelgel in vertikaler Lage polymerisieren. Anschließend wurde das Gel in eine Vertikalapparatur eingespannt und die Reservoirs mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, zum Denaturieren 5 min auf 95 °C erhitzt und nach Entfernen des Taschenformers in die Taschen des Gels transferiert. Nach Laden eines Größenmarkers erfolgte die Elektrophorese bei 8 V/cm. Im Anschluß daran wurde die Proteine mit Coomassie-Brillantblau gefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

2.2.3.7 Coomassie-Brillantblau-Färbung von Proteinen

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, können durch Coomassie-Brillantblau-Färbung sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Trenngel für 30 min in Färbelösung und darauffolgend in Entfärbelösung inkubiert bis die Proteine sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel in einer Trockenapparatur unter Vakuum bei 80 °C getrocknet.

2.2.3.8 Proteinaufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST) -Fusionsproteinen

Hierbei handelt es sich um eine Ligandenaffinitäts-Chromatographie. Ein Sepharosekügelchen ist mit Glutathion gekoppelt, an welches die Glutathion-S-Transferase mit hoher Affinität und Stabilität bindet. Liegt die GST als Fusionsprotein mit einem Köderprotein vor, können Bindungspartner des Köderproteins aus einem Homogenat aufgereinigt werden.

Hierzu transformierte man die Vektoren pGEX (Kontrolle) und pGEX49, welches für die Sequenz der Gephyrin-Bindungsstelle des GlyR als GST-Fusionsprotein kodiert, in Bakterien und exprimierte danach entweder die Kontrolle GST, oder das Fusionsprotein GST49. Nach mechanischer Lyse unter Zusatz von 1 mM PMSF in 1x PBS wurde der Überstand nach zwei Zentrifugationsschritten (jeweils 4000 und 15000 g) gereinigt. Dazu wurden 750 µl Kügelchen dreimal im zehnfachen Volumen 1x PBS gewaschen (Zentrifugation bei 500 g) und mit dem Lysat im Überkopfschüttler über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Kügelchen wurden wiederum dreimal gewaschen und mit Elutionspuffer (10 mM Glutathion, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) über eine Säule eluiert. Ein letzter Reinigungsschritt erfolgte bei einer Dialyse in 5 l PBS über Nacht bei 4 °C. Die Konzentration wurde gemessen, ein Proteingel angefertigt und mit Coomassie gefärbt. Nach Schockgefrieren bei -196 °C wurden die Proteine bei -70 °C gelagert.

20 µg (Fusionsprotein) bzw. 50 µg (Kontrolle) des Proteins wurden pro Experiment eingesetzt. Hierzu wurde die bakterielle Proteinlösung bei 4 °C aufgetaut, mit 10 µl gewaschenen Kügelchen pro Ansatz versetzt und für 4 h über Kopf bei 4 °C geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit dem entsprechenden Lysepuffer (5 min, 500 g, 4 °C) wurde das Zellysat zugegeben und 2 h bis über Nacht bei 4 °C über Kopf geschüttelt. Nach weiteren Waschschritten (3-5 mal, 5 min, 500 g, 4 °C) wurde mit Probenpuffer eluiert. Sowohl vom Ausgangsmaterial als auch von den letzten drei Waschschritten wurden jeweils Proben entnommen, die zusammen mit dem Eluat über ein Gel aufgetrennt und dem Western Blot zugeführt wurden.

2.2.3.9 Kosedimentation von Proteinen mit Tubulin

Durch Kosedimentation von Proteinen mit polymerisiertem Tubulin kann eine Bindung eines Proteins an Tubulin gezeigt werden (Gard und Kirschner 1987).

Hierzu wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Die Zellen wurden von den Schalen gekratzt und erst mit PBS, dann mit PEM gewaschen und mit EM-Puffer zum Schwellen gebracht. Die Zellen wurden während 2 min bei 500 g zentrifugiert und im Homogenisator zerrieben. Nach Zusetzen von 0.1 M Pipes, pH 6.6 (f.c.) wurde der Debris bei 2000 g während 5 min pelletiert und verworfen. Nach Zusatz von monomerem Tubulin (Sigma) wird dieses in der Lösung polymerisiert indem man 1 mM GTP und 20 µl Taxol (Sigma) zugab und für 5 min bei 37 °C inkubierte. Die Kontrollen wurden bei 4 °C gehalten. Im Reaktionsgefäß wurde dann PEM/20 % (v/v) Saccharose untergeschichtet und der Ansatz bei 15000 g für 20 min bei RT zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden daraufhin elektrophoretisch getrennt und nach Western geblotet.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Immunoblotanalyse von Proteinen

Proteine können nach Auftrennung in einem SDS-Gel auf eine Membran übertragen werden, um dort mit Hilfe von Antikörpern analysiert zu werden.

Zum Transfer von Proteinen auf Membranen wurde ein halbtrockenes oder ein nasses Verfahren angewendet. Beim halbtrockenen Verfahren wurden die Graphitelektroden der Blotkammer (Roth) mit Transferpuffer befeuchtet. Darauf wurden fünf Lagen befeuchtetes 3MM-Papier von der Größe des Gels, anschließend die befeuchtete Hybond-ECL-Membran B (Amersham-Buchler, Braunschweig), das Gel und weitere fünf Lagen befeuchtetes 3MM-Papier gebracht. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm für =120 min bei RT.

Zum Transfer im nassen System wurden zwei Lagen 3MM-Papier von der Größe des Gels, dann die Hybond-ECL-Membran B und weitere zwei Lagen 3MM-Papier zwischen die Spangen einer Gelhalterung geklemmt und in den puffergefüllten Transferkanister eingeführt.

Die Überführung der Proteine auf die Membran erfolgte während einer Stunde bei einer Stromstärke von 400 mA, ca. 100 mV.

Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper durch Inkubation für 30 min bei RT oder 8 h mit 3 % (v/w) Milchpulver in PBS bei 4 °C abgesättigt. Die Membran wurde dreimal mit 1 x PBS/3 % (v/w) Milchpulver für 5 min gewaschen. Der Primärantikörper wurde darin 1 : 25 bis 1 : 10000 verdünnt und der Blot unter Schütteln bei RT für 90 min mit der Antikörperlösung inkubiert. Danach wurde dreimal je 10 min mit 1 x PBS/3 % (v/w) Milchpulver gewaschen. Anschließend wurde in dem in 1 x PBS/3 % (v/w) Milchpulver auf 1:5000 verdünnten Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert und wiederum dreimal je 5 min gewaschen. Gleiche Teile der Detektionsreagentien wurden gemischt, der Blot darin 5 min inkubiert und ein Röntgenfilm bis zu 30 min exponiert.

2.2.4.2 Immunfärbung

Die Auswertung der Färbungen erfolgte an einem konfokalem Laser Scanning Mikroskop (SLSM) der Firma Leica, bzw. Molecular Dynamics mit 40-, 63- und 100fach vergrößernden Objektiven und auf die Farbstoffe angepassten Prismen- bzw. Filtereinstellungen.

2.2.4.2 Computerprogramme

Zur Analyse von Daten, zur Bearbeitung von Bildern, zur Erstellung von Vortragsmaterialien und zu Büro- und Schreibaarbeiten wurden folgende Computerprogramme eingesetzt:

Microsoft Office 98; 2000; 2001, Canvas 3.5.3; 5; 6; 7, Adobe Photoshop 6.0, Adobe Illustrator 9.0, Image Space, TCS-NT, Netscape Communicator, Mac Vector, Acrobat Reader 3.0; 4.0, Microsoft Powerpoint, sowie verschiedene Hilfsprogramme zum Laden, Sichern und Codieren von Dateien.

3. Ergebnisse

3.1 Kartierung der Bindungsstelle Gephyrins für den GlyR

3.1.1 Gephyrin P1 bindet an GST- β 49 Fusionsprotein

Um die Struktur, Funktion und Entstehung der glyzinerger postsynaptischer Spezialisierungen verstehen zu können, ist die Untersuchung der Bindungseigenschaften von Gephyrin unerlässlich. Frühe Untersuchungen hatten gezeigt, daß Gephyrin ausschließlich an die β -Untereinheit des GlyR bindet. Dort konnten 49 Aminosäuren (As) identifiziert werden, welche die Bindungsstelle für Gephyrin umfassen (Meyer et al., 1995). Innerhalb dieser Sequenz liegt eine Abfolge von 18 As, deren hydrophobe Reste für die Bindung benötigt werden (Kneussel, et al., 2000). Die Region Gephyrins, die für die Bindung an den GlyR verantwortlich ist, konnte bislang allerdings noch nicht eingegrenzt werden. Diese Fragestellung soll im Folgenden im Mittelpunkt stehen.

Um die Bindungsstelle Gephyrins für den GlyR einzugrenzen, wurde ein biochemisches Bindungsassay etabliert (Abb. 1). Es basiert auf der Bindung des zu untersuchenden Proteins an ein Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST), die in einem weiteren Schritt an Sepharose-immobilisiertes Glutathion bindet.

Hierzu wurde die cDNA der 49 As der GlyR β -Untereinheit, die an Gephyrin binden, in einem bakteriellen Expressionsvektor mit der Glutathion-S-Transferase fusioniert (Meyer et al., 1995). Dieses Konstrukt (GST- β 49) wurde in Bakterien transformiert und das Fusionsprotein exprimiert. Nach Lyse der Bakterien wurde es aufgereinigt. In einem weiteren Vorbereitungsschritt wurde entweder Gephyrin, ein Fragment oder eine Mutante Gephyrins in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert, und das Konstrukt in HEK-Zellen mittels der Kalzium-Phosphat-Methode transfiziert. Nach Expression des Polypeptides wurden die Zellen lysiert und ein Teil der zytosolischen Fraktion auf einen Ansatz von Glutathionsepharose-immobilisiertem GST- β 49-Fusionsprotein gegeben. Durch die Kopplung an Sepharose kann der Komplex aus gebundenen Proteinen sedimentiert und so vom Überstand getrennt werden. Nach Inkubation, mehreren Waschschritten und Elution mit SDS-Probenpuffer konnten Gephyrin-Fragmente, die in der Lage waren an GST- β 49 zu binden, im Immunoblot nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde unfusionierte Glutathion-S-Transferase (GST) verwendet, mit der genauso verfahren wurde (siehe auch Kapitel 2).

Zunächst wurde das Bindungsassay mit der wt-Gephyrin-Version P1 (Prior et al., 1991) etabliert (Abb. 1). Dazu wurde dieser Klon in den eukaryontischen Expressionsvektor pCDNA3 (Invitrogen) subkloniert und mit verschiedenen Markierungen versehen. Für die Experimente in Abb. 1A wurde wt-Gephyrin N-terminal mit einem Epitop aus einem Hüll-

protein des vesikulären Stomatitis Virus (VSV) zur Detektion im Immunoblot markiert (P1vsv; Spuren 1-6).

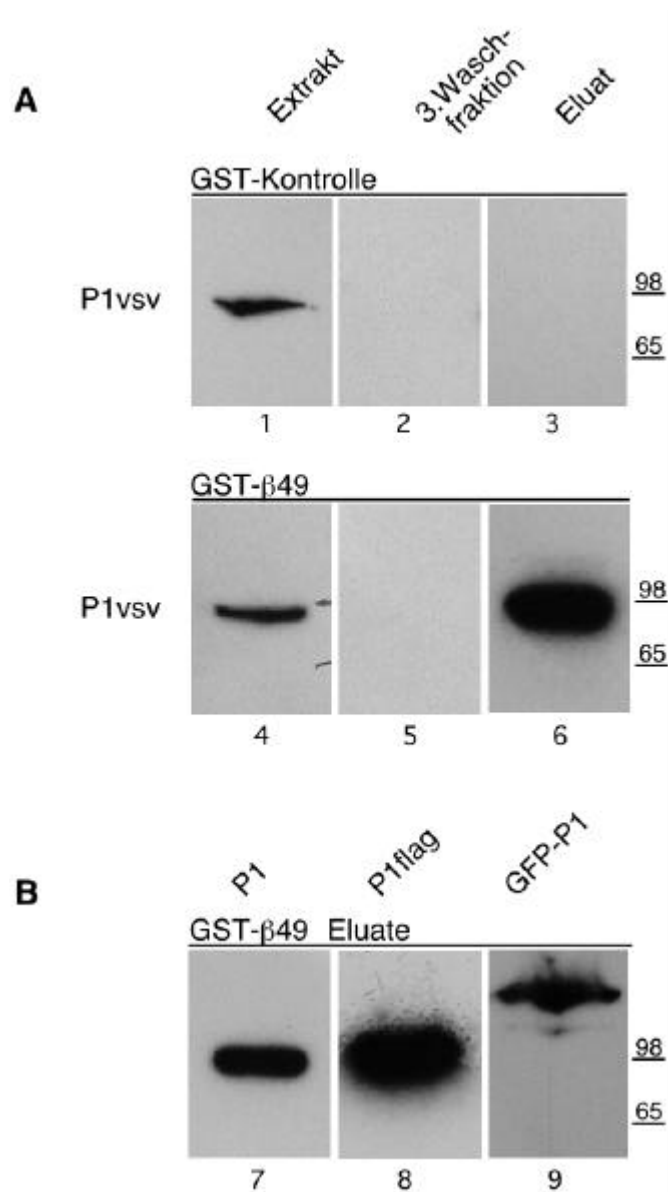


Abb. 1 : Gephyrin P1 bindet spezifisch an die 49 As der Bindungsstelle des GlyR.

GST-basierendes Bindungsassay mit GST-β49 und unterschiedlich markiertem Gephyrin aus HEK-Zellextrakten (Beschreibung im Text). Gezeigt sind Immunoblots gegen angegebene Epitope.

A: P1_{vsv} in der zytosolischen Fraktion der HEK-Zellen; Spuren 2 und 5: dritte Waschfraktion; Spuren 3 und 6: Elution von GST (3) bzw. von GSTβ-49 (6) -beladener Separosematrix.

B: Unmarkiertes (P1; Spur 7), flag-markiertes (P1flag; Spur 8) und GFP-markiertes Gephyrin (GFP-P1; Spur 9) binden in vergleichbarer Weise an das GST-β49 Fusionsprotein.

Nachweis über monoklonale anti-VSV- (P1vsv), anti-Geph- (P1), anti-flag- (P1flag) bzw. polyklonale anti-GFP-Antikörper (GFP-P1) als Erstantikörper; Zweitantikörper: anti-Maus-HRP bzw. anti-Kaninchen-HRP.

Bei Verwendung von zytosolischen HEK-Zell-Extrakten, die rekombinantes Gephyrin P1vsv enthielten, zeigte sich eine deutliche und saubere Bande im Immunoblot der Zellextrakte (Abb. 1A, Spur 1 und 4). Es wurde keine unspezifische Bande detektiert. Nach drei Waschschritten war kein immunreaktives Protein mehr im Überstand vorhanden (Spuren 2 und 5). In der Kontrolle war nach Elution keine unspezifische Bindung an die Sepharose, Glutathione oder die GST-beladene Sepharose nachweisbar (Spur 3). Beim Einsatz des GST- β 49-Fusionsprotein allerdings zeigte sich nach Elution eine sehr prominente Bande in der erwarteten Größe. Mit diesem Ansatz ist man also in der Lage, die Bindung von VSV-markiertem Gephyrin P1 an GST- β 49 effizient und spezifisch nachzuweisen.

In einem weiteren Schritt wurden unterschiedlich markierte Varianten des Gephyrin-Wildtyps auf Bindung an den GlyR untersucht (Abb. 1 B). Unmarkiertes Gephyrin (P1; Spur 7) oder mit einem C-terminalen flag-Epitop (P1flag; Spur 8) versehenes Gephyrin zeigte ebenso eindeutige Bindung an den GlyR wie ein Fusionsprotein aus dem Grün-Fluoreszierenden Protein (GFP) und Gephyrin P1 (GFP-P1; Spur 9). Bei diesem Konstrukt wurde Gephyrin P1 in den Vektor pEGFP-N3 an den C-Terminus von GFP fusioniert. Das Molekulargewicht dieses Fusionsproteins beträgt etwa 118 kDa.

In Abb. 1 B konnte gezeigt werden, daß auch wt-Gephyrin in diesem Untersuchungssystem spezifisch an die zytoplasmatische Bindungssequenz der GlyR- β Untereinheit bindet. In einigen Fällen wurde eine Doppelbande detektiert. Dies läßt sich möglicherweise auf posttranslationale Modifikationen zurückführen, wie z.B. Phosphorylierungen. Auch flag- und VSV-markiertes sowie GFP-fusioniertes Gephyrin banden spezifisch an GST- β 49. Die Kontrollen sowie die Waschschritte entsprachen denen in Abb. 1 A gezeigten und wiesen keinerlei immunreaktive Banden auf. Einzig in Spur 9, dem Eluat des Ansatzes GFP-P1 sind schwache unspezifische Banden zu erkennen. Der Größenunterschied ist auf die Fusionierung mit GFP zurückzuführen und wurde so erwartet. Bei allen anderen Ansätzen wurde nur eine prominente Bande der erwarteten Größe detektiert. Unspezifische Banden traten nicht auf.

Offensichtlich ist wt-Gephyrin bei jeder hier verwendeten Markierung in der Lage, hochreproduzierbar an ein Fusionsprotein bestehend aus GST und der Bindungsstelle der GlyR- β Untereinheit für Gephyrin zu binden. Somit ist dieses *in vitro* System für weiterführende Experimente zur Identifizierung und zur Eingrenzung der Bindungsstelle geeignet.

3.1.2 Affinitätsaufreinigung von Gephyrin

Eine Besonderheit fiel zunächst bei Untersuchung der unmarkierten Gephyrin P1-Version auf (Abb. 2). Beim Einsatz der zytosolischen Fraktion P1-exprimierender HEK-Zellen konnte zunächst keine Gephyrin-Bande mit dem anti-Gephyrin-Antikörper (anti-Geph) detektiert werden (Abb. 2, Spur 1 und 4). In diesem Fall befand sich die Gephyrinkonzentration unter der Nachweisgrenze. In den Waschfraktionen konnte dementsprechend auch kein Pro-

tein nachgewiesen werden (Spuren 2 und 5), das Eluat der Kontrolle war ebenfalls ohne Verunreinigungen (Spur 3). Im Bindungsassay konnte jedoch eine starke Anreicherung von Gephyrin durch dessen Bindung an GST- β 49 beobachtet werden (Spur 6).

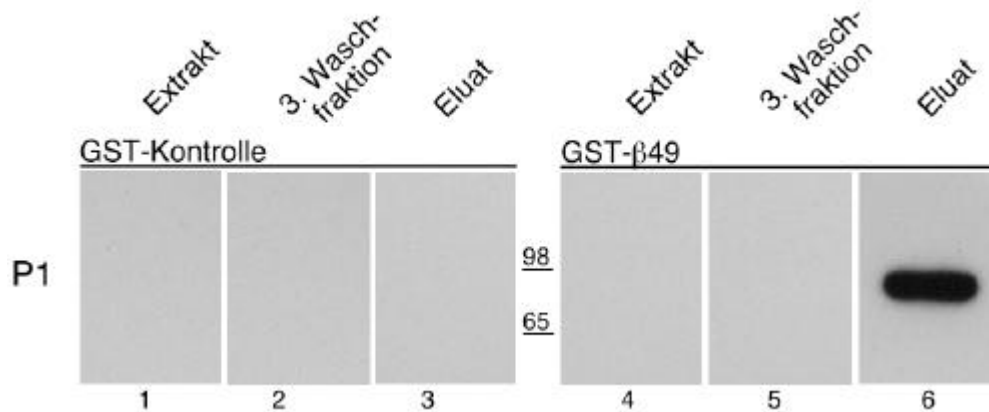


Abb. 2: Durch die Bindung an GST- β 49 lässt sich Gephyrin aufreinigen.

HEK-Zellen wurden mit unmarkiertem wt-Gephyrin P1 transfiziert und die Extrakte im Bindungsassay eingesetzt. Durchführung wie beschrieben. Links: GST-Kontrolle, Rechts: GST- β 49; Spuren 1 und 4: Extrakte, Spuren 2 und 5: dritte Waschfraktionen, Spuren 3 und 6: Eluate. Erstantikörper: anti-Geph; Zweitantikörper: anti-Maus-HRP.

Hier wurde also nicht nur die Bindung von Gephyrin an den GlyR gezeigt, es konnte zudem Gephyrin aufgrund seiner Affinität für die GlyR-Bindungsstelle angereichert werden.

Dadurch kann Gephyrin und dessen Fragmente auch dann auf Bindung an die GlyR-Bindungsstelle getestet werden, wenn nur geringe Expression vorliegt oder ein schwach bindender Antikörper verwendet wird.

3.1.3 Der N-Terminus Gephyrins bildet die Bindungsstelle für den GlyR

Um im Folgenden die Bindungsstelle Gephyrins für den GlyR zu finden, wurden verschiedene Fragmente und Deletionsmutanten Gephyrins mittels des oben beschriebenen Assays auf Bindung an das GST- β 49 Fusionsprotein getestet.

Eine Übersicht über die zur Bearbeitung dieser Fragestellung hergestellten und benutzten Teilkonstrukte und Mutanten Gephyrins findet sich unter Angabe von Markierung, relativer Lage und Größe in der Reihenfolge ihres Einsatzes in Abb. 3

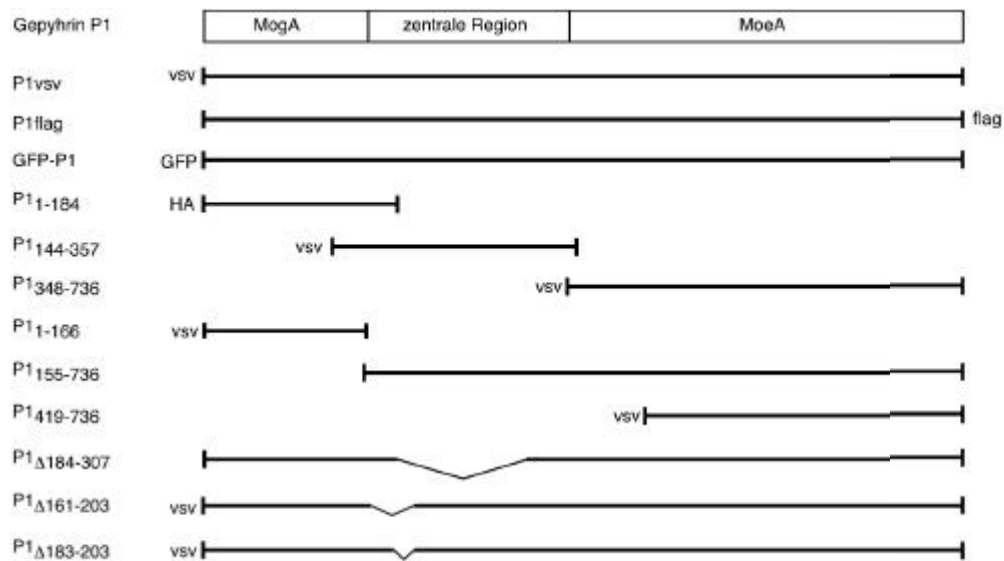


Abb. 3: Übersicht über die verwendeten Deletionskonstrukte Gephyrins.

Schematische Darstellung mit Bezeichnung und Angabe der kodierten Aminosäuren, sowie der Epitopmarkierung und der relativen Lage und Größe. Angaben der As beziehen sich auf Gephyrin P1. Zum Vergleich sind oben die Homologieregionen Gephyrins schematisch dargestellt. GFP: Grün Fluoreszierendes Protein; VSV: Vesiculärer Stomatitis Virus; HA: Hämagglutinin.

Zunächst wurden drei Fragmente auf Bindung an den GlyR untersucht, deren Konstruktion sich auf die Homologieregionen Gephyrins bezieht. P1₁₋₁₈₄ umfasst die N-terminale Region, die homolog zum bakteriellen Protein MogA ist, P1₃₄₈₋₇₃₆ repräsentiert die C-terminale Region, homolog zum bakteriellen Protein MoeA, P1₁₄₄₋₃₅₇ schließlich umfaßt die zentrale Verbindungsregion Gephyrins, die keine Homologie zu bekannten Proteinen aufweist (für Erläuterungen siehe Kapitel 1). Die Fragmente wurden in den Expressionsvektor pCDNA3 kloniert. Zur Markierung wurde jeweils ein VSV-Epitop, für P1₁₋₁₈₄ ein HA-Epitop eingefügt (siehe Abb. 4).

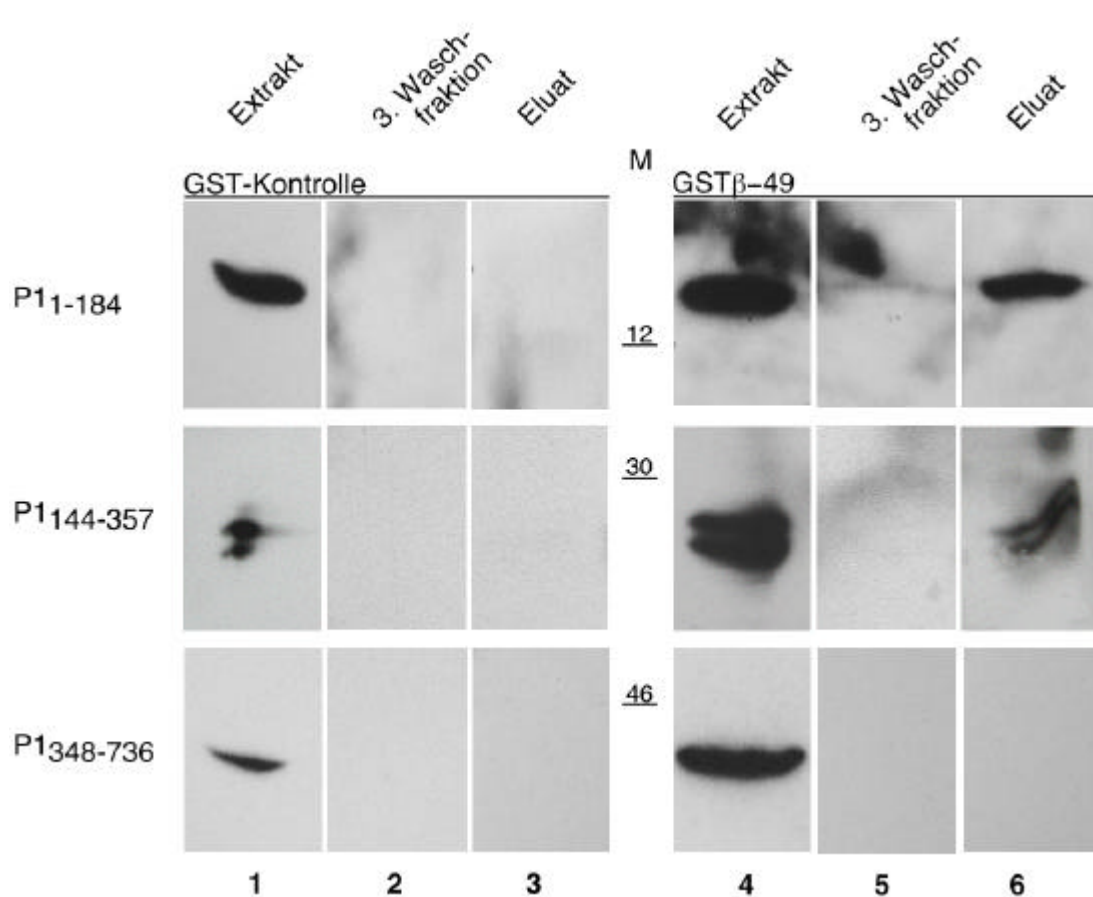


Abb. 4: Der N-terminale Bereich Gephyrins bindet an den GlyR.

Drei Fragmente Gephyrins P1₁₋₁₈₄, P1₃₄₈₋₇₃₆, und P1₁₄₄₋₃₅₇ wurden auf ihre Bindung and GST-β49 getestet. Durchführung wie beschrieben. Gezeigt sind Immunoblots der angegebenen Fraktionen. Linker Block: GST-Kontrolle; rechter Block: GST-β49. Spuren 1 und 4: Heterolog exprimiertes Fragment im Extrakt; Spuren 2 und 5: dritte Waschfraktion; Weiterhin: Elutionsfraktionen von GST (3) bzw. von GSTβ-49 (6). Nachweis über anti-VSV-Antikörper (P1₁₄₄₋₃₅₇; P1₃₄₈₋₇₃₆), bzw. über ant-HA-Antikörper (P1₁₋₁₈₄). Zweitantikörper: anti-Maus-HRP, für P1₁₋₁₈₄ anti-Kaninchen-HRP.

Die Fragmente wurden mit vergleichbarer Effizienz in HEK-Zellen exprimiert (Abb. 4: Der N-terminale Bereich Gephyrins bindet an den GlyR.). Sowohl in der dritten Waschfraktion als auch im Eluat der GST-Kontrolle waren keine unspezifischen Bindungen und keine bzw. kaum Verunreinigungen nachzuweisen (Spuren 2 und 5; Spur 3).

Die Ergebnisse der Bindungsstudie sind eindeutig: Das C-terminale Fragment P1₃₄₈₋₇₃₆ zeigt keinerlei Bindungsaktivität. Demgegenüber gut zu erkennen sind die Banden von P1₁₋₁₈₄ und im Eluat von P1₁₄₄₋₃₅₇ GST-β49. Beide Fragmente sind in der Lage an die β-Untereinheit des GlyR zu binden, wobei das N-terminale Fragment offensichtlich effizienter zu binden vermag.

Aus diesen Experimenten wird deutlich, daß die wichtigen As-Reste Gephyrins, welche die Bindung an den GlyR vermitteln, im Bereich zwischen den Aminosäuren 144 und 184 liegen sollten, den überlappenden Aminosäuren der Fragmente P1₁₋₁₈₄ und P1₁₄₄₋₃₅₇.

Zur Kontrolle, und um die Bindungsregion weiter einengen zu können, wurden zusätzliche Fragmente und Mutanten Gephyrins untersucht (siehe Abb. 5). Die Fragmente P1₁₋₁₆₆ und P1₁₅₅₋₇₃₆ wurden ebenso wie ein weiteres C-terminales Fragment (P1₄₁₉₋₇₃₆) und eine Deletionsmutante, bei der sich die beiden Homologiedomänen für MogA und MoeA direkt hintereinander befinden (P1_{Δ184-307}), in den Expressionsvektor pCDNA3 kloniert, in HEK-Zellen exprimiert und auf Bindung an GST-β49 Fusionsprotein getestet (siehe Abb. 5).

Die Expressionseffizienzen bzw. Stabilitäten dieser Fragmente in den HEK-Zellen waren sehr unterschiedlich. Das Fragment P1₁₋₁₆₆ wurde sehr stark exprimiert, P1₄₁₉₋₇₃₆ ähnlich wie der Wildtyp. Von den Fragmenten P1₁₅₅₋₇₃₆ und P1_{Δ184-307} waren nur recht schwache Banden sichtbar. Auch bei diesem Experiment waren sämtliche Waschfraktionen und Kontrollen ohne Verunreinigungen oder unspezifische Banden im Immunoblot (Abb.8, Spuren 2, 3, 5).

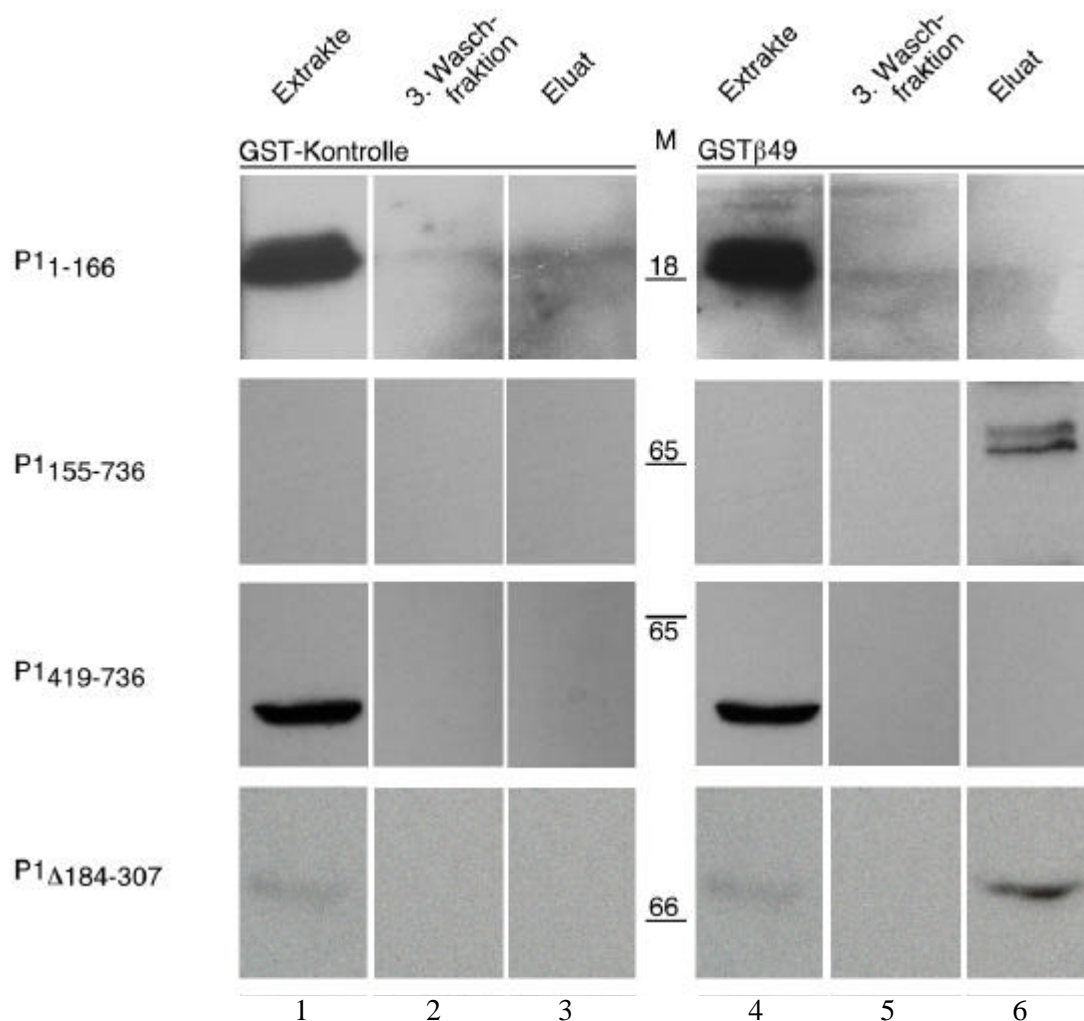


Abb.5: Ein großer Bereich im N-Terminus Gephyrins vermittelt die Bindung an den GlyR.

Drei weitere Fragmente Gephyrins ($P1_{1-166}$, $P1_{155-736}$, $P1_{419-736}$) und eine Deletionsmutante ($P1_{\Delta 184-307}$) wurden auf ihre Bindung an das GST- $\beta 49$ Fusionsprotein getestet. Durchführung wie beschrieben. Gezeigt sind Immunoblots der angegebenen Fraktionen. Linker Block: GST-Kontrolle; rechter Block: GST- $\beta 49$. Spuren 1 und 4: Zytoplasmische Fraktion; Spuren 2 und 5: dritte Waschfraktion; Spuren 3 und 6: Elution von GST (3) bzw. von GST- $\beta 49$ (6) beladener Glutathionseparose. Nachweis über anti-Geph-Antikörper ($P1_{155-736}$, $P1_{419-73}$, $P1_{\Delta 184-3076}$) und anti-VSV-Antikörper ($P1_{1-166}$). Zweitantikörper: anti-Maus-HRP; für $P1_{140-186GFP}$: anti-Kaninchen-HRP.

Das Fragment $P1_{155-736}$ konnte nie im Extrakt der HEK-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5, Spur 3). Allerdings wurde im Eluat des Ansatzes mit GST- $\beta 49$ eine deutliche Bindungsreaktion nachgewiesen. Es zeigte sich eine Doppelbande in der erwarteten Größe. Eine Doppelbande wurde auch zuweilen beim Nachweis von wt-Gephyrin detektiert. Darüber hinaus fanden sich hier noch weitere Banden in der Größe von wt-Gephyrin, sowie eine Bande im niederen molekularen Bereich. Möglicherweise wurde ein Anteil HEK-zelleigenen Gephyrins mit aufgereinigt. Auch die Deletionsmutante $P1_{\Delta 184-307}$ wurde nur relativ schwach exprimiert, war aber im Extrakt noch detektierbar und wurde durch GST- $\beta 49$ aufgereinigt. Ein weiteres C-terminales Fragment ($P1_{419-736}$) zeigte sich hier nicht in der Lage, an das GST- $\beta 49$ Fusionsprotein zu binden und bestätigt damit den Befund aus Abb. 4. Desweiteren wurde beobachtet, daß das Fragment bestehend aus den As-Resten 1-166 nicht an die GlyR-Bindungsstelle bindet. Offenbar liegen wichtige Elemente, die zur Bindung an den GlyR notwendig sind, außerhalb dieses Bereiches der Primärstruktur. Es wurden weiterhin kleinere Fragmente generiert und mit GFP fusioniert. Unfusionierte Fragmente dieser Größe sind erfahrungsgemäss in der Zelle nicht stabil und wurden deshalb nicht eingesetzt. Keines dieser Fragmente war bindungsfähig. Diese Fragmente Gephyrins waren offensichtlich zu kurz um eine Bindung mit dem GlyR ein zu gehen. (nicht gezeigt).

Auch in dieser Untersuchung bestätigte sich, daß der C-Terminus Gephyrins nicht an den GlyR bindet, sondern allein jene Fragmente, welche die Aminosäuren 166-184 beinhalten. Offensichtlich ist nur ein größerer Aminosäureabschnitt dieser Region in der Lage, hochaffin an den GlyR zu binden.

Deshalb wurden im folgenden Deletionsmutanten angefertigt und untersucht, denen die Aminosäuren 166-184 Gephyrins fehlen (Abb. 6). Die Deletionsmutanten $P1_{\Delta 183-203}$ und $P1_{\Delta 161-203}$ wurden mit einem PCR-basierten Mutageneseansatz hergestellt und in den Vektor pCDNA3 inkloniert (siehe Kapitel 2). Sie wurden mit einem VSV-Epitop am N-Terminus zum leichteren Nachweis versehen.

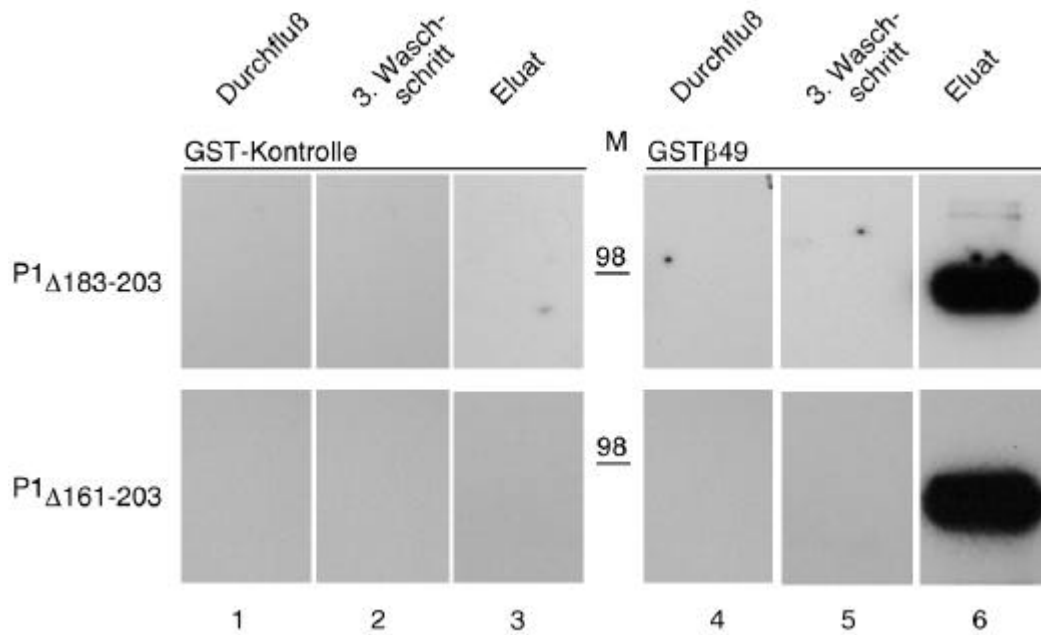


Abb. 6: Mutanten ohne As 166-184 sind in der Lage an den GlyR zu binden.

Zwei Deletionsmutanten Gephyrins, $P1_{\Delta 183-203}$ und $P1_{\Delta 161-203}$, wurden auf ihre Bindung an das GST- $\beta 49$ Fusionsprotein getestet. Durchführung wie beschrieben. Die Mutanten sind VSV-markiert. Gezeigt sind Immunoblots der angegebenen Fraktionen. Linker Block: GST-Kontrolle; rechter Block: GST- $\beta 49$. Spuren 1 und 4: Heterolog exprimiertes Fragment im Extrakt; Spuren 2 und 5: dritte Waschfraktion; Spuren 3 und 6: Elution von GST (3) bzw. von GST- $\beta 49$ (6) beladenen Sepharosekugeln. Nachweis über anti-VSV-Antikörper. Zweitantikörper: anti-Maus-HRP.

Auch diese Deletionsmutanten wurden nur sehr schwach exprimiert (Abb. 6). Im Extrakt selber ließen sich die Mutanten nicht nachweisen. Allerdings läßt sich an der prominenten Bande im Eluat eine starke Aufreinigung durch GST- $\beta 49$ erkennen. Die Fraktionen aus den Waschgängen und den Kontrollen sind frei von Signalen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die bei diesem Experiment deletierten Aminosäuren zwar an der Bindung Gephyrins an den GlyR beteiligt sind. Jedoch verbleibt nach deren Deletion noch ausreichend Bindungsaktivität anderer As-Reste, um nachweisbare Bindung zu vermitteln. Aus den hier gewonnenen Daten läßt sich schließen, daß die an der GlyR-Bindung beteiligten As-Reste über einen weiten Bereich im N-Terminus verteilt sind. Offensichtlich bilden voneinander entfernt liegende As die Bindungsstelle, wahrscheinlich über die Formierung einer komplexen tertiären Struktur. Die Entfernung beteiligter As-Reste hat deshalb nicht immer den Verlust der Bindungsfähigkeit zur Folge. Das Fragment $P1_{1-184}$ ist also das kürzeste Fragment Gephyrins, das den GlyR binden kann.

Als weiteres wurden verschiedene Mengen an Lysat eingesetzt, das P1₁₋₈₄ enthielt (siehe Abb. 7).

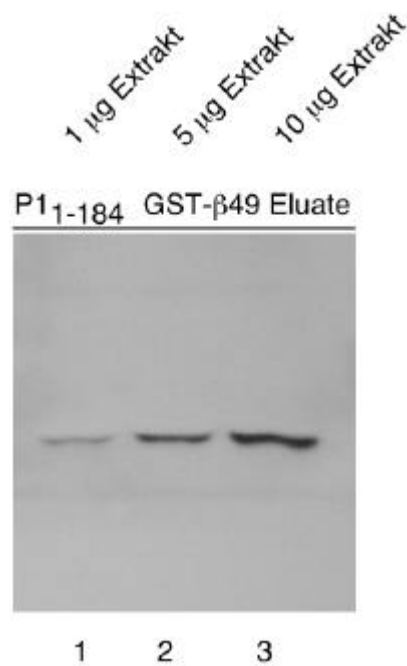


Abb. 7: Sensitivität des Bindungsassays mit P1₁₋₁₈₄.

Verschiedene Verdünnungen des Extraktes aus mit P1₁₋₁₈₄-transfizierten HEK-Zellen wurden im Bindungsassay mit GST-β49 eingesetzt. Angegeben ist die Gesamt-Proteinkonzentration der Verdünnungen von 1 µg (Spur 1), 5 µg (Spur 2) bis 10 µg (Spur 3) P1₁₋₁₈₄-haltiger zytosolischer HEK-Extrakte. Durchführung wie beschrieben. Erstantikörper: anti-HA; Zweitantikörper: anti-Kaninchen-HRP.

Um eine Verdünnungsreihe mit P1₁₋₁₈₄ anzufertigen, wurden verschiedene Protein-Konzentrationen von HEK-Fibroblasten, die P1₁₋₁₈₄ enthielten hergestellt und auf Bindung an GST-β49 getestet (Abb. 7). Die Zunahme der Bandendicke bei Erhöhung der Proteinmenge war eindeutig zu erkennen. Schon beim Einsatz eines Mikrogrammes zeigte sich eine eindeutig zu detektierende Bande.

Im Folgenden wird die Bindungsaktivität der untersuchten Fragmente und Deletionsmutanten nochmals zusammengefasst (Abb.8):

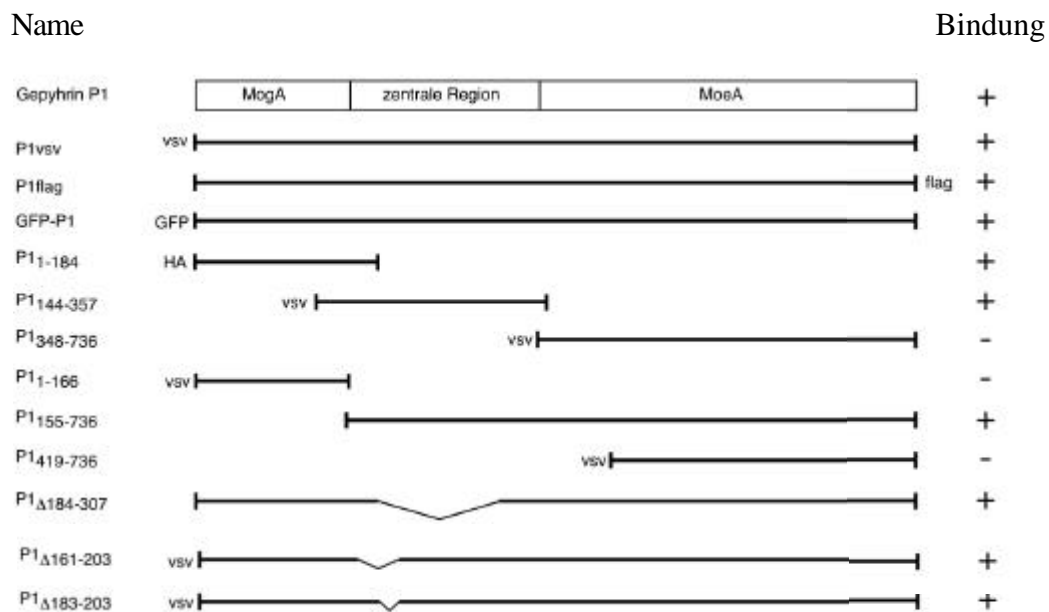


Abb. 8: Darstellung der eingesetzten Fragmente und Mutanten Gephyrins

mit Angabe des Namens, der relativen Größe und Lage zu Gephyrin P1 und ihres Bindungsverhaltens in der Reihenfolge des Einsatzes. Zum Teil wurden die gleichen Konstrukte für vorangegangene Untersuchungen eingesetzt. Siehe Kapitel 6 für eine Zusammenstellung aller Konstrukte.

Offensichtlich ist ein die Aminosäuren 166-184 C- oder N-terminal flankierender Bereich Gephyrins nötig, um eine Bindung zu vermitteln. Möglicherweise befindet sich in diesem Bereich eine Region mit besonderer sekundärer Struktur. Eine Computeranalyse zur Struktur der Bindungsregion ist in Abb. 9 gezeigt.

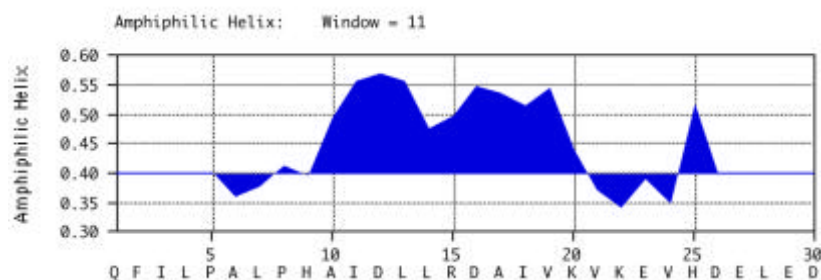


Abb. 9: Vorhersage über die Struktur der GlyR-bindenden Sequenz Gephyrins

nach Kyte-Doolittle. Untersucht wurden die As 155 bis 185. Zwischen As 164-176 wird eine amphiphatische Helix als wahrscheinliche Sekundärstruktur voraussagesagt.

Eine Computeranalyse legt als Sekundärstruktur eine amphiphatische α -Helix im Bereich der bindungsaktiven Region nahe (Abb. 9). Vermutlich ist eine solche Struktur bei der

Bindung Gephyrins an den GlyR beteiligt. Sämtliche Untersuchungen bezüglich bekannter Domänen in verschiedenen Datenbanken mit verschiedenen Algorithmen zeigten keinerlei Ähnlichkeiten zu bekannten funktionellen Protein-Domänen.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß eine für die GlyR-Bindung wichtige Region am N-Terminus Gephyrins liegt. Ein zentraler Bereich befindet sich zwischen As 155 und 184. Für diesen Bereich wird eine amphipatische α -Helix vorhergesagt. Diese ist wahrscheinlich wesentlich an der Bindung Gephyrins an den GlyR beteiligt, aber nicht als alleiniges Element verantwortlich. Offenbar handelt es sich hier nicht um eine lineare kurze Bindungsstelle, sondern um einen längeren Bindungsbereich, bei dem auch räumliche Strukturen zur Bindung beitragen.

3.2 Aufreinigung verschiedener Gephyrin-Varianten

Ursprünglich wurde Gephyrin aus Hirn zusammen mit dem GlyR aufgereinigt (Pfeiffer et al., 1982). Später wurde im ZNS alternatives Spleißen des Gephyrin-Primärtranskriptes im Bereich der 5'-Region nachgewiesen. Hinweise auf Expression Gephyrins in anderen, nicht-neuronalen Geweben wurden durch Northern Blot-Untersuchungen gewonnen (Prior et al., 1992). Später wurden unterschiedlich große Gephyrin-Transkripte in Niere, Lunge und der Leber entdeckt (Ramming et al., 2000). Es ist daher wahrscheinlich, daß das Molekulargewicht des Gephyrin-Proteins in verschiedenen Zellen variiert und auch mehrere Varianten im gleichen Gewebe vorkommen können.

Weitere Hinweise auf die mögliche Existenz verschiedener Gephyrin-Polypeptide ergaben sich aus Arbeiten über die Funktion Gephyrins in der MoCo-Synthese. Dabei zeigte sich, daß der N-Terminus der Gephyrin-Variante P1 (P1₁₋₄₁₉) eine funktionelle Rolle in der MoCo-Synthese bei Arabidopsis übernehmen kann. Das Vollängenprotein Gephyrin P1 (P1₁₋₇₃₆) war hierzu jedoch nicht in der Lage (Stallmeyer et al., 1999). In Gephyrin-defizienten Mäusen sind jene Enzyme ohne Funktion, die einen Molybdän-Kofaktor benötigen (Feng et al., 2000). Offensichtlich ist Gephyrin für die MoCo-Synthese essentiell. Möglicherweise wird in Zellen, die diesen Kofaktor synthetisieren, eine Gephyrin-Version exprimiert, die nicht der Version P1 entspricht, jedoch im Syntheseweg des Kofaktors mitwirkt.

Bislang sind Gephyrin-Proteine in anderen Organen als dem ZNS nicht nachgewiesen worden. Seit kurzem ist ein neuer Antikörper kommerziell erhältlich (anti-Geph, Transduction Lab). Er hat sein Epitop im C-Terminus zwischen As 528 und 736 und detektiert Gephyrin im Immunoblot sehr effektiv. Mit diesem Antikörper sollte Gephyrin und dessen Varianten auch in anderen Organen als dem Hirn nachweisbar sein.

Um Varianten Gephyrins zu finden, wurden Organe der adulten Ratte entnommen. Sofort nach Entnahme wurden sie in einen tritonhaltigen Lysepuffer gegeben, der mit einem Cocktail aus verschiedenen Proteinaseinhibitoren versetzt war, und homogenisiert. Bei Unter-

suchung dieser Triton-Extrakte im Immunoblot zeigten sich bei Niere, Lunge, Testis und Milz keine detektierbaren Gephyrin-Banden. Bei Leber, Hirn, Herz Muskel und Retina waren allerdings deutliche, teils schwache Banden zu entdecken (Abb. 10, Spuren 1-5). Neben der bekannten Größe von 93 kDa, die alle erwähnten Ansätze zeigten, wurden immunreaktive Proteine verschiedener Größen detektiert. Retina, Muskel und Herz und Leber zeigen eine Bande von 60 kDa. Im Herzen findet sich sehr schwach eine Gephyrinvariante von 52 kDa, in der Leber konnten weitere Banden von 52, 54 und 56 kDa festgestellt werden. Somit konnten in diesen Organen erstmals kürzere Varianten von Gephyrin entdeckt werden.

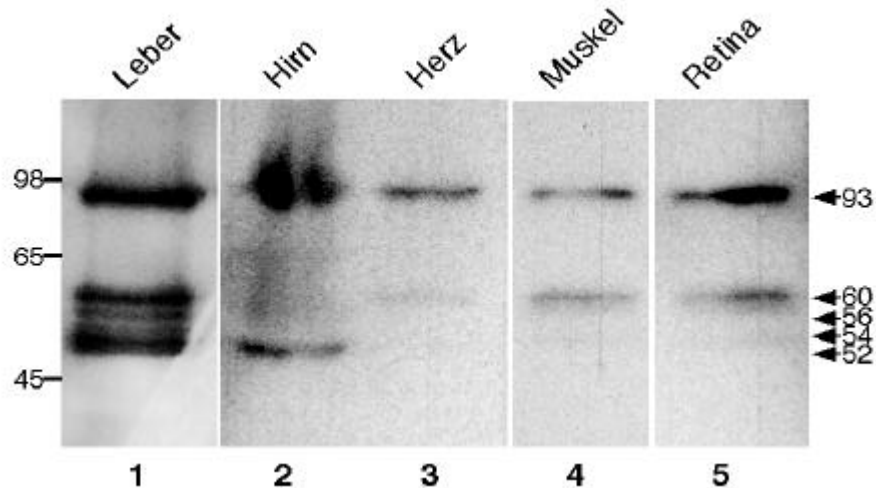


Abb. 10: Verschiede Gephyrine können in einigen Organen nachgewiesen werden.

Immunoblot mit dem monoklonalen Antikörper gegen die C-terminale Region von Gephyrin (anti-Geph, Transduction Lab) zeigt Gephyrine mit unterschiedlichem Molekulargewicht in Gewebeextrakten der adulten Ratte. Nur in den gezeigten Organen Leber, Hirn, Herz, Muskel und Retina konnte Gephyrin detektiert werden. Extrakte anderer Organe zeigten keine Färbungen im Immunoblot. Präparation der Proben wie oben und in Kapitel zwei angegeben. Erstantikörper: anti-Geph; Zweitantikörper: anti-Maus-HRP.

In vorigen Kapiteln wurde ein Bindungsassay mittels des GST- β 49 Fusionsproteins beschrieben, welches in der Lage ist, heterolog exprimiertes Gephyrin über dessen Bindung an den GlyR mit hoher Affinität anzureichern (siehe Abb. 2 und Kapitel 2). Im Folgenden fand dieses System zur Anreicherung von Gephyrin aus Triton-Extrakten aus Organen der adulten Ratte Verwendung (siehe Abb. 11).

Um die Anzahl der GST- β 49-bindenden Proteine abschätzen zu können, wurden die Proteinbanden nach Auftrennung zunächst mit Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Extrakte zeigten ohne Aufreinigung eine nicht auflösbare Bandendichte (Spur 1), nach Aufreinigung mit GST- β 49 Fusionsprotein wurden weitaus weniger (≥ 12) Banden sichtbar (Spur 2). Die Kontrolle, Aufreinigung mit GST (Spur 3), zeigte keine eluierte Bande.

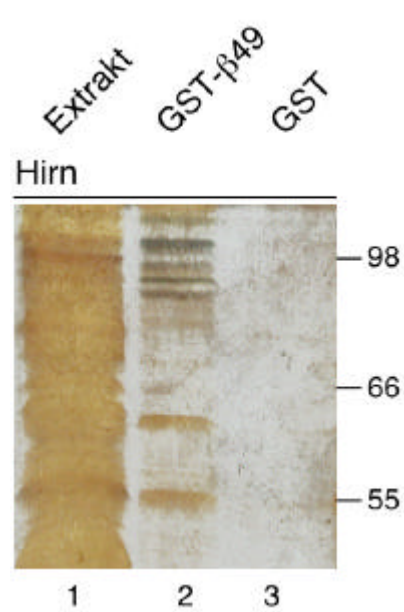


Abb. 11: Aufreinigung von Proteinen der glyzineren postsynaptischen Membran.

Homogenate des Hirns adulter Ratten wurden entweder direkt aufgetragen (1) oder mit GST-β49 (2) oder GST als Kontrolle (3) aufgereinigt und mit Silberfärbung detektiert. Extraktion und Bindungsassay wie beschrieben.

Diese Methode der Aufreinigung ist also in der Lage, Proteine aus Triton-Extrakten von Organen aufzureinigen (Abb. 11). Im Folgenden wurde daher unter Einsatz dieses Bindungsassays getestet, ob aus verschiedenen Organextrakten der adulten Ratte unterschiedliche Gephyrin-Varianten aufgereinigt werden können (Abb. 12).

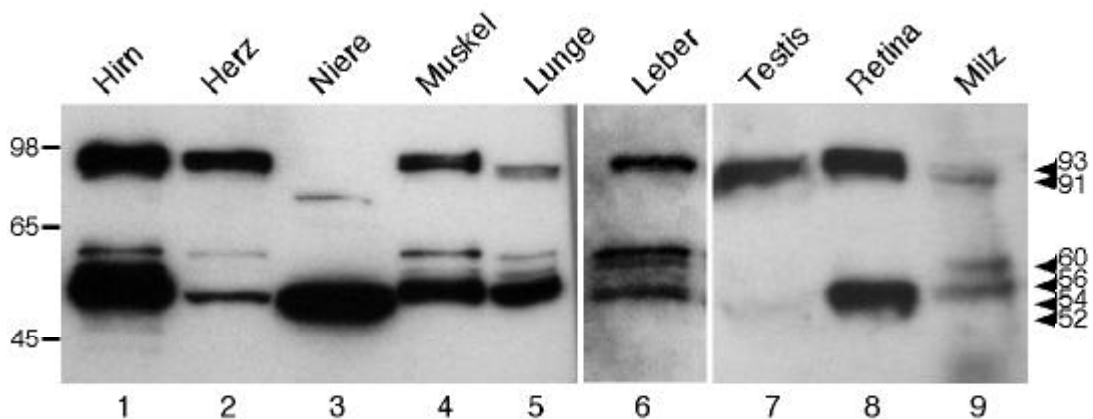


Abb. 12: Anreicherung von Gephyrinvarianten

Die angegebenen Organe wurden adulten Ratten entnommen und Tritonextrakte hergestellt. Nach Extraktion wurde der Zellextrakt einer Anreicherung durch das GST-Bindungsassays unterworfen. Präparation der Proben und GST-Bindungsstudien wie beschrieben. Erstantikörper: anti-Geph; Zweitantikörper: anti-Maus-HRP.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 12 dargestellt. In jedem untersuchten Gewebe wurden Gephyrin-Moleküle unterschiedlicher Größe entdeckt. Auffällig war hierbei, daß in allen Geweben, einschließlich Hirn, mindestens eine Bande zu detektieren war, die nicht der bislang bekannten Größe von 93 kDa entsprach. So konnten im Hirn Banden von 52 und 60 kDa aufgereinigt werden. Darüberhinaus konnten Banden folgenden Molekulargewichts (in kDa) gefunden werden: 52, 60 und 93 im Herz; 52 und 75 in der Niere; 52, 56, 60 und 93 im Skelettmuskel; 52, 56, 60, 91 und 93 in der Lunge; eine nur schwache Bande von 52 und eine prominente bei 93 kDa in Testis; in der Retina konnten Banden von 52 und 93 kDa, und in der Milz von 54, 60, 91 und 93 kDa (Abb. 12), detektiert werden.

Zur Kontrolle wurde jeweils nach dem letzten von fünf Waschgängen eine Probe der Waschfraktion entnommen und im Immunoblot untersucht, zusätzlich wurden Kontrollen mit unfusioniertem GST angefertigt. Es zeigte sich jeweils keinerlei Banden. Als weitere Kontrollen wurden Extrakte der Leber, als stoffwechselaktivstem Organ, und des Hirns mit wechselnden Mischungen von Proteinaseinhibitor mit GST- β 49 Fusionsprotein inkubiert, von der Sepharosematrix eluiert und im Immunoblot untersucht (siehe Abb. 13).

Aus Abb. 13, der Darstellung dieser Kontrollen, wird deutlich, daß die verschiedenen Banden nach Aufreinigung höchstwahrscheinlich nicht durch Abbau Gephyrins entstanden, da die selben Banden wie in Abb. 12 zu detektieren waren. Im Falle von Proteolyse wäre unter den verwendeten *in vitro* -Bedingungen ein verändertes Bandenmuster zu erwarten gewesen.

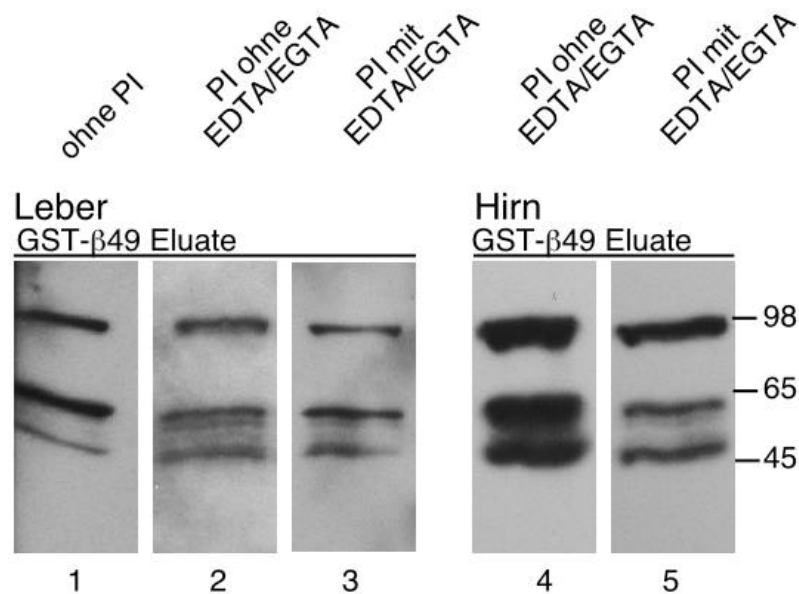


Abb. 13: Kontrolle mit verschiedenen Kombinationen von Proteinaseinhibitoren.

Gezeigt sind Eluate aus Gephyrin-Aufreinigungen mit GST- β 49 Fusionsprotein aus Leber (1-3) und Hirn (4-5). Lyse der Gewebe ohne (Spur 1) bzw. mit verschiedenen Mixturen von Proteinaseinhibitoren (PI) hat keinen Einfluß auf das Bandenmuster. PI: Mischung aus Antipain, Aproti-

nin, Bestatin, Bestatin, Chymostatin, Leupeptin, Pepstatin, Phosphoramidon, Pefabloc SC in vom Hersteller nicht angegebenen Konzentration (Roche Molecular Biochemicals).

Selbst bei Durchführung des Bindungsassays ohne Proteinaseinhibitoren (Abb. 13, Spur 1) zeigen sich die Banden ebenso stabil wie bei Verwendung einer vollständigen Kombination von Proteinaseinhibitoren. Besonders interessant sind die Ansätze mit bzw. ohne Ca^{2+} -Chelatoren bei Leber (Spuren 2 und 3) und Hirn (Spuren 4 und 5). Da die Bildung synaptischer GlyR-Aggregate aktivitätsabhängig ist, und in diesem Rahmen abhängig vom Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle (Kirsch und Betz, 1999), wäre es möglich, daß die Konzentration von Ca^{2+} in der Zelle Auswirkungen auf die Bindungsaktivität Gephyrins hat. Das ist jedoch offensichtlich nicht der Fall.

Man kann also aus den Ergebnissen dieser Experimente schließen, daß die gezeigten immunoreaktiven Proteine verschiedene Variationen Gephyrins repräsentieren. Hiermit ist es erstmals gelungen, Protein-Varianten Gephyrins aus verschiedenen Geweben nachzuweisen.

3.4 Anreicherung von Komplexen aus GlyR, Gephyrin und Collybistin

Postsynaptische Membranspezialisierungen bestehen aus einem Komplex vieler Proteine, die in Genese, Struktur, Aufrechterhaltung, Signaltransduktion und Plastizität involviert sind. Durch Aufreinigung des NMDA-Rezeptors konnten z.B. dutzende assoziierte Proteine identifiziert werden. Auch GlyR- und GABA_A -Rezeptore Cluster beinhalten höchstwahrscheinlich viele verschiedene Proteine, die größtenteils noch unbekannt sind. Die Identifizierung von Bindungspartnern für Gephyrin stellt somit eine wichtige Aufgabe dar, um die Bildung und Funktion glyzinerger und GABA_A erger Synapsen zu analysieren.

Für Gephyrin wurden in den letzten Jahren einige Bindungspartner identifiziert (siehe Kapitel 1). Eine direkte Lokalisierung dieser Proteine an der postsynaptischen Membranspezialisierung konnte aber bislang nicht nachgewiesen werden. Unter diesen Bindungspartnern befindet sich Collybistin, ein GDP/GTP-Austauschfaktor.

Mit dem im obigen Kapitel beschriebenen System zur Aufreinigung von Gephyrin sollte es möglich sein, auch Bindungspartner von Gephyrin aufzureinigen, die in einem Komplex mit Gephyrin und dem GlyR vorliegen. Solche Proteine sollten ebenfalls immobilisiert und im Immunoblot analysiert werden können.

Zur Überprüfung dieses Ansatzes wurden heterolog exprimierte Proteine eingesetzt. Hierzu wurden Vektoren, die die cDNAs von Collybistin (pCis Col1, Kins et al., 2000) und Gephyrin (pcDNA3-P1) exprimieren können, einzeln in HEK-Zellen transfiziert oder kotrans-

fiziert (Abb. 14 A). Nach einer Expressionszeit von zwei Tagen wurden die Zellen lysiert, das Zytosol extrahiert und im Bindungsassay eingesetzt (siehe auch Kapitel 2).

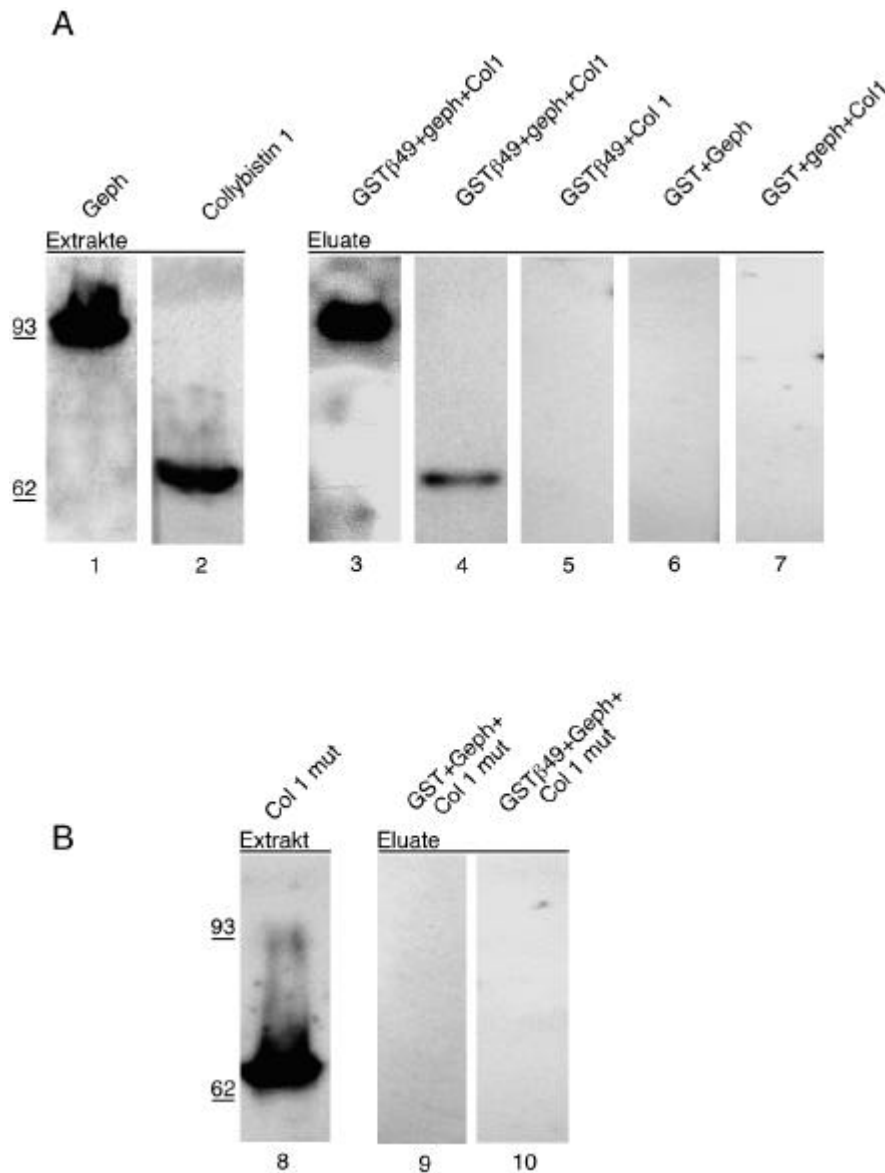


Abb. 14: Gephyrin, GlyR und Collybistin binden in einem trimeren Komplex.

GST- β 49 oder GST als Kontrolle wurden an Gluthathion-Sepharosematrix immobilisiert und mit Extrakte aus HEK-Zellen inkubiert, die mit Gephyrin und Collybistin (HA-Markiert) (A) oder mit Gephyrin und einer Collybistin-Mutante (B) kotransfiziert waren. Die Collybistin-Mutante ist ebenfalls HA-markiert und trägt Mutationen in der Bindungsstelle für Gephyrin. Sie ist daher nicht mehr in der Lage Gephyrin zu binden. Der Nachweis gebundener Proteine erfolgte im Immunoblot. Bande bei 93 kDa: Gephyrin; Bande bei 64 kDa: Collybistin. Erstantikörper: anti-Geph (Spuren 1+3) anti-HA (Spuren 2+4 bis 10). Zweitantikörper: anti-Maus-HRP, anti-kaninchen-HRP.

Die auf diese Weise exprimierte Gephyrin-Version P1 war unmarkiert. Collybistin war mit einem HA-Epitop versehen. Die Überstände, welche die zytosolische Fraktion dieser HEK-Zellen enthielten, wurden wie oben beschrieben im Bindungsassay mit GST- β 49 oder

GST als Kontrolle eingesetzt. Nach Kotransfektion von Gephyrin und Collybistin sind diese Proteine im Lysat enthalten (Abb. 14 A, Spuren 1 und 2). Im Bindungsassay zeigte sich, daß Gephyrin an GST- β 49 (Spur 3) und Collybistin gleichzeitig an Gephyrin bindet (Abb. 14 Spur 4). Zur Kontrolle wurde gezeigt, daß Collybistin ohne Gephyrin nicht an das GST-Fusionsprotein bindet (Spur 5). Weitere Kontrollen (Spuren 6 und 7) wiesen nach, daß weder Gephyrin noch Gephyrin/Collybistin mit der GST-Kontrolle interagiert. Zur weiteren Kontrolle wurde eine Mutante Collybistins, die mehrere Austausche von Aminosäureresten in der Bindungsregion für Gephyrin hat, mit Gephyrin in HEK-Zellen kotransfiziert (Großkreuz et al., 2001; Abb. 14 B, Spur 8). Wurde mit dieser Mutante im Bindungsassay auf die gleiche Weise verfahren, zeigten sich keinerlei Banden bei Eluat von Kontrolle und Ansatz im Immunoblot (Spuren 9 und 10). Dies bestätigt die Spezifität mit der Collybistins über Gephyrin an GST- β 49 bindet.

Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals mit einem biochemischen Ansatz gezeigt werden, daß die große zytoplasmatische Schleife des GlyR, Gephyrin und Collybistin in einem trimeren Komplex gebunden vorliegen können. Dies legt nahe, daß Collybistins auch in der glyzineren postsynaptische Membranspezialisierung vorliegt.

3.5 Der C-Terminus von Gephyrin bindet an Mikrotubuli

Für die strukturelle Integrität einer Synapse ist wichtig, daß deren Rezeptoren stabil am synaptischen Ort verankert sind. NMDA-Rezeptoren sind u.a. über α Actinin, das an die NR1-Untereinheit bindet, an der Synapse verknüpft (Allison et al., 1999; Tomia et al., 2001). An der glyzineren Synapse sind sowohl Aktin als auch Mikrotubuli für die Verankerung des Rezeptors notwendig. Dabei bindet Gephyrin direkt an Mikrotubuli und möglicherweise indirekt an Aktin-Filamente. Bei pharmakologischer Zerstörung des Zytoskeletts wird auch die glyzineren postsynaptische Dichte aufgelöst (Kirsch und Betz 1995). Bindungsstudien konnten zeigen, daß Gephyrin mit hoher Affinität kooperativ an polymerisiertes Tubulin bindet, nicht aber an monomeres (Kirsch et al., 1991).

Bei der Untersuchung der Aminosäuresequenz Gephyrins fällt auf, daß in Exon 15 ein Bereich liegt, der eine signifikante Homologie zur Mikrotubuli-Bindungsstelle von Tau und Map 2, zweier Mikrotubuli-assoziiierter Proteine, hat (Sally et al., 1988; Lee et al., 1988; siehe Abb. 15).

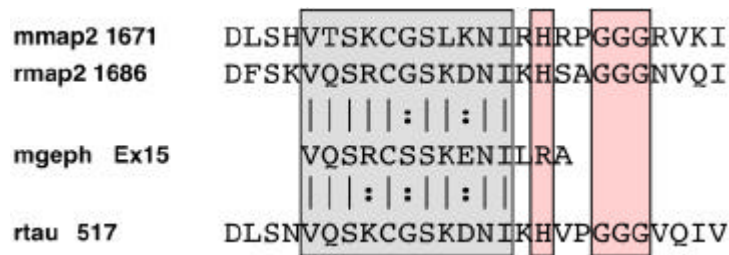


Abb. 15: Homologe Region Gephyrins zu den Mikrotubuli-Bindungsstellen von Map2 und Tau.

Dargestellt sind Sequenzabschnitte von Gephyrin der Maus (mgeph) sowie von Tau (Ratte, rtau) und Map2 der Maus (mmap2) und Ratte (rmap2) unter Angabe der jeweiligen Position innerhalb des Moleküls. As-Position in Gephyrin P1: 287-306. Grau unterlegt: homologe Region; Rot unterlegt: nicht-homologe Wiederholung von Glyzin. Striche verweisen auf Identität, Doppelpunkte auf Isofunktionalität der Aminosäurereste (aus Ramming et al., 2000). Neun von 15 As-Resten sind identisch.

Das Mikrotubuli-Bindungsmotiv von Map2 und Tau besteht aus drei der oben gezeigten Repeat-Motive, die jeweils durch eine nicht-homologe Verbindungssequenz aus 13 bis 14 As voneinander getrennt sind (Abb. 15; Sally et al., 1988; Lee et al., 1988). Untersuchungen über die Bindungseigenschaften der homologen Regionen zeigten, daß zur Bindung an Mikrotubuli mindestens zwei dieser Regionen nötig sind. Eine einzelne Bindungsstelle erzielte fast keine Bindungsaktivität mehr (Lee, et al., 1989). Man geht davon aus, daß die drei homologen Regionen direkt jeweils in eine Furche eines Tubulus binden und die Verbindungssequenz dabei als Abstandhalter für den Bereich zwischen den Furchen dient. Bei Gephyrin ist der oben gezeigte Sequenzabschnitt ohne die Glyzin-Wiederholung nur einmal vorhanden. Allerdings könnten sich mehrere Moleküle Gephyrins zusammen an einen Mikrotubulus binden. Möglicherweise sind auch Bindungsstellen für Mikrotubuli in einer anderen Region von Gephyrin zu finden, da Mikrotubuli-Bindungsstellen im allgemeinen eine sehr unterschiedliche Primärstruktur aufweisen.

Im Folgenden soll untersucht werden, ob der Abschnitt in Exon 15 die Bindungsstelle für Mikrotubuli ist. Hierzu wurde ein Untersuchungssystem etabliert, welches auf Kosedimentation von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen in ein Sucrosekissen beruht (Lee et al., 1998). Ein ähnlicher Ansatz wurde schon früher zum Nachweis der Mikrotubuli-Bindung von Gephyrin verwendet (Kirsch et al., 1991). Proteine, die nicht an Mikrotubuli binden, werden bei dieser Sedimentation nicht in das Sucrosekissen pelletiert. Im Pellet finden sich also die Mikrotubuli samt gebundenen Proteinen, im Überstand die nicht-bindenden Proteine. Für diese Experimente wurden Gephyrin, ein Fragment und eine Deletionsmutante Gephyrins in HEK-Fibroblasten transfiziert; die Zellen wurden nach Expression der Konstrukte lysiert und das Zytosol extrahiert. Die Polymerisation von zugesetztem und zelleigenem Tubulin erfolgte unter Zugabe von Taxol, Kontrollen wurden ohne Taxolbehandlung erstellt (siehe Abb. 16)

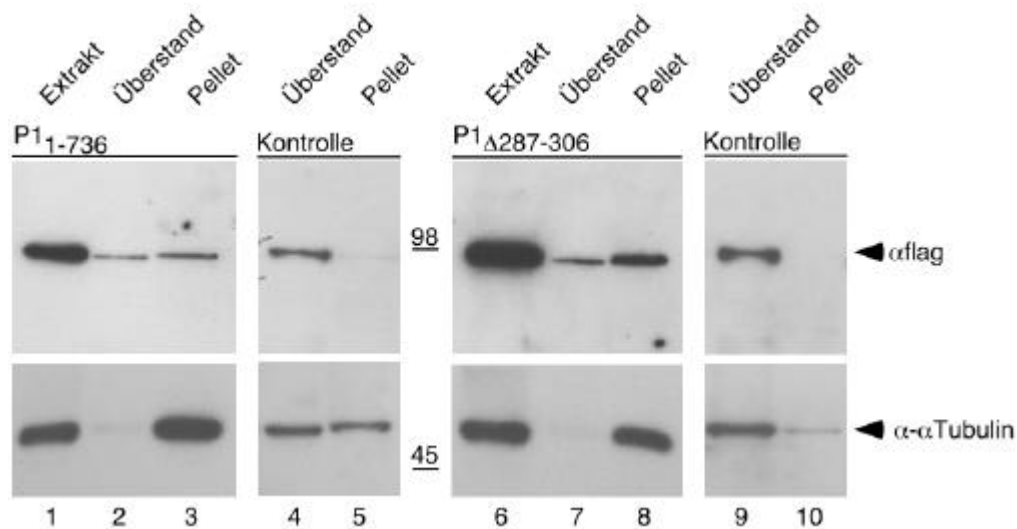


Abb. 16: Gephyrin und P1_{Δ287-306} kosedimentieren mit Mikrotubuli.

Gephyrin P1 und P1_{Δ287-306}-haltige HEK-Zellextrakte wurden mit Tubulin versetzt, dieses polymerisiert und mit Mikrotubuli-Bindeproteinen in ein Sucrosekissen kosedimentiert. Als Kontrolle wurde Tubulin unpolymerisiert belassen. P1 und P1_{Δ287-306} wurden mit einem flag-Epitop versehen. Obere Reihe: Detektion gegen flag-Epitop; untere Reihe: Detektion gegen Tubulin, Zweitantikörper: anti-Maus HRP.

Linker Block: Gephyrin P1: Spur 1: Expressionskontrolle; Spuren 2 und 3: Überstand und Pellet nach Kosedimentation von polymerisiertem Tubulin; Spuren 4 und 5: Kontrollen, Überstand und Pellet nach Kosedimentation von nicht-polymerisiertem Tubulin.

Rechter Block: Gephyrin P1_{Δ287-306}: Spur 6: Expressionskontrolle; Spuren 7 und 8: Überstand und Pellet nach Kosedimentation von polymerisiertem Tubulin; Spuren 9 und 10: Kontrollen, Überstand und Pellet nach Kosedimentation von nicht-polymerisiertem Tubulin. Abkürzungen: αflag: anti-flag; α-αTubulin: anti-αTubulin.

Gephyrin P1 und die Deletionsmutante Gephyrins P1_{Δ287-306} wurden mit vergleichbarer Effizienz in HEK-Fibroblasten exprimiert (Abb. 16; vergl. Spuren 1 und 6).

Nach Polymerisation und Sedimentation von Tubulin befand sich bei beiden Ansätzen kaum noch unpolymerisiertes Tubulin im Überstand, allerdings war noch etwas Gephyrin P1 und P1_{Δ287-306} im Überstand verblieben (Spuren 2 und 7). Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollen bei unpolymerisiertem Tubulin deutlich, daß unpolymerisiertes Tubulin im Überstand verblieben war (Spuren 4 und 9). Somit konnte also Tubulin effektiv polymerisiert werden. Nach Sedimentation fand sich fast keines mehr im Überstand. Gephyrin P1 und P1_{Δ287-306} sind jeweils noch zu einem Teil im Überstand zu detektieren.

Nach Polymerisation und Sedimentation von Tubulin fand sich bei beiden Ansätzen das Tubulin im Pellet (Spuren 3 und 8). Die Detektion gegen das flag-Epitop zeigte, daß sowohl Gephyrin P1 als auch P1_{Δ287-306} in das Pellet kosedimentierten (Spuren 3 und 8). Beide Proteine sind also in der Lage an Mikrotubuli zu binden und mit diesem in das Sucrosekissen zu migrieren. Dabei kann nicht festgestellt werden, daß die Mutante ohne die Homologie zur Mikrotubuli-Bindungsstelle von Tau und Map2 weniger gut migriert als wt-Gephyrin P1. In

der Kontrolle von Gephyrin P1 zeigte sich allerdings, daß ein Teil des Tubulins sedimentiert ist (Spur 5), auch in der Kontrolle von P1 $_{\Delta 287-306}$ (Spur 10) zeigt sich eine schwache Bande. Beides führt aber nicht zu einer wesentlichen Sedimentation der Bindeproteine. Dennoch zeigen die Kontrollen, daß Gephyrin P1 bzw. die Mutante nur dann sedimentieren, wenn polymerisiertes Tubulin pelletiert.

Dies bestätigt, daß mit diesem Assay die Bindung von Proteinen an Mikrotubuli nachgewiesen werden kann. Im vorliegenden Fall wurde sowohl Gephyrin P1 als auch die Mutante P1 $_{\Delta 287-306}$ an Mikrotubulie gebunden. Offensichtlich besitzt Gephyrin Mikrotubuli-Bindungsstellen, die nicht in Exon 15 liegen.

Zur weiteren Überprüfung einer möglichen Mikrotubuli-Bindungsstelle ausserhalb von Exon 15 wird ein Fragment im Kopolymerisationsassay eingesetzt. Es umfasst ausschließlich den C-Terminus Gephyrins, Gephyrin P1 $_{419-736}$, und ist mit einem VSV-Epitop versehen (siehe Abb. 17).

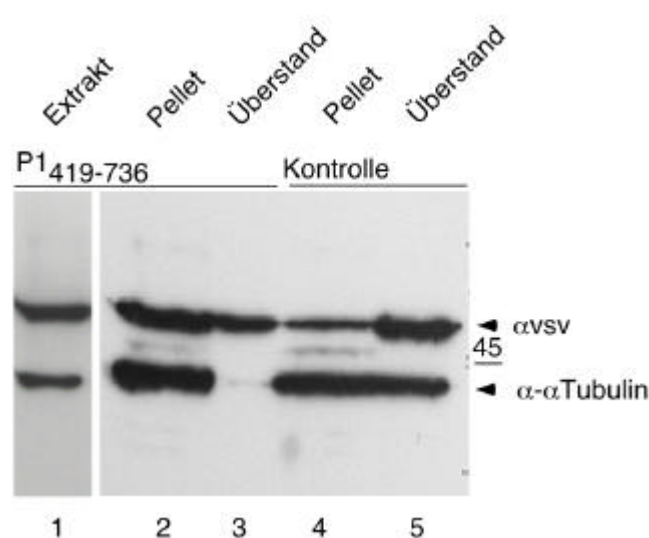


Abb. 17: Der C-Terminus Gephyrins kosedimentiert mit Mikrotubuli.

Gephyrin P1 $_{419-736}$ -haltige HEK-Zellextrakte wurden wie oben mit Tubulin versetzt, dieses polymerisiert und mit Mikrotubuli-Bindeproteinen in ein Sucrosekissen kosedimentiert. Als Kontrolle wurde Tubulin unpolymerisiert belassen. Das Peptid wurde mit einem VSV-Epitop versehen. Obere Reihe: Detektion von VSV; untere Reihe: Detektion von Tubulin; Zweitantikörper: anti-Maus-HRP.

Spur 1: Expressionskontrolle; Spuren 2 und 3: Pellet und Überstand nach Kosedimentation von polymerisiertem Tubulin; Spuren 4 und 5: Kontrollen: Überstand und Pellet nach Kosedimentation von nicht-polymerisiertem Tubulin.

Wie im oben beschriebenen Experiment zeigte sich auch hier eine gute Expression des transfizierten Proteins (Abb. 17; P1 $_{419-736}$; Spur 1). Nach Polymerisation von Tubulin und Sedimentation in das Sucrosekissen befand sich das weitaus meiste Tubulin im Pellet

(Spur 2), auch der größere Teil von P1₄₁₉₋₇₃₆ wurde dort detektiert (Spur 2). Im Überstand fand sich dagegen kaum noch Tubulin, allerdings befand sich dort, wie bei Gephyrin P1 und P1_{Δ287-306} noch ein Teil des Gephyrin Fragmentes P1₄₁₉₋₇₃₆. Es wurde also ein Teil des im Extrakt vorhandenen Fragmentes kosedimentiert.

Die Kontrollen zeigten, daß zwar ein Teil des Tubulins in das Pellet sedimentiert (vergl. Abb. 17, Spuren 4 und 5 mit Spuren 2 und 3), das gleiche ist mit einem Anteil kosedimentierten P1₄₁₉₋₇₃₆ zu detektieren. Der größte Anteil verbleibt allerdings im Überstand. Trotzdem zeigen die Kontrollen auch hier, daß die Sedimentation des Gephyrin-Fragmentes nur dann erfolgt, wenn polymerisiertes Tubulin sedimentiert. Im allgemeinen kann gesagt werden, daß die Polymerisation von Tubulin ein sehr effizienter Prozess ist, der sich in den Kontrollen nur verringern und nicht völlig verhindern läßt.

Insgesamt läßt sich hieraus schließen, daß wt-Gephyrin in diesem System wie früher gezeigt an Mikrotubuli bindet (Kirsch et al., 1991). Eine Mutante, der die Homologie zu den Mikrotubuli-Bindungsstellen von Tau und Map2 fehlt, bindet ebenso an polymerisiertes Tubulin wie ein C-terminales Fragment von Gephyrin P1, P1₄₁₉₋₇₃₆. Es befindet sich also eine Bindungsstelle für Mikrotubuli im C-terminalen Teil des Gephyrin-Proteins.

3.3 Das Epitop des Antikörpers mAb5 liegt in Exon 8

Bei der Aufreinigung des GlyR über dessen immobilisierten Antagonisten Strychnin wurde ein GlyR-Bindeprotein, Gephyrin, mitaufgereinigt. Zu weiteren Untersuchungen über die Funktion von Gephyrin wurden Antikörper hergestellt. Dazu wurde der aufgereinigte GlyR-Komplex aus α - und β -Untereinheit zusammen mit Gephyrin zur Immunisierung eingesetzt. Sechs Antikörper vermochten an ein oder mehrere der oben genannten Proteine zu binden. Es stellte sich unter anderem heraus, daß der Antikörper mAb5 sein Epitop innerhalb der Gephyrin-Sequenz hat (Pfeiffer et al., 1984). Der Antikörper mAb7 detektiert auch Gephyrin, zeigt aber bei Einsatz in Immunfluoreszenzexperimenten unspezifische Bindung im Nukleus von Zellen und wurde deshalb für diese Experimente nicht eingesetzt.

Untersuchungen mit dem mAb5 haben viel zum Verständnis über Aufbau und Funktion der glyzinerger Synapse beigetragen. In den letzten Jahren verdichteten sich Hinweise darauf, daß das Gephyrin-Gen ubiquitär exprimiert ist und die RNA in hohem Maße alternativ gespleißt wird (siehe Kapitel 1). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß verschiedene Varianten Gephyrins existieren (siehe Kapitel 3.2). Wahrscheinlich erkennt der Antikörper mAb5 nicht alle diese Varianten. Für zukünftige Untersuchungen über physiologische Systeme, in die verschiedene Gephyrin-Varianten eingebunden sind, ist es sinnvoll, die Lage des Epitops von mAb5 zu kennen. Dieses wurde im Folgenden ermittelt.

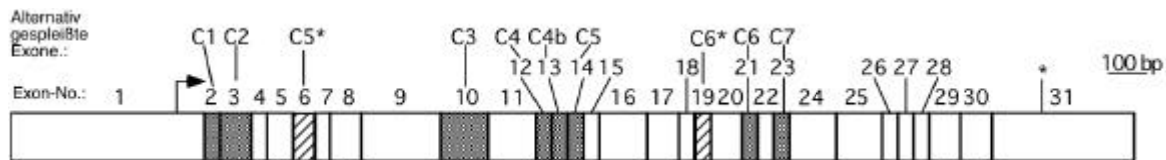


Abb. 18: Exonstruktur und alternativ gespleißte Exons des Gephyrin-Genes.

Angegeben sind die Nummern der Exons sowie Translationsstart und -stop. Die alternativ gespleißten Exons sind mit ‚C‘ bezeichnet und schattiert dargestellt. C5*/C6*: Exons deren Name doppelt verwendet wurde. Pfeil: Translationsstart von Gephyrin P1, *: Translationsstopp von Gephyrin P1.

In Abb. 18 ist eine Übersicht über die Struktur und die alternativ gespleißten Exons des Gephyrin-Genes dargestellt. Mittlerweile sind zehn Exons bekannt, die alternativ gespleißt werden können. Es ist bislang keine cDNA gefunden worden, die alle bekannten Exons enthält.

Zum Nachweis der Antikörperbindung wurde ein Expressionsassay herangezogen (Abb. 19). Hierzu wurde die wt-Gephyrin-Version P1 (Prior et al., 1992) in den Expressionsvektor pCDNA3 kloniert. Dieses Konstrukt wurde daraufhin in HEK-Zellen mit der Kalzium-Phosphat-Methode transfiziert und das Protein exprimiert (siehe Abb. 19 A). Mit allen weiterhin benutzten mutierten oder epitopmarkierten Konstrukten wurde ebenso verfahren. Nach Expression der Proteine wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt (siehe auch Kapitel 2).

Als Kontrollantikörper wurden dabei der monoklonale Gephyrin-Antikörper der Firma Transduction Laboratories (anti-Geph) und der Antikörper gegen ein Epitop aus dem Hüllprotein des vesikulären Stomatitis Virus (VSV; Boehringer Mannheim) genutzt. Der anti-Geph-Antikörper ist monoklonal und hat sein Epitop in einem nicht weiter bekannten Bereich zwischen As 519 und 728, der α VSV-Antikörper bindet an ein 11 As großes Epitop, das über eine N-terminal eingefügte Not I-Schnittstelle in Wildtyp-Gephyrin inkloniert wurde. Als Zweitantikörper diente jeweils ein Cy3-fluoreszenzmarkierter anti-Maus-IgG-Antikörper.

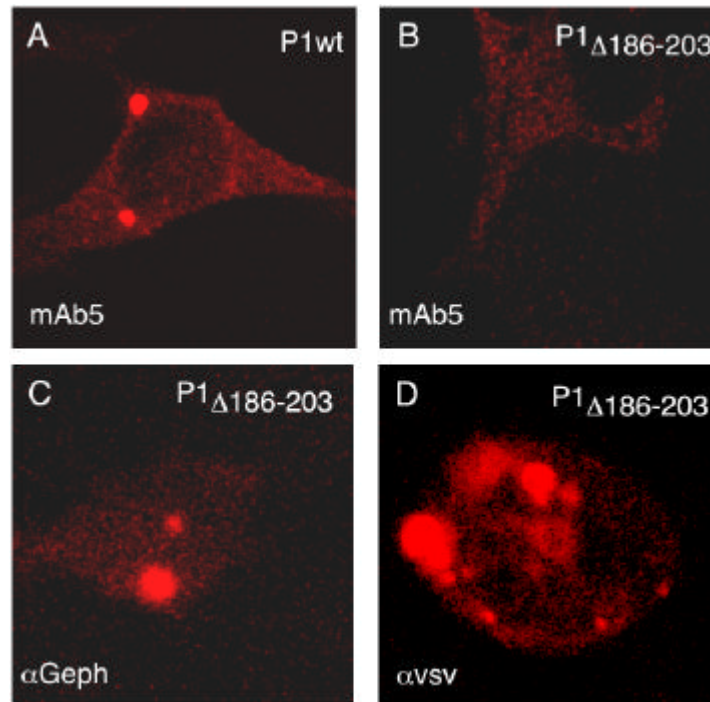


Abb. 19: Des Epitops des Antikörpers mAb5 liegt in Exon 8.

Wt-Gephyrin (A) und eine VSV-markierte Deletionsmutante, der As 186 bis 203, fehlen (B-D) wurden in HEK 293-Fibroblasten transfiziert und das Protein mit mAb5 (A und B), anti-Geph, (C) oder anti-VSV (D) immunzytochemisch angefärbt. Erstantikörper: mAb5: A, B; α Geph: D; anti-VSV: C. Zweitantikörper: anti-Maus-HRP.

Wt-Gephyrin (A) und eine VSV-markierte Mutante der As 186 bis 203 fehlen (B-D) wurden in HEK-Fibroblasten transfiziert und das Protein mit mAb5 (A und B), antiGeph. (C) oder anti-VSV (D) immunzytochemisch angefärbt. Erstantikörper: mAb5: A, B; anti-Geph: D; anti-VSV: C. Zweitantikörper: anti-Maus-Cy3.

Zur Eingrenzung des Epitops wurden drei gut charakterisierte Antikörper und zwei Deletionsmutanten Gephyrins verwendet (siehe Abb. 19). Der unmarkierte Wildtyp P1 (A) zeigt deutliche Reaktivität des mAb5-Antikörpers. Wurden HEK-Zellen angefärbt, die eine Mutante Gephyrins ohne As 186-203 exprimierten ($P1_{\Delta 186-303}$), so fand sich ausschließlich zellulärer Hintergrund des mAb5 (B). In keiner einzigen Zelle konnte die Mutante mit diesem Antikörper nachgewiesen werden. Wurden allerdings HEK-Zellen, die genau die gleiche Mutante Gephyrins exprimierten, mit dem anti-Geph-Antikörper angefärbt, so konnte man deutliche Expression dieser Mutante erkennen (C). Das selbe Konstrukt wurde mit einem VSV-Epitop markiert und als weitere Kontrolle benutzt ($P1_{\Delta 183-203VSV}$). Auch hier zeigten sich deutliche Signale mit VSV-Antikörper.

Diesen Ergebnissen entsprechend befindet sich also das Epitop für den Antikörper mAb5 im Bereich um die mutierten Aminosäuren 186-203 (Abb. 20).

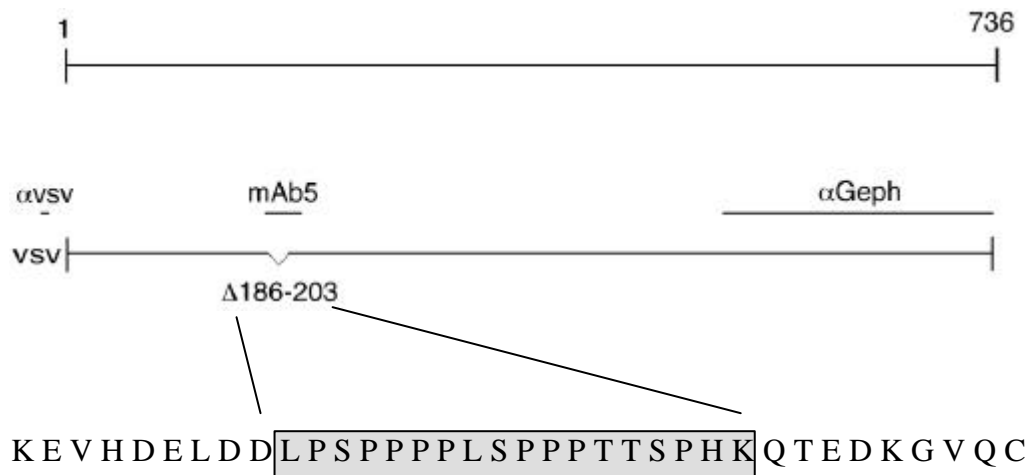


Abb. 20: Relative Lage der Epitope von mAb5, anti-Geph und anti-VSV.

Dargestellt sind der Gephyrin-Wildtyp, die Deletionsmutation von 17 As und die 36 As des Bereichs 175 bis 212, innerhalb derer der mAb5 sein Epitop findet. Die Sequenz ist vollständig und ausschließlich in Exon 8 enthalten. Relativ zu P₁₋₇₃₆ sind die Epitopbereiche der benutzten Antikörper dargestellt: mAb5; α VSV: anti-VSV; α Gephyrin: anti-Geph.

Epitope von Antikörpern umfassen im Allgemeinen eine Sequenz von etwa sechs bis zehn Aminosäuren. Der polyklonale Antikörper anti-Geph wurde gegen einen C-terminalen Abschnitt Gephyrins gerichtet, anti-VSV und mAb5 sind monoklonal. Deren Epitop lässt sich eng eingrenzen. Das Epitop von mAb5 ist in Exon acht, direkt im Anschluß an die MogA-Homologie Gephyrins im Bereich einer prolinreiche Sequenz lokalisiert. Diese bildet wahrscheinlich eine strukturelle Bruchstelle und den Übergang in die mittlere Verbindungsregion zwischen den homologen Regionen. Somit konnte der Bereich der mAb5-Bindung auf ca. 40 As eingegrenzt werden. Diese Aminosäuren befinden sich sämtlich in Exon 8 (siehe Abb. 20).

Im Hinblick auf die Fragestellung kann also festgestellt werden, daß jede Spleißvariante Gephyrins durch den mAb5 detektiert werden kann, sobald Exon acht Bestandteil der translatierten RNA ist. Varianten Gephyrins, die auch in anderen Organen als dem ZNS exprimiert werden können, die Exon acht nicht enthalten, sind mit dem mAb5 nicht nachzuweisen. In Kombination mit dem Antikörper anti-Geph werden damit vergleichende Expressionsstudien möglich.

3.6 Identifikation einer Autoaggregationsdomäne Gephyrins

Bildung und Stabilität der glyzinergen und der meisten GABA_Aergen Synapsen ist von dem peripheren Membranprotein Gephyrin abhängig. In Gephyrin-defizienten Mäusen ist die Bildung solcher Synapsen unterbunden (Feng et al., 2000). Die synaptische Aggregation Gephyrins geht der des GlyR voraus (Kirsch et al., 1993). Offensichtlich bildet Gephyrin einen Aggregationskern, der den freien membranständigen GlyR an der sich entwickelnden

Synapse verankert. Dabei geht man davon aus, daß ein Gephyrinmolekül einerseits den GlyR mit Elementen des Zytoskeletts verbindet, und andererseits über die Bindung an mindestens ein weiteres Gephyrinmolekül Rezeptoren lateral vernetzt. Die Bindung von Gephyrin an mindestens ein weiteres Gephyrinmolekül, die Aggregationsfähigkeit Gephyrins, ist demnach ein wichtiges Element zu Aufbau und Erhalt der glyzinerigen Synapse. Diese Autoaggregation zeigt sich auch nach heterologer Expression Gephyrins (Kirsch et al., 1995). Wahrscheinlich sind zur effektiven Formierung dieser synaptischen Aggregate mindestens zwei Bindungsstellen pro Gephyrinmolekül notwendig.

Zum weiteren Verständnis vom Aufbau und Funktion der GlyR-Cluster ist daher die Feststellung von Autoaggregationsdomänen Gephyrins von besonderer Notwendigkeit.

Die Analyse der Proteinsequenz von Gephyrin ergab keine Hinweise auf bekannte Bindungs- oder Interaktionsdomänen, die mit der Autoaggregation in Verbindung gebracht werden könnte. Erste Hinweise auf Autoaggregationsdomänen wurden in dieser Arbeit bei einem Hefe-Zwei-Hybrid-Bindungsassay deutlich (Abb. 21). Findet eine Interaktion beider Proteine statt, kommt es zur Aktivierung des Reportergens Gal4. Die Hefen färben sich blau (siehe auch Kapitel 2). Hier wurden Fragmente Gephyrins auf Bindung an Vollängen-Gephyrin P1 getestet, welche gemäß der Homologieregionen Gephyrins konstruiert wurden (erhalten von Jens Fuhrmann). Als Kontrolle wurde das präsynaptische Synaptophysin eingesetzt, das an der Postsynapse nicht vorhanden ist. P1₂₋₁₅₄ umfasst einen wesentlichen Teil der MogA-Homologieregion, P1₃₄₉₋₇₃₆ die MoeA-homologe Region. Die zentrale Verbindungsregion wird mit dem Fragment P1₁₅₃₋₃₄₈ exprimiert. Die Ergebnisse waren eindeutig (siehe Abb. 21). Synaptophysin (E-F) zeigte selbst nach längerer Inkubationsdauer keine (E, F, und H) oder nur sehr schwache (G) Autoaktivierung. Die Positivkontrolle (Spur A) zeigt, daß Gephyrin in diesem System in der Lage ist an sich selbst zu binden. Starke Interaktion zwischen Vollängen-Gephyrin und dem C-Terminus (D) und eine sehr schwache Interaktion mit dem N-Terminus Gephyrins (B) konnte hier festgestellt werden. In diesem Untersuchungssystem zeigte die zentrale Verbindungsregion keine nachweisbare Bindungsaktivität an Vollängen-Gephyrin P1.

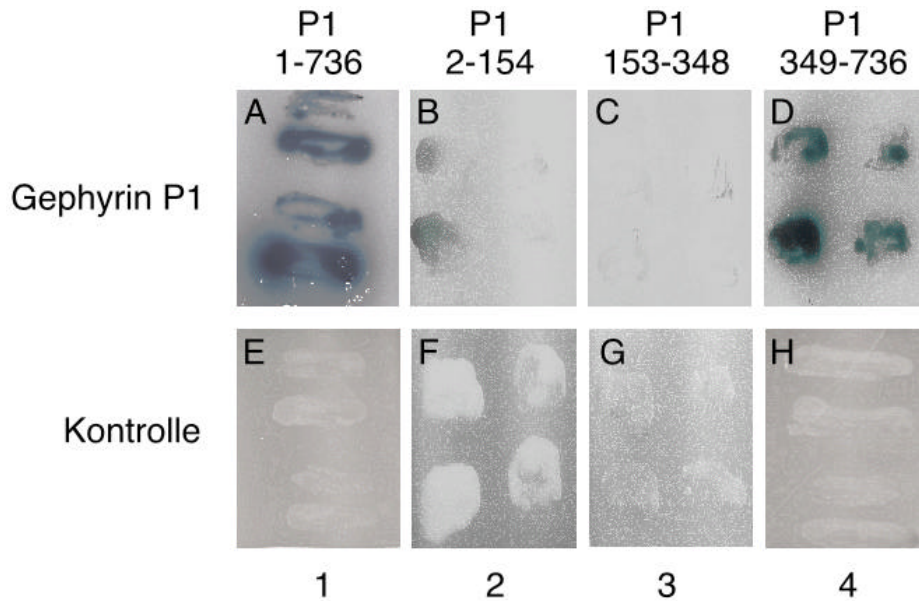


Abb.21: N- und C-terminale Fragmente interagieren mit Gephyrin P1.

Hefe-2-Hybrid-Bindungsassay. Durchführung wie in Kapitel 2 beschrieben. Die Interaktion mit Vollängen-Gephyrin wird durch blaue Kulturen signalisiert. Kontrolle mit Synaptophysin. Spur 1: wt-Gephyrin; Spur 2: N-terminales Fragment, Spur 3: zentrale Verbindungsregion, Spur 4: C-Terminus. Kleinere Fragmente des C-Terminus zeigten keinerlei Aktivierung mehr (nicht gezeigt).

Mit diesen Versuchen konnten zwei Regionen definiert werden, welche an Gephyrin binden. Besonders hervorzuheben ist die starke Interaktion des C-Terminus. Die Kulturen zeigten bereits nach einigen Stunden Inkubation Blaufärbung, wohingegen das N-terminale Fragment bei den transfizierten Hefen erst nach mehreren Tagen Inkubationsdauer zu einer deutlich von der Kontrolle unterschiedbaren Blaufärbung führte. Kleinere Fragmente zeigten leider in diesem Untersuchungssystem keine Interaktion mit Vollängen-Gephyrin mehr. Für weiterführende Bindungsstudien mußte also ein anderes Interaktionsassay eingesetzt werden.

Daher wurde die weitere Eingrenzung der Autoaggregationsdomänen mittels Expressionsstudien durchgeführt. Heterolog in HEK-Zellen exprimiert bildet Gephyrin zelluläre Aggregate aus, die auf eine spezifische Aggregationsfähigkeit zurückgehen. Offensichtlich koaggregiert Gephyrin ausschließlich mit spezifischen Bindungspartnern, während Moleküle, die keine spezifischen Bindungspartner darstellen, nicht koaggregieren (Kirsch et al., 1995). In diesem System ist Gephyrin als spezifischer Bindungspartner für mindestens ein weiteres Gephyrin-Molekül zu betrachten. Fragmente und Mutanten von Gephyrin, die die Fähigkeit zur Bindung an Gephyrin besitzen, sind daher in der Lage mit Gephyrin zu koaggregieren (siehe Abb. 23).

Die cDNA von P1₁₋₇₃₆ wurde mutiert oder fragmentiert und in den eukaryontischen Expressionsvektor pCDNA3 eingefügt (siehe Kapitel 2). Als Markierung wurden gegebenenfalls Epitope zur Antikörperdetektion wie angegeben angefügt (siehe Abb. 22). Teilweise wurden Fragmente eingesetzt, die bereits in den vorigen Kapiteln beschrieben worden sind.

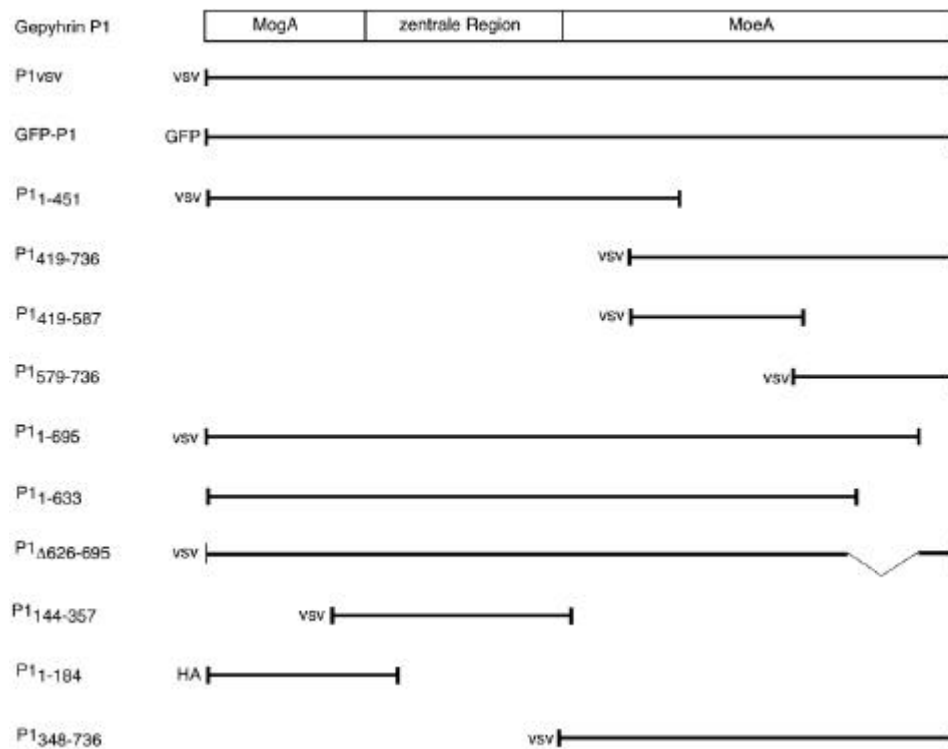


Abb.22: Übersicht über verwendete Fragmenten und Mutanten Gephyrins.

Schematische Darstellung mit Bezeichnung und Angabe der Aminosäuren, sowie der Markierung und der relativen Lage und Größe in der Reihenfolge des Gebrauchs. Die As-Angaben beziehen sich auf Gephyrin P1. Zum Vergleich sind oben die Homologieregionen von Gephyrin P1 angegeben. vsv: Vesiculärer Stromatitis Virus, HA: Hämagglutinin. Teilweise wurden diese Konstrukte in vorherigen Untersuchungen eingesetzt. Ein Gesamtübersicht findet sich in Kapitel 6.

Diese Fragmente und Deletionsmutanten Gephyrins wurden in HEK-Zellen transient transfiziert. Nach zwei Tagen Expressionsdauer wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch behandelt. Die weitere Analysen erfolgten mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops (CLSM; siehe Kapitel 2).

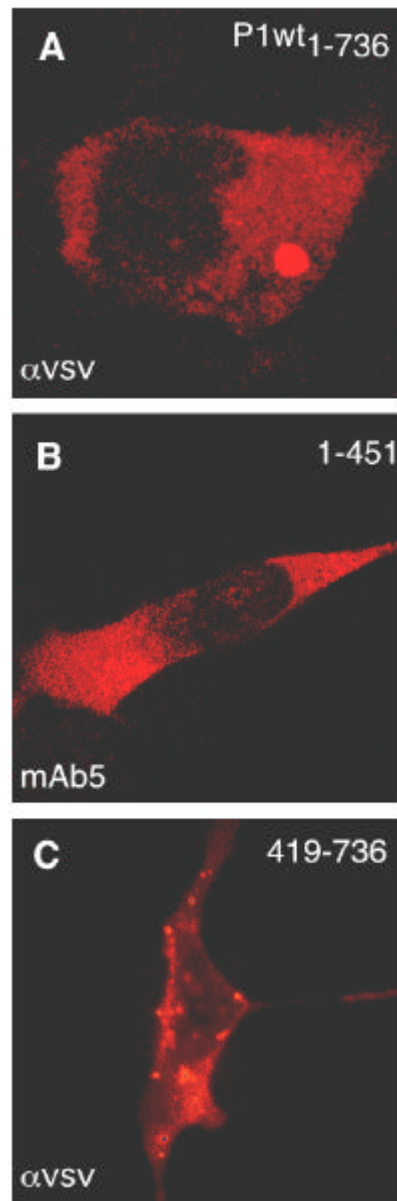


Abb. 23: Im C-terminalen Teil Gephyrins liegt eine Autoaggregationsdomäne.

Gephyrin P1 (A), P1₁₋₄₁₉ (B), bzw. P1₄₁₉₋₇₃₆ (C) wurden in HEK-Zellen transfiziert. Nach zwei Tagen Expression erfolgte eine Fixierung mit Methanol/Eisessig und eine immunocytochemische Färbung. Erstantikörper: mAb5, anti-VSV; Zweitantikörper: Cy3-fusionierter Ziege anti-Maus.

Zunächst wurden wildtypisches Gephyrin P1₁₋₇₃₆ (Klon P1; Prior et al., 1991) und zwei Fragmente, die den N- bzw. C-terminalen Teil Gephyrins umfassen in diesem System untersucht. Bei diesem Experiment zeigte wildtypisches Gephyrin das typische Aggregationsverhalten in HEK-Zellen (Abb. 23). Es zeigten sich wenige oder nur ein relativ großes Aggregat, bei schwachem zellulären Hintergrund (A, P1₁₋₇₃₆). Das N-terminale Fragment Gephyrins hingegen zeigte in diesem System keine Autoaggregation mehr (B, P1₁₋₄₅₁), es war diffus in der Zelle verteilt. Das Fragment, welches den C-Terminus von Gephyrin umfaßte

(Abb. 23 C, P1₄₁₉₋₇₃₆), zeigte deutliche Autoaggregation. In diesem Fall fanden sich kleinere Aggregate von höherer Anzahl mit stärkerem zellulären Hintergrund.

Das trunkierte Protein, das den C-terminalen Teil Gephyrins umfaßt, verhielt sich also ähnlich wie der Wildtyp und ist wie dieser in der Lage, Aggregate auszubilden. Der N-terminale Teil Gephyrins zeigt in diesem Untersuchungssystem keine Aggregationsfähigkeit. Offensichtlich befindet sich eine Autoaggregationsdomäne in den 319 Aminosäuren des C-Terminus' Gephyrins. Dies bestätigt auch die Befunde aus dem Zwei-Hybrid-Interaktionsassay (vergl. Abb. 21 und Abb. 23).

Um die Aggregationsdomänen im C-Terminus weiter einzuengen, wurde das C-terminale Fragment P1₄₁₉₋₇₃₆ mittels einer weiteren PCR-unterstützten Fragmentierung geteilt. Die Transfektionseffizienz der Konstrukte und die Stabilität der daraus hervorgehenden Peptide war trotz der wesentlich kürzeren Polypeptidsequenz ähnlich wie für wt-Gephyrin P1 (Abb. 24).

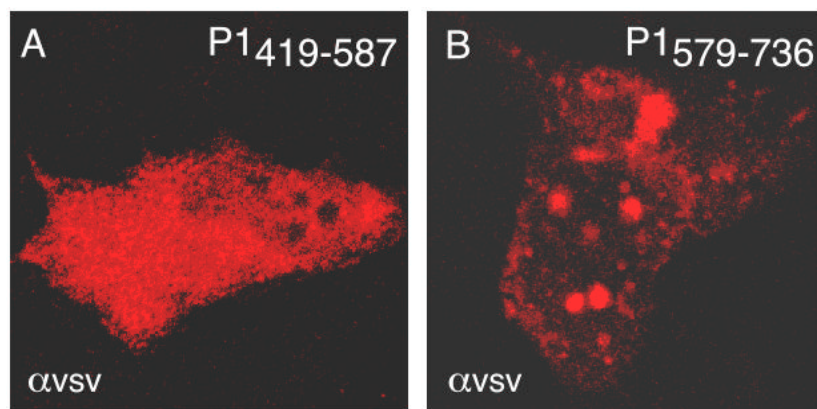


Abb. 24: Ein Autoaggregationsdomäne liegt im äußeren C-Terminus.

Eine weitere Unterteilung des C-Terminus von Gephyrin in die Abschnitte P1₄₁₉₋₅₈₇ (A) und P1₅₇₉₋₇₃₆ (B) wurde vorgenommen. Die korrespondierenden cDNAs wurden in den Vektor pCDNA3 kloniert und mit einem VSV-Epitop versehen. Nach Expression in HEK-Zellen, immunocytochemischer Behandlung und Analyse im CSLM ergab sich eine verbliebene Aggregationsfähigkeit im äußeren C-Terminus. Erstantikörper anti-VSV; Zweitantikörper: Alexa 594.

Von den beiden in Abb. 24 eingesetzten Polypeptiden war das Fragment P1₄₁₉₋₅₈₇ nicht mehr in der Lage zu aggregieren (Abb. 24 A). Einzig der äußere C-Terminus, Fragment P1₅₇₉₋₇₃₆, zeigte die gleichen Aggregationseigenschaften wie das Fragment P1₄₁₉₋₇₃₆ (C). Auch in diesem Falle sind mehrere, auch kleinere Aggregate zu erkennen.

Aus in diesem Experiment konnte also geschlossen werden, daß sich im C-Terminus Gephyrins eine Domäne zur Autoaggregation befindet. Die Eingrenzung war hier auf die C-terminalen 157 Aminosäuren Gephyrins möglich.

Um die autoaggregierende Domäne im C-Terminus des Proteins noch weiter einzugrenzen, wurden C-terminale Trunkationen von Gephyrin hergestellt, wie oben in HEK-Zellen exprimiert und untersucht. Diese Fragmente bestehen aus einem vollständigen wildtypischen N-Terminus und sind am C-Terminus von Fragment zu Fragment progressiv trunkiert. Eine Markierung durch ein Epitop wurde nur in einem Falle vorgenommen (Abb. 25). Die Transfektionseffizienz des Konstrukts P1₁₋₆₉₅ war Gephyrin P1 vergleichbar. Allerdings zeigte sich eine geringe Transfektionseffizienz oder Stabilität von P1₁₋₅₇₉ in HEK-Zellen.

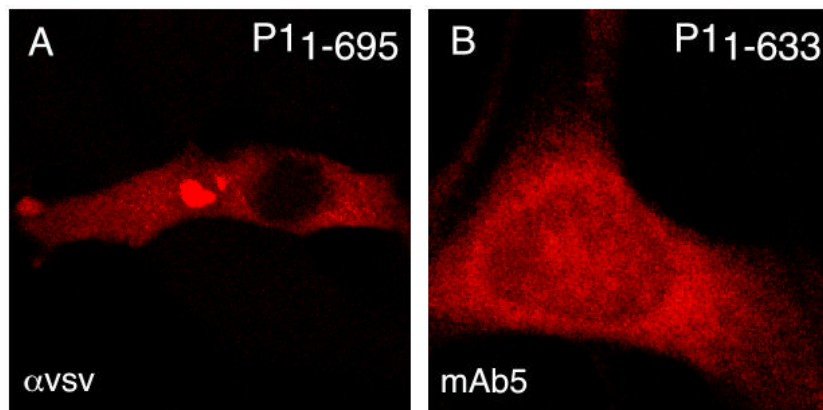


Abb. 25: Die Aminosäuren 633 bis 695 umfassen eine Aggregationsdomäne.

In den eukaryontischen Expressionsvektor pCDNA3 wurden die Aminosäuresequenzen 1-695 (P1₁₋₆₉₅; A), und 1-633 (P1₁₋₆₃₃; B) kloniert und in HEK-Zellen transfiziert, immunocytochemisch behandelt und analysiert. Erstantikörper: anti-VSV (A), mAb5 (B); Zweitantikörper: Cy3-fusio-nierter Ziege anti-Maus.

Abb. 25 zeigt deutlich, daß ein Fragment Gephyrins, das die Aminosäuren 1-695 enthält ähnlich dem Wildtyp aggregiert (A), während ein um 62 Aminosäuren kleineres Fragment (B; P1₁₋₆₃₇) nicht mehr in der Lage war zu aggregieren. Innerhalb dieser Region liegt also die C-terminale Autoaggregationsdomäne. Sie konnte in diesem Experiment auf 62 Aminosäuren eingegrenzt werden.

Um die oben beschriebenen Ergebnisse zu bestätigen, wurden im nächsten Schritt Koexpressionsstudien in HEK-Zellen durchgeführt. Dazu wurde die cDNA von Gephyrin in den Vector pEGFP-N3 eingefügt. Dieses Konstrukt führte nach Transfektion zur Expression eines Fusionsproteins aus einem C-terminalen Gephyrinanteil und dem N-terminal lokalisierten Grün Fluoreszierenden Protein (GFP-P1; siehe Abb. 26).

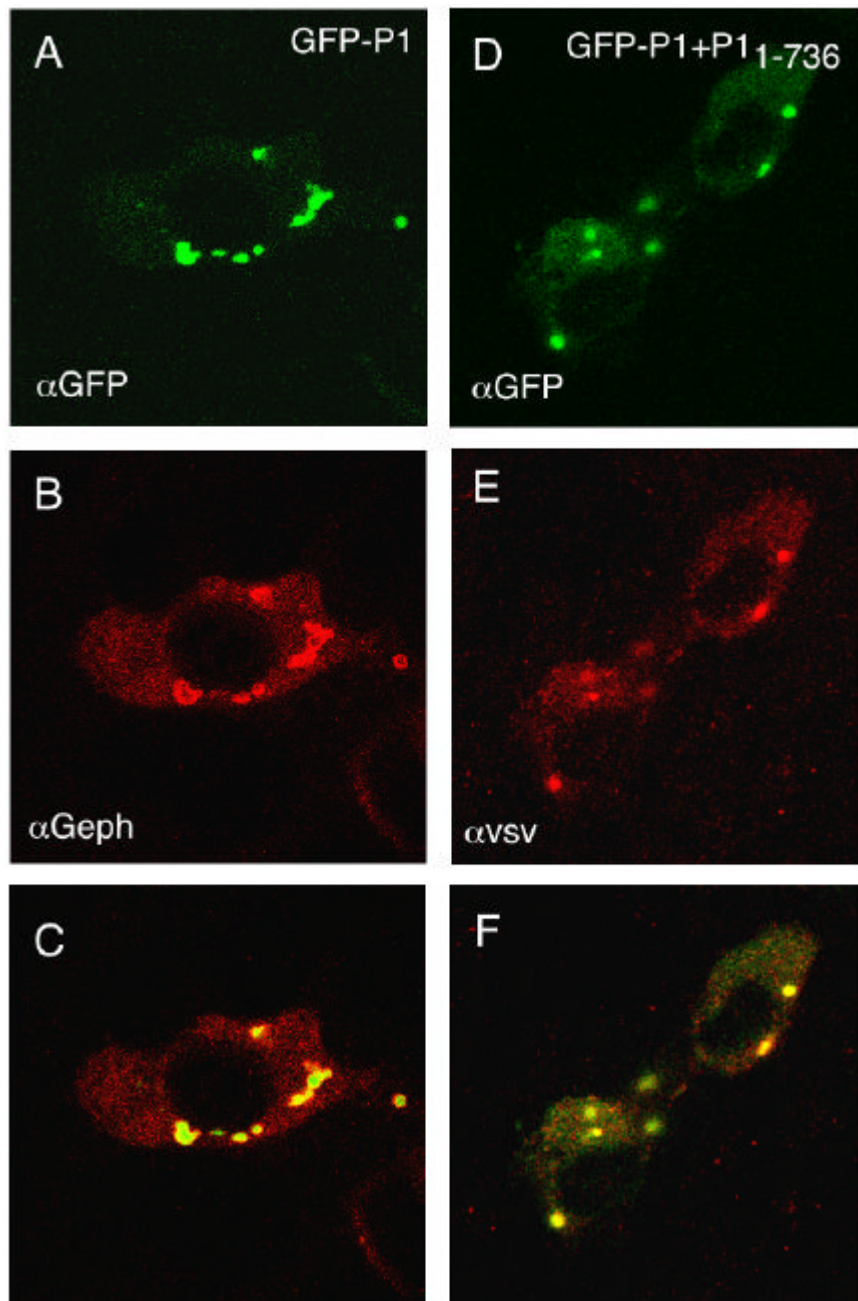


Abb.26: Expression von P1vsv und Koexpression von GFP-P1 mit P1vsv zeigen wildtypische Aggregationseigenschaften von GFP-P1.

HEK-Zellen wurden wie in Kapitel 2 beschrieben mit GFP-P1 transfiziert (A-C) oder mit GFP-P1 und P1₁₋₇₃₆ (VSV-markiert) kotransfiziert (D-F). Erstantikörper: anti-GFP-Antiserum (A+D) und anti-VSV Antikörper (B+E) als Erstantikörper, Alexa 488 und Alexa 594 als Zweitantikörper. Grüner Kanal: anti-GFP; roter Kanal: anti-Geph (B) bzw. anti-VSV (E). C und F: Überlagerung der Kanäle Abkürzung: α : anti-.

Das Fusionsprotein GFP-P1 verhält sich im Aggregationsassay wie der Wildtyp. Wie in Abb. 26 dargestellt, wurde GFP-P1 alleine transfiziert (A-C), oder GFP-P1 mit P1₁₋₇₃₆ kotransfiziert (D-F). A+D wurden mit anti-GFP als Erstantikörper detektiert, B+E mit anti-VSV. C+F zeigen die Überlagerung. In A erfolgt die Detektion mit anti-GFP, in B wurde das

selbe Fusionsprotein mit anti-Geph. angefärbt. Es zeigten sich einige wenige Aggregate und relativ schwacher Hintergrund. Aus D-F wird deutlich, daß auch koexprimiertes Gephyrin mit dem Fusionsprotein koaggregiert. Hier zeigten sich also keine Unterschiede im Aggregationsverhalten des Fusionsproteins im Vergleich zum Wildtyp.

Das GFP-P1-Fusionskonstrukt wurde in den folgenden Untersuchungen eingesetzt. Dabei wurde GFP-P1 mit verschiedenen Fragmenten und Mutanten von Gephyrin in HEK-Zellen koexprimiert. Eine Koaggregation der entsprechenden Mutante mit Gephyrin würde die Interaktion mit Gephyrin bestätigen (siehe Abb. 27).

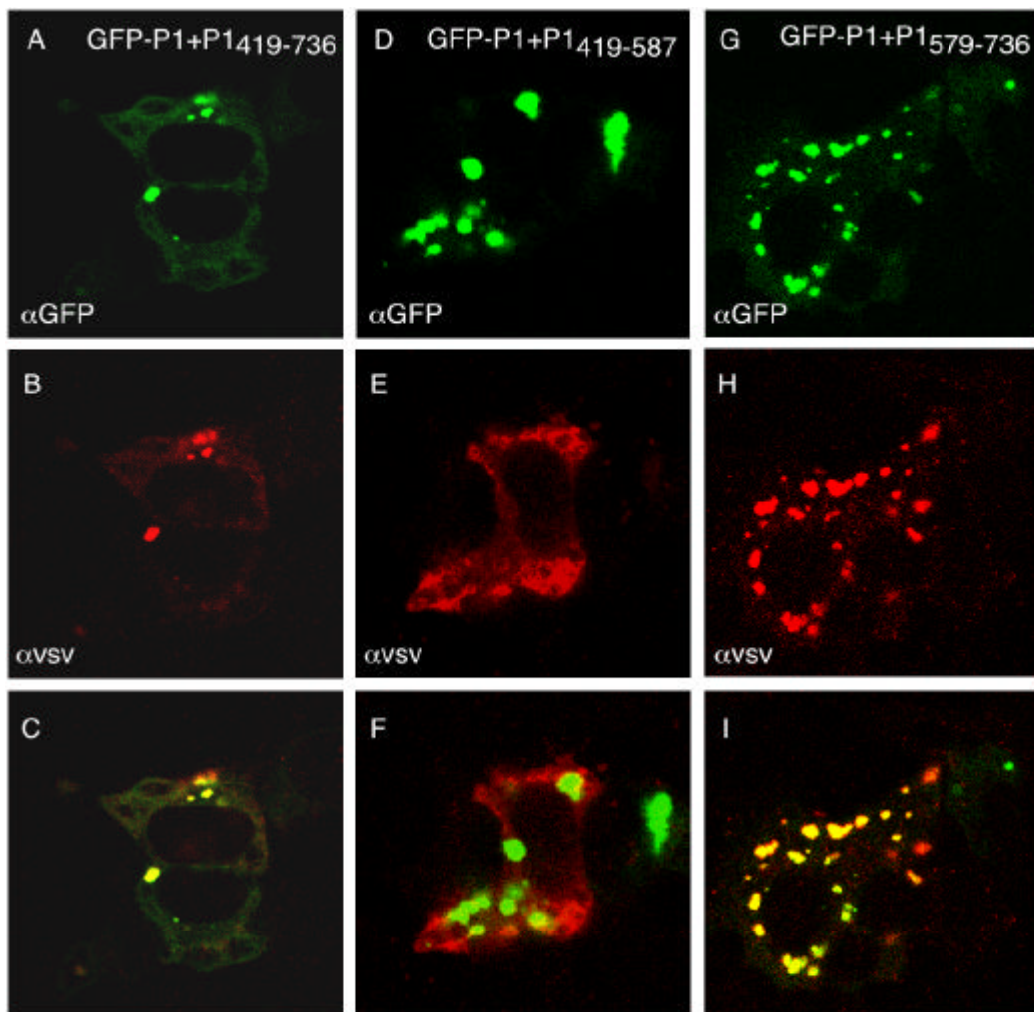


Abb.27: Koexpression von GFP-P1 mit C-terminalen Fragmenten bestätigen eine C-terminale Autoaggregationsdomäne.

Koexpression von GFP-P1 mit P1₄₁₉₋₇₃₆ (A-C), P1₄₁₉₋₅₇₉ (D-F) und P1₅₈₀₋₇₃₆ (G-I) in HEK-Zellen erfolgte wie beschrieben. Der Nachweis erfolgte mit anti-GFP Antiserum (A, D+G) und anti-VSV Antikörper (B,E+H) als Erstantikörper, Alexa 488 und Alexa 594 als Zweitantikörper. Grüner Kanal: GFP-P1; roter Kanal Gephyrinfragmente.

In Abb. 27 sind die Ergebnisse aus den Koexpressionsstudien von GFP-P1 mit P1₄₁₉₋₇₃₆ (A-C), P1₄₁₉₋₅₈₇ (D-F) und P1₅₇₉₋₇₃₆ (G-I) dargestellt. Die Koexpression eines langen C-terminalen Fragments mit GFP-P1 hat eine Koaggregation der beiden Proteine zur Folge (A-C). Hier wurde bestätigt, daß in diesem Bereich eine Autoaggregationsdomäne liegt. Dieses Ergebnis unterstützt die Befunde aus den vorangegangenen Studien (siehe Abb. 23 C). Es wurden auch die bereits in Abb. 24 eingesetzten kleineren Fragmente des C-Terminus von Gephyrin auf Koaggregation mit GFP-P1 getestet. Das Fragment P1₄₁₉₋₅₇₉ koaggregiert nicht mit GFP-P1, im Gegensatz zum Bereich 579-736. Dieses Ergebnis wurde erwartet. Diese Untersuchung bestätigten also in vollem Umfang die Ergebnisse aus Abb. 24. Im C-terminalen Bereich von Gephyrin ist eine Domäne zur Aggregation von Gephyrin lokalisiert

Um die Eigenschaften der Autoaggregation der Aminosäurereste 633-695, die als Bindungsstelle identifiziert worden sind, zu bestätigen, wurden diese 62 Aminosäuren in wildtypischem Gephyrin P1 deletiert. Ansonsten blieb das Protein unverändert. Diese Deletionsmutante (P1_{Δ626-965}) und P1₁₋₆₉₅ wurden im Koaggregationsassay zusammen mit GFP-P1 kotransfiziert (siehe Abb. 28).

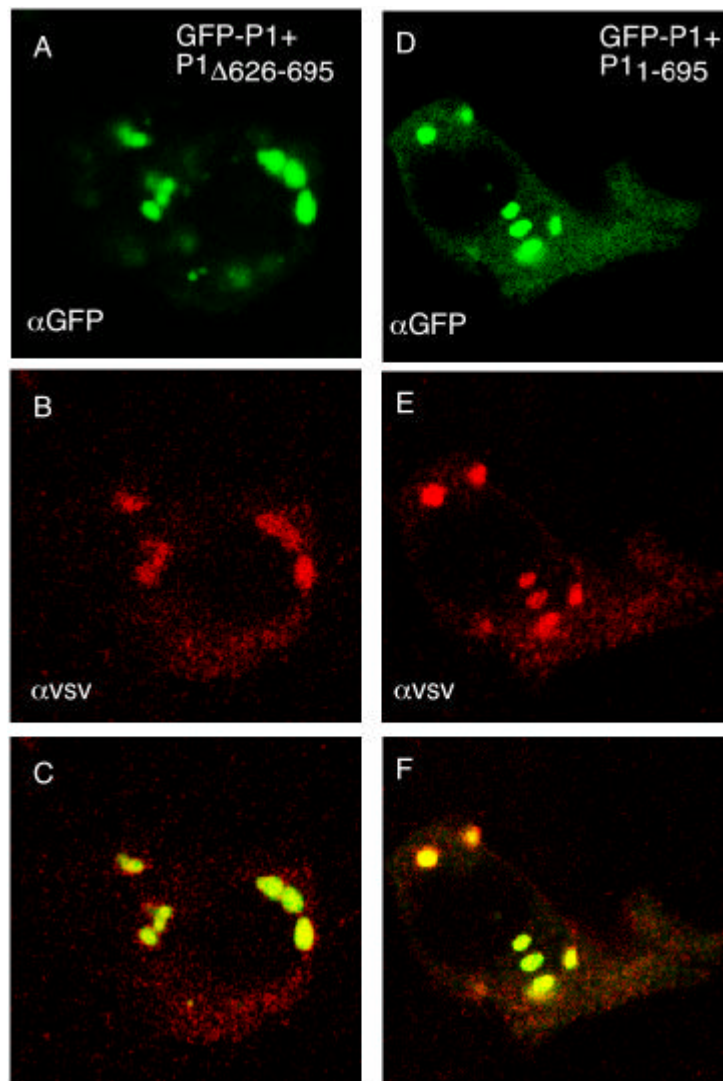


Abb. 28: Koassemblierung von GFP-P1 mit P1_{D626-695} bzw. P1₁₋₆₉₅.

Kotransfektion von GFP-P1 mit P1₁₋₆₉₅ sowie P1 Δ 626-695, Expression in HEK-Zellen und Färbung erfolgte wie beschrieben. Erstantikörper: anti-GFP-Antiserum (A+D), anti-VSV (B+E); Alexa 488 und Alexa 594 als Zweitantikörper. Grüner Kanal: GFP-P1; roter Kanal: anti-VSV.

Hier zeigte sich allerdings, daß diese Deletionsmutante immer noch in der Lage war mit Gephyrin zu koaggregieren (Abb. 28 A-C). Aus Abb. 28 D-F geht hervor, daß eine Deletionsmutante der die 62 terminalen Aminosäuren der Domäne zur Autoaggregation fehlen, dennoch in der Lage ist, mit GFP-P1 zu koaggregieren. Möglicherweise stellen diese Aminosäuren nur eine Komponente von mehreren Regionen dar, welche die physiologischen Aggregationseigenschaften von Gephyrin determinieren. Abb. 28 erschließt die Möglichkeit, daß eine nebenliegende Region eine weitere Komponente zur Autoaggregation Gephyrins beiträgt.

Um weitere Regionen zu finden, die einen Beitrag zur Interaktion zweier oder mehrerer Gephyrin-Moleküle leisten, zu finden, wurden anschließend weitere Fragmente und Deletionsmutanten im Aggregationsassay untersucht (siehe Abb. 29).

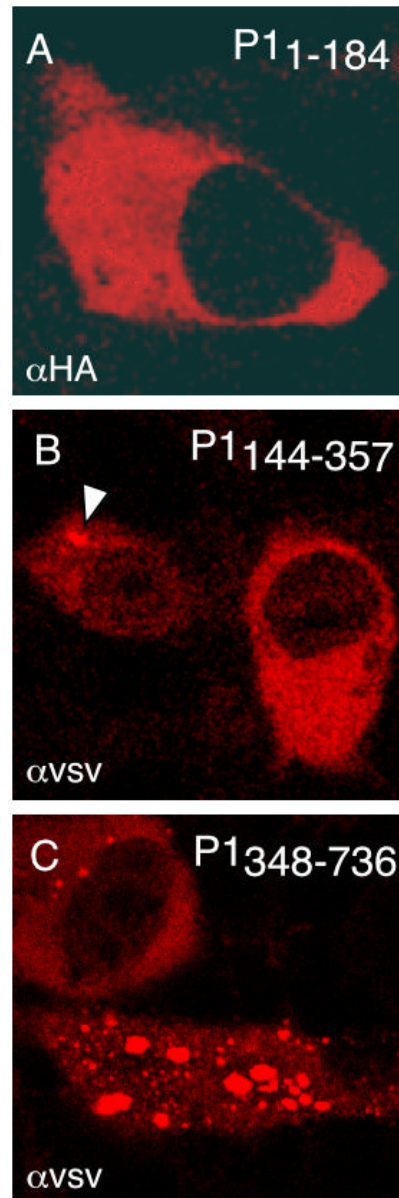


Abb. 29: Das Gephyrin-Fragment P1₁₄₄₋₃₅₇ zeigt schwache Autoaggregationsaktivität.

Die Expression der Fragmente P1₁₋₁₈₄ (A), P1₁₄₄₋₃₅₇ (B) und P1₃₄₈₋₇₃₆ (C) erfolgte wie in Kapitel zwei beschrieben. Zum Nachweis wurde das Fragment P1₁₋₁₆₆ mit einem HA-Epitop, die beiden anderen Fragmente mit einem VSV-Epitop versehen. Erstantikörper: anti-HA (A) sowie anti-VSV (B, C). Zweitantikörper: Alexa 594. Der Pfeil deutet auf ein Aggregat von P1₁₄₄₋₃₅₇.

Hierzu wurden die Fragmente P1₁₋₁₈₄, P1₁₄₄₋₃₅₇ und P1₃₄₈₋₇₃₆ in HEK-Zellen transfiziert und deren Aggregationsverhalten analysiert (Abb. 29). Das N-terminale Fragment P1₁₋₁₈₄ ist im Rahmen dieser Methode nicht in der Lage zur Autoaggregation (Abb. 29 A). Das Frag-

ment P1₁₄₄₋₃₅₇ zeigte zumindest in einigen transfizierten Zellen bei hohem zellulären Hintergrund Aggregate (B). Das Fragment P1₃₄₈₋₇₃₆ zeigte und bestätigte nochmals die schon in vorangegangenen Experimenten für den C-Terminus beobachteten Autoaggregations-eigenschaften (C). Offensichtlich befindet sich im Fragment P1₁₄₄₋₃₅₇ eine weitere Komponente, die an der Autoaggregation beteiligt ist. Dieses Fragment ist in dem schon beschriebenen großen N-terminalen Fragment P1₁₋₄₅₁ enthalten, das ebenfalls keine Autoaggregation zeigt (siehe Abb. 23). Offenbar zeigt dieses Fragment nur dann Autoaggregation, wenn der N-Terminus fehlt. Möglicherweise liegt hier eine Funktion vor, die nur in Gephyrin-Versionen aktiv ist, denen diese N-terminalen Sequenzen fehlen.

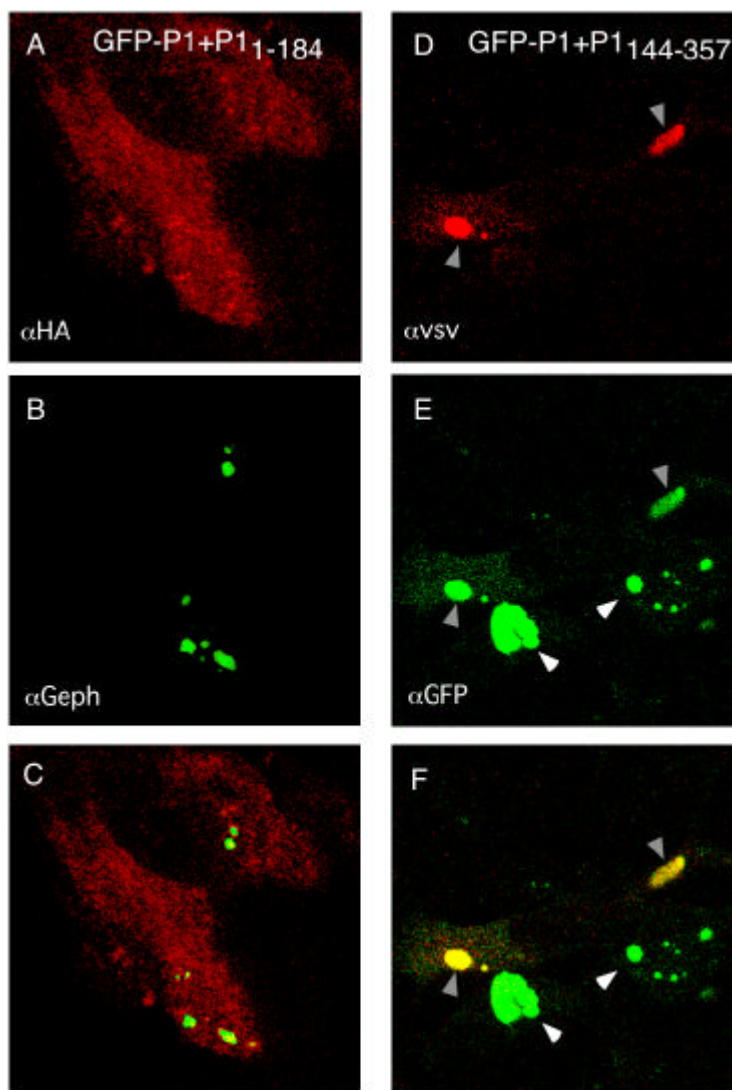


Abb.30: Koexpressionsstudien mit GFP-P1 und P1₁₄₄₋₃₅₉ bestätigen eine zweite Komponente zur Autoaggregation.

Die Koexpression der cDNAs von Gephyrin P1 mit P1₁₋₁₈₄ (A-C), bzw. von GFP-P1 und P1₁₄₄₋₃₅₉ (D-F) erfolgte wie in Kapitel 2 beschrieben. Der Nachweis erfolgte mit anti-GFP-Antiserum (A)

und anti-VSV-Antikörper (B) als Erstantikörper, Alexa 488 und Alexa 594 als Zweitantikörper. Graue Pfeile: Koaggregation von GFP-P1 und P1₁₄₄₋₃₅₉ in kotransfizierten Zellen. Weiße Pfeile: GFP-P1-Aggregate bei GFP-P1 einfach-transfizierten Zellen.

Die beiden Fragmente P1₁₋₁₈₄ und P1₁₄₄₋₃₅₇ wurden daraufhin auf ihr Verhalten in Koexpressionsstudien getestet. Diese Fragmente wurden dazu mit GFP-P1 kotransfiziert (Abb. 30).

Die Zahl der Zellen, die beide Polypeptide exprimieren, war relativ gering. Die Koexpression des N-terminalen Fragmentes zeigte nochmals, daß dieser Teil Gephyrins in diesem Experimentalsystem keine Fähigkeit zur Autoaggregation besitzt. Das Fragment P1₁₄₄₋₃₅₇ verhielt sich dagegen ganz anders (Abb. 30, D-F). Hier sind unterschiedlich transfizierte Zellen gezeigt. Die grauen Pfeile bezeichnen Aggregate bestehend aus GFP-P1 und dem Fragment, die weißen Pfeile zeigen GFP-P1-Aggregate in Zellen die ausschließlich mit GFP-P1 transfiziert wurden. Es fand sich bei fast allen kotransfizierten Zellen, die beide Konstrukte exprimierten, eine Koaggregation von GFP-P1 mit P1₁₄₄₋₃₅₇. Offensichtlich ist das GFP-P1 Fusionsprotein in der Lage, P1₁₄₄₋₃₅₇ vollständig in die typischen Aggregate zu relokalisieren. Damit verhält sich dieses Fragment wie ein spezifischer Bindungspartner Gephyrins.

In der Folge wurden die oben geschriebenen Befunde quantifiziert (siehe Abb. 31).

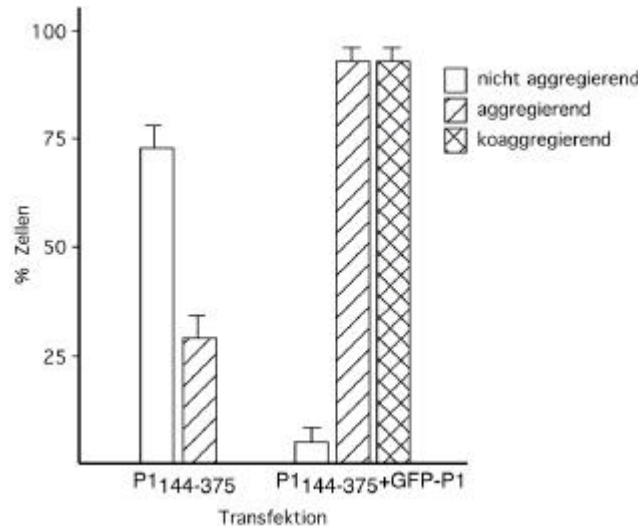


Abb.31: Quantifizierung zu den Kotransfektionsstudien von GFP-P1 mit P1₁₄₄₋₃₅₇.

Dargestellt sind Zählungen aus fünf unabhängigen Transfektionsexperimenten. Erster Block: Einzeltransfektionen von P1₁₄₄₋₃₅₇; Zweiter Block; Kotransfektionen von P1₁₄₄₋₃₅₇ mit GFP-P1.

Bei einer Transfektion von P1₁₄₄₋₃₅₇ in HEK-Zellen konnten nur in etwa 27 % der transfizierten Zellen Aggregate gefunden werden. Anders verhielt es sich bei Kotransfektion mit GFP-P1. In diesem Fall zeigten fast 90 % aller Zellen, die beide Proteine heterolog expri-

mierten eine Koaggregation (Abb. 31). GFP-P1 ist also in der Lage mit P1₁₄₄₋₃₅₇ wie mit einem spezifischen Bindungspartner zu interagieren. Hier, in dieser zentralen Verbindungsregion ist also eine Interaktionsdomäne Gephyrins vorhanden, die in diesem System schwache Autoaggregation zeigt.

Eine computergestützte Analyse des Bereiches 634-695 von Gephyrin zeigte, daß keinerlei Ähnlichkeiten zu bekannten Interaktionsdomänen anderer Proteine bestehen. Die Analyse der Peptidsequenz mittels verschiedener Algorithmen führte zu widersprüchlichen Vorhersagen über die Struktur. Auffällig zeigte sich allerdings ein eindeutig hydrophiler Abschnitt um eine Wiederholung der Aminosäuresequenz LDPRP. Möglicherweise ist dieser Abschnitt in die Autoaggregation Gephyrins involviert (Abb. 32).

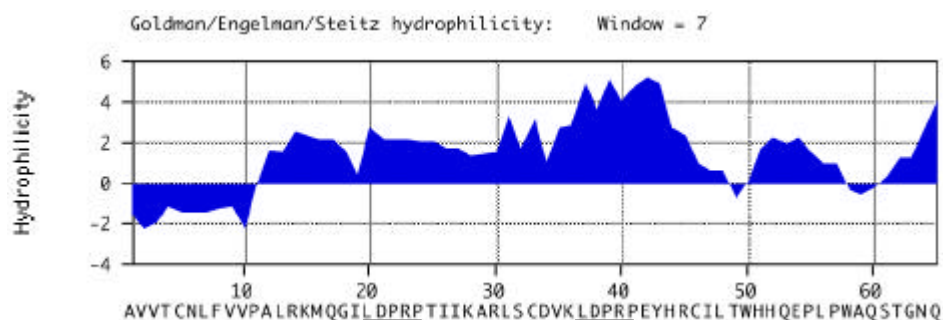


Abb.32: Zwischen As 641 und 678 Gephyrins liegt ein hydrophiler Bereich um eine Wiederholung der Sequenz LDPRP. 3

Nach Goldmann/Engelmann/Steitz wurde die Wahrscheinlichkeit für Hydrophilizität der Domäne zur Autoaggregation berechnet. Der gezeigte Aminosäureabschnitt Gephyrins liegt zwischen As 630 und 695 von Gephyrin P1. Unterstrichen: Wiederholung der Aminosäuresequenz LDPRP.

In Abb. 32 ist eine Analyse über die Sekundärstruktur des Abschnittes gezeigt, der in der Lage ist, Autoaggregation bei Gephyrin zu vermitteln. Mehrere verschiedene Algorithmen erbrachten das gleiche Ergebnis. Um die Aminosäuren 641 und 678 herum wird ein hydrophiler Bereich vorhergesagt, in diesem Bereich ist eine weitere Auffälligkeit lokalisiert: Die Aminosäuren LDPRP werden wiederholt. Möglicherweise spielen diese Eigenschaften eine Rolle bei der Bindung an Gephyrin-Moleküle. Eindeutige Hinweise auf eine Helix- oder Faltblattstruktur konnten nicht gewonnen werden.

Im Folgenden werden die eingesetzten Fragmente und die Mutante Gephyrins mit deren Autoaggregationseigenschaften zusammengefasst dargestellt (siehe Abb. 33).

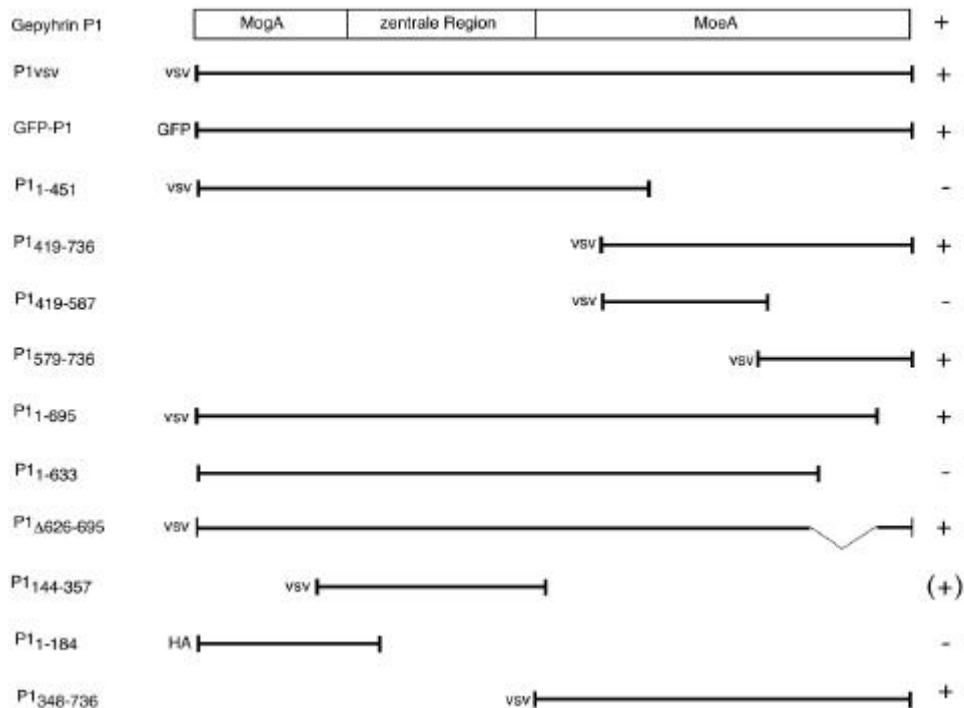


Abb.33: Darstellung der benutzten Fragmente und Mutanten Gephyrins

Zusammenfassung der Bindungseigenschaften der im zellulären Autoaggregationsassay eingesetzten Mutanten und Fragmente Gephyrins in der Reihenfolge ihrer Verwendung, vergleiche Abb. 22.

Zur Autoaggregation eines Proteins müssen mehrere Komponenten verfügbar sein, die einen Beitrag zur Bindung mindestens zweier Moleküle aneinander leisten. Bei Gephyrin wurden in diesem zellulären Untersuchungssystem zwei Komponenten gefunden, die in der Lage sind spezifisch Aggregate auszubilden. Eine Domäne im C-terminalen Bereich des Proteins konnte auf 62 Aa eingegrenzt werden, dort ist ein hydrophober Abschnitt um die Wiederholung der Aa-Sequenz LDPRP. Der N-Terminus konnte auf der Basis des Zwei-Hybrid-Systems als weitere Region ermittelt werden, die Autoaggregation vermittelt. Er ist allerdings nur isoliert in nur einem zellulären Bindungsassay in der Lage an Gephyrin zu binden.

3.7 Expression der GlyR-Bindungsstelle Gephyrins in Neuronen

Aus den Ergebnissen in Kapitel 3.1 geht hervor, daß das kleinste GlyR-bindende Gephyrin-Fragment P1₁₋₁₈₄ ist. Darüber hinaus zeigte sich, daß dieses Fragment in Fibroblasten nicht mehr an Gephyrin zu binden vermag (Kapitel 3.6). Es könnte daher als spezifischer Kompetitor für die Interaktion des GlyR mit Gephyrin in spinalen Neuronen der Ratte fungieren.

Peptidische Inhibitoren, die spezifische Funktionen von Proteinen hemmen, können sowohl kurze Peptide, als auch längere Moleküle sein, die auch eine dominant-negative Funkti-

onsweise haben können. Im vorliegenden Fall könnte das heterolog exprimierte Gephyrin-Fragment an den Neuron-eigenen GlyR binden und dadurch die Interaktion zwischen GlyR und intrinsischem Gephyrin verhindern. Da der GlyR schon vor der Integration in synaptische Membranspezialisierungen in der Zellmembran vorliegt (Feng et al., 2000), sollte eine immunzytochemische Färbung des GlyR in P1₁₋₁₈₄-transfizierten Neuronen eine diffuse Verteilung des GlyR in der Zellmembran ergeben.

Spinale Neurone der Ratte wurde wie in Kapitel zwei beschrieben präpariert und in Kultur genommen. Nach zehn bis zwölf Tagen *in vitro* (DIV) erfolgte die Transfektion chemisch, nach der Kalzium-Phosphat-Methode (siehe Kapitel 2). Nach einer Expressionsdauer von 6 h wurden die Zellen mit Methanol/Eisessig fixiert und immunzytochemisch angefärbt (siehe Kapitel 2).

Färbungen gegen GlyR und in Neuronen transfiziertes P1₁₋₁₈₄ sind in Abb. 34 gezeigt.

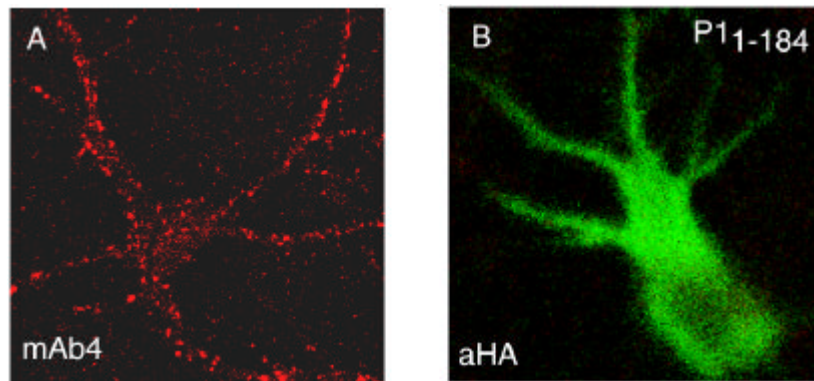


Abb. 34: Transfektion von Neuronen des Rückenmarks.

Neurone des Rückenmarks der adulten Ratte wurden wie in Kapitel zwei beschrieben untransfiziert analysiert (A) oder mit dem HA-markierten Fragment Gephyrins P1₁₋₁₈₄ im Expressionsvektor pCDNA3 HA-markiert transfiziert (B). Der immunzytochemische Nachweis erfolgte mit mAb4 gegen GlyR (A) und anti-HA gegen P1₁₋₁₈₄ (B) als Erstantikörper, bzw. mit Alexa 488 bzw. Alexa 594 als Zweitantikörper.

Abb. 34 A zeigt ein kultiviertes spinales Neuron der Ratte nach 10 DIV mit dem Antikörper mAb4 gegen GlyR angefärbt. Die Verteilung von GlyR in diesen Neuronen ist typisch: An der Membran von Zellkörper und Dendriten finden sich charakteristische Aggregate. Abb. B zeigt ein Neuron nach Transfektion mit P1₁₋₁₈₄. Dieses Gephyrin-Fragment ist hier, wie auch in Fibroblasten, diffus in der Zelle verteilt.

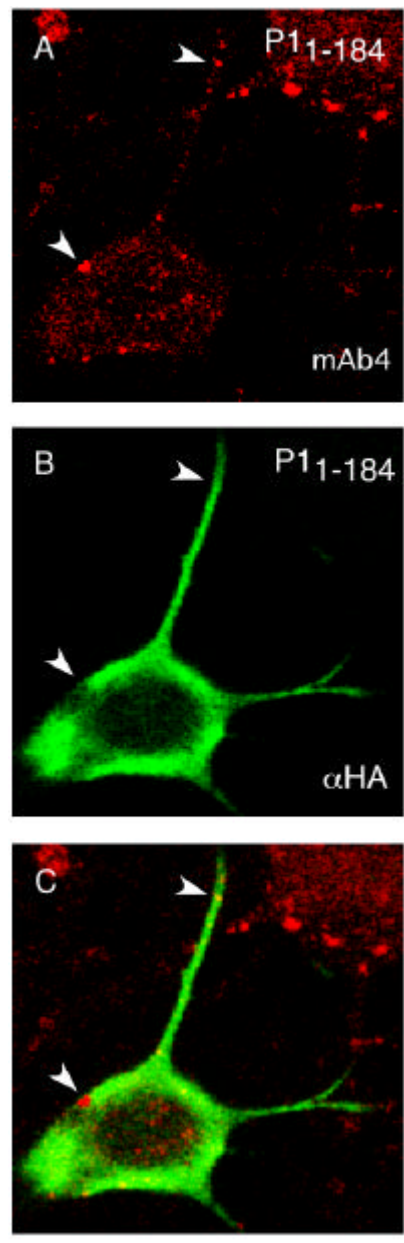


Abb. 35: Kofärbung von P1₁₋₁₈₄ und GlyR in transfizierten spinalen Neuronen.

Neurone der Ratte wurden wie in Kapitel zwei beschrieben präpariert, kultiviert, transfiziert, und immunzytochemisch behandelt. Erstantikörper: mAb4 (A), αHA (B); Zweitantikörper: 594 (A) und 488 (B).

Daraufhin wurden Kofärbungen von P1₁₋₁₈₄-transfizierten Neuronen angefertigt (siehe Abb. 35). Abb. 35 A zeigt die Färbung eines Neurons gegen den GlyR. Auch hier sind die üblichen Rezeptor-Aggregate zu sehen, wie sie auch in Abb. 34 zu sehen sind. Die Gegenfärbung mit dem anti-HA-Antikörper zeigt die selbe zelluläre Verteilung von P1₁₋₁₈₄, wie sie auch in Fibroblasten und in Abb. 34 B beobachtet werden konnte. Die GlyR-Aggregate reichern kein P1₁₋₁₈₄ an. Die leichte Gelb-Färbung der Aggregate in Abb. 35 C erfolgt nicht auf-

grund einer Kolo-kalisation der beiden Proteine, sondern aufgrund der Überlagerung der ange-färbten Bereiche in der Brennebene des konfokalen Bildes.

Die Expression von P1₁₋₁₈₄ führt also weder zu einer Translokation dieses Fragmentes in GlyR-haltige Aggregate, noch führt es zur Auflösung von diesen Aggregaten. Offensichtlich interagiert dieses Fragment nach heterologer Expression in Neuronen nicht mit nativem GlyR. Die Mechanismen der GlyR-Aggregation sind offensichtlich mit einem kurzen Fragment Gephyrins nicht zu beeinflussen.

4. Diskussion

Gephyrin ist als multifunktionelles Protein in zwei physiologischen Zusammenhängen von großer Bedeutung: bei der Synthese des MoCo und bei der postsynaptischen Lokalisation des GlyR und vieler GABA_A-Rezeptor-Subtypen.

In dieser Arbeit wurde Gephyrin weiter charakterisiert. Es wurde eine Domäne identifiziert, welche die Bindung zwischen Gephyrin und dem GlyR vermittelt. Das Epitop des Antikörpers mAb5 wurde eingegrenzt. Eine Domäne, die Gephyrin Autoaggregation vermittelt, konnte identifiziert werden. Es wurde zudem untersucht, ob Mikrotubuli an eine Region Gephyrins binden, die homolog zu Mikrotubuli-Bindungsstellen von Tau und Map2 ist. Darüber hinaus wurde eine Methode entwickelt, mit der sich GlyR-assoziierte Proteine anreichern lassen. Mit dieser Methode konnte erstmals auf Proteinebene gezeigt werden, daß verschiedene Gephyrin-Varianten in verschiedenen Organen existieren.

4.1 Kartierung der Gephyrin-Bindungsdomäne für den GlyR

Die Interaktion GlyR-Gephyrin ist ein Schlüsselement für die Entstehung und Persistenz der glyzinerger Synapse. Die Bindungsstelle des GlyR für Gephyrin wurde in der großen zytoplasmatischen Schleife zwischen der Transmembranregion drei und vier der β -Untereinheit gefunden. Diese Bindungsstelle umfasst 33 As, 18 von ihnen stellen das zentrale Motiv dar, dessen sechs hydrophobe Aminosäurereste die Bindung an Gephyrin vermitteln. Für die Sekundärstruktur wird eine amphipatische Helix als Bindungsmotiv vermutet. (Meyer et al., 1995; Kirsch et al., 1995; Kneussel et al., 1999). Der Einbau dieses Motives in GABA_A- (Meyer et al., 1995) oder NMDA-Rezeptoruntereinheiten (Kins et al., 1998) verleiht diesen Chimären die Fähigkeit, Gephyrin zu binden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Abschnitt Gephyrins kartiert, der für die Bindung an GlyR verantwortlich ist (siehe Kapitel 3.1). Dazu wurde ein 49 As langes Fragment der β -Untereinheit des GlyR, das die Bindungsstelle für Gephyrin enthält, an GST fusioniert (GST- β 49). Mit matrixgebundenem Glutathion läßt sich dieses Fusionsprotein mit seinen Adsorbanten aufreinigen. Damit war eine wichtige Voraussetzung erfüllt, verschiedene Fragmente und Mutanten Gephyrins untersuchen zu können.

Es zeigte sich, daß die Affinität Gephyrins an diese Bindungsstelle so hoch ist, daß Gephyrin angereichert werden konnte. Im Immunoblot der Eluate von GST- β 49 war Gephyrin deutlich zu detektieren, selbst wenn die Konzentration im Zellextrakt unter der Nachweisgrenze lag (Kapitel 3.1.2). Dies erlaubte ein Gephyrin-Fragment auf Bindung zu untersuchen, auch wenn dieses nur mäßig exprimiert wurde.

Im Anschluß wurden Fragmente Gephyrins auf die Bindung an GST- β 49 untersucht. Es stellte sich heraus, daß der C-Terminus Gephyrins keine Bindungsaktivität für GST- β 49 zeigt.

Alle Fragmente, die die As 166 bis 184 beinhalten, banden an den GlyR. Offensichtlich sind diese Aminosäuren notwendiger Bestandteil von GlyR-bindenden Gephyrinfragmenten. Zwei Deletionsmutanten, denen As 183-203 bzw. 161-203 fehlten, banden noch mit hoher Affinität an die Bindungsstelle des Rezeptors ($P1_{\Delta 183-203}$; $P1_{\Delta 161-201}$; Kapitel 3.1.3). Die Aminosäuren 166 bis 184 sind somit zwar ein Teil der Bindungsstelle, aber nicht alleine für die Bindung an den GlyR verantwortlich.

Daraus läßt sich ableiten, daß die Bindungsstelle für den GlyR im N-Terminus von Gephyrin gelegen ist. Sie entspricht keinem linearen Abschnitt, sondern umfasst Aminosäuren, die in einem weiteren Bereich der Primärstruktur gelegen sind. Die Bindungsstelle Gephyrins für den GlyR ist also diskontinuierlich.

Für den Bereich der As 155-190 wurde eine Vorhersage über die Sekundärstruktur nach Kyte/Doolittle erstellt. Demnach befindet sich zwischen As 166 und 184 ein Bereich, der in der Lage ist eine amphiphatische Helix zu bilden. Als amphiphatisch werden Helices bezeichnet, wenn deren hydrophobe und hydrophile Aminosäureseitenketten auf jeweils einer Seite der Helix angeordnet sind. Sie wurden oftmals als Strukturen beschrieben, die in der Lage sind, über hydrophobe Wechselwirkungen Proteinbindungen einzugehen, wie zum Beispiel beim **Brain Injury-derived neurotrophic peptide** (BINP; Morris et al., 1994) oder bei der Bindung von Calmodulin an den metabotropen Glutamat-Rezeptor (Airas, et al., 2001). Gephyrin könnte also über die hydrophoben Seitenketten dieser Helix und über weitere hydrophobe Seitenketten anderer Aminosäuren an den Bindungsstelle des GlyR binden.

Kürzlich wurden von zwei Gruppen die Kristallstruktur des N-terminalen Teils von Gephyrin, der MogA-Homologie-Region, veröffentlicht. Diese beiden Kristallstrukturen erwiesen sich als identisch (Schwarz et al., 2001; Sola et al., 2001). Schwarz et al. verglichen zudem die Kristallstruktur Gephyrins mit der Kristallstruktur der MogA-homologen Domäne des Pflanzenproteins Cnx1. Eine weitere Gruppe untersuchte die Kristallstruktur von MogA aus *E. coli*, welches dem N-Terminus von Gephyrin homolog ist (Liu et al., 2000). Diese Untersuchungen zeigten eine hohe strukturelle Identität zwischen den drei Proteinen. Insbesondere bilden alle drei Proteine trimere Komplexe hoher struktureller Ähnlichkeit.

Nur drei Unterschiede in der Struktur von MogA und Gephyrin $P1_{2-188}$ zeigten sich in den oben genannten Untersuchungen. Zum einen ein β -Hairpin unbekannter Funktion bei MogA, zweitens Veränderungen in einer Schleife zwischen α -Helix 2 und β -Faltblatt 2 dieser Proteine, und drittens interessanterweise Unterschiede in den C-terminalen Regionen. Bei Gephyrin findet sich dort die α -Helix 8, die bei MogA nicht existiert. Auch bei Cnx1 ist dort keine Helix vorhanden. Sie verbindet die N-terminale Region Gephyrins mit der zentralen Verbindungsregion. Aus der Struktur wird deutlich, daß diese Region nicht fest in das Trimer eingebunden ist (Sola et al., 2001). Diese α -Helix 8 entspricht den Aminosäuren 174 bis 182 (Sola et al., 2001; Schwarz et al., 2001). Ob sie amphiphatisch ist, geht aus diesen Publikationen nicht hervor. In der vorliegenden Arbeit wurde genau diese Sequenz als amphiphatische

Helix vorher gesagt und konnte als wichtiges Element für die GlyR-Bindung identifiziert werden.

Darüber hinaus beschreiben Schwarz et al. (2001) einen hydrophoben Bereich, der ausschließlich auf der Oberfläche des Gephyrin P1₂₋₁₈₈-Trimers zu beobachten ist. Dieser Bereich wird von den Aminosäuren Ile15, Leu49, Leu120, Val122, Pro124, Phe157, Pro160 und Pro163 gebildet, die mit Ausnahme von Leu120 und Pro124 nur bei Gephyrin vorkommen. Dieser Unterschied in der Oberflächeneigenschaft könnte mit der Bindung Gephyrins an den GlyR zusammen hängen. Die Aminosäuren, welche die Bindungsstellen für den GlyR bilden, wären somit über den gesamten N-Terminus verteilt. Auch dieses steht im Einklang mit den in dieser Arbeit gemachten Befunden. Diese Erkenntnisse erklären auch die Ergebnisse von Meyer et al., 2000, wonach bei Insertion eines alternativ gespleißten Exons (Exon C5, nach Meyer et al., 2000) in die Sequenz innerhalb der α -Helix 4, zwischen As 98 und 99 von Gephyrin P1, die Bindungsfähigkeit Gephyrins für den GlyR verloren geht.

Die Befunde dieser Arbeit, verglichen mit den neuen Kristallstrukturen, zeigen also, daß die Aminosäuren, welche für die Bindung an den GlyR wichtig sind, über einen größeren Bereich Gephyrins - As 15 bis 184 - verteilt sind, und daß eine amphiphatische α -Helix zwischen As 174 und 182 für die Bindung an den GlyR wichtig ist. Somit ist schlüssig, daß Fragmente Gephyrins, wie P1₁₄₄₋₃₅₇ oder P1₁₅₅₋₇₃₆, noch restliche Bindungsaktivität zeigen, und daß die Deletionsmutante, welcher die As 161 bis 203 fehlen, noch in der Lage ist, an den GlyR zu binden, wohin gegen das Fragment P1₁₋₁₆₆ nicht an den GlyR zu binden vermag.

4.2 In unterschiedlichen Organen werden verschiedene Gephyrin-Varianten exprimiert

Produkte alternativ gespleißter RNAs führen zu unterschiedlichen Proteinen, die verschiedene Funktionen ausführen können. Schon bei der ersten Klonierung Gephyrins waren verschiedene Gephyrin-mRNAs nachgewiesen worden (Prior et al., 1991). In Untersuchungen über die Genstruktur konnten alternativ gespleißte Exons gefunden werden (Ramming et al., 2000). Darüber hinaus wurden cDNAs entdeckt, die Hinweise auf weitere alternativ gespleißte Regionen geben. Mittlerweile geht man von 31 Exons aus, zehn davon werden alternativ gespleißt. Es ist keine cDNA bekannt, die alle Exons beinhaltet (Heck et al., 1997; Meyer et al., 2000). Die Nomenklatur der alternativ gespleißten Regionen ist nicht einheitlich, so werden jeweils zwei unterschiedliche Exone als C 5 und nochmals zwei als C 6 bezeichnet (vergl. Meyer et al., 2000, Ramming et al., 2000).

Einen weiteren Hinweis auf die Existenz unterschiedlicher Gephyrin-Proteine ergaben Arbeiten über die MoCo-Synthesefunktion Gephyrins. Dabei zeigte sich, daß der MogA homologe N-Terminus der Gephyrin-Variante P1 eine funktionelle Rolle in der Molybdän-Co-

faktor-Synthese bei Arabidopsis übernehmen kann, das Vollängenprotein jedoch nicht (Stallmeyer et al., 1999). Offenbar ist also eine von Gephyrin P1 verschiedene Variante an der MoCo-Synthese beteiligt. Demnach existieren wahrscheinlich unterschiedliche Gephyrin-Proteine. Bislang war es allerdings noch nicht gelungen, andere als die 93 kDa-Variante, Gephyrin-P1, als Protein nachzuweisen.

In dieser Arbeit konnten in unterschiedlichen Organen der Ratte verschiedene Varianten Gephyrins identifiziert werden. Hierzu wurde ein Assay etabliert, um Gephyrin aus Organextrakten anzureichern (siehe Kapitel 3.2). Es wurden Peptide mit einem Molekulargewicht von 52, 53, 56, 60 kDa und die bekannte 93 kDa-Variante gefunden.

Grundsätzlich können diesen Befunden verschiedene Spleißvarianten Gephyrins zugrunde liegen, aber auch Proteolyse oder posttranslationale Modifikation. Alle Kontrollen mit unterschiedlichen Mischungen von Proteinaseinhibitoren zeigen, daß es sich hierbei wahrscheinlich nicht um proteolytische Artefakte handelt. Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Lipidierung erhöhen zumeist das Molekulargewicht eines Proteins. In diesem Falle würde man eine Bande höher als 93 kDa erwarten. Zudem verändern solche Modifikation das Molekulargewichtes eines Peptides meistens nur relativ gering. So kann die Bande über 93 kDa durchaus durch Phosphorylierung eines 52 kDa Peptides entstehen. Eine Größenveränderung um 33 kDa (von 60 kDa auf 93 kDa) ist aber eher unwahrscheinlich. Somit lassen sich die o.g. Befunde auf die Existenz zumindest einer bis zwei Spleißvarianten Gephyrins zurückführen.

Weiterhin hervorzuheben sind die Kontrollen mit und ohne Ca^{2+} -Chelator (EDTA/EGTA; siehe Kapitel 3.2). Aufgrund des Aktivierungsmodells geht man davon aus, daß eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in der Postsynapse die GlyR-Aggregation auslöst (Kirsch und Betz, 1998; Kneussel und Betz, 2000). Die Abwesenheit von Ca^{2+} im Bindungspuffer hatte bei den Untersuchungen in dieser Arbeit allerdings keine Auswirkung auf das Bindungsverhalten Gephyrins. Regulationsprozesse über Ca^{2+} finden somit nicht auf der Ebene der Bindung von Gephyrin an GlyR statt.

In der hier durchgeführten Arbeit konnten nur GlyR-bindende Gephyrine nachgewiesen werden, die gleichzeitig mit dem Antikörper anti-Geph zu detektieren sind. Die Antikörper mAb5 bzw. mAb7 als Vergleichsantikörper erwiesen sich als zu schwach. Meyer et al. konnten zeigen, daß bei Verbleib des Exon C 5* in der RNA (Bezeichnung nach Meyer et al., 2000) das resultierende Polypeptid nicht mehr an den GlyR binden kann. Varianten, mit der Sequenz aus Exon C5* konnten in dieser Arbeit also nicht nachgewiesen werden. Bei Verbleib des Exon C 7 in der RNA entsteht durch ein Stop-Codon ein verkürztes Peptid, welches das Epitop von anti-Geph nicht mehr trägt. Also können auch Varianten, die Exon C7 tragen, in dieser Arbeit nicht detektiert werden.

Die RNA der im Rahmen dieser Arbeit angereicherten Varianten beinhaltet also wahrscheinlich nicht die Exons C 5* und C 7. Für beide Exons wurde Expression im Rückenmark

nachgewiesen. Es gibt also zumindest im ZNS noch Gephyrin-Varianten, die in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnten. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, daß Gephyrine angereichert wurden, die zwar nachweisbar sind, aber nicht an den GlyR binden. Sie könnten über die Autoaggregationsdomäne GlyR-bindender Gephyrinvarianten an den GST- β 49-Gephyrin Komplex assoziieren. Auch diese Varianten würden aufgereinigt und nachgewiesen werden. Dies ist konsistent mit mehreren als nur der 93 kDa Bande im Immunoblot.

Da die Interspezies-Identität bei Gephyrins sehr hoch ist (Gephyrin P1: 97 % zwischen Ratte und Maus), ist es sehr wahrscheinlich, daß auch in anderen Spezies Varianten Gephyrins vorliegen. Es konnten auch bei Northern Blot-Untersuchungen verschieden große RNAs von Gephyrin in unterschiedlichen Organen nachgewiesen werden (Prior et al., 1991). Offenbar wird Gephyrin ubiquitär exprimiert (Ramming et al., 2000). Auch die Expression des GlyR ist nicht auf das ZNS beschränkt. In Testis z.B. ist der GlyR an der Akrosomen-Reaktion beteiligt (Melendrez, et al., 1995). Wahrscheinlich ist die Interaktion Gephyrins und den Varianten Gephyrins mit dem GlyR auch in anderen Organen von physiologischer Bedeutung.

Hier konnte also gezeigt werden, daß Varianten von Gephyrin in unterschiedlichen Organen exprimiert werden. Möglicherweise werden die verschiedenen Funktionen Gephyrins durch eine komplexe Regulation der zellspezifischen Prozessierung von Gephyrin-RNA vermittelt. So reflektiert die Gegenwart mehrerer Gephyrin-Varianten in der Leber wahrscheinlich die hohe MoCo-abhängige enzymatische Aktivität dieses Organs (Johnson, et al., 1989; Kisker et al., 1997). Im Augenblick werden weitergehende Untersuchungen vorgenommen, die zur Identifizierung weiterer Gephyrin-Exons aus Leber führen sollen. Welche Rolle solche Varianten in der MoCo-Synthese oder in anderen Systemen des Organismus spielen, müssen zukünftige Arbeiten zeigen.

4.3 Anreicherung von GlyR Komplexen mit GST-b49

Die PSD ist eine subzelluläre Mikrodomäne zur postsynaptischen Signaltransduktion. Gekennzeichnet durch eine hohe Dichte an synaptischen Proteinen ist sie etwa 30 bis 40 nm dick und bis zu einigen hundert nm breit. Sie läßt sich über differenzielle Zentrifugation aufreinigen (Carlin et al., 1980). Proteomische Analysen am NMDA-Rezeptorkomplex konnten schon über hundert Proteine nachweisen (Husi et al., 2000). Die Gesamtzahl könnte einige hundert betragen, vor allem wenn man die schwächer assoziierten Proteine einbezieht. Für die glyzinerge Synapse kann man ähnliche Komplexe vermuten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindungsstelle des GlyR als GST- β 49 Fusionsprotein eingesetzt, um Proteine aufzureinigen, die an der glyzineren PSD an den GlyR-Gephyrin-Komplex binden. Durch eine Silberfärbung konnte gezeigt werden, daß mehrere Proteine an diesen Komplex spezifisch binden (siehe Kapitel 3.2). In einem weiteren Schritt

konnte gezeigt werden, daß Collybistin, ein GTP/GDP-Exchange Factor, in der Lage ist, nach heterologer Expression spezifisch an den Komplex aus GST- β 49 und Gephyrin zu binden (Kapitel 3.3). Eine Mutante Collybistins war dazu nicht mehr in der Lage. Dies legt nahe, daß Collybistin über Gephyrin auch in die postsynaptische Dichte eingebunden ist.

Damit ist es erstmals gelungen mit Hilfe des cytoplasmatischen Loops des GlyR Proteinkomplexe spezifisch anzureichern.

Zukünftige Arbeiten werden die genauere Zusammensetzung des GlyR-Gephyrin-Komplexes mit dieser Methode analysieren können. Dabei ist die Anreicherung und Isolierung einzelner Proteinbanden und anschließende Teilsequenzierung der Komplex-assoziierten Proteine denkbar.

4.4 Gephyrin bindet Mikrotubuli ohne die Map2/Tau-homologe Region

Map2 und Tau sind zwei gut untersuchte Mikrotubuli-bindende Proteine. Deren Mikrotubuli-Bindungsmotiv besteht im Ganzen aus einer drei- oder vierfachen unvollständigen As-Wiederholung, die jeweils durch eine nicht-homologe Verbindungssequenz voneinander getrennt sind (Sally et al., 1988; Lee et al., 1988). Man geht davon aus, daß diese drei Wiederholungen direkt jeweils in eine Furche eines Tubulus binden. Die Verbindungssequenz dient dabei als Abstandhalter. Zur Bindung an Mikrotubuli sind mindestens zwei dieser Wiederholungen nötig (Lee et al., 1989). Schon öfter wurden homologe Regionen dieser Wiederholungen in anderen Proteinen als funktionelle Bindungsstellen für Mikrotubuli nachgewiesen (z.B. Kursula et al., 2000). Im allgemeinen sind Mikrotubuli-Bindungsstellen allerdings sehr variabel und können auch bei Gephyrin eine Primärstruktur haben, die sich von den MT-Bindemotiven von Map2 oder Tau unterscheidet (siehe z.B. Assman et al., 1999; Koonce et al., 2000; Segermann, et al., 2000).

Bei Gephyrin ist nur ein solches Bindungsmotiv, zudem unvollständig, vorhanden. Man könnte sich vorstellen, daß ein Gephyrin-Trimer mit seinen drei Motiven an einen Mikrotubulus bindet. Die Bindung Gephyrins an MT ist positiv kooperativ (Kirsch et al., 1991), Map2 scheint jedoch nicht-kooperativ zu binden (Coffey et al., 1995), obwohl es auch Hinweise für eine kooperative Bindung gibt (Wallis, et al., 1993).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Map2/Tau-homologe Region Gephyrins für die Bindung Gephyrins an Mikrotubuli verantwortlich ist. Hierfür wurde ein Standard-Mikrotubuli-Bindungsassay eingesetzt, das auf Kosedimentation von polymerisiertem Tubulin und dessen Bindungspartnern in ein Sucrosekissen beruht (Gard und Kirschner 1987). Ein solches System wurde schon früher benutzt, um die Mikrotubuli-Bindung von Gephyrin nachzuweisen (Kirsch et al., 1991).

Die Ergebnisse in Kapitel 3.5 zeigen allerdings, daß Gephyrin auch dann an Mikrotubuli binden kann, wenn Exon 15, welches für die Map2/Tau-homologe Region kodiert, nicht mehr Bestandteil der RNA ist. Ein Fragment Gephyrins, das den gesamten C-Terminus umfasst, die Homologie-Region aber nicht besitzt, ist immer noch in der Lage, an Mikrotubuli zu binden.

Die Map2/Tau-homologe Region ist also nicht die Sequenz, oder nicht die alleinige, welche die *in vitro* MT-Bindung Gephyrins vermittelt. Offensichtlich befindet sich im C-Terminus von Gephyrin mindestens eine Bindungsstelle für polymerisiertes Tubulin, die keine Homologie zu einer bekannten MT-Bindungsstelle aufweist. Zukünftige Arbeiten müssen Struktur und Funktion dieser Bindungsstelle klären.

4.5 Die Epitopspezifität des Antikörpers mAb5

Zur Untersuchung Gephyrins stehen mittlerweile drei monoklonale Antikörper zur Verfügung. Der Antikörper mAb7 hat sein Epitop zwischen As 445-736, der Antikörper der Firma Transduction Lab (anti-Geph) zwischen As 528-736. Die Epitope liegen also im C-Terminus Gephyrins, der nach heutigem Kenntnisstand in den meisten Spleißvarianten vorkommt. N-terminal, zwischen As 1-445, liegt das bislang nicht näher definierte Epitop des Antikörpers mAb5. Arbeiten mit diesem Antikörper haben viel zum Verständnis von synaptischer Funktion beigetragen (siehe z.B. Kirsch und Betz, 1993). In diesem N-terminalen Bereich Gephyrin ist alternatives Spleißen allerdings weitaus häufiger. Neun der zehn alternativ gespleißten Exons liegen in diesem Bereich (Prior et al., 1992; Heck et al., 1997; Meyer et al., 2000; Ramming et al., 2000). Für weitergehende Untersuchungen, z.B. Expressionsstudien, ist es daher wichtig, das Exon zu kennen, in dem das Epitop des mAb5 liegt.

In Kapitel 3.3 wird gezeigt, daß das Epitop von mAb5 auf Exon 8 liegt. Das wildtypische Gephyrin wurde eindeutig und erwartungsgemäß durch mAb5 erkannt, eine Mutante ohne die As 186-203 dagegen kann nicht mehr an mAb5 binden. Färbungen mit dem anti-Geph- und dem anti-VSV-Antikörper zeigen eindeutig, daß diese Mutante ähnlich dem Wildtyp exprimiert wird. In Kapitel 3.3 ist der enge Sequenzbereich angegeben, in dem das Epitop liegt. Der Antikörper mAb5 erkennt also alle Varianten Gephyrins, die Exon 8 in ihrer RNA aufweisen. Dort liegt das Epitop weiterhin zwischen As 175 bis 212, um einen prolinreichen Abschnitt. MAb5 bindet mit hoher Spezifität, Sequenzvergleiche weisen eine hohe Redundanz der prolinreichen Region nach. Daher ist davon auszugehen, daß die prolinreiche Sequenz nicht selbst das Epitop bildet, sondern mit diesem allenfalls überlappt. Somit bindet mAb5 höchstwahrscheinlich in einem der Randbereiche der prolinreichen Sequenz (As 175 bis 184, bzw. As 196 bis 212).

Bislang ist keine cDNA ohne Exon 8 gefunden worden. Alle Proteine, denen eine bekannte cDNA zugrunde liegt, sollten somit durch diesen Antikörper nachgewiesen werden.

Exon 8 liegt allerdings am C-terminalen Ende der MogA-Homologieregion und könnte somit auch vor Translation von MoCo-syntheseaktiven Varianten herausgespleißt werden. Möglicherweise benötigt man zur Untersuchung von MoCo-aktiven Varianten einen weitere Antikörper.

4.6 Die Autoaggregationsdomänen Gephyrins

Die Bildung und Stabilität der glyzinerger und der meisten GABA_Aergen Synapsen ist von dem peripheren Membranprotein Gephyrin abhängig. Offensichtlich bildet Gephyrin einen Aggregationskern, der den GlyR an der Synapse verankert und über die Bindung weiterer Gephyrin-Moleküle lateral vernetzt (siehe Kapitel 1). Diese Autoaggregation ist demnach ein wichtiges Element zu Aufbau und Erhalt der glyzinerger Synapse.

Ähnlich wie Gephyrin bei der glyzinerger Synapse vermittelt PSD-95 das Clustern des NMDA-Rezeptors und dessen Verankerung an der Synapse sowie die Interaktion mit anderen synaptischen Proteinen. PSD-95 autoaggregiert ähnlich wie Gephyrin (siehe Kapitel 1). Hierfür sind zwei Cystein-Reste im N-Terminus des Proteins notwendig. Bei Deletion dieser Cystein-Reste werden die Bindungseigenschaften von PSD-95 für synaptische Kanäle offenbar nicht verändert, allerdings ist das mutierte PSD-95 nicht in der Lage, Rezeptoren zu clustern (Hsueh und Sheng, 1999). Hier konnte bereits eine Autoaggregationsdomäne definiert und deren Bedeutung für das Clustern von Rezeptoren nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß mehr als eine Region Gephyrins zur Autoaggregation beiträgt. Die Primärstruktur Gephyrins zeigt keine Ähnlichkeiten mit bekannten Interaktionsdomänen anderer Proteine. Eine N-terminal und eine C-terminal gelegene Autoaggregationsdomäne wurde identifiziert (siehe Kapitel 3.6).

Der N-Terminus Gephyrins zeigte im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay eine relativ schwache Bindungsaktivität an Gephyrin P1. Ein kleineres N-terminales Fragment zeigte in diesem Assay keine Aktivität mehr. Im Koaggregationsassay band das N-terminale Fragment nicht an Gephyrin P1.

Neue Untersuchungen über die Kristallstruktur des N-Terminus von Gephyrin P1₂₋₁₈₈ und seinem Homolog MogA zeigen, daß beide Proteine ein Trimer bilden. Die As-Reste, welche die Trimerisierungsdomäne bilden, sind nur schwach konserviert. Die Struktur des Trimers von MogA und Gephyrin P1₂₋₁₈₈ allerdings ist hochkonserviert. Bei Gephyrin sind die Trimer-bildenden As-Reste von As 89 bis 168 über verschiedene Strukturelemente verteilt. Die Domäne, in die sie eingebunden sind, interferiert nicht mit den As-Resten, die für die GlyR-Bindung verantwortlich sind (siehe Kapitel 3.1, 4.1). Ob Vollängen-Gephyrin P1 ebenfalls über diese Trimerisierungsdomäne aggregiert, ist nicht untersucht. Allerdings spricht die rasche Sedimentation Gephyrins auf Sucrosegradienten für ein Molekulargewicht des nativen Proteins von >350 kDa. Vermutlich ist die Trimerisierung dieser Proteine für die MoCo-

Synthesefunktion von Bedeutung (Sola et al., 2001; Schwarz et al., 2001). Gephyrin P1 kann im Gegensatz zu seinem isolierten N-terminus keine MogA-Funktion übernehmen (Stallmeyer et al., 1999).

Somit könnte Gephyrin auch an der Synapse über den N-Terminus trimerisiert vorliegen und gleichzeitig den GlyR binden. In dieser Konstellation könnte es allerdings keine MoCo-Funktion übernehmen.

Auch die zentrale Region Gephyrins interagiert mit Gephyrin P1 in einem zellulären Koaggregationssassay. Möglicherweise trägt dieses Fragment (P1₁₄₄₋₃₅₇) damit zur Autoaggregation Gephyrins bei. Wahrscheinlich bindet es aber über die Sequenz 144-168 an Gephyrin (s.o.). Wenn man die oben diskutierte Kristallstruktur betrachtet, fällt auf, daß dieses Fragment drei As-Reste umfasst, die in die Trimerisierungsdomäne Gephyrins involviert sind (vergl. Sola et al., 2001; Schwarz et al., 2001). Dies sind Ala161, Ala165 und Lys 168. P1₁₄₄₋₃₅₇ zeigt in einigen Zellen die Fähigkeit zur Autoaggregation, eine einfache Bindung an Gephyrin P1 ist eindeutig gezeigt (vergl. Kapitel 3.6). Wahrscheinlich sind drei As-Reste nicht ausreichend um Autoaggregation zu vermitteln, sicherlich tragen sie aber zur Bindung von P1₁₄₄₋₃₅₇ an Gephyrin P1 bei. Wahrscheinlich gehen diese Befunden also auf die Überlapung dieses Fragments mit der N-terminalen Trimerisierungsdomäne zurück.

Die C-terminale Autoaggregationsdomäne Gephyrins konnte im Rahmen dieser Arbeit auf die Aminosäuren 633 bis 695 von Gephyrin P1 eingegrenzt werden. Hierzu wurden das Hefe-Zwei-Hybrid-System und ein zelluläres Koaggregationssassay herangezogen. Allerdings zeigt eine Mutante Gephyrins, der diese Aminosäuren fehlen, noch Autoaggregation. Diesem Befund nach liegt auch hier eine Bindungsstelle vor, die von As-Resten gebildet werden, die über einen weiteren Bereich der Primärstruktur verteilt sind. Diese gehen offensichtlich noch in den Bereich As 695-736 über. Der hydrophile Bereich innerhalb der 62 As der Autoaggregationsdomäne spielt wahrscheinlich bei der Autoaggregation eine Rolle. Somit liegt auch hier eine diskontinuierliche Bindungsstelle vor.

Eine Kristallstruktur des C-terminalen Bereiches von Gephyrin liegt bisher nicht vor. Allerdings wurde kürzlich das MoeA-Protein von *E. coli*, ein Homolog des C-terminalen Bereiches von Gephyrin, kristallisiert (Xiang et al., 2001; Schrag et al., 2001). Demnach gliedert sich dieses Protein in vier Domänen, die sich L-förmig anordnen. Das Protein bildet ein moderat stabiles, flexibles Dimer, indem sich einige hydrophobe As-Reste der Domänen I, III und IV anlagern. Der Komplex bildet daraufhin ein gegenläufig angeordnetes Doppel-L. Diese As-Reste sind auch bei Gephyrin konserviert. (Xiang et al., 2001). Wenn die Interaktion Gephyrins auf die selbe Art und Weise verläuft, hieße dies, daß sieben konservierte As-Reste zwischen As 375 und 699 eine Bindung zweier Gephyrine vermitteln würden. Das so entstan-

dene Gephyrin-Dimer könnte dann aber nicht aggregieren wie das Fragment P1₅₇₉₋₇₃₆. Hier muß also noch eine weitere Komponente zur Multimerisierung Gephyrins beitragen.

Die in dieser Arbeit ermittelte Autoaggregationsdomäne liegt in einem schwächer konservierten Bereich zwischen As 633 und 695, der eine hydrophile Region umfasst (vergl. Xiang et al., 2001; Schrag et al., 2001 und Kapitel 3.6). Bei Gephyrin existiert also eine Autoaggregationsdomäne, die bei der nur moderat stabilen Interaktion zwischen zwei MoeA-Dimeren nicht zum tragen kommt. Wahrscheinlich sind bei Gephyrin P1 beide Mechanismen, die zur Aggregation beitragen können, aktiv. Dies könnte auch die verglichen zum N-Terminus relativ starke Interaktion des C-Terminus im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay erklären. Das Vorhandensein multipler C-terminaler Interaktionsreste erklärt auch das scheinbar widersprüchliche Aggregationsverhalten der Gephyrin-Fragmente und Mutanten im Koaggregationsassay in HEK-Zellen: Dem Fragment P1₁₋₆₃₃ fehlt ein C-terminaler Teil der hydrophoben Komponente und der gesamte hydrophile Bereich, sie aggregiert daher nicht mehr. Der Mutante P1_{Δ626-695} fehlt allerdings nur der hydrophile Bereich, sie kann daher noch über den hydrophoben Bereich an Gephyrin binden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte also eine Domäne, die die Autoaggregation Gephyrins vermittelt, eingegrenzt werden. Diese Domäne liegt in einem schwächer konservierten Bereich und umfasst die Wiederholung der As-Reste LDPRP. Eine solche As-Wiederholung ist in keinem Gephyrin-homologen Protein nachweisbar.

In Abb. 37 sind nochmals die wichtigsten Mutanten und Fragmente Gephyrins dargestellt, die zur Ermittlung der GlyR-Bindungsstelle und der Autoaggeationsdomänen eingesetzt wurde.

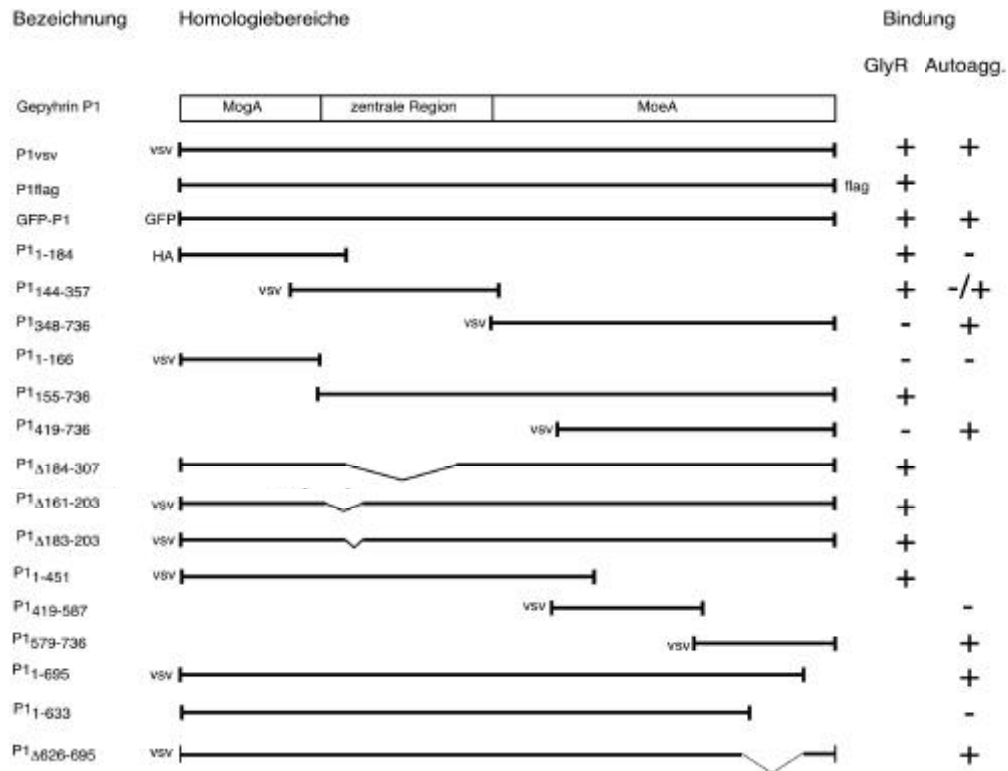


Abb. 37: Zusammenstellung von Fragmenten und Mutanten Gephyrins, die für die Identifizierung der GlyR-Bindungs- und Autoaggregationsdomäne eingesetzt wurden (siehe auch Kapitel 3)

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Daten, läßt sich das Modell der glyzineren Synapse verifizieren. In Abb. 38 wird ein solches Modell vorgeschlagen. Die GlyR-β Unter-einheit bindet an eine diskontinuierliche Bindungsstelle, die den N-Terminus von Gephyrin umfaßt. Wahrscheinlich über den C-Terminus bindet Gephyrin an Mikrotubuli. N- wie C-terminal befindet sich jeweils eine Autoaggregationsdomäne, mit der Gephyrin-GlyR-Komplexe vernetzt werden können. Collybistin und DLC2 sind wahrscheinlich Bestandteil des GlyR-Proteinkomplexes. Kleinere Varianten Gephyrins binden auch an den Rezeptor.

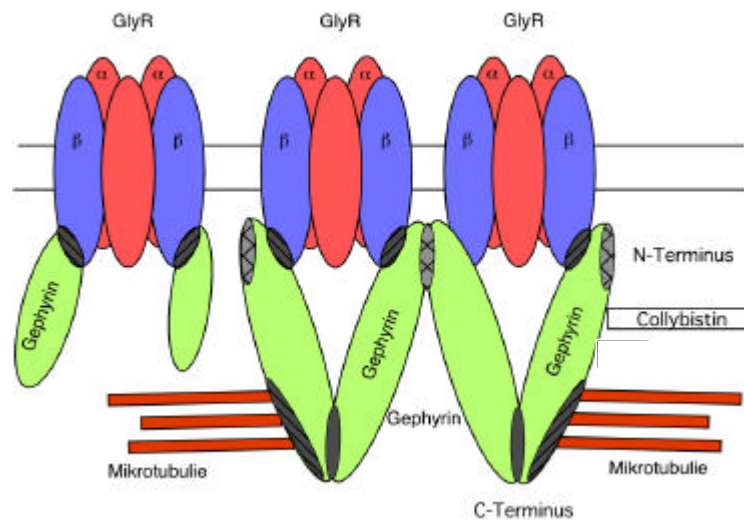


Abb. 38: Schematische Darstellung der Kartierung der Bindungsstellen Gephyrins.

Dargestellt ist ein Schema der in dieser Arbeit untersuchten Bindungsstellen. Unterschiedliche Gephyrin-Varianten binden an den GlyR, Collybistin und DLC 2 binden an den synaptischen Komplex. Im N-Terminus von Gephyrin P1 befindet sich die diskontinuierliche GlyR-Bindungsstelle und eine Autoaggregationsdomäne, im C-Terminus befindet sich eine diskontinuierliche Autoaggregationsdomäne. Auf weitere Details wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Erläuterungen im Text.

4.7 Expression der GlyR-Bindungsstelle Gephyrins in Neuronen

Als spezifische Inhibitoren von Proteininteraktionen werden oftmals kleine Peptide, die z.B. mit einer Bindungsstelle interagieren, verwendet (Mochida et al., 1998). Auch größere Polypeptide mit dominant-negativem Effekt werden häufig benutzt um Interaktionen zu beeinflussen (Pak et al., 2001).

Aus Kapitel 3.1 und 4.1 geht hervor, daß die Bindungsstelle Gephyrins für den GlyR über den N-terminalen Bereich verteilt ist, den das Fragment P1₁₋₁₈₄ umfasst. Dieses Fragment bindet in HEK-Zellen nicht mehr an Gephyrin (Kapitel 3.6).

In dieser Arbeit wurde das N-terminale Fragment P1₁₋₁₈₄ als inhibitorisches Peptid benutzt, um die Interaktion des GlyR mit Gephyrin zu beeinflussen (Kapitel 3.7). Mit der in diesem Labor etablierten Methode der Kalzium-Phosphat-Transfektion von Neuronen wurde das Konstrukt in Neurone eingebracht und dort exprimiert. Das Peptid war im Neuron wie auch in HEK-Fibroblasten diffus verteilt (vergl. Kapitel 3.7 mit Kapitel 3.6). Bei Doppelfärbungen zeigte sich allerdings, daß die GlyR-Bindungsstelle des Gephyrin-Fragmentes P1₁₋₁₈₄ nicht in der Lage war mit dem endogenen GlyR zu interagieren. Die typischen GlyR-Aggregate kolo-kalisiert in keiner Weise mit dem transfizierten Peptid. Offensichtlich ist die Bindungsstelle des GlyR für Gephyrin zu keiner Zeit zugänglich für das heterolog exprimierte P1₁₋₁₈₄.

Nach Feng et al. (2000) und Meyer et al. (2000) befindet sich der GlyR vor dem Einfügen in die PSD in der Zellmembran und dort in sogenannten Mikroclustern, die ohne Beteiligung von Gephyrin gebildet werden. Gephyrin selbst agiert demnach als Aggregationskern an der Synapse. Das in dieser Arbeit eingesetzte Peptid müßte also vor der Integration des GlyR in den synaptischen Cluster an dessen Gephyrin-Bindungsstelle binden und so die Interaktion und synaptische Lokalisierung verhindern. Dies war allerdings nicht der Fall. Offensichtlich ist die Interaktionsdomäne zwischen TM 3 und 4 des GlyR nicht frei zugänglich, das Peptid kann den GlyR nicht binden. Es könnte auch eine Sättigung des GlyR durch endogenes Gephyrin, eine verringerte Affinität des Konstrukts oder seine unzureichende Expression reflektieren. Möglicherweise ist der GlyR aufgrund der Einbindung in Mikroaggregate nicht zugänglich für das Peptid.

Zukünftige Arbeiten werden den Struktur Funktion des GlyR-Clusters weiter verifizieren.

5. Literatur

Airas, J.M., Betz, H., ElFar, O. (2001). PKC phosphorylation of a conserved serine residue in the C-terminus of group III metabotropic receptors inhibits calmodulin binding. *FEBS Lett.* 494:60-63.

Allison, D.W., Chervin, A.S., Gelfand, V.I., Craig, A.M. (2000). Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *J.Neurosci.* 20:4545-4554.

Allison, D.W., Gelfand, V.I., Spector, I., Craig, A.M. (1998). Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J.Neurosci.* 19:2423-2436.

Altiok, N., Bessereau, J., Changeux, J. (1995). Erb3 and ErbB2/neu mediate the effect of neuregulin on acetylcholine receptor gene expression in muscle: differential expression at the endplate. *EMBO J.* 14:4258-4266.

Apel, E.D., Glass, D.J., Moscoso, L.M., Yancopoulos, G.D., Sanes, J.R. (1997). Rapsyn is required for MuSK signalling and recruits synaptic components to a MuSK containing scaffold. *Neuron* 18:623-635.

Apel, E.D., und Merlie, J.P. (1995). Assembly of the postsynaptic apparatus. *Curr.Opin. Neurobiol.* 5:62-67.

Assmann, V., Jenkinson, D., Marshall, J.F., Hart, I.R. (1999). The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J. Cell Sci.* 112:3943-3954.

Beattie, E.C., Carroll, R.C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M., Malenka, R.C. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signalling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci.* 3:1291-1300.

Bechade, C., Colin, I., Kirsch, J., Betz, H., Triller, A. (1996). Expression of glycine receptor alpha subunits and gephyrin in cultured spinal chord neurons. *Eur. J. Neurosci.* 8:429-435.

Becker, C.M., Hoch, W., Betz, H. (1989). Sensitive immunoassay shows selective association of peripheral and integral membrane proteins of the inhibitory glycine receptor complex. *J. Neurochem.* 53:124-131.

Bennett, M.R., Pettigrew, A.G. (1976). The formation of neuromuskular synapse. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 40:409-24; Zitiert nach Sanes und Lichtman, 1999

Berg, D.K., Hall, Z.W. (1975). Loss of alpha-bungarotoxin from junctional and extrajunctional acetylcholine receptors in rat diaphragm muscle *in vivo* and in organ culture. *J. Physiol.* 244:659-679.

Betz, H. (1990). Ligand gated ion channels in the brain: the amino acid receptor family. *Neuron* 5:383-392.

Bezakova, G. Bloch, R.J. (1998). The zink finger domaine of the 43kDa receptor associated protein, Rapsyn – role in acetylcholine receptor clustering. *Moll. Cell. Neurosci.* 11:274-278.

Bonnert, T.P., (1999). θ , a novel γ -aminobutyric acid type A receptor subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:9891-9896.

Bormann, J. (2000). The ‚ABC‘ of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:16-19.

Burgess R.W., Nguyen, Q.T., Son, Y.J., Lichtman, J.W., Sanes, J.R. (1999). Alternatively spliced isoforms of nerve- and muscle derived agrin: Their roles at the neuromuscular junction. *Neuron* 23: 33-44.

Burkin, D.J., Gu, M.J., Hodges, B.L., Campanelli, J.T., Kaufman, S.J. (1998). A functional role for specific splice variants to the $\alpha 7\beta 1$ integrin in acetylcholine receptor clustering. *J. Cell Biol.* 143:1067-1075.

Burkin, D.J., Kim, J.E., Gu, M.J., Kaufmann, S.J. 2000. Laminin and $\alpha 7\beta 1$ integrin regulate agrin induced clustering of acetylcholine receptors. *J. Cell Sci.* 113:2877-2886.

Cabot, J.B., Bushnell, A., Alessi, V., Mendell, N.R. (1995). Postsynaptic gephyrin immunoreactivity exhibits a nearly one-to-one correspondence with γ -aminobutyric acid-like immunogold labelled synaptic inputs to sympathetic preganglionic neurons. *J. Comp. Neurol.* 356:418-432.

- Cabral, J.H., Petosa, C., Sutcliffe, M.J., Raza, S., Byron, O., Poy, F., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Liddington, R.C. (1996). Crystal structure of a PDZ domain. *Cell* 77:663-674.
- Campanelli, J.T., Hoch, W., Rupp, F., Kreiner, T., Scheller, R.H. (1991). Agrin mediates cell contact-induced acetylcholine receptor clustering. *Cell* 67:909-916.
- Carlin, K.R., Grab, D., Cohen, R., Siekevitz, P., (1980). Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J. Cell Biol.* 86:831-845.
- Carroll, R.C., Beattie, E.C., Von Zastrow, M., Malenka, R.C. (2001). Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:315-324.
- Chen H.J., Rojas-Soto, M., Oguni, A., Kennedy, M.B. (1998). A synaptic Ras GTPase activation protein (p135/SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* 20:895-904.
- Coffey, R.L., Purich, D.L. (1995). Non-cooperative binding of the Map-2 microtubule-binding region to microtubules. *J. Biol. Chem.* 270:1035-1040.
- Cornish, T., Chi, J., Johnson, S., Lu, Y., Campanelli, J.T. (1999). Globular Domains of agrin are functional units that collaborate to induce acetylcholine receptor clustering. *J. Cell Sci.* (112):1213-1223.
- Craig, A.M. (1998). Activity and synaptic receptor targeting: the long view. *Neuron* 21:459-462.
- Dai, Z.S., Luo, X.Y., Xie, H.H., Peng, H.B. (2000). The actin-driven movement and formation of acetylcholine receptor clusters. *J. Cell Biol.* 150:1321-1334.
- Davies, P.A., Hanna, M.C., Hales, T.G., Kirkness E.F. (1997). Insensitivity to anesthetic agents conferred by a class of GABA_A receptor subunit. *Nature* 385:820-823.
- Daw, M.I. PDZ-proteins interacting with c-terminal GluR2/3 involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 28:873-886.
- DeChiara, T.M., Bowen, D.C., Valenzuela, D.M., Simmons, M.V., Poueymirou, W.T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D.L., Rojas, E., Park, J.S., Smith, C., DiStefano, D.S., Glass, D.J., Burden, S.J., Yancopoulos, G.D. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is

required for neuromuscular junction formation *in vivo*. *Cell* 85:501-512.

Dia, J., Zhang, X., Staudinger, J., Huganir, R., L. (1999). Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* 22:179-187.

Dong, H., O'Brian, r.J., fung, E.T., Lanahan, A.A., Worley, P.F., Huganir, R.L. (1997). GRIP: A synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA-Rezeptors. *Nature* 386:279-284.

Dumoulin, A., Levi, S., Riveau, B., Gasnier, B., Triller, A. (2000). Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. *Europ. J. Neurosci.* 12:3883-3892.

Durand, G.M., Kolvachuk, Y., Konnerth, A. (1996). A long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381:71-75.

Ehlers, M.D. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron*. 28:511-525.

Ehlers, M.D., Tingley, W.G., Huganir, R.L. (1995). Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science* 269:1734-1737.

Ehlers, M.D., Zhang, S., Bernhardt, J.P., Huganir, R.L., (1996). Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84:745-755.

Essrich, C., Lorez, M., Benson, J.A., Fritschy, J.M., Lüscher, B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the γ 2 subunit and gephyrin. *Nature Neurosci.* 1:536-571.

Expression and mRNA splicing of glycine receptor subunits and gephyrin during neuronal differentiation of P19 cells *in vitro*, studied by RT-PCR and immunocytochemistry. *Brain Research. Dev. Brain Res.* 98:211-220.

Falls, D., Rosen, K., Corfas, G., Lane, W., Fischbach, G. (!993). ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72:801-815.

Feng GP, Tintrup H, Kirsch J, Nichol MC, Kuhse J, Betz H, Sanes JR. (2000). Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science*. 282:1321-1324.

Fertuck, H.C., und Salpeter, M.M. (1974). Localization of the acetylcholine receptors by ¹²⁵I-labelled α -bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78:5230-5234.

Fischer, F., Kneussel M, Tintrup H, Haverkamp S, Rauen T, Betz H, Wässle H. (2000). Reduced synaptic clustering of GABA and glycine receptors in the retina of the gephyrin null mutant mouse. *J.Comp. Neurol.* 427:634-648.

Fritschy, J.M. Mohler, H. (1995). GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of major subunits. *J. Comp. Neurol.* 359:154-194.

Froehner, S.C., Luetje, C.W., Scotland, P.B., Patrick, J. (1990). The postsynaptic 43 K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 5:403-410.

Fuhrer C, Sugiyama JE, Taylor RG, Hall ZW. (1997). Association of the muscle-specific kinase MuSK with the acetylcholine receptor in mammalian muscle. *EMBO J.* 16:4910-4960.

Fuhrer, C., Gautam, M., Sugiyama, J.E., Hall, Z.W. (1999). Roles of Rapsyn and agrin in interaction of postsynaptic proteins with acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* 19:6405-6416.

Gard, D.L., Kirschner, M.W. (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus end. *J. Cell. Biol.* 2203-2215.

Garner, C.C., Nash, J., Huganir, R.L. (2000). PDZ domains in synapse assembly and signaling. *Trends Cell Biol.* 10:274-280.

Gautam, M., DeChiara, T.M., Glass D.J., Yancopoulos G.D., Sanes, J.R. (1999). Distinct phenotypes of mutant mice lacking agrin, MuSK or rapsyn. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 114:171-178.

Gautam, M., Noakes, P.G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, C.G., Sanes, J.R., Merlie, J.P. (1995). Failure of postsynaptic specializations to develop at neuromuscular-junctions of rapsyn

defizient mice. *Nature* 377:232-236.

Glass DJ, Apel ED, Shah S, Bowen DC, Dechiara TM, Stitt TN, Sanes JR, Yancopoulos GD. (1997). Kinase Domain of the muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) is sufficient for phosphorylation but not clustering of Acetylcholine receptors - required role for the MuSK ectodomain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94:8848-8853

Glass, D.J., Yancopoulos, G.D. (1997). Sequential roles of agrin, MuSK and rapsyn during neuromuscular junction formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7:379-384.

Grenningloh, G., Rienitz, A., Schmitt, B., Methfessel, C., Zensen, M., Beyreuther, K., Gundelfinger, E.D., Betz, H. (1987). The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature* 328:215-220.

Grow, W.A., Ferns, M, Gordon, H. (1999). Agrin-independent activation of the agrin signal transduction pathway. *J.Neurobiol.* 40:356-365.

Grow, W.H., Gordon, H. (2000) Sialic acid inhibits agrin signaling in C2 myotubes. *Cell Tiss. Res.* 299:273-279.

Hama, T., Murayama, M., Kato, R., Ohtake, A., Sato, K. (1996). Amphiphilic Helix is essential for the activity of brain injury-derived neurotrophic peptide (BINP). *FEBS Lett.* 396:143-146.

Hasona, A., Ray, R.M., Shanmugam, K.T. (1998). Physiological and genetic analyses leading to identification of a biochemical role for the *moeA* (molybdate metabolism) gene product in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 180:1466-1472.

Hayashi, Y., et al., Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287:2262-2267.

Heck, S., Enz, R., Richterlandsberg, C., Blohm, D.H. (1997)

Hedblom, E, Kirkness E.F. (1997). A novel class of GABA_A-receptor subtypes in tissues of the reproductive system. *J. Biol. Chem.* 272:15346-15350.

Hollmann, M., Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:31-108.

- Hsueh, Y.P., Kim, E., Sheng, M. (1997). Disulfide-linked head to head multimerization in the mechanism of ion channel clustering by PSD-95. *Neuron* 18:803-814.
- Hsueh, Y.P., Sheng, M. (1998). Anchoring of glutamate receptors at the synapse. *Prog. Brain Res.* 116:123-131.
- Husi, H., Ward, M.A., Choudhary, J.S., Blackstock, W.P., Grant, S.G.N. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat. Neurosci.* 20:661-669.
- Husseini, A.E., Schnell, D.M., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A., Brecht, D.S. (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290:1364-1368.
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T.W., Südhof, T.C. (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277:1511-1515.
- Isaac, J.T., Nicoll, R.A., Malenka, R.C. (1995). Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15:427-434.
- Jaffrey, S., Snowman, A., Eliasson, M., Cohen, N., Snyder, S.H. (1998). CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interaction with PSD95. *Neuron* 20:115-124.
- Jo, S., Zhu, X., Marchionni, M., Burden, S. (1995). Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate Ach-receptor gene expression. *Nature* 373:158-161.
- Johnson, J.L., Waldman, S.K. (1989). Molybdenum cofactor deficiency. In: Inherited basis of metabolic disease (Stanbury, J.B. and Wyngaarden, J.B., Eds.). pp. 1463-1475. McGraw-Hill, New York.
- Keegan LP, Gallo A, O'Connell MA. (2001). The many roles of an RNA editor. *Nat. Rev. Genetics* 2:869-878.
- Kennedy, M.B. (1998). The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci.* 20:264-268.
- Kim E., Cho, K.O., Rothschild, A., Sheng, M. (1996). Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins.

Neuron 17:103-113.

Kim J.H., Liao, D., Lau, L.-F., Huganir, R.L. (1998). SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron* 20:683-691.

Kim, E., Cho, K.O., Rothschild, A. Sheng, M. (1996). Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn 110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron* 17:103-113.

Kins S., Betz H., Kirsch J. (2000). Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nature Neurosci.* 3:22-29.

Kirsch, J. (1999). Assembly of signalling machinery at the postsynaptic membrane. *Curr Opin. Neurobiol*

Kirsch, J., Betz, H. (1995). The postsynaptic localization of the glycine receptor associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J.Neurosci.* 15:4148-4156.

Kirsch, J., Betz, H. (1998). Glycine receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 392:717-720.

Kirsch, J., Kröger, S. (1996). Postsynaptic anchoring of receptors: A cellular approach to neuronal and muscular sensitivity. *Neuroscientist* 2:100-108.

Kirsch, J., Kuhse, J., Betz, H., (1995). Targeting of glycine receptor subunits to gephyrin rich domains in transfected human kidney cells. *Moll. Cell. Neurosci.* 6: 450-461.

Kirsch, J., Langosch, D., Prior, P., Littauer, U.Z., Schmitt, B., Betz, H. (1991). The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J. Biol. Chem.* 266:22242-22245.

Kirsch, J., Wolters, I., Triller, A., Betz, H. (1993). Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366:745-748.

Kisker, C., Schindelin, H., Pacheco, A., Wehbi, WA., Garrett, RM., Rajagopalan KV., Enemark, J.H., Rees, D.C. (1997). Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* 97:973-83.

- Kneussel, M und Betz, H. (2000). Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *TINS* 23:429-435.
- Kneussel, M., Brandstätter, J.H., Gasnier, B., Feng, G.P., Sanes, J.R., Betz, H. (2001). Gephyrin independent clustering of postsynaptic GABA_A-rezeptor subtypes. *Moll. Cell. Neurosci.* 17:9973-982.
- Kneussel, M., Brandstatter, J.H., Laube, B., Stahl, S., Muller, U., Betz, H. (1999) Loss of postsynaptic GABA_A receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J. Neurosci.* 19:9289-9297.
- Kneussel, M., Engelkamp, D., Betz, H. (2001). Distribution of transcripts for the brain-specific GDP/GTP exchange factor collybistin in the developing mouse brain.
- Kneussel, M., Haverkamp, S., Fuhrmann, J.C., Wang, H.B., Wassle, H., Olsen, R.W., Betz H. (2000). The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABA(A)R)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:8594-8599.
- Kneussel, M., Hermann, A., Kirsch, J., Betz, H. (1999). Hydrophobic interactions mediate binding of the glycine receptor β -subunit to gephyrin. *J. Neurochem.* 72:1323-1326.
- Koonce, M.P., Tikhonenko, I. (2000). Functional elements within the dynein microtubule-binding domain. *Molec. Biol. Cell* 11:523-529.
- Kornau, H.-C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., Seeburg, P.H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 296:1737-1740.
- Kuhse, J., Betz, H., Kirsch, J. (1995). The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5:318-323.
- Kuhse, J., Kuryatov, A., Maulet, Y., Malosio, M.-L., Schmieden, V., Betz, H. (1991). Alternative splicing generates two isoforms of the α 2 subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Let.* 283:73-77.

- Kuhse, J., Laube, B., Magalai, D., Betz, H. (1993). Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron* 11:1049-1056.
- Kuhse, J., Schmieden, V., Betz, H., (1990). Identification and functional expression of a novel ligand binding subunit of the inhibitory glycine receptor. *J. Biol. Chem.* 265:22317-1211.
- Kursula, P., Letho, V.-P., Heape, A.M. (2000). The small myelin-associated glycoprotein binds to tubulin and microtubules. *Mol. Brain Res.* 87:22-30-
- Langosch, D., Thomas, L., Betz, H. (1988). Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the glycine receptor pentamer. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85:7394-7398.
- Laurie, D.J., Wisden, W., Seeburg, P.H. (1992). The distribution of thirteen GABA_A receptor subunit mRNA in the rat brain. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.* 12:4151-4172.
- Lee, G., Neve, R.L. Kosik, K.S. (1989). The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2:1615-1624.
- Lee, S.H., Sheng, M. (2000). Development of neuron-neuron synapses. *Curr. Opinion Neurobiol.* 10:125-131.
- Legesse-Miller, A., Sagiv, Y., Glozman, R., Elazar, Z. (2000). Aut7p, a soluble autophagic factor, participates in multiple membrane traffic processes. *J. Biol. Chem.* 275:32966-32973.
- Lemke, D. (1996). Neuregulins in Development. *Mol. Cell. Neurosci.* 7:247-262.
- Leonard, A.S., Davare, M.A., Horne, M.C., Garner, C.C., Hell, J.W. (1998). SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. (1998). *J.Biol.Chem.* 273:19518-19524.
- Lévi, S., Vannier, C., Triller, A. (1998). Strychnine-sensitive stabilization of postsynaptic glycine receptor clusters. *J. Cell Sci.* 111:335-345.
- Levitan, I. (1999). It is calmodulin after all! Mediator of the calcium modulation of multiple ion channels. *Neuron* 22:645-48.

Lewis, S.A., Wan, D., Cowan, N.J. (1988). Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with Tau. *Science* 242: 936-939.

Liao, D., Hessler, N.A., Malinow, R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375:400-404.

Lin, J.W., Ju, W., Foster, K., Lee, S.H., Ahmadian, G., Wyszynski, M., Wang, Y.T., Sheng, M. (2000). Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalisation. *Nat. Neurosci.* 3:1282-1290.

Lin, W., Burgess, R.W., Dominguez, W., Pfaff, S.L., Sanes, J.R., Lee, K.-L. (2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410:1057-1063.

Lissin, D., Carroll, R., Nicoll, R., Malenka, R.C., Zastrow, M. (1999). Rapid activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19:1263-1272.

Lissin, D., Gomperts, S., Carroll, R., Christine, C., Kalman, D., Kitimura, M., Hardy, S., Nicoli, R., Malenka, R.C., Zastrow, M. (1998). Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7097-7102.

Liu, M.T.W., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V., Schindelin, H. (2000). Crystal structure of the gephyrin related molybdenum cofactor biosynthesis protein MogA from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275: 1814-1822.

Lüscher, C., Xia, H., Beattie, E.C., Carroll, R.C., von Zastrow, M., Malenka, R.C., Nicoll, R.A. (1999). Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* 24:649-658.

Maammar M. Rodeau JL. Taleb O. (1997). Permeation and gating of alpha glycine-gated channels expressed at low and high density in *Xenopus* oocyte. *FEBS Let.* 414:99-104.

Maimone, M.M., Enigk, R.E. (1999). The intracellular domain of the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit mediates its coclustering with rapsyn. *Moll. Cell. Neurosci.* 14:340-354.

- Malenka, R.C., Nicoll, R.A. (1999). Long-term potentiation - a decade of progression? *Science* 285:1870-1874.
- Malinow, R., Mainen, Z.F., Hayashi, Y. (2000). LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10:352-357.
- Maloisio, M., Marqueze-Pouey, B., Kuhse, J., Betz, H. (1991b). Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J.* 10:2401-2409.
- Maloisio, M.L., Grenningloh, G., Kuhse, J., Schmieden, V., Schmitt, B., Prior, P., Betz, H. (1991a). Alternative splicing generates two variants of the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor. *J. Biol. Chem.* 266:2048-2053.
- Mammoto, A., Sasaki, T., Asakura, T., Hotta, I., Imamura, H., Takahashi, K., Matsuura, Y., Shirao, T., Takai, Y. (1998). Interactions of debrin and gephyrin with profilin. *Bioch. Biophys. Res. Com.* 243:86-89,
- Matzenbach, B., Maulet, Y., Sefton, L., Courtier, B., Avner, P., Guénet, J.L., Betz, H. (1994). Structural analysis of mouse glycine receptor α subunit genes. Identification and chromosomal localization of a novel variant, $\alpha 4$. *J. Biol. Chem.* 269:2607-2612.
- Mayer, G., Kirsch, J., Betz, H., Langosch, D. (1995). Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor β subunit. *Neuron* 15:563-572.
- Mayer, G., Wallace, B.G. (1998). Recruitment of nicotinic acetylcholine receptor mutant lacking cytoplasmic tyrosine residues in its beta subunit into agrin induced aggregates. *Mol. Cell. Neurosci.* 11:324-333.
- McMahan, U.J. (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 55: 407-18; Zitiert nach Sanes und Lichtman, 1999.
- Meier, J., de Chaldee, M., Triller, A., Vannier, C. (2000). Functional heterogeneity of gephyrins. *Mol. Cell. Neurosci.* 16:566-577.
- Meier, J., Meunier-Durmort, C., Forest, C., Triller, A., Vannier, C. (2000). Formation of glycine receptor clusters and their accumulation at synapses. *J. Cell Sci.* 113:2783-2795.

Meier, J., Vannier, C., Serge, A., Triller, A., Choquet, D. (2001). Fast and reversible trapping of glycine receptors by gephyrin. *Nature Neurosci.* 4:253-260.

Melendres, C.S., Meizel, S. (1995). Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl⁻ channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Biol. of Reprod.* 53:676-83.

Merlie, J.P., Isenberg, K.E., Russel, S.D., Sanes, J.R. (1984). Denervation supersensitivity in skeletal muscle: analysis with a cloned cDNA probe. *J. Cell. Biol.* 99:332-335.

Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L.C., Watabe, A.M. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396:433-439.

Miller, S., Kennedy, M.B. (1985). Distinct forebrain and cerebellar isoenzymes of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase associate differentially with the postsynaptic membrane. *J. Biol. Chem.* 260:9039-9046.

Mochida, S., Orita, S., Sakaguchi, G., Sasaki, T., Takai, Y. (1998). Role of the Doc2 α -Munc13-1 interaction in the neurotransmitter release process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11418-11422.

Mohamad, A.S., Swope, S.L. (1999). Phosphorylation and cytoskeletal anchoring of the acetylcholine receptor by Src class protein-tyrosine kinases – Activation by rapsyn. *J. Biol. Chem.* 274:20529-20539.

Mohamed, A.S., Rivas-Plata, K.A., Kraas, J.R., Saleh, S.M., Swope, S.L. (2001). Src-class kinases act within the agrin/MuSK pathway to regulate acetylcholine receptor phosphorylation, cytoskeletal anchoring, and clustering. *J. Neurosci.* 21:3806-3818.

Montanaro F. Gee SH. Jacobson C. Lindenbaum MH. Froehner SC. Carbonetto S. Montanaro, F., Gee, S.H., Jacobson, C., Lindenbaum, M.H., Froehner, S.C., Carbonetto, S. (1998). Laminin and alpha-dystroglycan mediate acetylcholine receptor aggregation via a MuSK-independent pathway. *J. Neurosci.* 18:1250-1260

Morris, K., Wool, I.G. (1994). Analysis of the contribution of an amphiphilic α -helix to the structure and to the function of ricin A chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7530-7533.

- Moss, J.M., Smart, S.G. (2001). Constructing inhibitory synapses. *Nature Rev. Neurosci.* 2:240-247.
- Naisbit, S., Kim E., Tu, J.C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R.J., Worley, P.F., Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 21:87-97.
- Niethammer, M., Kim, E., Sheng, M. (1996). Interaction between the c-terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J.Neurosci.* 16:2157-2163.
- O'Brien, R., Kamboj, S., Ehlers, M.D., Rosen, K., Fischbach, G., Huganir, R.L. (1998). Activity dependent modulation of synaptic AMPA-Rezeptor accumulation. *Neuron* 21:1067-1078.
- O'Brien, R.J., Xu, D., Petralia, R.S., Steward, O., Huganir, R., Worley, P. (1999). Synaptic clustering of AMPA receptors by extracellular immediate early gene product Narp. *Neuron* 23:309-323.
- Pak, D.T.S., Yang, S.Y., Rudolph-Correia, S., Kim, E., Sheng, M. (2001). Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP. *Neuron.* 31:289-303.
- Parkhomovski, N., Kammesheidt, A., Martin, P.T. (2000) N-acetyllactosamine and the CT carbohydrate antigen mediate agrin-dependent activation of MuSK and acetylcholine receptor clusterind in skeletal muscle. *Molec. Cell. Neurosci.* 15:380-397.
- Pfeiffer, F., Betz, H. (1981). Solubilization of the glycine receptor from rat spinal chord. *Brain Res.* 225:273-279.
- Pfeiffer, F., Graham, D., Betz, H. (1982). Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J. Biol. Chem.* 257:9389-9393.
- Philips, W., Kopta, C., Blount, P., Gardner, P., Steinbach, J.H., Merlie, J.P. (1991). ACh receptor-rich membrane domains organized in fibroblasts by recombinant 43-kilodalton protein. *Science* 251:568-570.

Rabow, L.E., Russek, S.J., Farb, D.H. (1996). From ion currents to genomic analysis: Recent advances in GABA_A receptor research. *Synapse* 21:411-413

Rajagopalan, K.V., Johnson, J.L. (1992). The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* 267:10199-10202.

Ramming, M., Kins, S., Werner, N., Hermann, A., Betz, H., Kirsch, A. (2000). Diversity and phylogeny of gephyrin: tissue-specific splice variants, gene structure, and sequence similarities to molybdenum cofactor-synthesizing and cytoskeleton associated proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97:10266-10271.

Rao, A, Craig, A.M. (1997) Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron* 19:779-790.

Rao, A., Kim, E., Sheng, M., Craig, A.M. (1998). Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 18:1217-1299.

Reid, T., Bathoorn, A., Ahmadian, M.R., Collard, J.G. (1999). Identification and characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42. *J. Biol. Chem.* 274:33587-33593

Reid, T., Bathoorn, A., Ahmadian, M.R., Collard, J.G. (1999). Identification and characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42. *J. Biol. Chem.* 274:33587-33595.

Reiss J. (2000). Genetics of molybdenum cofactor deficiency *Human Genetics.* 106:157-163.

Reist, N.E., Werle, M.J., McMahan, U.J. (1992). Agrin released by motor neurons induces the aggregation of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. *Neuron* 8:865-68

Sabatini, D.M., Barrow, R.K., Blackshaw, S., Burnett, P.E., Lai, M.M., Field, M.E., Bahr, B.A., Kirsch, J., Betz, H., Snyder, S.H. (1999) Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science* 284:1161-1164

Sagiv, Y., Legesse-Miller, A., Porat, A., Elazar, Z. (2000). GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS 28. *EMBO J.* 19:1494-1504.

- Sanes, J.R. (1997). Genetic analysis of postsynaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 357:1-14.
- Sassoe-Pognetto, M., Fritschy, J.M. (2000). Mini-review: gephyrin, a major postsynaptic protein of GABAergic synapses *Eur. J. Neurosci.* 12:2205-2212.
- Sassoe-Pognetto, M., Fritschy, J.M., Wässle, H. (1995). Co-localization of gephyrin and GABAA receptor subunits in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 357:1-14-
- Sassoe-Pognetto, M., Panzanelli, P., Sieghart, W., Fritschy, J.M. (2000). Co-localization of multiple GABA_A receptor subtypes with gephyrin at postsynaptic sites. *J. Comp. Neurol.* 420:481-498.
- Sattler, R., Ziong, Z. Lu, W.-Y., Hafner, M., MacDonald, J.F., Tymianski, M. (1999). Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95. *Science* 284:1845-1848.
- Scheiffele, P., Fan, J., Chioh, J., Fetter, R., Serafini, T. (2000). Neuregulin expressed in noneuronal cells triggers presynaptic development of contacting axons. *Cell* 101:657-669.
- Schmieden, V., Grenningloh, Schofield, P.R., Betz, H. (1989). Functional expression in *Xenopus* oocytes of the strychnine binding 48 kDa subunit of the glycine receptor. *EMBO J.* 8:695-700.
- Schmitt, B., Knaus, P., Becker, C.M., Betz, H. (1987). The m₁ 93000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor is a peripheral membrane protein. *Biochemistry* 26:805-811.
- Schrag, J.D., Huang, W., Sivaraman, J., Smith, C., Plamondon, J., Larocque, R., Matte, A., Cygler, M. (2001). The crystal structure of Escherichia coli MoeA, a protein from the molybdopterin synthesis pathway. *J. Molec. Biol.* 310:419-431.
- Schwarz, G., Schrader, N., Mendel, R.R., Hecht, H.-J., Schindelin, H. (2001). Crystal structures of human gephyrin and plant Cnx1 G Domains: Comparative analysis and functional implications. *J. Molec. Biol.* 312:405-416.
- Segermann, B., Larsson, N., Holmfeldt, P., Gullberg, M. (2000). Mutational analysis of Op18/Stathmin-Tubulin-interacting surfaces. *J. Biol. Chem.* 46:35759-35766.

- Shi, S.-H., Hayashi, Y., Petralia, R.S., Zaman, S.H., Wenthold, R.J., Svoboda, K., Malinow, R. (1999). Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284:1811-1816.
- Shin, H., Hsueh, Y.P., Yang, F.C., Kim, E., Sheng, M. (2000). An intramolecular interaction between Src homology 3 domain and guanylate kinase-like domain required for channel clustering by postsynaptic density-95/SAP90. *J. Neurosci.* 20:3580-3587.
- Si, J., Luo, Z., Mei, L. (1996). Induction of acetylcholine receptor gene expression by ARIA requires activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271:19752-19759.
- Simon, A.M., Hoppe, P., Burden, S.J. (1992). Spatial restriction of AChR gene expression to subsynaptic nuclei. *Development* 114:545-553.
- Smith, C.L., Mittaud, P., Prescott, E.D., Fuhrer, C., Burden, S.J. (2001). Src, Fyn and Yes are not required for neuromuscular synapse formation but are necessary for stabilisation of agrin-induced clusters of acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* 21:33151-3160.
- Snyder S.H., Sabatini, D.M., Lai, M.M., Steiner, J.P., Hamilton, G.S., Suzdak, P.D. (1998) Neural actions of immunophilin ligands. *Trends Pharmacol.* 19:21-226.
- Sola, M., Kneussel, M., Heck, I.S., Betz, H., Weissenhorn, W. (2001). X-ray crystal structure of the trimeric n-terminal domain of gephyrin. *J. Biol. Chem.* 276:25294-25301.
- Srivastava, S., Osten, P., Vilim, F.S., Khatri, L., Inman, G., States, B., Daly, C., DeSouza, S., Abagyan, R., Valtschanoff, J.G., Weinberg, R.J., Ziff, E.B. (1998). Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding Protein ABP. *Neuron* 21:581-591.
- Stallmeyer, B., Schwarz, G., Schulze, J., Nerlich, A., Reiss, J., Kirsch, J., Mendel, R.R., (1999). The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells. *Proc Nat. Acad. Sci.* 96:1333-1338
- Sugiyama, J.E., Glass, D.J., Yancopoulos, G.D., Hall, Z.W. (1997) Laminin-induced acetylcholine receptor clustering – an alternative pathway. *J. Cell Biol.* 139:181-191.

Takeuchi, M., Hata, Y., Kirao, K., Toyoda, A., Irie, M., Takai, Y. (1997). SAPAPs. A family of PSD-95/SAP-90-associated proteins localized at postsynaptic density. *J. Biol. Chem.* 272:11943-11951.

Taleb, O., Betz, H., (1994). Expression of the human glycine receptor alpha 1 subunit in *Xenopus* oocytes: apparent affinities of agonists increase at high receptor density. *EMBO J.* 13:1318-1324.

Tansay, M., Chu, G., Mehrlie, J. (1996). ARIA/HRG regulates AChR epsilon subunit gene expression at the neuromuscular junction via activation of phosphatidylinositol-3-kinase and RAS/MAPK pathway. *J. Cell. Biol.* 134:465-476.

Tomita, S., Nicoll, R.A., Brecht, D.S. (2001). PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J. Cell. Biol.* 153:F19-F23.

Triller, A., Cluzaud, F., Korn, H. (1987). Gamma-aminobutyric acid-containing terminals can be apposed to glycine receptors at central synapses. *J. Cell. Biol.* 104, 947-956.

Triller, A., Cluzaud, F., Pfeiffer, F., Betz, H., Korn, H. (1985). Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study. *J. Cell Biol.* 101:683-688.

Tsim, K.W., Ruegg, M.A., Escher, G., Kröger, S., McMahan, U.J. (1992). A cDNA, that encodes active agrin. *Neuron* 8:677-689.

Walikonis, R.S., Jensen, O.N., Mann, M., Provance, D.W. Jr., Mercer, J.A., Kennedy, M.B. (2000). Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J. Neurosci.* 20:4069-4080.

Wallis, K.T., Azhar, S., Rho, M.B., Lewis, S.A., Cowan, N.J., Murphy, D.B. (1993). The mechanism of equilibrium binding of microtubule-associated protein 2 to microtubules. Binding is a multi-phasic process and exhibits positive cooperativity. *J. Biol. Chem.* 268:15158-15167.

Wang, Z.Z., Mathias, A., Gautam, M., Hall, Z.W. (1999). Metabolic stabilization of muscle nicotinic acetylcholine receptor by rapsin. *J. Neurosci.* 19:1998-2007.

- Watty, A., Neubauer, G., Dreger, M., Zimmer, M., Wilm, M., Burden, S.J. (2000). The in vitro and in vivo phosphotyrosine map of activated MuSK. *PNAS* 97:4585-4590
- Weston, C., Yee, B., Hod E., Prives, J. (2000). Agrin-induced acetylcholine receptor clustering is mediated by the small guanosine triphosphatases Rac and Cdc42. *J. Cell Biol.* 150:205-212.
- Wyszynski, M., Kharazia, V., Shangvi, R., Rao, A., Beggs, A.H., Sheng, M. (1998). Differential regional expression and ultrastructural localization of α -actinin-2, a putative NMDA receptor - anchoring protein, in rat brain. *J. Neurosci.* 18:1383-1392.
- Wyszynski, M., Lin, J., Rao, A., Nigh, E., Beggs, A.H., Sheng, M. (1987). Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 385:439-442.
- Xiang, S., Nichols, J., Rajagopalan, K.V., schindelin, H. (2001). The crystal structure of Escherichia coli MoeA and its relationship to the multifunctional protein gephyrin. *Structure* 9:299-310.
- Yakumi, Y., Ramirez-Leon, V., Laake, P., Rinvik, E., Ottersen, O.P. (1999). Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci.* 2:618-624.
- Yang, X., Li, W., Prescott, E.D., Burden, S.J., Wang, J.C. (2000). Patterning of the muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron* 30:399-410.

6. Zusammenfassung

An der chemischen Synapse des Nervensystems führt ein präsynaptisches Aktionspotential zur Freisetzung eines Neurotransmitters, der über den synaptischen Spalt diffundiert und an die Rezeptoren der postsynaptischen Membran bindet. Die ionotropen Rezeptoren sind an dieser Membran zu Clustern aggregiert. Entstehung und Dynamik dieser Rezeptoraggregate sind für Funktion und Plastizität der Synapse essentiell. Für die Aggregation der inhibitorischen Glyzin- und der meisten Subtypen der GABAA-Rezeptoren ist das periphere Membranprotein Gephyrin notwendig. Es ist ein Schlüsselfaktor für die Genese und Aufrechterhaltung der glyzinerger postsynaptischen Membran. Dabei bindet es direkt an den GlyR und verbindet diesen über die Bindung von Mikrotubulie an das Zytoskelett. Auch andere Bindungspartner wurden nachgewiesen.

Gephyrin ist in einer zweiten Funktion in die Synthese des Molybdän-Cofaktors involviert und weist Sequenzhomologien zu Proteinen anderer Spezies auf, die in diesen Syntheseweg eingebunden sind. Gephyrin ist ubiquitär exprimiert und wird alternativ gespleißt.

Möglicherweise existieren verschiedene Varianten mit unterschiedlichen Funktionen.

Die Untersuchung der Domänen und Bindungseigenschaften Gephyrins ist daher für das weitere Verständnis über Aufbau und Funktion der Synapse unerlässlich.

In dieser Arbeit wurde ein Testsystem etabliert, mit dem sowohl heterolog exprimiertes als auch natives Gephyrin über die hoch-affine Bindung an den GlyR aufgereinigt werden konnte. Mit diesem System konnten erstmals unterschiedliche Varianten Gephyrins nachgewiesen werden. In verschiedenen Organen der adulten Ratte wurden dabei Gephyrinmoleküle mit Molekulargewichten zwischen 52 und den bekannten 93 kDA identifiziert.

Auch Bestandteile des GlyR-Komplexes lassen sich mit dieser Methode anreichern. So wurde gezeigt, daß Gephyrin und Collybistin in einem trimeren Komplex mit dem GlyR vorliegen können. Hiermit ist es künftig möglich, in einem proteomischen Ansatz weitere aus dem GlyR-Komplex anzureichern und zu identifizieren.

Mit dem gleichen System wurde auch die Bindungsregion Gephyrins für den GlyR gefunden. Diese diskontinuierliche Bindungsstelle wird aus einer α -Helix der Aminosäuren 164 bis 184, sowie aus hydrophoben Resten gebildet, die von Aminosäure 15 bis 163 unregelmäßig über den gesamten N-Terminus Gephyrins verteilt sind. Zur Bindung an den GlyR werden beide Elemente benötigt. Das kleinste GlyR-bindende Gephyrinfragment erstreckt sich somit über die Aminosäuren 1-184.

Mit einem Kosedimentationsassay wurde die Bindung Gephyrins an Mikrotubuli untersucht. Es stellte sich heraus, daß die vermutete Bindungsstelle nicht zur Bindung an Mikrotubuli benötigt wird. Vielmehr ist der C-terminale Abschnitt Gephyrins hierzu ausreichend.

Um Regionen Gephyrins zu finden, die die Autoaggregation vermitteln, wurden Bindungsstudien mit dem Zwei-Hybrid-System und ein heterologes Expressionssystem in Zellkulturen durchgeführt. Es wurde gezeigt, daß sowohl die N- als auch der C-terminal gelegene Bereich in der Lage sind, mit Gephyrin zu aggregieren. Im C-Terminus wurde die Domäne auf 62 Aminosäuren eingegrenzt.

Zur Erfüllung der verschiedenen Funktionen Gephyrins sind die hierfür notwendigen Domänen offensichtlich in modularer Art organisiert. So lässt sich durch alternatives Spleißen eine Variante exprimieren, die den speziellen Erfordernissen der Zelle gerecht wird.

In dieser Arbeit wurden mehrere Domänen und Regionen Gephyrins eingegrenzt, deren Aufgaben von der GlyR-Bindung über die Autoaggregation zur Bildung glyzinerger Proteinkomplexe und der Verknüpfung mit dem Zytoskelett reichen. Somit konnte ein Beitrag zum weiteren Verständnis über die glyzinerge Synapse geleistet werden.

Verständnis über die glyzinerge Synapse geleistet werden.

7. Abkürzungen

As	Aminosäuren
A	Ampère
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonaltag
f.c.	Endkonzentration
Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
i.d.R.	In der Regel
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
kDa	Kilo-Dalton
lsg.	Lösung
μ	Mikro
m	Mili
M	Molar
mol	Mol
n	Nano
N	Normal
NTP	Nukleotidtriphosphate
p.A.	Pro Analysis
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
UE	Untereinheit
Vol./v	Volumen
w	Gewicht
z.B.	Zum Beispiel
V	Volt
wt	Wildtyp

Lebenslauf

Name Achim Hermann

Anschrift
geboren Ackerstr. 150, 40233 Düsseldorf
11. Februar 1969 in Stuttgart

Schulbesuch

1975 bis 1979 Grundschule Marbach am Neckar
1979 bis 1989 Friedrich-Schiller-Gymnasium Marbach am Neckar
4/89 Abitur

Studium

10/90 bis 5/97 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt
9/93 bis 8/94 Studium der Biochemie am University College London
2/96 bis 5/97 Diplomarbeit in der Abteilung *Immungenetik* des Deutschen
Krebsforschungszentrums Heidelberg. Leitung: Prof. Dr. Peter H.
Krammer
5/97 Abschluß als Diplom-Biologe

Promotion

9/97 bis 11/01 Anfertigung der Promotionsarbeit in der Abteilung *Neurochemie* des
Max-Planck-Instituts für Hirnforschung Frankfurt. Direktor: Prof. Dr.
Heinrich Betz.
4/98 bis 11/01 Stipendiat im Graduiertenkolleg *Neuronale Plastizität* der Johann
Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Beruf

seit 12/01 Laborleiter in der Abteilung CNS/Pain der Bayer AG in Wuppertal

Düsseldorf, im Oktober 2002

Publikationen

Hermann, A., Kneussel, M., Betz H. (2001).

Identification of multiple gephyrin variants in different organs of the adult rat. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 282:67-70

Grosskreuz, Y., Hermann, A., Kins, S., Fuhrmann, J.C., Betz, H., Kneussel M. (2001).

Identification of a gephyrin binding motif on the GDP/GTP exchange factor collybistin. *Biol. Chem.* 382:1455-62

Ramming, M., Kins, S., Werner, N., Hermann, A., Betz, H., Kirsch, J. (2000). Diversity and phylogeny of gephyrin: tissue specific splice variants, gene structure and sequence similarities to molybdenum cofactor-synthesizing and cytoskeleton-associated proteins. *PNAS* 97: 10266-71

Kneussel, M., Hermann, A., Kirsch, J., Betz, H. (1999).

Hydrophobic interactions mediate binding of the glycine receptor beta subunit to gephyrin. *J. Neurochem.* 72: 1323-6