

Die funktionelle Charakterisierung des Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptors (CAR) im zentralen Nervensystem

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Uta Wrackmeyer

aus Halle

2010

Die Arbeit wurde vom 02.01.2006 bis 19.11.2010 unter Anleitung von Prof. Dr. Gotthardt am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Gotthardt

Disputation am: 10.03.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	2
3 Einleitung	3
3.1 Das vertebrale Nervensystem.....	3
3.1.1 Die zellulären Komponenten des Nervensystems.....	3
3.1.2 Die Reizweiterleitung	4
3.1.3 Zell-Zellkommunikation an chemischen Synapsen	5
3.1.4 Die Synaptische Plastizität.....	9
3.2 Der Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR)	11
3.2.1 Das CAR-Gen und die CAR-Isoformen	11
3.2.2 Die Struktur des CAR-Proteins.....	12
3.2.3 Die Expression von CAR und dessen Regulation.....	14
3.2.4 CAR, ein Adhäsionsprotein und seine Interaktionspartner.....	15
3.2.5 Erkenntnisse aus CAR-Knockout-Modellen.....	17
3.2.6 CAR im zentralen Nervensystem.....	18
3.3 Zielstellung der Arbeit	20
4 Material und Methoden	21
4.1 Material	21
4.1.1 Geräte.....	21
4.1.2 Chemikalien	22
4.1.3 Farbstoffe	23
4.1.4 Enzyme	23
4.1.5 Antikörper	23
4.1.6 Oligonukleotide.....	25
4.1.7 Vektoren.....	26
4.2 Methoden.....	26

4.2.1	Tierexperimentelle Praxis	26
4.2.2	Präparation von Organen	27
4.2.3	Nukleinsäureanalytik	27
4.2.4	Proteinchemie	34
4.2.5	Histologie	38
4.2.6	Neuronale Zellkultur Experimente	40
4.2.7	Elektrophysiologie an Gehirnschnitten	45
4.2.8	Verhaltensanalysen	45
4.2.9	Statistik	48
5	Ergebnisse	49
5.1	Generierung gehirnspezifischer CAR-Knockout-Modelle.....	49
5.2	Verifizierung der CAR-Knockout-Modelle	50
5.3	Unauffällige morphologische Entwicklung in CAR-defizienten Tieren.....	53
5.4	CAR kolokalisiert mit Proteinen der Prä- und Postsynapse.....	56
5.5	CAR-Defizienz führt zu erhöhter synaptischer Transmission	58
5.6	CAR-Knockout-Neurone zeigen Veränderungen in der Präsynapse	60
5.7	Veränderte postsynaptische Potenzierung in CAR-defizienten Tieren.....	61
5.8	CAR-Knockout-Tiere zeigen normales Lernverhalten	63
5.9	Veränderte Gen-Expression in CAR-Knockout-Tieren	66
5.10	Erhöhte Synaptotagmin 2 und PROT-Expression in CAR-defizienten Tieren.....	68
5.11	Synaptotagmin 1-Expression ist in CAR-Knockout-Tieren unverändert	71
5.12	Identifizierung neuronaler CAR-Interaktionspartner	72
6	Diskussion.....	77
6.1	Nex- und CamKII α -Cre führen zu unterschiedlicher neuronaler CAR-Deletion.....	78
6.2	Die Gehirnstruktur ist in CAR-Knockout-Tieren unverändert	80
6.3	CAR beeinflusst die basale synaptische Transmission	81
6.4	CAR als Mediator bei der Exozytose von Vesikeln.....	82

6.5	CAR beeinflusst hippocampale Langzeit-Potenzierung	86
6.6	Veränderte Synaptotagmin 2 Expression in CAR-Knockout-Tieren	88
7	Ausblick	95
8	Anhang	97
9	Literaturverzeichnis	103
	Wissenschaftlicher Werdegang	125
	Danksagung	127

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APV	(2R)-amino-5-phosphonovalersäure
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CBB	Colloidal Coomassie
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[3-(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CTX	<i>Cortical Thymocytes in Xenopus</i>
CVB3	Coxsackievirustyp B3
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DOC	Dodecyloxycholol
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaler Tag <i>post coitum</i>
ECL	verstärkte Chemilumineszenzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylen-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
FUDR	5-fluoro-2'-desoxyuridin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IVC	individuell belüftete Käfige
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
Ktr	Kontrolle
LB	Luria-Bertani Medium
LTP	Langzeit-Potenzierung
min	Minute
mg	Milligramm
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
Mw	Molekulargewicht
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP-40	Nonylphenyl-polyethylenglykol
OD	optische Dichte
P	postnataler Tag
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion

PDZ	PSD-95/DlgA/ZO-1
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNase	Ribonuclease
PNS	Peripheres Nervensystem
qRT-PCR	quantitative <i>Reverse-Transcriptase</i> -PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRP	<i>Readily Releasable Pool</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyoxymethylenether
U	unit
ÜN	über Nacht
WB	Wasserbad
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Der Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR) ist ein Zelladhäsionsprotein und wurde ursprünglich als Rezeptor für humanpathogene Viren, wie CVB3, identifiziert. Seine physiologische Funktion, insbesondere im ZNS, ist weitgehend unbekannt, aber die hohe pränatale Expression von CAR im Herzen und im Gehirn sprechen für eine Rolle von CAR in der Embryonalentwicklung. In den vergangenen Jahren wurde die Funktion von CAR vorwiegend im Herzen untersucht. So führte die CAR-Defizienz in Mäusen zu Fehlbildungen des Herzmuskels und Einblutung mit embryonaler Letalität. Induzierbare herzspezifische CAR-Knockout-Mäuse (KO) waren lebensfähig und äußerlich unauffällig, zeigten aber eine gestörte elektrische Reizweiterleitung im Herzen. Dies war mit veränderter Kommunikation zwischen benachbarten Zellen durch die Deregulation von Connexinen assoziiert. CAR ist somit nicht nur essentiell für die embryonale Herzentwicklung, sondern auch für die adulte Herzfunktion.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von CAR im zentralen Nervensystem (ZNS) unter Verwendung konditioneller CAR-Knockout-Modelle. Durch das Cre/lox-Rekombinationssystem und neuronaler Expression der Cre-Rekombinase wurde CAR während der Embryonalentwicklung im Riechhirn, Kortex und Hippokampus deletiert (Nex-Cre) bzw. nahezu ubiquitär im gesamten ZNS (CamKII α -Cre). Die KO-Tiere beider Stämme waren äußerlich unauffällig. Der CamKII α -CAR-KO zeigte eine erhöhte hippocampale Reizübertragung nach Applikation unterschiedlicher Reizstärken in den Schaffer-Kollateralen. Zusammen mit der höheren postsynaptischen Antwort auf repetitive 10 Hz Stimulierung und der erhöhten Langzeit-Potenzierung (LTP) im Knockout deutet dies auf eine Funktion von CAR in der synaptischen Reizweiterleitung hin. Eine Auswirkung der elektrophysiologischen Veränderungen auf räumliches oder assoziatives Lernverhalten der Mäuse wurde nicht beobachtet. Auf zellulärer Ebene führte die Deletion von CAR zu einer veränderten Kinetik der Exozytose synaptischer Vesikel. In diesen Prozess sind mehrere Proteine involviert, darunter Synaptotagmin 2, das im CAR-KO verstärkt exprimiert wurde und Snapin, welches als potentieller CAR-Interaktionspartner identifiziert wurde. Diese Ergebnisse weisen auf eine Rolle von CAR in der synaptischen Reizweiterleitung durch Beeinflussung präsynaptischer Prozesse hin, die CAR unter anderem zu einem therapeutischen Target für neurologische Erkrankungen mit veränderter Reizübertragung macht.

2 Summary

The coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) is a cell adhesion protein and was originally identified as a virus-receptor for human pathogens such as CVB3. Its physiological function – in particular in the brain – is still largely unknown. Nevertheless, the elevated prenatal expression of CAR in heart and brain implicates a function of CAR in embryonic development. During the last years the function of CAR was primarily studied in the heart. In mice with CAR deficiency hearts were malformed and cardiac bleeding led to early embryonic lethality. Inducible heart specific CAR knockout mice (KO) were viable and appeared normal, but showed an impaired electrical conduction in the heart. This phenotype was associated with changes of gap-junctions - specialized cell-cell contacts formed by Connexins. The prior art therefore suggests that CAR is relevant for cardiac development and function.

Aim of this study was the functional characterization of CAR in the central nervous system (CNS) using conditional CAR KO models. The Cre/lox-recombination-system and neuronal expression of the Cre-recombinase were utilized to delete CAR in the olfactory bulb, cortex and hippocampus during embryonic development (Nes-Cre) or throughout the brain shortly after birth (CamKII α -Cre). The KO animals derived from both strains were viable and appeared normal. Synaptic signal transduction in the Schaffer collateral in CamKII α CAR KO mice was increased after electrical stimulation at different intensities. Together with a higher postsynaptic response to repetitive 10 Hz stimulation and increased long-term potentiation (LTP) in the KO these data suggest a function of CAR in synaptic signal transmission. An effect of the electrophysiological changes on spatial or associative learning was not observed. On the cellular level CAR deletion altered the kinetics of exocytosis of synaptic vesicles. Multiple proteins are related to this process such as synaptotagmin 2 which is up regulated in CamKII α CAR KO mice and snapin which was isolated as a potential CAR interaction partner. These results point towards a role of CAR in the presynaptic aspect of neuronal signal transduction which makes CAR a relevant therapeutic target for neurological diseases with impaired signal transduction.

3 Einleitung

3.1 Das vertebrale Nervensystem

Das vertebrale Nervensystem ist die Gesamtheit des vertebralen Nervengewebes. Es dient der Aufnahme, der Weiterleitung und der Verarbeitung elektrischer Reize. Hinsichtlich seiner Lage wird das Nervensystem in das zentrale (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS) eingeteilt. Das ZNS wird durch das Gehirn und das Rückenmark gebildet. Das PNS umfasst die Hirnnerven, die Rückenmarksnerven und die peripheren Ganglien. Bezogen auf seine Funktionalität erfolgt die Einteilung des Nervensystems in das animale und vegetative Nervensystem. Das animale Nervensystem gehorcht dem Willen während das vegetative autonom funktioniert (Schmidt et al., 2004).

3.1.1 Die zellulären Komponenten des Nervensystems

Die zellulären Bestandteile des Nervensystems werden in die beiden Hauptgruppen Nervenzellen (Neurone) und Gliazellen unterteilt. Nervenzellen sind hochspezialisierte Zellen, die der interzellulären Reizweiterleitung dienen. Sie besitzen einen Zellkörper, das Soma, von dem im Allgemeinen ein bis mehrere Fortsätze, die Dendriten, und ein Axon ausgehen. Die Nervenzellen kommunizieren über Synapsen miteinander. Das Aussehen der Nervenzellen ist stark variabel. Entsprechend der Anzahl an Fortsätzen werden die Neurone in multipolare, bipolare, pseudounipolare oder unipolare Nervenzellen unterteilt.

Die Gliazellen sind die Stütz- und Versorgungszellen des Nervensystems. Sie besitzen einen Zellkörper mit vielen Fortsätzen. Im ZNS werden sie in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia unterteilt. Die Astrozyten sorgen im Besonderen für die Aufrechterhaltung des extrazellulären chemischen Milieus sowie für eine funktionierende interneuronale Signalübertragung und sind Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke (Purves et al., 2007). Die Oligodendrozyten bilden die Myelinscheide um Axone von Nervenzellen, indem sich ihre Ausläufer mehrfach um diese speziellen Fortsätze winden. Die Myelinscheide ermöglicht eine schnellere Reizweiterleitung entlang der Axone (Vernadakis, 1988). Im PNS wird diese Funktion durch Schwannzellen übernommen.

Die Mikrogliazellen sind die „Makrophagen“ des Nervensystems, da sie Zellreste beseitigen und in Entzündungsvorgängen involviert sind (Schmidt et al., 2004).

3.1.2 Die Reizweiterleitung

Das menschliche Gehirn beinhaltet circa 100 Milliarden Nervenzellen, wobei jede einzelne dieser Nervenzellen mehr als 1000 Synapsen bildet (Drachman, 2005; Williams and Herrup, 1988). Es gibt verschiedene Formen von synaptischen Verbindungen im ZNS. Synapsen entstehen zwischen einem Axon und einem Dendrit (axodentritisch), einem Axon und dem Soma einer Nervenzelle (axosomatisch) und zwischen zwei Axonen (axoaxonisch). Über die Synapsen erfolgt die Informationsweitergabe zwischen Neuronen.

Innerhalb einer Nervenzelle erfolgt die Reizweiterleitung durch lokale Depolarisierung der Zellmembran. Zellen haben in Ruhe (ohne Stimulation) ein Ruhemembranpotential. Dieses variiert je nach Zelltyp. Bei Neuronen liegt das Ruhemembranpotential bei circa -70 mV. Es wird verursacht durch einen Ionengradienten an der Zellmembran und der selektiven Membranpermeabilität für bestimmte Ionen. Extrazellulär ist die Konzentration von Natrium-, Kalzium- und Chloridionen hoch, und die Kaliumkonzentration gering, während dies intrazellulär umgekehrt ist. Im Ruhezustand sind Kaliumkanäle geöffnet und ermöglichen den Fluss von Kaliumionen durch die Membran. Natriumkanäle sind in dieser Zeit geschlossen. Das Ruhemembranpotential wird durch die Durchlässigkeit der Membran für Kaliumionen bestimmt. Aktiver Transport der Ionen durch Natrium-Kalium-Pumpen entgegen ihres elektrischen Gradienten halten das Membranpotential aufrecht (Hodgin and Horowicz, 1959; Hodgin and Katz, 1949).

Durch einen elektrischen Reiz öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle und ermöglichen den Eintritt von Natriumionen in die Zelle (Abb. 1). Das Membranpotential wird positiver, die Zelle wird depolarisiert und weitere spannungsabhängige Natriumkanäle werden geöffnet. Überschreitet das Membranpotential einen Schwellenwert, wird ein Aktionspotential ausgelöst. Spannungsabhängige Kaliumkanäle öffnen sich und ermöglichen den Austritt von Kaliumionen aus der Zelle. Mit dem Erreichen des Depolarisationsmaximums schließen sich die spannungsabhängigen Natriumkanäle und werden refraktär. Sie können für eine kurze Zeit nicht wieder aktiviert werden. Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind weiterhin geöffnet und führen somit zur Repolarisation der Zellmembran. Da die Kaliumpermeabilität durch die zusätzlich geöffneten spannungsabhängigen Kaliumkanäle höher ist als beim Ruhemembranpotential, kommt es zur Hyperpolarisierung der Membran. Diese hat das Schließen der spannungsabhängigen Kaliumkanäle zur Folge und führt zur Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials (Hodgin et al., 1959; Barnett and Larkman, 2007).

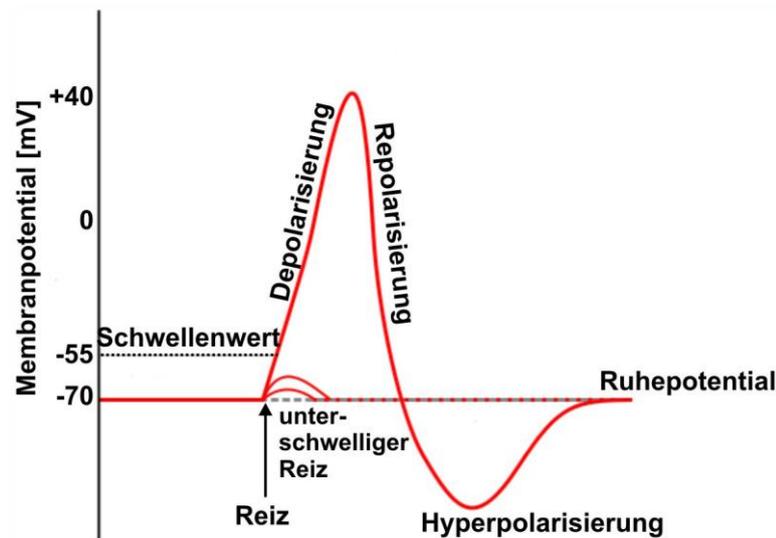


Abb. 1: Aktionspotential. Im Ruhezustand haben Nervenzellen ein Ruhemembranpotential um -70 mV. Durch einen Reiz kommt es durch Öffnung von spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanälen zur Depolarisierung der Membran. Während der maximalen Depolarisierung schließen sich Natriumkanäle. Die Membran repolarisiert. Durch das hohe Ausströmen von Kaliumionen hyperpolarisiert die Membran, spannungsabhängige Kaliumkanäle schließen sich und das Ruhemembranpotential stellt sich wieder ein. (nach Barnett et al., 2007).

Die lokale Depolarisierung der Membran während eines Aktionspotentials aktiviert benachbarte Natriumkanäle und bewirkt dadurch die Weiterleitung des Aktionspotentials. Da an einem Aktionspotential beteiligte spannungsabhängige Natriumkanäle nach der Depolarisierung refraktär sind, breitet sich das Aktionspotential nur in eine Richtung aus. In myelinisierten Axonen wird das Aktionspotential schneller weitergeleitet als an nicht-myelinisierten Axonen, da sich Ionenkanäle nur in den Ranvierschen-Schnürringen befinden. An diesen Schnürringen ist die Myelinschicht unterbrochen. Die Reizleitung erfolgt demnach springend (saltatorisch) bis zu den Endpunkten, den Synapsen.

3.1.3 Zell-Zellkommunikation an chemischen Synapsen

Synapsen werden in zwei Gruppen unterteilt, in elektrische und in chemische Synapsen. Bei elektrischen Synapsen sind die beiden beteiligten Zellen über *Gap Junctions* miteinander verbunden. Diese werden durch Kanalproteine, den Connexinen, gebildet. Durch diese fließen Ionen und somit elektrische Ladung direkt von einer Zelle zur Nachbarzelle (Peters, 2006). Elektrische Synapsen sind nur in geringem Maße im ZNS vorhanden. Den überwiegenden Anteil bilden die chemischen Synapsen (Connors and Long, 2004). Hier werden elektrische

Signale in Form von Neurotransmittern von der Präsynapse über den synaptischen Spalt an die postsynaptische Zelle weitergeleitet.

3.1.3.1 Neurotransmitter und ihre Rezeptoren

Neurotransmitter sind chemische Signalstoffe. Je nach ihrer molekularen Größe werden sie in Neuropeptide oder niedermolekulare Transmitter unterschieden. Zu den niedermolekularen Neurotransmittern gehören Acetylcholin, die Aminosäuren Glutamat, Aspartat, γ -Aminobutyrinsäure (GABA) und Glyzin sowie verschiedenen biogene Amine und Purine. In Abhängigkeit ihrer Rezeptoren bewirken die Neurotransmitter eine Hyperpolarisierung der postsynaptischen Membran (inhibitorische Wirkung) oder dessen Depolarisierung (exzitatorisch Wirkung) (Sheng and Kim, 2002; Purves et al., 2007). Glutamat ist einer der am häufigsten vorkommenden Neurotransmitter und wirkt vorwiegend exzitatorisch. Es gibt mehrere Glutamat-Rezeptoren, drei von ihnen sind ionotropisch (NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren). Ionotropische Rezeptoren sind nach der Bindung von Transmittern durchlässig für Ionen. NMDA- und AMPA-Rezeptoren sind nicht-selektive Kationenkanäle. Ihre Namen beruhen auf ihrer selektiven Aktivierbarkeit durch die entsprechenden Antagonisten α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure (AMPA) und N-Methyl D-Aspartat (NMDA). GABA und Glyzin wirken vorwiegend inhibitorisch. Die Aktivierung von GABA oder Glyzin-Rezeptoren erhöht die Membranpermeabilität für Chloridionen. Zwei der GABA-Rezeptoren sind ionotropisch, einer metabotropisch. Metabotropische Rezeptoren sind nicht durchlässig für Ionen, beeinflussen aber die Aktivität anderer Ionenkanäle durch chemische Botenstoffe (Emson, 2007).

3.1.3.2 Der Vesikelkreislauf

Die Neuropeptide werden im Soma der Nervenzellen synthetisiert und gelangen von dort in Vesikeln über das Axon zu den Präsynapsen. Die Synthese der niedermolekularen Neurotransmitter GABA, Glyzin, Glutamat und Aspartat erfolgt in der Präsynapse aus ihren chemischen Vorläufern. Durch Protonenpumpen in der Vesikelmembran wird ein elektrochemischer Gradient erzeugt, der die Neurotransmitteraufnahme in die Vesikel antreibt (Fykse and Fonnum, 1996). Transporter sorgen für die Beladung der Vesikel mit den entsprechenden niedermolekularen Neurotransmittern (Fremeau et al., 2002; Alfonso et al., 1993; Sagné et al., 1997). Hippokampale Synapsen enthalten circa 200 Vesikel. Davon wird

jedoch nur ein Bruchteil exozytiert. Entsprechend ihrer Beteiligung an Endo- und Exozytoseprozessen werden die Vesikel in verschiedene *Pools* unterteilt. Vesikel, die nach Ankunft eines Reizes sofort exozytiert werden, gehören zu dem *Readily-Releasable-Pool* (RRP) (Dobrunz and Stevens, 1997). Wird die Zelle intensiv stimuliert, so werden zusätzlich Vesikel aus dem sogenannten *Reserve-Pool* an die aktive Zone rekrutiert und exozytiert. Die aktive Zone ist der präsynaptische Membranabschnitt gegenüber der postsynaptischen elektronendichten Membran. Beide Membranabschnitte begrenzen den synaptischen Spalt. Der RRP und der *Reserve-Pool* bilden den *Recycling-Pool* (Murthy and Stevens, 1999; Schikorski and Stevens, 1997). Die Mehrheit der Vesikel gehören zum *Resting-Pool* und sind im Allgemeinen nicht an Endo- und Exozytoseprozessen beteiligt, können aber unter bestimmten experimentellen Bedingungen zur Exozytose stimuliert werden (Ceccarelli and Hurlbut, 1980; Südhof, 2000). In Abbildung 2 ist die Exo- und Endozytose von Vesikeln schematisch dargestellt (Vesikelkreislauf).

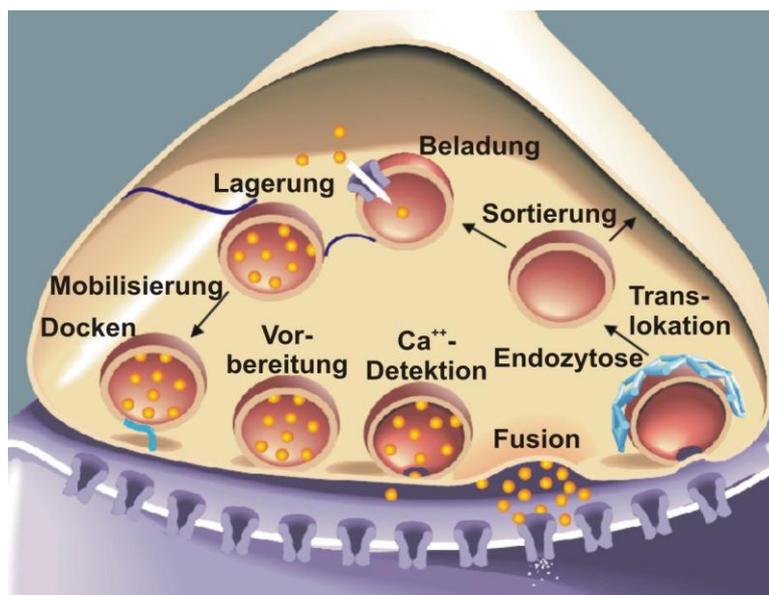


Abb. 2: Transmitterfreisetzung. Die Vesikel werden über Transporter mit Neurotransmittern beladen. Ein Teil der Vesikel lagert sich an der präsynaptischen Membran entlang des synaptischen Spalts an und werden durch molekulare Interaktionen auf die Fusion mit der Zellmembran vorbereitet. Nach Ankunft eines Aktionspotentials öffnen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle. Proteine in der Vesikelmembran binden eintretende Kalziumionen. Die Vesikel fusionieren mit der Membran und die Neurotransmitter werden in den synaptischen Spalt abgegeben. Neue Vesikel werden über Endozytose aufgenommen und recycelt. (nach Richmond, 2006).

Nach der Beladung sind die Vesikel des RRP an der aktiven Zone der Präsynapse angelagert. Durch die Interaktion von Vesikelproteinen und Membranproteinen der aktiven Zone werden die Vesikel näher an die Membran herangezogen. Bei Ankunft eines Aktionspotentials an die Präsynapse öffnen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle und die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigt. Spezielle Proteine in der Vesikelmembran wirken als Kalziumsensoren. Sie binden Kalziumionen und Phospholipide und tragen zur schnellen synchronen Fusion der Vesikel mit der Zellmembran bei (Richmond, 2006). Zeitlich verzögert ist ebenfalls eine asynchrone Membranfusion möglich (Pang and Südhof, 2010; Rizo and Rosenmund, 2008). Bei der Fusion der Vesikel mit der Zellmembran werden die Transmitter in den synaptischen Spalt entlassen und binden an ihre Rezeptoren in der Postsynapse.

Die Neubildung der Vesikel erfolgt über verschiedene Wege. In der Literatur werden Endozytose-Modelle wie „*Kiss-and-Stay*“ bzw. „*Kiss-and-Run*“ als Alternative zu der Clathrin-vermittelten Vesikelendozytose diskutiert. Es wird vermutet, dass einige Vesikel nur eine Fusionspore bilden ohne vollständig mit der Membran zu verschmelzen und somit nicht mit Hilfe von Clathrinen endozytiert werden. Einige Vesikel werden nach vollständiger Verschmelzung mit der Membran möglicherweise ohne Mitwirken von Clathrinen endozytiert und mit Transmittern beladen (Südhof, 2004; Stevens and Williams, 2000; Rizzoli and Jahn, 2007).

Vorwiegend erfolgt die Vesikelendozytose jedoch mit Hilfe der Clathrine (Dittman and Ryan, 2009; Smith et al., 2008; Südhof, 2004; Granseth et al., 2006; Jung and Haucke, 2007). Clathrin-Moleküle lagern sich durch Wechselwirkung mit Adapterproteinen an die intrazelluläre Seite der präsynaptischen Membran an. Es folgt die Wölbung der Membran nach innen und das Abschnüren des Vesikels von der aktiven Zone. Nach der Endozytose der Vesikel wird der Clathrin-Proteinkomplex von der Vesikeloberfläche entfernt und die Vesikel stehen entweder direkt dem Vesikel-Kreislauf zur Verfügung oder werden von endosomalen Intermediaten regeneriert (Koenig and Ikeda, 1996; Sweitzer and Hinshaw, 1998; Rizzoli et al., 2007).

Die bei der Vesikel-Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzten Transmitter binden an ihre Rezeptoren auf der postsynaptischen Seite. Dies führt zum Öffnen oder Schließen von Ionenkanälen und zum veränderten Ionenaustausch über die Zellmembran. Die Summe der im Soma ankommenden Signale entscheidet über das resultierende exzitatorische bzw. inhibitorische postsynaptische Membranpotential (EPSP/IPSP) und die Auslösung eines

Aktionspotentials in dieser Zelle (Purves et al., 2007). Abbaue Enzyme, die Rückaufnahme von Transmittern in die Präsynapse oder umliegende Gliazellen führen zur Entfernung der Transmitter aus dem synaptischen Spalt.

3.1.4 Die Synaptische Plastizität

Synapsen haben die Fähigkeit sich zu verändern, sie sind plastisch. Bereits 1949 vermutete Hebb, dass Synapsen nicht statisch sind und formulierte das Hebb'sche Gesetz: „Wenn das Axon einer Zelle A . . . eine Zelle B erregt und dies wiederholt oder andauernd tut, so kommt es zu Wachstums- oder metabolischen Veränderungen in einer der beiden Zellen oder in beiden. Somit erhöht sich die Effizienz in der Signalübertragung von A zu B.“ (Hebb and Hebb, 2002). Dies konnte in den Folgejahren experimentell bestätigt werden (Carew et al., 1984; Garthe et al., 2009; Morris, 1989). Bleibt die erhöhte Kommunikationseffizienz zwischen den Synapsen für längere Zeit bestehen, so spricht man von Langzeit-Potenzierung (LTP). LTP kann in verschiedenen Gehirnarealen, wie zum Beispiel im Hippokampus, durch hochfrequente Stimulierung induziert werden. Die Signalweiterleitung erfolgt in dieser Gehirnregion vorwiegend über den trisynaptischen Kreislauf (Abb.3B). In den Schaffer-Kollateralen, Axone die von der *Cornu ammonis* 3-Region (CA3) zur CA1-Region des Hippokampus verlaufen, ist die Induktion von LTP von der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren abhängig (MacDonald et al., 2006; Neves et al., 2008).

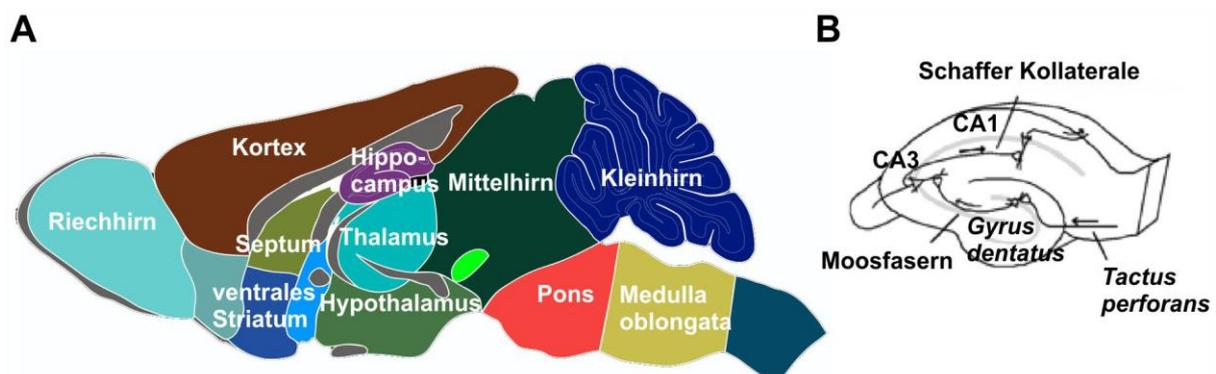


Abb. 3: Das Mausgehirn. (A) Schematische sagittale Ansicht des Mausgehirns. (B) Vergrößerung des murinen Hippokampus und des trisynaptischen Schaltkreises. Axone des *Tactus perforans* projizieren auf Körnerzellen des *Gyrus dentatus*. Dessen Axone, die Moosfasern, leiten das Signal an Neurone der CA3-Region weiter. Deren Axone bilden die Schaffer Kollaterale, die auf Neurone der CA1-Region projizieren (nach Dong and Science, 2008 und Neves et al., 2008).

Im Hippokampus erfolgt die Reizweiterleitung an chemischen Synapsen vorwiegend durch den Transmitter Glutamat. Dieser bindet an postsynaptische Glutamat-Rezeptoren, wie AMPA- und NMDA-Rezeptoren. Die Depolarisierung der Membran erfolgt hauptsächlich durch die Aktivierung der AMPA-Rezeptoren, da NMDA-Rezeptoren durch Magnesiumionen blockiert sind (Collingridge et al., 1992). Eine hochfrequente Stimulierung hippokampaler Neurone, wie bei der Induktion von LTP, führt zu einer verlängerten Depolarisierung der postsynaptischen Membran durch Aufsummierung der EPSP und zur Freisetzung des Magnesiums von den NMDA-Rezeptoren. Durch die Pore der NMDA-Rezeptoren fließen daraufhin Kalzium- und weitere Kationen in die postsynaptische Zelle. Die Kalziumionen binden an Kalzium-abhängige Proteinkinasen, wie die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CamKII) und Proteinkinase C (PKC) (Sweatt, 1999). Nach Aktivierung von CamKII durch Kalzium bindet diese an den zytoplasmatischen Teil des NMDA-Rezeptors. Dies verhindert die Inaktivierung der Proteinkinase (Bayer et al., 2001). Die Aktivität der Kalzium-abhängigen Proteinkinasen erhöht die Durchlässigkeit der membranständigen AMPA-Rezeptoren durch deren Phosphorylierung und den Einbau weiterer AMPA-Rezeptoren in die Membran (Malenka and Bear, 2004). Neben CamKII und PKC werden eine Reihe weiterer Proteine oder Proteingruppen aktiviert, wie Ras-Mitogen-aktivierte Kinasen (MAPK) und Phosphoinositol-3-Kinasen (PI3K) (Sheng et al., 2002). Die daraus folgende Neusynthese von mRNA und Proteinen verursacht Veränderungen in der Prä- und Postsynapse. Es kommt zur Erhöhung der Vesikelanzahl, Vergrößerung der postsynaptischen Oberfläche und Bildung neuer Synapsen (Edwards, 1995; Desmond and Levy, 1988). Diese Veränderungen führen zu einer effizienteren Zell-Zellkommunikation an den Synapsen (Lynch, 2004).

3.2 Der Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR)

Adenoviren und Coxsackieviren sind Pathogene für unterschiedliche Organismen. Im Menschen verursachen sie Erkrankungen der Atemwege, der Verdauungsorgane, des Herzens oder der Gehirnhaut (Raschperger et al., 2006; Kallewaard et al., 2009; Pinkert et al., 2009; Lu et al., 2005). Zwei Arbeitsgruppen konnten 1997 unabhängig voneinander den gemeinsamen Rezeptor für Coxsackie- und Adenoviren identifizieren, welcher entsprechend Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR) genannt wurde (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997).

3.2.1 Das CAR-Gen und die CAR-Isoformen

CAR ist hoch konserviert und wurde unter anderem im Zebrafisch, in der Maus und im Menschen nachgewiesen (Petrella et al., 2002; Bergelson et al., 1997). In der Maus befindet sich das CAR-Gen auf Chromosom 16 und im Menschen auf Chromosom 21 (Bowles et al., 1999; Chen et al., 2003). In beiden Organismen besteht das CAR-Gen aus 8 Exons (Bergelson et al., 1998; Excoffon et al., 2010). Alternatives Spleißen der mRNA führt zu unterschiedlichen CAR-Isoformen. Im murinen und im humanen Organismus sind zwei membranständige Isoformen sowie drei lösliche Varianten isoliert worden (Thoelen et al., 2001; Chen et al., 2003; Dorner et al., 2004). Chen *et al.* beschreiben eine theoretische dritte membranständige CAR-Isoform. Diese wurde bei Sequenzanalysen der Intron-Exon Übergänge des Mausgens gefunden, aber noch nicht experimentell nachgewiesen (Chen et al., 2003).

Exon 1-6 kodieren den extrazellulären N-terminalen Bereich des CAR-Proteins. Das Signalpeptid zur Lokalisierung von CAR in der Membran bzw. zur Sekretion wird durch das 1. Exon kodiert. Im sechsten Exon ist die Sequenz für die Transmembranregion enthalten. Exon 7 und 8 kodieren den zytoplasmatischen C-terminalen Abschnitt des CAR-Proteins. Wie Abbildung 4 verdeutlicht, stimmen die membranständigen Isoformen im extrazellulären Bereich überein. Sie variieren jedoch in ihrer zytoplasmatischen Sequenz auf Grund der alternativen Spleißvorgänge.

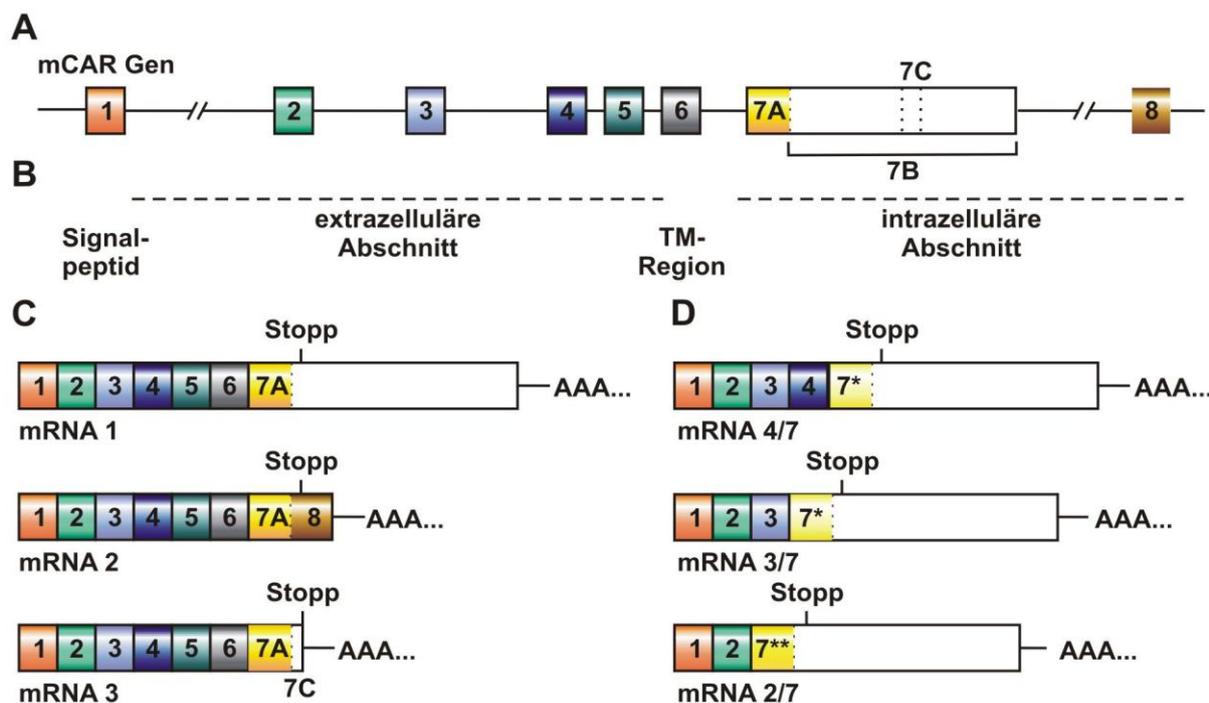


Abb. 4: CAR-Genstruktur und CAR-Spleißvarianten. (A) Das CAR-Gen besteht aus 8 Exons. (B) Exon 1 bis 6 kodieren den extrazellulären Abschnitt des CAR-Proteins. Das Signalpeptid wird im 1. Exon kodiert und die Transmembranregion (TM-Region) im 6. Exon. Exon 7 und 8 enthalten die Sequenz für den C-terminalen intrazellulären Proteinbereich. Durch alternatives Spleißen entstehen drei verschiedene membranständige (C) und drei lösliche CAR-Isoformen (D). (nach: Chen et al., 2003; Dorner et al., 2004).

Der N-terminale Bereich der löslichen CAR-Isoformen ist im Vergleich zu den membranständigen CAR-Proteinen verkürzt. Da den löslichen CAR-Proteinen die Transmembranregion fehlt, schließt sich die Sequenz des 7. Exons direkt an Exon 4 (CAR 4/7), Exon 3 (CAR3/7) bzw. Exon 2 (CAR 2/7) an. Der C-terminale Abschnitt der löslichen CAR-Isoformen weicht durch eine Leserahmenverschiebung während des Spleißens von den membranständigen CAR-Varianten ab (Abb. 4D: 7*, 7**).

3.2.2 Die Struktur des CAR-Proteins

Das CAR-Protein besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid von 19 Aminosäuren (AS), zwei extrazellulären Immunglobulin (Ig)-Domänen (D1 und D2), einer Transmembranregion und einem C-terminalen zytoplasmatischen Bereich (Wang et al., 1999). CAR ist ein Typ-1 Transmembranprotein und zählt auf Grund seiner extrazellulären Ig-Domänen zu den Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF). Die Aminosäuresequenz von CAR ist hoch konserviert. Die Sequenzhomologie zwischen murinem und humanem CAR beträgt in

der extrazellulären Region über 90% und im intrazellulären Bereich circa 95% (Wang et al., 1999).

Die membranständigen CAR-Isoformen umfassen circa 365 AS. Nach Abspaltung des Signalpeptids entspräche dies einem Molekulargewicht von circa 38 kDa. Tatsächlich wurde CAR als ein 46 kDa Protein isoliert. Die erhöhte molekulare Masse des CAR-Proteins wird durch Glykosylierung der Asparaginsäuren in der D1- und D2-Domäne verursacht (Honda et al., 2000; Excoffon et al., 2007). Beide Ig-Domänen weisen eine β -Faltblattstruktur auf. Hierbei entspricht D1 einer typischen v-Ig-Domäne während D2 eine C2-artige Ig-Domänenstruktur aufweist. Die D2-Domäne enthält eine außergewöhnliche α -Helixstruktur mit hydrophober Oberfläche, die möglicherweise an der Wechselwirkung mit extrazellulären Interaktionspartnern beteiligt ist (Hung and Sheng, 2002; He et al., 2001; Jiang and Caffrey, 2005, 2007; Patzke et al., 2010). Als weitere Besonderheit enthält die D2-Domäne eine zusätzliche Disulfidbrücke. Dieses Sequenzmerkmal teilt CAR mit den Proteinen A33 (Antigen 33) und CTX (*Cortical Thymocytes in Xenopus*), weswegen CAR der Subgruppe CTX innerhalb der IgSF zugeordnet wird (Carson, 2001).

Der extrazelluläre Abschnitt des CAR-Proteins wird durch eine 22 AS lange Transmembranregion von dem circa 100 AS umfassenden zytoplasmatischen Bereich getrennt. Der zytoplasmatische C-terminale Bereich des CAR-Proteins beinhaltet mehrere Phosphorylierungsstellen und zwei Palmitoylierungsstellen in der Nähe der Transmembranregion. Die Palmitoylierung des CAR-Proteins ist wichtig für die Verankerung von CAR in der Membran. Ein Austausch der entsprechenden Cysteine in den Palmitoylierungsstellen führt zu einer anormalen Anreicherung von CAR im perinukleären Bereich (Excoffon et al., 2005). Trotz alternativen Spleißens enthalten alle membranständigen CAR-Isoformen sowohl innerhalb des zytoplasmatischen Bereiches als auch am C-Terminus Bindemotive für Proteine mit PDZ- (PSD-95/Dlg/ZO-1) Domänen. Obwohl PDZ-haltige Proteine an PDZ-Domänen-Bindemotive innerhalb einer Sequenz binden können, kommt es vorwiegend zu einer Interaktion mit PDZ-Domänen-Bindemotiven am C-Terminus (Hung et al., 2002). Die PDZ-Domänen-Bindemotive werden entsprechend ihrer Aminosäuresequenz klassifiziert. Die C-terminale Aminosäuresequenz –SIV der CAR-Isoform A (auch CAR 1 genannt) und –TTV der CAR-Isoform B (CAR 2) gehören zu der Klasse 1 der PDZ-Domänen-Bindemotive.

3.2.3 Die Expression von CAR und dessen Regulation

CAR wurde durch verschiedene Nachweistechiken in der Leber, Lunge, Niere, im Skelettmuskel, im Herzen, im Gehirn, im Verdauungstrakt und in den Geschlechtsorganen nachgewiesen (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997; Fechner et al., 1999; Honda et al., 2000; Mirza et al., 2006; Wang et al., 2007; Shi et al., 2009). In vielen dieser Organe ist CAR in besonders dichten Zell-Zellkontaktbereichen (*Tight Junctions*) der Epithelzellen lokalisiert. So befindet sich CAR oft in dichten Epithelschichten, wie beispielsweise im Sammelrohr der Niere oder im *Plexus Choroideus* im Gehirn (Raschperger et al., 2006). Neben den Epithelzellen wird CAR im Gehirn in Astrozyten und Nervenzellen und im Herzen in den Herzmuskelzellen exprimiert (Raschperger et al., 2006; Persson et al., 2006). Im Herzen ist CAR an den Zellkontaktgrenzen der Herzmuskelzellen, den sogenannten Glanzstreifen, lokalisiert (Myers et al., 2004; Noutsias et al., 2001; Kashimura et al., 2004).

Neben der Expression von CAR in verschiedenen Organen, ist der Rezeptor in einer Reihe von Tumorzellen zu finden. Hierbei korreliert die Menge an CAR mit der Zellteilungsrate. Es wird vermutet, dass CAR als Tumorsuppressor fungiert, da die Expression von CAR das Wachstum von Pankreastumorzellen, Harnblasentumorzellen und Gliomazellen inhibiert (Okegawa et al., 2001, 2004; Fuxe et al., 2003; Kim et al., 2003).

Die Expression von CAR ist zeitlich reguliert (Honda et al., 2000; Fechner et al., 2003; Kashimura et al., 2004). Ab dem siebenten Tag der Embryonalentwicklung (E7) ist CAR in der Maus nachweisbar (Hotta et al., 2003; Asher et al., 2005). Besonders im Skelettmuskel, im Herzen und im Gehirn ist die CAR-Expression während der pränatalen Entwicklung hoch. Im Skelettmuskel nimmt die CAR-mRNA-Menge direkt nach der Geburt drastisch ab. Im Herzen und im Gehirn geschieht dies ab einer Woche postnatal (Honda et al., 2000; Fechner et al., 2003; Hotta et al., 2003; Nalbantoglu et al., 1999).

Zusätzlich wird die CAR-Expression durch verschiedene Signalstoffe beeinflusst (Fechner et al., 2003; Ito et al., 2000; Nalbantoglu et al., 1999; Noutsias et al., 2001). Inflammatorische Zytokine wie TNF- α und INF- γ oder eine hohe Zelldichte führen zu einer Reduktion der CAR-Proteinmenge (Vincent et al., 2004; Fechner et al., 2003). Eine Steigerung der CAR-Expression wurde in Herzmuskelzellen myokardialer Infarktregionen gezeigt, sowie durch Inhibierung des RAF/MEK/ERK-Signalweges in Tumorzellen (Anders et al., 2003; Fechner et al., 2003).

3.2.4 CAR, ein Adhäsionsprotein und seine Interaktionspartner

Die Coxsackie- und Adenoviren waren die ersten bekannten Interaktionspartner von CAR. Beide Virustypen besitzen eine isohedrale Kapsidstruktur. Im Vergleich zu den Coxsackieviren verfügen die Adenoviren zusätzlich über Strukturproteine auf der Kapsidoberfläche, welche die Bindung an Membranproteine vermitteln (Gonzalez-Mariscal et al., 2009). Trotz der unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit der Coxsackie- und Adenoviren zeigten Untersuchungen, dass beide Virustypen mit der D1 Ig-Domäne von CAR interagieren. Sie binden jedoch an verschiedene Strukturen innerhalb dieser Domäne (Bewley et al., 1999; He et al., 2001; Kirby et al., 2000). Während die D1-Domäne essenziell für die Interaktion von CAR mit den beiden Virustypen ist, hat die D2-Domäne bei der Interaktion von CAR mit Adenoviren eine unterstützende Funktion. Sie beeinflusst die Bindeeffizienz der Adenoviren an CAR und dadurch die Infektionsrate der Viren (Excoffon et al., 2005).

Viele Proteine der IgSF sind Zelladhäsionsproteine. So vermittelt auch CAR die Aggregation von Zellen (Cohen et al., 2001; Honda et al., 2000). CAR-Proteine bilden durch Interaktion der Ig-Domänen Homodimere (Hung et al., 2002; Jiang et al., 2004). Beide Ig-Domänen sind essenziell für diese Interaktion (Excoffon et al., 2005; Patzke et al., 2010). Hauptsächlich findet die Bildung der Homodimere jedoch über hochkonservierte Aminosäuresequenzen in der D1 Ig-Domäne statt, wobei die Dissoziationskonstante für die D1:D1 Interaktion mit 16 μM denen anderer Adhäsionsproteine ähnelt (Hung et al., 2002). Über die extrazellulären Ig-Domänen bildet CAR auch Heterodimere mit JAM-3 (*Junctional Adhesion Molecule 3*) oder JAML (*Junctional Adhesion Molecule-like*). Beide Proteine gehören genauso wie CAR zu der CTX-Unterfamilie der IgSF (Mirza et al., 2006; Zen et al., 2005; Verdino et al., 2010). Des Weiteren konnte eine Interaktion von CAR mit Glykoproteinen der extrazellulären Matrix, wie Laminin-1, Tenascin-R und Fibronectin gezeigt werden (Patzke et al., 2010).

In Zell-Zellkontaktbereichen befindet sich CAR insbesondere in den *Tight Junctions* (Cohen et al., 2001; Walters et al., 2002; Excoffon et al., 2005). Hier scheint CAR, wie auch andere Adhäsionsproteine, die Permeabilität für Makromoleküle und Ionen zu beeinflussen (Cohen et al., 2001). In den Zell-Zellkontaktbereichen interagiert CAR über seinen zytoplasmatischen Bereich mit dem Zell-Adhäsionsprotein β -Catenin und dem *Tight Junction* Protein ZO-1 (Cohen et al., 2001; Walters et al., 2002). Die subzelluläre Lokalisation von CAR ist im humanen Organismus von der CAR-Isoform abhängig. Die humane CAR-Isoform 1 befindet sich in den *Tight Junctions* und kolokalisiert mit ZO-1, während die humane CAR-Isoform 2

unterhalb der *Tight Junctions* zu finden ist und mit β -Catenin, aber nicht mit ZO-1 kolokalisiert (Walters et al., 2002; Excoffon et al., 2005, 2010).

Über das PDZ-Domänen-Bindemotiv am C-Terminus interagiert CAR mit den PDZ-Domänen von ZO-1, MUPP1 (*Multi-PDZ Domain Protein 1*) und der membranassoziierten Guanylatkinase MAGI-1b (Coyne et al., 2004; Excoffon et al., 2004). MUPP1 und MAGI-1b bilden Komplexe mit verschiedenen Zelladhäsionsproteinen, wie z.B. MUPP1 mit Claudin-1 und MAGI-1b mit β -Catenin (Excoffon et al., 2005, 2004). Weitere Interaktionspartner von CAR sind Connexin 45, das durch die Bildung von *Gap Junctions* an der Zell-Zellkommunikation benachbarter Zellen beteiligt ist, und LNX (*Ligand of numb protein-X*), welches über seine Interaktion mit Numb mit dem Notch-Signalweg assoziiert ist (Sollerbrant et al., 2003; Lim et al., 2008). Des Weiteren interagiert CAR über sein PDZ-Domänen-Bindemotiv mit den neuronal exprimierten Proteinen PSD95 (*Postsynaptic Density 95*) und PICK1 (*Protein interacting with C kinase*), welche in der Postsynapse von Neuronen lokalisiert sind (Excoffon et al., 2004; Gomperts, 1996; Lu and Ziff, 2005). Abbildung 5 fasst die bisher beschriebenen Interaktionspartner von CAR zusammen.

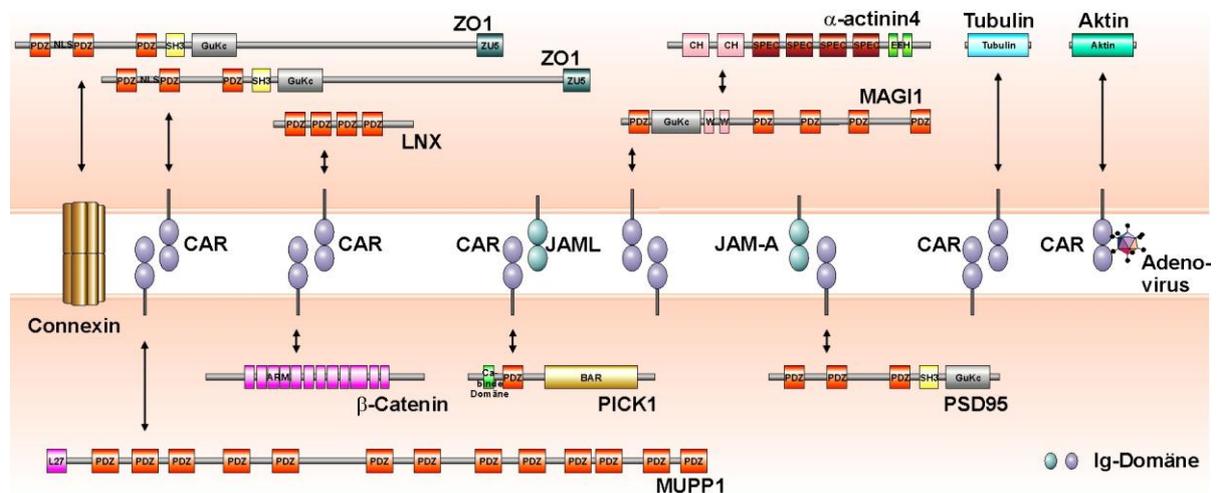


Abb. 5: CAR interagierende Proteine. CAR ist der Rezeptor für Coxsackie- und Adenoviren. CAR bildet Homo- und Heterodimere mit den IgSF-Proteinen JAML, JAM-A, -B und -C. Intrazellulär interagiert CAR über sein C-terminales PDZ-Domänen-Bindemotiv mit den PDZ-Domänen von MUPP1, MAGI1-1b, ZO-1, LNX, PSD95 und PICK1. Weitere Interaktionspartner sind β -Catenin und die Zytoskelettproteine Aktin und Tubulin. Zusammen mit ZO-1 bildet CAR einen Komplex mit dem *Gap Junction* Protein Connexin 45. (nach Fischer et al., 2009).

Arbeiten von Fok und Huang belegen ebenfalls eine Interaktion von CAR mit den Zytoskelettproteinen Tubulin und Aktin (Huang et al., 2007; Fok et al., 2007).

3.2.5 Erkenntnisse aus CAR-Knockout-Modellen

Durch Zellkulturexperimente konnte gezeigt werden, dass CAR als Zelladhäsionsprotein wirkt. Um die physiologische Funktion von CAR *in vivo* zu untersuchen, wurden CAR-KO-Modelle generiert. Es stellte sich heraus, dass die Deletion von CAR in der Keimbahn zur embryonalen Letalität führt. Die KO-Mäuse sterben um den Tag E11.5 und weisen kardiale Einblutung auf (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006). Histologische und ultrastrukturelle Analysen belegten eine pathologische Entwicklung der Herzstruktur. Die KO-Herzen zeigten einen partiellen Verlust von Zell-Zellkontakten und Veränderungen in der Myofilamentstruktur. Diese Befunde ließen vermuten, dass CAR eine Rolle in der kardialen Entwicklung spielt (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006). Um eine embryonale Letalität zu umgehen wurden konditionelle CAR-KO-Mäuse generiert. Hierfür wurde das aus Bakterien stammende Cre/lox-System verwendet (Sauer and Henderson, 1988). Die Cre-Rekombinase wird in Abhängigkeit ihres vorgelagerten Promotors nur in bestimmten Organen exprimiert. Sie erkennt spezielle Sequenzabschnitte (loxP-Sequenzen), die durch genetische Manipulation einen definierten Abschnitt eines Gens im Mausgenom flankieren. Die Aktivität der Cre-Rekombinase bewirkt die Deletion des flankierten Genabschnittes.

Insgesamt sind fünf herzspezifische CAR-KO-Modelle und ein pankreasspezifischer CAR-KO publiziert (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006; Lisewski et al., 2008; Kallewaard et al., 2009; Lim et al., 2008). Die herzspezifischen CAR-KO-Strategien unterscheiden sich hinsichtlich der Promotoren der verwendeten Cre-Rekombinasen oder der Lokalisierung der loxP-Sequenzen (zusammengefasst in Fischer et al., 2009). Drei der herzspezifischen CAR-KO-Strategien führen zur Letalität der KO-Tiere (Chen et al., 2006; Lisewski et al., 2008). Die weiteren zwei herzspezifischen CAR-KO-Modelle zeigen keine erhöhte Sterberate. Diese KO-Tiere entwickeln jedoch einen atrioventrikulären Block (AV-Block). Dies ist eine Störung der elektrischen Reizweiterleitung von den Vorhöfen über den atrioventrikulären Knoten zu den Herzkammern (Lisewski et al., 2008; Lim et al., 2008). Die für den Ionenaustausch wichtigen Zell-Zellkontakte, die *Gap Junctions* sind in diesen KO-Tieren beeinträchtigt (Peters, 2006). Die *Gap Junctions*, werden durch verschiedene Connexine gebildet. Die Expression von Connexin 37, 43 und 45 ist in den adulten

herzspezifischen CAR-KO-Tieren reduziert (Lisewski et al., 2008; Lim et al., 2008). Eine Interaktion von CAR mit Connexin 45, vermittelt durch ZO-1, wurde von Lim *et al.* gezeigt (Lim et al., 2008). Die Expression von ZO-1 und β -Catenin ist in diesen CAR-KO-Tieren ebenfalls reduziert (Lisewski et al., 2008). Die herzspezifische Deletion von CAR belegt somit eine Verbindung zwischen dem *Tight Junction* Protein CAR und den *Gap Junction* Proteinen und verdeutlicht die Relevanz von CAR für die Herzentwicklung und die adulte Herzfunktion (Fischer et al., 2009).

Untersuchungen adulter herzspezifischer CAR-KO-Tier und pankreasspezifischer CAR-KO-Mäuse bestätigten die Funktion von CAR bei der Infektion mit Coxsackieviren *in vivo*. Die Deletion von CAR führte zum Schutz vor Coxsackievirus-Infektion des Herzens bzw. des Pankreas in den jeweiligen CAR-KO-Modellen (Dorner et al., 2006; Shi et al., 2009; Kallewaard et al., 2009; Pinkert et al., 2009).

3.2.6 CAR im zentralen Nervensystem

CAR wurde ab E7 im Mausembryo und während der weiteren Entwicklung in verschiedenen Gehirnregionen nachgewiesen (Hotta et al., 2003). Während der frühen zerebralen Entwicklungsphase befindet sich CAR im Neuroepithel, aus deren proliferierenden Zellen später postmitotische Neurone hervorgehen. Zwischen E13.5 und E16.5 ist CAR im Di- und Telenzephalon nachweisbar. Dort ist CAR im ventrikulären Neuroepithel des Telenzephalondaches, besonders im Bereich des *Plexus Choroideus* und der Hippokampusanlage sowie in der Amygdala- und in der Hypothalamusanlage lokalisiert (Hotta et al., 2003). In neugeborenen Mäusen wurde CAR im Kortex, im Mittelhirn, im Hippokampus, in der Amygdala und im Thalamus detektiert. Des Weiteren befindet sich CAR in den Neugeborenen in der Gehirnhaut sowie im *Corpus Callosum* (Balken) und in der *Commissura anterior*, welche beide Gehirnhälften miteinander verbinden. Ab sieben Tage nach der Geburt sinkt die CAR-Expression stark ab. Die höchste CAR-Expression in Gehirnschnitten adulter Tiere wurde im Riechhirn, in Zellen der subgranulären Schicht des *Gyrus dentatus*, in der subventrikulären Schicht des seitlichen Ventrikels, im rostralen migrierenden Strom (RMS) und in Epithelzellen des *Plexus Choroideus* gezeigt (Honda et al., 2000; Hotta et al., 2003; Raschperger et al., 2006). CAR wird in kortikalen und hippokampalen Neuronen, in Axonen der weißen Substanz (wie dem *Corpus Callosum*), in Astrozyten und in Mikrogliazellen, jedoch nicht in Oligodendrozyten exprimiert. Vereinzelt ist CAR in diesen Zellen auch in adulten humanen Gehirnbiopsien nachweisbar, wobei die

Expression von CAR in inflammatorischen Gehirnproben höher ist als in gesunden. Dies lässt vermuten, dass die CAR-Expression im Gehirn auch durch inflammatorische Signale reguliert wird (Persson et al., 2006). Hinsichtlich seiner Funktion als Virusrezeptor wird vermutet, dass CAR eine Rolle bei der infantilen Meningitis spielt (Honda et al., 2000; Persson et al., 2006; Ahn et al., 2008). Coxsackievirus-Infektionen sind häufig Ursache für virale Meningitis im Menschen, wobei neugeborenen Kinder besonders anfällig sind (Modlin and Rotbart, 1997; van den Pol, 2006). Zellkulturexperimente zeigen, dass mit fortschreitender Reifung der Neurone die Infektionsrate mit CVB3 sinkt. Dies korreliert mit der sinkenden CAR-Expression in den Nervenzellen (Ahn et al., 2008).

Über die physiologische Funktion von CAR im ZNS ist wenig bekannt. Versuche an Hühnerneuronen lassen vermuten, dass CAR das Längenwachstum von Dendriten beeinflusst (Patzke et al., 2010). Dies ist eine Eigenschaft, die bereits für andere neuronal exprimierte Mitglieder der IgSF (Abb. 6) gezeigt wurde (Yamagata et al., 2003).

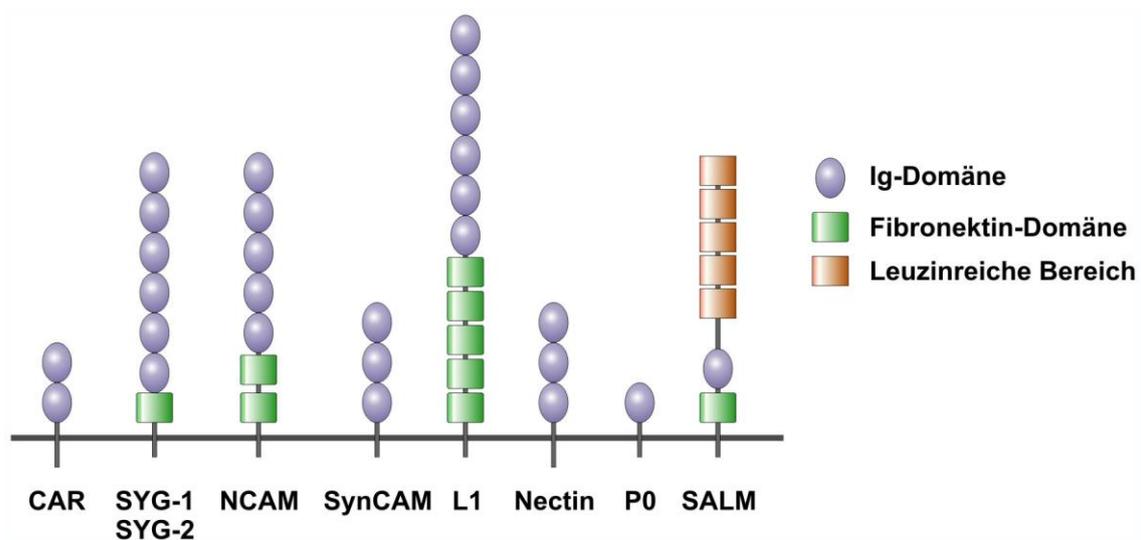


Abb. 6: Immunglobulin-Superfamilie (IgSF). Dargestellt sind Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie, die im zentralen und peripheren Nervensystem vorkommen. Proteine der IgSF enthalten eine bis mehrere Ig-Domänen. Einige Mitglieder der IgSF weisen zusätzliche konservierte Bereiche, wie Fibronektin-Domänen oder leuzinreiche Bereiche auf. (nach Yamagata et al., 2003).

Die IgSF-Proteine NCAM und L1 beeinflussen durch homo- oder heterophile Interaktion das Längenwachstum der Dendriten neuronaler Zellen. Sie sind relevant für die Bündelung von Axonen und die Bildung von Zell-Zellkontakten (Lemmon et al., 1989; Niethammer et al.,

2002; Yamagata et al., 2003; Stoeckli, 2004). Des Weiteren sind diese Proteine an der Aufrechterhaltung und der Funktionalität von Synapsen beteiligt sowie an der neuronalen Zellwanderung (Biederer et al., 2002; Bukalo et al., 2004; Markram et al., 2007; Muller et al., 1996).

3.3 Zielstellung der Arbeit

CAR ist ein hoch konserviertes Protein und wird in einer Vielzahl von Organen exprimiert. Besonders im Herzen, im Skelettmuskel und im Gehirn ist die CAR-Expression während der embryonalen Entwicklung hoch und sinkt nach der Geburt stark ab (Fechner et al., 2003). Eine Relevanz von CAR in der Herzentwicklung und der Herzfunktion wurde mittels muriner CAR-KO-Modelle gezeigt. So verursacht die CAR-Deletion in der Keimbahn eine Fehlbildung des Herzmuskels und führt zu embryonaler Letalität. Die induzierbare Deletion von CAR im adulten Herzen verursacht eine Störungen der kardialen Reizweiterleitung unter Beeinträchtigung von *Gap Junctions* (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008; Chen et al., 2006). CAR gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und spielt eine Rolle bei der Zell-Zelladhäsion (Cohen et al., 2001; Honda et al., 2000; Jiang et al., 2004; Excoffon et al., 2010). Über seinen C-Terminus interagiert CAR mit PDZ-Domänen diverser Proteine. CAR ist in verschiedenen Gehirnregionen exprimiert und wurde in Astrozyten und Neuronen nachgewiesen (Honda et al., 2000; Hotta et al., 2003). Jedoch ist die neuronale Funktion von CAR kaum bekannt.

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von CAR im zentralen Nervensystem. Hierfür sollte mittels des Cre/lox-Systems und verschiedener Cre-Mauslinien gehirnspezifische CAR-KO-Tiere generiert werden. Es sollte die Morphologie der CAR-KO-Gehirne untersucht werden, da für einige Proteine der IgSF eine Beteiligung an der morphologischen Gehirnentwicklung bekannt war. Mitglieder dieser Familie sind ebenfalls an der neuronalen Reizweiterleitung beteiligt. Auf Grund dessen und der Erkenntnisse von dem induzierbaren herzspezifischen CAR-KO-Modell (Lisewski et al., 2008) sollte die synaptische Signaltransmission in gehirnspezifischen CAR-KO-Tieren überprüft werden. Subzelluläre Untersuchungen, wie Interaktions-, Lokalisations- und Expressionsstudien, sollten Aufschluss über die Funktion von CAR im zentralen Nervensystem geben.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Tab. 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller und Typ
Geldokumentation	Syngene, GENE GENIUS
Gelsystem (Mini) für Agarosegele	Cosmo Bio Co, Mupid 21
Gelsystem für SDS-PAGE	GE-Healthcare, Hoefer Small gel unit
Gelsystem	Renner
Tissue-Processor	TP 1020, Leica
Elektronenmikroskop	Zeiss 910
Inkubator für Zellkultur	Binder, APT Line CB 150
Konfokales Mikroskop	Leica, TCS SP5/Carl Zeiss, LSM 5 Pascal
Kühlplatte für Paraffineinbettung	Leica EG1140C
Homogenisator	IKA®-Werk, Ultra-Turrax T-8
Mikroskop	Olympus BX51TF; Leica CTR6000; Zeiss Axiovert 200
Mikrotom	Mirom HM3555; Leica SM2000R Sliding Microtome
Monochromator (Polychrom II)	TILL photonics
Einbettmaschine für Paraffinpräparate	Leica, EG 1140 H; Leica TP 1002
PCR-Maschine	MJ Research, PTC-200
PCR-Maschine für <i>Real time</i> -PCR	Applied Biosystems, 7900HT
Perfusionskammer	RC-20, Warner Instruments
Pipetten	Gilsen/Eppendorf
Spannungsgerät	Biometra, 105BIO-LVD

Gerät	Hersteller und Typ
Spektrophotometer	Amersham, Ultraspec 2100 pro; PeqLab, NanoDrop ND-1000
Stereomikroskop	Leica, MZ75
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer comfort
Tischzentrifuge	Heraeus, Biofuge/Eppendorf, centrifuge 5804
Vibratom	Leica VT1200
Wasserbad	Haake, DC10
Western Blot-Apparatur	BioRad, Mini Trans. Blot Cell
Zentrifuge für 96 Well-Platten	Sigma, 4K15, Rotor: 09100

4.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders ausgewiesen, von Roth, GE Healthcare und Sigma bezogen.

Tab. 2: Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
ABC-Elite	Vektor
DNA Ligation Kit Ver.1	TAKARA BIO INC.
EasyPure DNA Purification Kit	Biozym
FAST qPCR MasterMix Plus	Eurogentec
GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Assay	Affymetrix
GeneChip WT Sense Target Labeling and Control Reagents	Affymetrix
GeneChip Hybridization, Wash and Stain kit	Affymetrix
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
RiboMinus Concentration Module	Invitrogen

Kit	Hersteller
RiboMinus Transcriptome Isolation Kit (Human/Mouse)	Invitrogen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR System	Invitrogen
RNeasy Micro Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
ThermoScript RT-PCR System for First-Strand Synthesis System	Invitrogen

4.1.3 Farbstoffe

Der Farbstoff FM1-43 stammt von der Firma Invitrogen.

4.1.4 Enzyme

Proteinase K für den Verdau von Mausgewebe wurde von Merck und die Taq-DNA-Polymerase für PCR von Invitrogen bezogen. Für den Verdau der DNA wurde die DNase I von Qiagen verwendet. Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas und New England Biolabs bezogen.

4.1.5 Antikörper

Die Antikörper wurden wie folgt verwendet:

Tab. 3: Verwendete Primärantikörper.

Antikörper	Spezies	IF	WB	Hersteller
β -Tubulin	m		1:10000	Sigma
β -Catenin	m	1:1000	1:2000	BD
CAR	r	1:50	1:2000	Santa Cruz
CAR	r	1:1000		AG Prof. Dr. Rathjen
GAPDH	m		1:5000	Chemicon

Antikörper	Spezies	IF	WB	Hersteller
NMDAR1	m	1:140		Synaptic Systems
MAP2	c	1:10000		Abcam
PSD95	m		1:2500	UC Davis
Synaptophysin	m		1:2500	Synaptic Systems
Synaptotagmin-2	r		1:2000	Synaptic Systems
Snapin	g	1:200	1:1000	Santa Cruz
TRPM1	sh	1:200	1:2500	Zymed

c: chicken; r: rabbit; m: mouse; sh: sheep; g: goat; IF: Immunofluoreszenz; WB: Western Blot

Tab. 4: Verwendete Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Spezies	IF	WB	Hersteller
Anti-r-Alexa Fluor 568	g	1:1000		Invitrogen
Anti-m-Alexa-Fluor 647	g	1:1000		Invitrogen
Anti-c-Alexa-Fluor 555	g	1:1000		Invitrogen
Anti-g-IgG-biotinyliert	d	1:500		Jackson
Anti-r-IgG-biotinyliert	d	1:500		Jackson
Anti-m-IgG-HRP-konjugiert	g		1:5000	Calbiochem
Anti-r-IgG-HRP-konjugiert	d		1:5000	GE Healthcare
Streptavidin 647		1:500		Invitrogen

d: donkey; c: chicken; r: rabbit; m: mouse; g: goat; IF: Immunofluoreszenz; WB: Western Blot; Jackson: Jackson ImmunoResearch Laboratories

4.1.6 Oligonukleotide

Tab. 5: Verwendete Primer zur Genotypisierung.

Primer	Sequenz (von 5' zu 3')
CAR P1f	CCATGCACAGGGTGATCTG
CAR P1r	TGAGACTAAAAACCAGCAGCTTC
CAR P2f	AACCTAGCCATTCAAAAAGAAGG
Cre1200	GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC
Cre800	GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG
CamK1	GGT TCT CCG TTT GCA CTC AGG A
CamK2	CCT GTT GTT CAG CTT GCA CCA G
CamK3	CTG CAT GCA CGG GAC AGC TCT

r: revers; f: forward

Tab. 6: Verwendete Primer für quantitative *Reverse-Transcriptase-PCR* (qRT-PCR).

Primer und Sonden	Sequenz/ Applied Biosystems Katalog Nummer
18S-RNA f	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC
18S-RNA r	TGGGCAAATGCTTTCGCTC
18S-RNA-Sonde	6-FAM-TGGACCGGCGCAAGACGGAC-TAMRA
β -Catenin	Mm00483033_m1
CAR01-f	AGC TGC ACG GTT CAA AAC AGA
CAR01-r	TTC CGG CTC GGT TGG A
CAR01 Sonde	6-FAM-CTCTGACCAGTGTATGCTGCGACTAGACGT-TAMRA
Cx36	Mm00439121_m1
Cx43	Mm00439105_m1
Cx45	Mm00433624_m1
GAPDH-154f	GGC AAA TTC AAC GGC ACA GT
GAPDH-223r	AGA TGG TGA TGG GCT TCC C

Primer und Sonden	Sequenz/ Applied Biosystems Katalog-Nummer
GAPDH-Sonde	6-FAM-AGGCCGAGAATGGGAAGCTTGTCATC-TAMRA
MUPP1-f	GCTGGAGGAATAATGGCACTG
MUPP1-r	TTCTTCTCGCTCTGGGAGTT
MUPP1-Sonde	6-FAM-TGGAATGTCTCTGCCAGTGTATGA-TAMRA
Syt1	Mm00436858_m1
Syt2	Mm00436864_m1
Slc6a7	Mm01261761_m1
ZO-1	Mm00493699_m1

r: revers; f: forward

Die Oligonukleotide wurden entweder von der Firma BioTeZ synthetisiert oder von Applied Biosystems bezogen.

4.1.7 Vektoren

Der Vektoren pGemTeasy wurde von Invitrogen und der Vektor pGex4T1 von GE Healthcare bezogen.

4.2 Methoden

4.2.1 Tierexperimentelle Praxis

Die für die Experimente benötigten Mäuse stammten aus eigener Zucht. Die Tiere wurden in IVC-Käfigen (individuell belüftete Käfige) in der tierexperimentellen Einrichtung des Max-Delbrück-Centrums Berlin gehalten. Sie erhielten unbegrenzten Zugang zu Wasser und Futter und hatten ein 12 h Tag/Nacht Rhythmus. Die Versuche wurden gemäß der Richtlinien der europäischen Union durchgeführt und von der deutschen Tierschutzbehörde genehmigt.

Für die Generierung gehirnspezifischer CAR-KO-Modelle wurden CARrecf/recf Tiere mit Tieren verpaart, die heterozygot für das Cre-Allel (Cre+) und Wildtyp für das CAR-Allel (CARwt/wt) waren. Die resultierenden CARrecf/wt Cre+ Tiere wurden mit CARrecf/recf Mäusen verpaart, um CARrecf/recf Tiere zu erhalten in denen die Cre-Rekombinase

exprimiert wird (CAR^{ref/ref} Cre⁺). Die Verpaarung von CAR^{ref/ref} Cre⁺ Mäusen mit CAR^{ref/ref} Mäusen ergab Cre⁺ und Cre⁻ CAR^{ref/ref} Tiere. Je nach Cre-Rekombinase werden die CAR^{ref/ref} Cre⁺ Tiere als Nex-CAR-KO (CAR^{ref/ref} Nex⁺) oder als CamKII α -CAR-KO (CAR^{ref/ref} CamKII α ⁺) bezeichnet.

4.2.2 Präparation von Organen

Für die Präparation des Gehirns wurden abhängig vom Alter der Tiere die Mäuse durch Tiefennarkose (Tiere ab P12) oder durch Abtrennung des Kopfes (Tiere bis P12) getötet. Die Kopfhaut wurde von kaudal zu kranial entlang der Mittellinie geschnitten und durch seitliches Aufschneiden der Schädeldecke das Gehirn freigelegt. Bei zwei Tage alten Jungtieren wurde das Gehirn mittels eines kleinen Löffels entnommen. Das Herz wurde durch seitliche Öffnung des Thorax präpariert.

4.2.3 Nukleinsäureanalytik

Für die Genotypisierung der Versuchsmäuse wurde eine Schwanzbiopsie von 1-2 mm Länge mit 100 μ l Embryolysispuffer und 5 μ l Proteinase K (10 μ g/ml) ÜN bei 54°C und 700 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Die Proteinase K wurde durch Erhitzen der Proben auf 95°C für 5 min inaktiviert. Für die PCR wurden die in Tab. 5 aufgelisteten Oligonukleotide und die in Tab. 7, Tab. 8 und Tab. 9 beschriebenen PCR-Programme verwendet.

Für die Verifizierung der Rekombination im Gehirn und Herzen wurde die DNA aus den jeweiligen Organen mittels Phenolisierung aufgereinigt. Für die DNA Isolation mittels Phenol wurden die Organe über Nacht in 700 μ l *Tail*-Puffer und 25 μ l Proteinase K unter Schütteln (700 rpm) bei 54°C verdaut. Die Proteinase K wurde durch Inkubation der Proben bei 95°C für 5 min inaktiviert. Es folgte die Zugabe von 700 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1), Invertieren der Proben und 5-minütige Zentrifugation mit 13000 rpm. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1,5 ml eiskaltes 99,9%iges Ethanol zugegeben. Die DNA wurde bei -20°C für 20 min gefällt und danach 30 min bei 4°C mit 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und zum Schluss in 100 μ l H₂O gelöst. Für die PCR wurde 1 μ l einer 1:10 Verdünnung eingesetzt.

Tail-Puffer

2 ml 1M Tris pH 8; 1 ml 0,5M EDTA pH 8; 1 ml 20% SDS; 2,34 g NaCl; ad 100 ml dH₂O

Embryolysispuffer

50 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM Tris pH 8,9; 0,01% Gelatine; 0,4% NP-40; 0,45% Tween-20

Zum Nachweis des geflochten CAR-Allels (Recf) und des WT-Allels wurde die in Tab. 7 dargestellte PCR durchgeführt. Der Nachweis des jeweiligen Cre-Gens erfolgte wie in Tab. 8 und 9 dargestellt.

Tab. 7: PCR-Ansatz und Programm zum Nachweis des Recf- und WT-Allels.

CARrecf/wt PCR	End- konzentration	CARrecf/wt PCR-Programm		
Gitschier-Puffer (10x)	1x	1. Denaturierung	94°C	1 min
DMSO	10%	3. Annealing	60°C	2 min
dNTP Mix (10 mM)	0,5 mM	4. Elongation	65°C	5 min
CAR P1f (10 µM)	0,2 µM	5. Denaturierung	94°C	30 s
CAR P1r (10 µM)	0,2 µM	6. Annealing	60°C	30 s
BSA (10 mg/ml)	0,08 mg/ml	7. Elongation	65°C	1 min
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,025 U/µl	8. Elongation	65°C	10 min
Steriles ddH ₂ O	ad 24 µl	9. Ende	4°C	∞
		Schritt 5- 7: 40x		

Gitschier-Puffer (10x)

166 mM (NH₄)₂SO₄; 670 mM Tris, pH 8,8; 67 mM MgCl₂; 50 mM β-Mercaptoethanol; 67 mM EDTA

Tab. 8: PCR-Ansatz und Programm zum Nachweis des Nex-Cre-Gens.

Nex-Cre PCR-Mix	End- konzentration	Nex-Cre PCR-Programm		
PCR-Puffer (Invitek)	1x	1. Denaturierung	94°C	2 min
MgCl ₂	1,5 mM	2. Denaturierung	94°C	15 s
dNTP Mix (10 mM)	0,2 mM	3. Annealing	49°C	15 s
Primer Cre800/1200-Mix	0,6 µM	4. Elongation	72°C	45 s
Taq-Polymerase	0,04 U/µl	5. Elongation	72°C	8 min
dH ₂ O	ad 24µl	6. Ende	4°C	∞
		Schritt 2- 4: 35x		

Tab. 9: PCR-Ansatz und Programm zum Nachweis des CamKIIα-Cre-Gens.

CamKII-Cre-PCR-Mix	End- konzentration	CamKII-Cre PCR-Programm		
PCR-Puffer (Invitek)	1x	1. Denaturierung	94°C	2 min
MgCl ₂	1,5 mM	2. Denaturierung	94°C	15 s
dNTP Mix (10 mM)	0,2 mM	3. Annealing	63°C	15 s
Primer CamK1	0,2 µM	4. Elongation	72°C	45 s
Primer CamK2	0,2 µM	5. Elongation	72°C	8 min
Primer CamK3	0,2 µM	6. Ende	4°C	∞
Taq-Polymerase	0,04 U/µl	Schritt 2- 4: 35x		
dH ₂ O	ad 24µl			

4.2.3.1 RNA-Isolation

4.2.3.1.1 RNA-Isolation aus Gehirngewebe

Das präparierte Gehirn (4.2.2) wurde auf einer gekühlten Petrischale in einzelne Gehirnareale unterteilt, die separat in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die RNA Isolation erfolgte nach dem Protokoll von Peqlab.

Das bei -80°C aufbewahrte Gewebe wurde nach Zugabe von Trizol (1 ml pro 50-100 mg Gewebe) mit Hilfe des Ultra-Turrax dreimal 15 s mit 10 s Pause auf Eis homogenisiert. Die Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend mit 12000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,2 ml Chloroform gemischt, 7 min bei RT inkubiert und wieder 5 min bei 12000x g zentrifugiert. Die obere RNA-haltige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol für 10 min auf Eis gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 75% Ethanol und 10-minütiger Zentrifugation mit 12000x g bei 4°C gewaschen. Das Pellet wurde in 89 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Um die RNA in Lösung zu bringen wurde sie 10 min bei 56°C in einem Thermoschüttler inkubiert.

4.2.3.1.2 RNA-Isolation aus Zellen

Neuronale Zellkulturen (siehe 4.2.6) wurden mit 1 ml Trizol pro 10 cm² Wachstumsfläche vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und durch mehrfaches Pipettieren mit einer P200-Pipette mechanisch zerkleinert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT folgte die Fällung mit 0,2 ml Chloroform pro eingesetzten Milliliter Trizol. Die weitere Isolation folgte wie unter 4.2.3.1.1 beschrieben.

4.2.3.2 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte nach Herstellerangabe mittels des Nanodrop (Nanodrop ND-1000) spektroskopisch bei 260 nm.

4.2.3.3 RNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der RNA erfolgte je nach resultierender RNA-Menge mit dem Qiagen RNeasy Mini- oder Mikro-Kit (max. 100 µg bzw. max. 45 µg Ausgangs-RNA-Menge) nach Angaben des Herstellers.

4.2.3.4 Elektrophorese

4.2.3.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Genotypisierung wurden die PCR-Produkte mit 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Zur Herstellung des Agarosegels wurde die Agarose mit 0,5x TAE-Puffer aufgekocht, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in Gelträgern gegossen. Nach Abkühlung der Agarose wurde der Gelträger in die Elektrophoresekammer (Cosmo Bio Co, Mupid 21) überführt und diese mit 0,5x TAE aufgefüllt. Die DNA-Proben wurden mit 3 µl *Orange-G* Puffer versetzt. Die Geltaschen wurden mit den Proben beladen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt bis der Farbmarker die Mitte des Agarosegels überschritten hatte. Als Größenstandard diente die GeneRuler™ 50 bp DNA Leiter (Fermentas). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA unter UV-Licht mit dem Gel-Imager sichtbar gemacht.

0,5x TAE-Puffer

40 mM Tris; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA, pH 8,0

***Orange-G* Puffer**

0,5% Orange G; 50% Glycerol; 25 mM EDTA

4.2.3.4.2 Formamidgelelektrophorese

RNA Proben wurden nach Angaben des RNeasy Kits von Qiagen durch Formamidgel (FA)-Elektrophorese aufgetrennt. Es wurde dafür ein 1,2%iges FA-Gel verwendet, welches aus UltraPure™ Agarose, 1x FA-Puffer und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt wurde. Die RNA-Proben wurden mit 5x *Loading*-Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen) versetzt und die Elektrophorese 40 min bei 100 V in der Mupid-ex-Gelkammer (Eurogentec GmbH) durchgeführt. Die RNA wurde mit Hilfe des Gel-Imagers durch UV-Licht sichtbar gemacht.

1x FA-Puffer

20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0; 250 mM Formaldehyd

4.2.3.5 cDNA Synthese

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde RNA in cDNA umgeschrieben. In Abhängigkeit der RNA-Ausbeute dienen 1-4 µg RNA als Ausgangsmaterial. Die cDNA Synthese erfolgte nach Herstellerangaben des ThermoScript First-Strand cDNA Synthese-Kit von Invitrogen.

Es wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

dNTP Mix (10 mM)	2 µl
Random Primer (50 ng/µl)	1 µl
RNA-Template 1-4 µg	entsprechend
DEPC-H ₂ O	ad 12 µl

Es erfolgte zunächst die Denaturierung der RNA bei 65°C für 5 min und danach wurden folgende Komponenten für die cDNA-Synthese hinzugefügt:

cDNA-Synthese-Puffer (5x)	4 µl
DTT (0,1 M)	1 µl
RNase (40 U/µl)	1 µl
ThermoScript Reverse Transkriptase (15 U/µl)	1 µl
DEPC-H ₂ O	1 µl

4.2.3.6 Genexpressionsanalyse

4.2.3.6.1 Affymetrix

Für die Analyse des Hippokampus Genexpressionsprofils aus drei 10 Tage alten Gehirnen von CamKII α -CAR-KO-Tieren und drei Geschwisterkontrolltieren wurden Exon Maus Chips 1.0 ST der Firma Affymetrix verwendet. Die Aufreinigung der Proben erfolgte nach dem Protokoll der Firma Affymetrix. Die Gesamt-RNA wurde wie unter 4.2.3.1.1 beschrieben aus Hippokampi isoliert. Für die Exon-Chip-Analyse wurde 1 µg der Gesamt-RNA verwendet. Mit Hilfe des RiboMinus Transcriptome Isolation Kit (Human/Mouse) und des RiboMinus Concentration Module wurde die Menge an rRNA reduziert und somit späteres Hintergrundsignal verringert. Mittels „WT Sense Target Labeling and Control Reagents“ Kit wurde die RNA mit Zufalls-Hexamer Primern mit T7 Promotorsequenz in cDNA

umgeschrieben. Diese Doppelstrang-cDNA diente als Grundlage für die Synthese von cRNA mittels T7-RNA-Polymerase. Es folgte das Umschreiben der cRNA in Einzelstrang cDNA durch Zufalls-Hexamer-Primer unter Einbau von dUTPs. Durch eine Kombination von Urazil DNA Glycosylase (UDG) und apurinischer/ apyrimidinischer Endonuklease (APE 1) wurde das zuvor eingebaute dUTP erkannt und an dieser Stelle die DNA fragmentiert. DNA Fragmente wurden durch terminale Deoxynukleotidyl Transferase (TdT) kovalent mit Biotin markiert. Die Hybridisierung und Waschen der Exon Chips erfolgte durch das „GeneChip Hybridization, Wash and Stain“ Kit. Die Aufreinigung wurde von Beate Golbrich-Hannig und die Hybridisierung der Chips von der AG Hübner am MDC durchgeführt. Die Affymetrix-Chips wurden im Affymetrix GeneChip Scanner 3000 gelesen. Die Daten wurden von Dr. Herbert Schulz (AG Hübner) mit der GeneChip Operating Software (Affymetrix) unter Verwendung der vom Hersteller vorgegebenen Einstellungen ausgewertet. Nach Qualitätskontrolle wurden die Daten durch log-scale robust multiarray Analyse normalisiert. Nach Students-T-Test wurde ein parametrischer Varianztest (ANOVA; F-Test) durchgeführt, um globale Expressionsunterschiede zu ermitteln (*Stepup* P-Wert).

4.2.3.6.2 Quantitative *Reverse-Transcriptase-PCR*

Für die quantitative *Reverse-Transcriptase-PCR* (qRT-PCR) wurde der qPCR Master Mix Plus Kit (Eurogentec) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Für die qRT-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

- | | | |
|-------------------|------|--------|
| 1. Annealing | 50°C | 2 min |
| 2. Denaturierung | 95°C | 10 min |
| 3. Denaturierung | 95°C | 15 s |
| 4. Amplifizierung | 60°C | 1 min |
| 5. Ende | 4°C | ∞ |

Schritt 3-4: 50x

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des *Sequence Detection System 1.2* von Applied Biosystems unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode, welche im Handbuch des ABI PRISM 7900 *Sequence Detection System* beschrieben ist. Die ermittelten CT-Werte wurden auf 18S-RNA oder GAPDH-mRNA normalisiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die normalisierten Werte zwischen KO und Kontrollen verglichen, wobei die Kontrolle als 100% gesetzt wurde.

4.2.4 Proteinchemie

4.2.4.1 Proteinisolation aus Gewebe

Bei -80°C aufbewahrtes Gewebe wurde mit dem Ultra-Turrax in entsprechendem Puffer zerkleinert. Für eine native Proteinisolation wurde RIPA- oder DOC-Puffer verwendet. Für eine denaturierende Aufreinigung erfolgte der Aufschluss in Harnstoffpuffer. In beiden Fällen wurden 4 ml Puffer/g Gewebe eingesetzt. Nach der Zerkleinerung wurde das Lysat mittels *Douncer* bzw. mittels Ultraschallstab (bei denaturierenden Bedingungen) weiter aufgeschlossen und anschließend 20 min bei 4°C und 1000x g zentrifugiert, um Zellkerne und Zellbruchstücke abzutrennen. Um die Membranfraktion zu erhalten, wurden die nativ in Homogenisierungspuffer aufgetrennten Lysate zusätzlich 30 min bei 4°C mit 50000 rpm ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 2% SDS 30 min bei RT gelöst und anschließend in RIPA- bzw. DOC-Puffer 1:20 verdünnt. Es folgte die Proteinbestimmung nach Bradford oder mittels der Amidoschwarz-Methode.

Harnstoffpuffer

8 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 3% SDS; 75 mM DTT; 0,05 M Tris-HCl; pH 6,8

Homogenisierungspuffer

140 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; pH 8

RIPA-Puffer

50 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 1% IGPAL; 0,1% Na-DOC; 5 mM EDTA; 0,1% SDS; 0,2 mM PMSF; 0,01 mM Leupeptin

DOC-Puffer

50 mM Tris pH9; 50 mM NaF; 5 mM EDTA; 0,2 mM PMSF; 1 µg/ml Pepstatin; 0,01 mM Leupeptin; 1% DOC

4.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit der Amidoschwarz-Methode von Schaffner und Weissmann (Schaffner and Weissmann, 1973) oder mit Bradfordlösung (Roth) anhand der Herstellerangaben bestimmt.

4.2.4.3 SDS-PAGE

Es wurden 50 µg Proteinlysate mit 4x Lämmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und auf SDS-Gele entsprechenden Prozentsatzes aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit der Hoefer Small Gel Unit (GE-Healthcare) ca. 30 min bei 90 V und 2 h bei 120 V. Als Laufpuffer wurde 1x SDS-Gelpuffer verwendet. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blue (GE-Healthcare, nach Anleitung des Herstellers) gefärbt oder auf eine Membran geblottet.

SDS-Gelpuffer

1% SDS; 0,2 M Glycin; 25 mM Tris-HCl, pH 7,5

4x Lämmli-Puffer

0,08% Bromphenolblau; 50% Glycerin; 5% β-Mercaptoethanol; 4% SDS

4.2.4.4 Western Blot

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele 2 h bei 250 mA auf Hybond-C+-Membranen (GE-Healthcare) geblottet (Mini Trans Blot Cell, Biorad). Anschließend wurde die Transfereffizienz mit einer reversiblen Ponceau-S-Färbung (Sigma) überprüft, indem die Membran für 10 s mit der Färbelösung inkubiert wurde. Anschließend wurde die Färbung mit PBS-Tween entfernt. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden mit 5%iger Milchpulverlösung in PBS-Tween 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurde die Membran 3x mit dem primären Antikörper (AK) in PBS bei 4°C inkubiert und 3x 15 min mit PBS/PBS-Tween gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären HRP- (*horseradish peroxidase*) konjugierten AK für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran 2x 15 min mit PBS und 1x 15 min mit PBS-Tween gewaschen. Lösung A und B des Supersignal Kit (Pierce) wurden im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt und 1 min auf der Membran inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion des Chemilumineszenzsignals mit dem Stella 8300 Detektionssystem (Raytest).

PBS

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O; 1,8 mM KH₂PO₄

PBS-Tween

PBS + 0,1% Tween

4.2.4.5 Pulldown

Für *Pulldown*-Versuche wurden zwei verschiedene Ansätze genutzt. Zum einen wurde das bakteriell exprimierte GST-CARtail-Fusionsprotein und zum anderen das synthetisch hergestellte cxadr-A-Peptid (CAR-Peptid) verwendet (Eurogentec).

4.2.4.5.1 Aufschluss und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Für die Gewinnung des GST-CARtail Fusionsproteins wurde von Dr. Yu Shi die zytoplasmatische Domäne (CARtail) von CAR in den GST-Fusionsvektor pGex4T1 (GE-Healthcare) kloniert und anschließend in *E. coli* BL21 transformiert. Für die Überexpression des Fusionsproteins und der Kontrollen (Sorcs3-GST Fusionsprotein, bereitgestellt von Dr. Breiderhoff, AG Willnow und GST) wurden 200 ml LB mit 200 µL Ampicilin (10 mg/ml), 150 µl Chloramphenicol (34 mg/ml) und 10 ml Glukoselösung (36%) mit einer 2 ml ÜN-Kultur auf OD₆₀₀= 0,05 angeimpft und bei 37°C bis OD₆₀₀= 0,3 geschüttelt. Anschließend wurden 2 ml der Kultur als Kontrolle vor der Induktion entnommen, abzentrifugiert und das resultierende Pellet bei -20°C gelagert. Durch Zugabe von 100 µl 1 M IPTG zur Kultur wurde die Expression der Fusionsproteine induziert. Anschließend wurde die Kultur für weitere 4 h bei 16°C geschüttelt und bei 4°C und 7700x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert und mit Ultraschall bei 70% *power and pulse* 2x für 45 s aufgeschlossen. Nach Zugabe von 0,5 ml 20%igem Triton X-100 (Endkonzentration 1%) wurde das Lysat mit 0,001 M PMSF für 1 h auf Eis geschüttelt und dann bei 10000x g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -20°C gelagert und der Überstand für den *Pulldown* weiterverwendet. Für die Aufreinigung des GST-CARtail-Fusionsproteins und der Kontrollen wurden 50 µl Glutathion Sepharose 4b Beads (GE-Healthcare) in ein Eppendorfgefäß gegeben und 3x mit 200 µl PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte jeweils bei 500x g und 4°C für 3 min. Vom aufgeschlossenen Überstand wurde 1 ml auf das gewaschene Trägermaterial (*Beads*) gegeben und ÜN bei 4°C oder 2 h bei RT rotiert. Der Überstand wurde aufgehoben und die *Beads* mit 0,1% Triton enthaltendem PBS 3x gewaschen. Um die Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine zu überprüfen, wurde die entnommene 2 ml Probe vor der IPTG-Induktion wie die Hauptkultur mit Triton

enthaltendem PBS aufgeschlossen. Das Pellet der Hauptkultur wurde durch Inkubation mit 1%iger SDS Lösung für 5 min bei 95°C gelöst. Beide Ansätze sowie eine Probe des aufgeschlossenen Überstandes vor und nach der Bindung an die Sepharosebeads wurden mit 4x Lämmli-puffer (4.2.4.3) versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen.

4.2.4.5.2 Kopplung von Peptid an Trägermaterial

Das von Eurogentec synthetisierte cxadr-A-Peptid mit der Sequenz H2N-CPV MIP AQS KDG SIV-COOH, welches der C-terminalen zytoplasmatischen Sequenz der CAR-Isoform A entspricht, wurde mittels des N-terminal eingefügten Cysteins an SulfoLink *Beads* (Pierce, Cat.20401) gekoppelt. Hierfür wurden 800 µl der *Beads* bei RT in eine Säule (Bio-RAD Poly Prep column, Cat.731-1550) gefüllt. Es wurde 1 mg des Peptids in 200 µl Bidest-Wasser gelöst und 50 µl 5x Kopplungspuffer hinzugefügt. Die Säule wurde durch 6x 1 ml Kopplungspuffer äquilibriert. Anschließend wurde das gelöste Peptid zur Säule gegeben und 2 h bei RT inkubiert. Der erste Durchlauf wurde aufgefangen und die Säule dreimal mit 1 ml Kopplungspuffer gewaschen. Es folgte die Blockierung mit 1 ml Block-Puffer mittels 15 min Mischen und 30 min Inkubation bei RT. Danach wurde die Säule zweimal mit 1 M NaCl gewaschen. Zur Aufbewahrung wurden die *Beads* ad 800 µl mit 1 M NaCl aufgefüllt und ad 10 mM Natriumazid zugegeben, um bakterielle Kontamination zu vermeiden. Zur Abschätzung der Bindungseffizienz wurde die optische Dichte bei 280 nm der Peptidlösung vor Zugabe zur Säule mit der des Durchlaufs verglichen.

5x Kopplungspuffer

250 mM Tris-HCl; 25 mM EDTA, pH 8.6

Block-Puffer

50 mM Cystein in 1x Kopplungspuffer; (43,7 mg Cystein in 5 ml Kopplungspuffer)

4.2.4.5.3 Pulldown-Analyse

Für den *Pulldown* wurden 50 µl der 50%igen Säulenlösung (mit CARTail-GST-Fusionsprotein, GST, SorcS3-GST, CAR-Peptid oder CASK-Peptid) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit entsprechendem Puffer (RIPA oder DOC) gewaschen und

dann mit 1-5 mg nativen Proteinlysate (4.2.4.1) ÜN bei 4°C rotierend oder 2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Der erste Durchlauf nach der Inkubation und der erste Durchlauf nach Zugabe des Waschpuffers wurden aufgefangen. Die inkubierten *Beads* wurden insgesamt viermal mit entsprechenden Puffern (RIPA oder DOC) gewaschen. Anschließend wurden die Proteine durch Inkubation mit Lämmli-Puffer bei 95°C für 5 min von den *Beads* getrennt und mittels SDS-PAGE separiert. Als Kontrollen dienten zum einen die entsprechenden *Beads*, das Sorcs3-GST Fusionsprotein und das CASK-Peptid (bereitgestellt von AG Poy, synthetisiert von Eurogentec). Das Gel wurde anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und spezifische Bande ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie von der MDC-Core Facility analysiert.

4.2.5 Histologie

4.2.5.1 Einbetten von Gewebe in Paraffin

Präpariertes Gehirn (4.2.2) wurde über Nacht in 4% Formaldehyd-PBS-Lösung (FA-Lösung) bei 4°C unter Schütteln fixiert. Es folgte das Wässern des Gehirns für mindestens 1 h. Zur Dehydrierung und Einbettung der Organe in flüssigem Paraffin wurde das Gerät Leica TP 1002 benutzt.

Es wurde folgendes Programm verwendet:

1x 1h	70% Ethanol
1x 1h	90 % Ethanol
2x 1h	96 % Ethanol
3x 1h	99% Ethanol
3x 1h	Rotihistol
2x 1h	Paraffin

Am Folgetag wurde das Gehirn entsprechend der gewünschten Schneideorientierung in Paraffin eingebettet und durch Abkühlen erhärten gelassen. Die Paraffinblöcke wurden mindestens 24 h bei RT gelagert und dann 10 µm dicke Schnitte mittels Mikrotom (HM3555, Leica) angefertigt.

4.2.5.2 Nissl-Färbung von Paraffinschnitten

Paraffinschnitte wurden 1 h bei 60°C inkubiert, um das Paraffin abzuschmelzen und dann wie folgt rehydriert:

2x 4 min Xylol

2x 4 min 99% Ethanol

2x 4 min 96% Ethanol

1x 4 min 80% Ethanol

1x 4 min 70% Ethanol

1x 4 min 50% Ethanol

Bis zur Färbung wurden die Paraffinschnitte in dH₂O aufbewahrt. Die Nissl-Färbelösung wurde aus einer 1%igen Thionin-Stammlösung (in Wasser) durch 1:40 Verdünnung in 0,1 M Acetatlösung pH 3,8 hergestellt (Endkonzentration 0,00025% Thionin). Die Acetatlösung wiederum wurde durch Mischung von 24 ml 0,1 M Natriumacetatlösung mit 176 ml 0,1 M Essigsäure hergestellt. Die Färbung erfolgte 30 min in der Nissl-Färbelösung. Hintergrundfärbung wurde anschließend durch 2x 1 min Inkubation in 96% Ethanol ausgewaschen. Zum Einbetten wurden die Schnitte 2x 1 min in 99%igem Ethanol und anschließend 5 min in Rotihistol getaucht. Zuletzt wurden Tropfen von Rotihistokit auf die Schnitte gegeben und mit Objektgläsern unter Vermeidung von Luftblasen eingedeckelt.

4.2.5.3 Anfertigung von Kryoschnitten (*Floating-Schnitte*)

Gehirne wurden ÜN mit 4% FA-Lösung bei 4°C fixiert. Nach mehrfachem Waschen mit PBS und 3 h Inkubation in 15% Saccharose/PBS bei 4°C, wurden die Gehirne in 30% Saccharose/PBS bei 4°C bis zur Verwendung, aber mindestens ÜN aufbewahrt. Zum Schneiden wurden die Gehirne entsprechend der Schnittrichtung auf Trockeneis mit O.C.T.-Gefrierlösung (Firma Vogel) auf die Probenplatte des Mikrotoms (Leica SM2000R) gefroren und in 40 µm dicke Schnitte geschnitten. Die sogenannten *Floating-Schnitte* wurden mit einem feinen Pinsel vom Messer abgenommen und in CPS-Puffer in einer 96-well Platte bei 4°C aufbewahrt.

CPS (*Cryoprotectant Solution*)

250 ml Glycerol; 250 ml Ethylenglycol; 500 ml 0,1M Natriumphosphat-Puffer; ad 1 l H₂O

4.2.5.4 Schwarzgold-Färbung von Kryoschnitten

Die 40 µm dicken Kryoschnitte wurden mit Hilfe eines Siebes 2x in PBS gewaschen und anschließend in 2 ml 0,2%iger Schwarzgoldlösung in einer 6-well Platte ca. 30 min bei 60°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit dH₂O gestoppt. Die Schnitte wurden ÜN in PBS gelagert und dann auf Objektträger gezogen. Nach dem Trocknen wurden sie 10x in Rotihistol getaucht und mit Rotihistokit eingedeckelt.

4.2.5.5 Immunohistofärbung von Kryoschnitten

Für die Färbung wurden mehrere Schnitte mittels Pinsel in eine Vertiefung einer 24-well Platte überführt, in der sich ein feines Sieb und PBS befand. Die Schnitte wurden 3x mit PBS gewaschen, wobei sie mit Hilfe des Siebs von einer Vertiefung zur nächsten überführt wurden. Dieses Sieb ermöglichte eine schonendere und gleichmäßigere Behandlung der Schnitte, im Vergleich zum Pinsel. Es folgte eine Permeabilisierung mit 0,3% Triton X-100 in PBS für 30 min und anschließend mehrfaches Waschen mit PBS. Blockiert wurde mit Blocklösung, 1 h bei RT. Der 1. AK wurde in PBS verdünnt und ÜN bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Waschen mit PBS-Tween wurden endogene Peroxidasen durch 3% H₂O₂ in PBS, 15 min weitestgehend inaktiviert. Nach 3x Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit dem 2. AK (Biotin-konjugiert) für 2 h bei RT unter leichtem Schütteln. Die Schnitte wurden anschließend 3x mit PBS gewaschen und dann 30 min mit dem nach Herstellerangaben vorbereiteten ABC-Kit (Pierce) inkubiert, 2x mit PBS gewaschen und dann mit DAB entwickelt. Die Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und nach dem Trocknen mit Wasser gespült, dann 10x in Rotihistol getaucht und mittels Rotihistokit eingedeckelt.

Blocklösung

2% BSA, 2% Eselserum in PBS

4.2.6 Neuronale Zellkultur Experimente

4.2.6.1 Isolation von Neuronen

Hippokampale Neuronen wurden nach einem modifizierten Protokoll basierend auf Bekkers und Stevens isoliert (Bekkers and Stevens, 1991).

Zur Vorbereitung wurden 14 mm Deckgläser 24 h mit 1 M HCL unter Schütteln inkubiert, anschließend 8x mit dH₂O und 2x mit 70%igem Ethanol gespült und dann in 99%igen Alkohol gelagert. Die Deckgläschen wurden vor der Präparation nach kurzem Abflammen in 24-well Platten gelegt und mit einem Gemisch von 600 µl 17 mM Essigsäure, 200 µl Poly-(D)-Lysin und 200 µl Collagen beschichtet. Die Enzymlösung wurde 15 min mit CO₂ begast, steril filtriert und nach Zugabe von 25 U Papain/ml Enzymlösung 1 h bei 37°C, 900 rpm inkubiert. Das Gehirn der Jungtiere (4.2.2) wurde in gekühltes HBSS-Medium (Invitrogen) gelegt. Die Hippokampi wurden präpariert und in die vorinkubierte Papain-haltige Enzymlösung gegeben und für 1 h bei 37°C mit 900 rpm im Thermoschüttler verdaut. Maximal sechs Hippokampi Paare wurden im Abstand von 5 min präpariert. Nach 1 h wurde die Enzymlösung gegen 800 µl Stopplösung ausgetauscht und weitere 5 min bei 37°C und 900 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Stopplösung entfernt und 300 µl Dissoziationslösung zugegeben und mit einer P200-Pipette das Gewebe mechanisch zerkleinert. Die ersten 200 µl wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und erneut 200 µl Dissoziationslösung zu der restlichen Lösung gegeben, wieder mechanisch zerkleinert und mit der vorherig abgenommenen Dissoziationslösung vereinigt. Die dissoziierten Hippokampi wurden 10 min bei 100x g in einer Schwingrotorzentrifuge zentrifugiert, das Dissoziationsmedium abgenommen und gegen 2 ml Neuronenmedium ausgetauscht. Das zellhaltige Neuronenmedium eines Hippokampipaars wurde gleichmäßig auf 6 wells einer 24-well Platte verteilt bzw. 0,4 ml in 2 wells einer 24-well Platte und der Rest in eine beschichtete 3,5 cm Petrischale. Nach vier Tagen wurde das Medium zur Hälfte entfernt und gegen frisches Neuronenmedium ausgetauscht, welches 3 µg FUDR pro Milliliter Medium enthielt. FUDR ist ein Mitosehemmer, der die Zellteilung vorhandener Astrozyten und Oligodendrozyten verhindert. Das Neuronenmedium wurde alle vier Tage jeweils zur Hälfte des Volumens gewechselt.

Enzymlösung

2 mg Cystein; 50 ml DMEM (Invitrogen); 1mM CaCl₂; 0,5mM EDTA

Dissoziationslösung

47 ml DMEM; 5% FCS; 0,5 ml Penicillin/Streptomycin (=100U/ml Pen; 0,1 mg/ml Strep)

Stopplösung

75 mg Albumin; 75 mg Trypsin Inhibitor; 30 ml Dissoziationslösung

Neuronenmedium

49 ml Neurobasal A (Invitrogen); 1 ml B27 (Invitrogen); 0,5 ml Glutamax (Invitrogen); 0,5 ml Pen/Strep

FUDR-Lösung

25 mg 5-fluoro-2'-desoxyuridin (Sigma); 62,5 mg Uridin (Sigma); 12,5 ml DMEM

4.2.6.2 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Für die Färbung wurden auf Objektgläsern gewachsene Zellen (4.2.6.1) 15 min mit 4% FA-Lösung fixiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen. Es folgte der Transfer der Deckgläser in eine Feuchtkammer, die Permeabilisierung der Zellen mittels 0.3% Triton X-100 in PBS für 15 min, 3x Waschen mit PBS und anschließend die Blockierung mit Blocklösung (4.2.5.5) für 1 h. Die Zellen wurden ÜN bei 4°C mit entsprechend in PBS verdünnten 1. AK (Tab. 3) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3x mit PBS, 1x PBS-Tween und 2x PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem fluoreszenzgekoppelte 2. AK (fluorophorkonjugierten) für 2 h bei RT. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS, 1x PBS-Tween, 2x PBS und 2x mit dH₂O gewaschen. Die Zellen wurden mittels Fluorescence Mounting Medium (Dako) eingedeckelt. Die Färbungen wurden am Konfokalmikroskop Leica SP5 und der Software Leica LAS AF ausgewertet.

4.2.6.3 Sholl-Analyse

Die Zellen wurden wie unter 4.2.6.2 beschrieben mit einem anti-MAP2 AK und einem sekundären fluorophorkonjugierten AK gefärbt und mit einem 20er Objektiv eines nicht-konfokalen Leica CTR6000 Mikroskop untersucht. Die Ausmessung der Dendriten erfolgte mittels CorelDraw-Software durch Zeichnung konzentrischer Kreise mit definiertem Radius um das Soma der Zelle. Es wurde die Anzahl der Kreuzungspunkte von Dendriten mit dem jeweiligen Ring bestimmt.

4.2.6.4 Exozytose-Versuch

Hippokampale Neuronen wurden wie in 4.2.6.1 beschrieben isoliert und auf Objektgläser ausgesät. Nach 13 Tagen in Kultur erfolgte der Exozytose-Versuch. Ein Objektglas mit Neuronen wurde in eine Perfusionskammer (RC-20, Warner Instruments) in das Zeiss-

Stereomikroskop (Zeiss Axiovert 200) eingespannt und zuerst mit 2 ml Imaging Puffer (mit 10 μ M CNQX, Sigma) gewaschen und anschließen in diesem Puffer 5 min inkubiert. Die Zugabe von 10 μ M CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) diene der Inhibierung von rückläufigen Signalen durch Blockierung der AMPA/NMDA-Rezeptoren. Durch eine 5-minütige Inkubation in Hoch-KCl Puffer (mit 10 μ M CNQX) mit 10 μ M FM1-43 (Invitrogen) wurde die Zellmembran der Neuronen depolarisiert, Aktionspotentiale und somit Exozytose ausgelöst. Der Farbstoff lagerte sich an die nun exponierten Membranen an und wurde über natürlich folgende Endozytose in Vesikel aufgenommen. Zur Erholung der Zellen und zur vollständigen Färbung der Vesikel wurde das KCl durch waschen mit 2 ml Imaging Puffer entfernt und anschließend 10 min in Imaging Puffer mit 10 μ M FM1-43 inkubiert. Um überschüssigen Farbstoff gut zu entfernen, aber eine Entladung der Vesikel zu verhindern wurde ein Imaging-Puffer ohne CaCl_2 zum Waschen verwendet. Das Waschen erfolgte im Wechsel zwischen 3 ml Waschen, 2 min Inkubation, 3 ml Waschen und 5 min Inkubation. Um wieder extrazellulär CaCl_2 im System zu haben, wurden die Zellen noch einmal mit 4 ml Imaging Puffer gespült. Dies war erforderlich, da ansonsten keine Exozytose stattgefunden hätte. Die Anregung des Farbstoffes erfolgte durch einen Polychrom II Monochromator (TILL photonics) mit 480 nm und einer Detektion mittels Breitbandfilter. Jede Sekunde wurde eine Aufnahme gemacht und nach 20 s Hoch-KCl-Puffer mit 1 ml/min zugeführt, der kontinuierlich abgesaugt wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software TiLLvisIon v3.4. Nur sich entladende Synapsen wurden in der Analyse berücksichtigt. Es wurde ein ROI (*Region of Interest*) um ein Vesikel gelegt und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität nach Abzug des Hintergrundsignals ermittelt. Unter Verwendung von GraphPad Prism erfolgte die nichtlineare Regression „Plateau mit einphasigem Abstieg“, die Berechnung der Halbwertszeit $t_{1/2}$ und die statistische Analyse (ungepaarter T-Test) drei unabhängiger Zellpräparationen.

Imaging-Puffer

145 mM Na Cl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl_2 ; 1 mM CaCl_2 ; 10 mM Glukose; 10 mM HEPES; pH 7,4

Hoch-KCl Puffer

55 mM NaCl; 90 mM KCl; 1 mM MgCl_2 ; 1 mM CaCl_2 ; 10 mM Glukose; 10 mM HEPES; pH 7,4

4.2.6.5 Elektronenmikroskopie an Hippokampalen Neuronen

Hippokampale Neurone wurden isoliert wie unter 4.2.6.1. beschrieben. Ein Teil der Nervenzellen wurden auf Lumox 35 mm Petrischalen (Greiner) ausgesät. Nach zwei Wochen in Kultur wurden die Zellen in 3% Formaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer für 4 h in den Schalen fixiert. Die Eponeinbettung erfolgte in den Petrischalen und wurde von der Technischen Assistenten Frau Marianne Vannauer durchgeführt. Nach dem Waschen der Zellen mit Cacodylatpuffer wurden die Zellen mit 1% Osmiumtetroxid, pH 7,5 für 2h bei Raumtemperatur behandelt, zweimal mit Cacodylatpuffer gewaschen und dann durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert.

15 min	30% EtOH, 4°C
2x30 min	50% EtOH, 4°C
	70% EtOH, 4°C, ÜN
30 min	70% EtOH, 4°C
2x 30 min	90% EtOH, 4°C
2x 30 min	100% EtOH, 4°C

Die Einbettung in Epon ging wie folgt:

2x 30 min	Propylenoxid, RT
2x 30 min	Propylenoxid/ Epon 1:1, RT
2x 30 min	Propylenoxid/ Epon 1:2, RT
1x 3 h	Epon, RT
1x	Epon, RT, ÜN

Das Epon wurde noch einmal gewechselt und dann für 2-3 Tage bei 60°C ausgehärtet. Anschließend wurden kleine Stücke aus der Petrischale ausgeschnitten und in Förmchen auf zähem Epon aufgesetzt und noch einmal miteinander ausgehärtet. Dies ermöglichte eine bessere Schneidbarkeit der Zellen. Schnitte wurden von Frau Vannauer in 70 nm Dicke angefertigt und mit Uranylazetat und Bleizitrat kontrastiert. Die Schnitte von drei Tieren aus zwei unabhängigen Präparationen wurden am Zeiss 910 Elektronenmikroskop untersucht und Bilder mittels CCD Kamera (Proscan) aufgenommen. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der iTEM Software (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany).

4.2.7 Elektrophysiologie an Gehirnschnitten

Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Schmitz, an der Charité, Berlin von Dr. Ulrike Pannasch durchgeführt und ausgewertet. Hippokampale Gehirnschnitte von drei Monate alten Mäusen wurden wie in Schmitz *et al.*, 2003 beschrieben, angefertigt (Schmitz *et al.*, 2003). Das Gehirn wurde aus isoflurananesthetisierten Mäusen entnommen und Gewebelöcher mit Subikularbereich und Hippokampus in die Kammer des Vibratoms (Leica VT1200) mit eiskalten artifiziellen Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF) platziert. Transverse Schnitte von 400 µm wurden für 30 min bei 35°C aufbewahrt. Die Schnitte wurden dann auf Raumtemperatur äquilibriert und in ACSF-A Lösung überführt. Nach 1-7 h Lagerung der Schnitte in ACSF-A wurden die Schnitte in die Aufnahmekammer überführt und dort mit 3-4 ml/min ACSF-A bei 34°C durchströmt. Extrazelluläre Feld- und Ganzzell-*Patch-Clamp* Aufnahmen wurden durch Stimulierung der Schaffer-Kollateralen in der CA1-Region im *Stratum radiatum* mit ACSF-A gefüllter Glaspipette unter Verwendung des Stimulus Isolators gemessen (ISO-flex, A.M.P.I). Stimulierungsartefakte wurden gegen Prä-Stimulus-Werte abgeglichen. Verlängerte wiederholende Stimulierung bei 10 Hz wurden für 60 s in Gegenwart von 50 µM APV ((2*R*)-amino-5-phosphonovalersäure) durchgeführt. LTP wurde durch tetanische Stimulierung der Schaffer-Kollateralen (2 Folgen von 100 Hz für 1 s, 20 s Abstand) induziert. Die Messdaten wurden mittels Axopatch 700B Amplifizierer erhalten (Molecular Devices), digitalisiert bei 5 kHz, gefiltert bei 2 kHz, gespeichert und mit IGOR Pro 4 Software (Wavemetrics) analysiert.

ACSF

87 mM NaCl; 75 mM Saccharose; 26 mM NaHCO₃; 2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH₂PO₄; 0,5 mM CaCl₂; 7mM MgSO₄; 25 mM Glukose; Gesättigt mit 95% O₂, 5% CO₂, pH 7,4

ACSF-A

119 mM NaCl; 26 mM NaHCO₃; 10 mM Glukose; 2,5 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1,3 mM MgCl₂; 1 mM NaH₂PO₄; Gesättigt mit 95% O₂, 5% CO₂, pH 7,4

4.2.8 Verhaltensanalysen

Für die Verhaltenstests wurden Tiere verwendet, die sechs Generationen auf C57/Bl6 zurück gekreuzt waren. Die Tiere wurden zwei Tage vor der Versuchsdurchführung in den

Nebenraum des Versuchslabors gebracht, um den Versuch nicht durch Transportstress zu beeinflussen. Die Mäuse wurden geordnet nach ihrer Ohrnummer und nicht nach Genotyp dem Verhaltenstest unterzogen.

4.2.8.1 Context-Fear-Conditioning

Für diesen Versuch benötigte man eine Testbox mit einem Gitterboden zur Stromapplikation von 0,7 mA, ein Lautsprecher 60 dB, eine Kamera sowie einen Computer und Versuchssoftware (Med Associates) zur zeitlichen Koordinierung des Versuchs. Der Versuch wurde nach Angaben von Wehner und Radcliffe durchgeführt (Wehner and Radcliffe, 2004). Am ersten Tag wurde die Maus unter eingeschaltetem Weiß- und Infrarotlicht in die Testbox gesetzt und die Videoaufzeichnung begonnen. Nach 2 min erfolgte ein Ton von 60 dB, 10 kHz. Nach 13 s wurde zusätzlich für weitere 2 s über die Fußplatte ein Strom von 0,7 mA appliziert. Nach einer Ruhezeit von 2 min wiederholte sich die beschriebene Ton- und Stromapplikation (Konditionierung). Die Maus wurde nach der 2. Stromgabe für 30 s in der Testbox belassen und dann in den Zuchtkäfig überführt. Am zweiten Tag wurde die Maus zuerst unter den gleichen Lichtbedingungen wie am Vortag für 3 min in die Testbox gesetzt (Kontext). Die Testbox wurde nach gutem Auslüften mit einer weißen Schaumgummiwand ausgekleidet und das Fußgitter mit einer weißen Plastik abgedeckt, um die Optik zu verändern. Des Weiteren wurde ein Duftstoff (Männerdeodorant) neben die Testbox gestellt und das Weißlicht ausgeschaltet. Die Maus wurde in die Box gesetzt und ihr Verhalten für 3 min vor dem Ertönen des gleichen Tons, wie am Vortag (prä Ton), als auch 3 min während des Ertörens des Tons beobachtet (Ton). Die Auswertung des Versuches erfolgte mit Hilfe der Med-Software (Med Associates). Die Software errechnete anhand der Videoaufzeichnung den prozentualen Anteil, in der die Maus sich nicht bewegte (*freezing*). Mit Hilfe des GraphPad Prism Programms wurden diese Werte statistisch mit TwoWayANOVA ausgewertet.

4.2.8.2 Open-Field

Die Mäuse wurden einzeln für 3 min in einen normalen Käfig mit Streu und einem Gitterdeckel mit Zugang zu Futter und Trinken gesetzt. Der Käfig befand sich in einem Rahmen mit an entsprechend gegenüberliegenden Seiten angebrachten Lichtschrankensendern und-empfängern. Die Lichtschranken waren in x-y-Orientierung ausgerichtet. Um ein

Verlassen der Maus aus der x-y-Orientierung durch Klettern am Deckergitter zu verhindern, wurde der größte Bereich des Deckelgitters (außer Futter und Trinkflaschenbereich) mit einer durchsichtigen Plastikfolie abgespannt. Mit Hilfe der ActiMot-Software wurde die Bewegung der Mäuse (anhand der durchbrochenen Lichtschranken) detektiert und ausgewertet. Eine statistische Analyse erfolgte mittels GraphPad Prism als ungepaarter T-Test.

4.2.8.3 Barnes-Labyrinth

Die Versuchsdurchführung orientierte sich an Sunya *et al.* (Sunyer, 2007).

Das Labyrinth bestand aus einer weißen runden Platte mit 20 Löchern entlang des Randes. Unter einem der Löcher war eine dunkle Box installiert. Um das Labyrinth befanden sich mehrere Markierungen (Kreise, Dreiecke), um der Maus die räumliche Orientierung zu ermöglichen. Ziel des Versuches war zu ermitteln, ob und wie gut die Maus sich erinnert, unter welchem Loch der Rückzugsort (Box) lag. Ausgenutzt wurde bei diesem Versuch, dass Mäuse einen dunklen, nicht exponierten Ort bevorzugen, also die Box anstatt der hellen Platte. Zu Beginn des ersten Tages wurde den Mäusen die Rückzugsbox gezeigt. Hierfür wurde die Maus in eine runde Startbox in der Mitte des Labyrinths gesetzt. Nach 10 s wurde diese entfernt. Leichte Vibration der Platte motivierte die Maus zum Laufen. Sie wurde behutsam zu dem Loch mit der Rückzugsbox gelenkt. Sobald die Maus in der Box war, wurde die Vibration gestoppt und die Maus für 2 min dort belassen. Nach der Gewöhnung aller Mäuse folgte die Lernphase. Für diese wurde die Maus in die Startbox gesetzt, nach 10 s die Box entfernt und die Vibration der Platte aktiviert. Die Maus erkundete für maximal 3 min das Labyrinth. Falls sie das Loch mit der Rückzugsbox nicht innerhalb der 3 min gefunden hatte, wurde sie wiederum behutsam zu dieser geführt und dann für 1 min in der Box belassen und die Vibration ausgeschaltet. Diese Übung wurde insgesamt viermal pro Tag für vier Tage durchgeführt mit einem Intervall von mindestens 15 min zwischen den Tests. Nach jedem Test wurde die Platte und die Box gesäubert und nach jedem Durchgang das Labyrinth gedreht, um Beeinflussung durch Duftspuren zu verhindern. Am 5. Tag wurde der oben beschriebene Versuch wiederholt, wobei diesmal die Maus 90 s auf der Plattform blieb und die Rückzugbox verschlossen war. Ziel war zu ermitteln, wie oft die Maus die Rückzugsbox am richtigen Loch sucht und wie lange sie braucht, um dieses zu finden. Um die Langzeiterinnerungsfähigkeit zu testen, wurde dieser Test 5 Tage später, ohne weiteres Training, wiederholt. Die Aufzeichnung der Versuche erfolgte mittels Deckenkamera und wurde manuell ausgewertet.

4.2.9 Statistik

Für die Auswertung wurde die GraphPad Prism 5.0-Software (GraphPad Software Inc.) verwendet. Die Messwerte wurden gemittelt und als Mittelwert mit Standardabweichung (S.E.M.) dargestellt. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte mittels Student T-Test und der Vergleich von mehr als zwei Gruppen mittels one-way ANOVA. Um den Einfluss zweier Parameter zu vergleichen wurde der two-way ANOVA Test durchgeführt. P-Werte mit * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0.001$ wurden als signifikant betrachtet.

5 Ergebnisse

5.1 Generierung gehirnspezifischer CAR-Knockout-Modelle

Um die neuronale Funktion des Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptors zu untersuchen, wurden von uns konditionelle gehirnspezifische CAR-KO-Modelle generiert. Dies war erforderlich um die embryonale Letalität des konventionellen CAR-Knockouts (KO) zu umgehen. In der Arbeitsgruppe bereits vorhandene CAR^{recf/recf} Tiere (Lisewski et al., 2008; Shi et al., 2009) wurden mit Cre-Rekombinase (Cre) -exprimierenden Mäusen verpaart. Die genetisch modifizierten CAR^{recf/recf} Tiere sind homozygot für das gefloxtete Allel (Recf, Abb. 7). In diesem Recf-Allel ist das erste Exon des CAR-Gens, welches das Start-ATG für die Transkription enthält, mit loxP-Sequenzen flankiert. Die Expression der Cre unter Kontrolle des Nex-Promotors (Goebbels et al., 2006) bzw. des CamKII α -Promotors (Casanova et al., 2001) führt in CAR^{recf/recf} Tieren zur Deletion des 1. Exons beider Allele durch Rekombination der loxP-Sequenzen. Die CAR-KO-Tiere (Nex-CAR-KO und CamKII α -CAR-KO) sind lebensfähig und fertil. Sie weisen keine offensichtlichen Verhaltensauffälligkeiten auf.

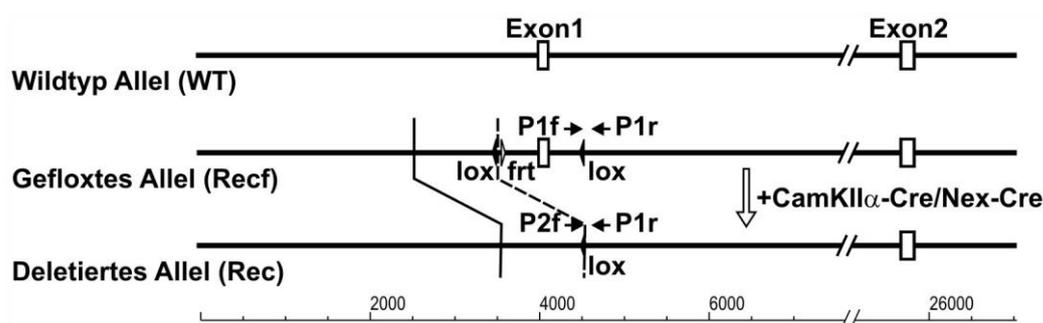


Abb. 7: Generierung konditioneller CAR-Knockout-Modelle. In homozygoten genetisch modifizierten CAR-Tieren (CAR^{recf/recf}) ist das 1. CAR Exon durch loxP-Sequenzen flankiert (Recf). Die Verpaarung dieser CAR^{recf/recf} Mäuse mit Nex-Cre bzw. CamKII α -Cre Mauslinien führte zur Deletion des CAR-Exon 1 durch Rekombination der loxP-Sequenzen im Gehirn (Rec).

Der Genotyp der Mäuse wurde mittels PCR überprüft. Mitunter kann es auf Grund des genetischen Hintergrundes einer Maus zu unerwarteter Cre-Aktivität in Organen kommen, in denen der Promotor normalerweise nicht aktiv ist (Hébert and McConnell, 2000). Um eine unerwünschte Rekombination der loxP-Sequenzen im Herzen auszuschließen, wurde DNA aus dem Gehirn und dem Herz mittels PCR überprüft (Abb. 8). Die Primerpaare P1f und P1r

(Abb. 7) weisen das Recf- und das Wildtyp-Allel und die Cre-Primer das Cre-Rekombinasegen nach.

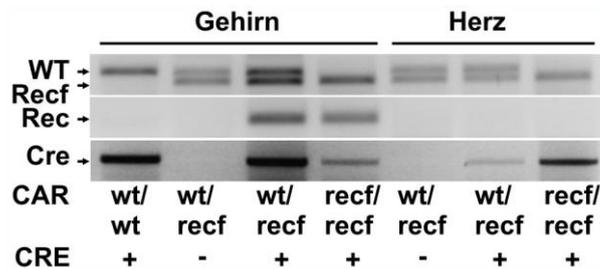


Abb. 8: Überprüfung der Rekombination der loxP-Sequenzen mittels PCR. Das Wildtyp-Allel (WT) und das Recf-Allel wurden mittels P1f/P1r-Primerpaar nachgewiesen. Wildtyp-CAR-Tiere (CARwt/wt) zeigten die WT-Bande. Homozygote CAR-Tiere (CARrecf/recf) ergaben die Recf-Bande, während heterozygote CAR-Tiere (CARwt/recf) beide Banden aufwiesen. In Anwesenheit der Nex-Cre (CRE+) wurde die Rekombinationsbande (Rec) mittels des P2f/P1r-Primerpaares nur im Gehirn CAR Recf-Allel-haltiger Tiere nachgewiesen.

Im Gegensatz zum Gehirn konnte im Herzen keine Rekombinationsbande (Rec) in Nex-Cre exprimierenden CAR Tieren nachgewiesen werden.

5.2 Verifizierung der CAR-Knockout-Modelle

Durch die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Nex- bzw. des CamKII α -Promotors kam es zu unterschiedlicher lokaler und zeitlicher Rekombination des geflochten Allels in den Nex- bzw. CamKII α -CAR-KO-Tieren. Während die Nex-Cre-Rekombinase ab dem embryonalen Tag (E) 12 exprimiert wird, ist die CamKII α -Cre-Expression ab dem postnatalen Tag (P) 3 nachweisbar (Goebbels et al., 2006; Casanova et al., 2001).

Um zu überprüfen, in welchen Arealen das CAR-Protein in den CAR-KO-Tieren deletiert war, wurden die CAR-Expression immunohistochemisch in Gehirnschnitte sieben Tage alter Mäuse untersucht. Im Vergleich zu Kontrollgeschwistertieren ohne Nex-Cre (Nex-), war in Nex-CAR-KO-Tieren (Nex+) das Signal (Braunfärbung) für das CAR-Protein im Kortex und Hippokampus, im Riechhirn und im Kleinhirn reduziert. Die CamKII α -CAR-KO-Tiere (CamKII α +) zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren (CamKII α -) eine starke Verringerung des CAR-Signals in nahezu allen Gehirnregionen (Abb. 9).

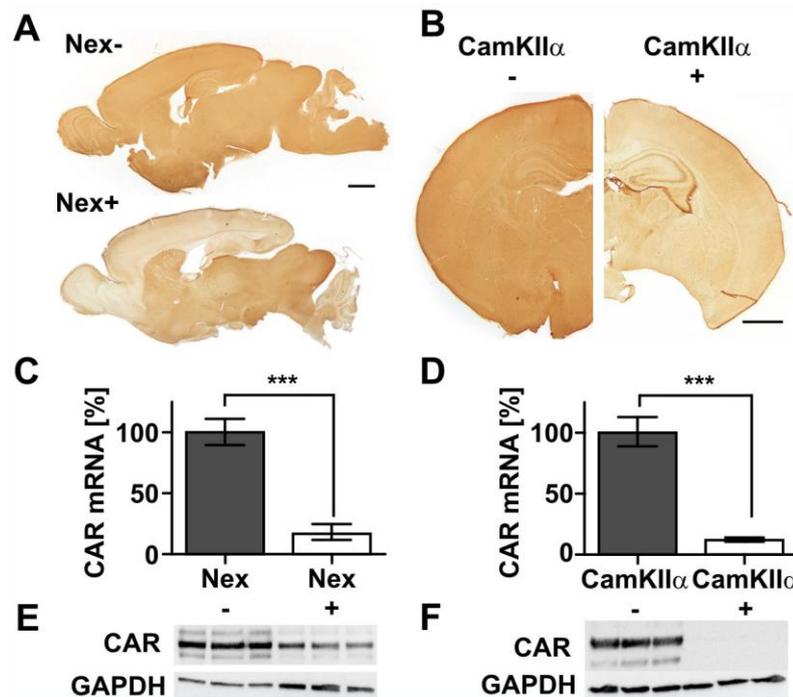


Abb. 9: Verifizierung der CAR-Knockout-Modelle. (A) Immunohistochemiefärbungen mit einem anti-CAR Antikörper an 40 μm *Floating*-Gehirnschnitten 7 Tage alter Mäuse zeigten die Verringerung des CAR-Signals in Nex-CAR-KO-Tieren (Nex+) im Kortex, Hippokampus, Riechhirn und Kleinhirn. (B) In CamKII α -CAR-KO-Tieren (CamKII α +) war das CAR-Signal in nahezu allen Gehirnarealen reduziert. (C und D) Auf mRNA-Ebene war die CAR-Expression im Kortex inklusive Hippokampus im Nex-CAR-KO auf ca. 25% im Vergleich zu Kontrolltieren und im CamKII α -CAR-KO auf ca. 10% reduziert (Normalisierung auf GAPDH-RNA; T-Test, *** $P \leq 0.001$; $n = 3$ pro Genotyp). (E und F) Auf Proteinebene ist CAR im Nex-CAR-KO auf 50% reduziert im Vergleich zu Kontrolltieren. Im CamKII α -CAR-KO war CAR im Kortex inklusive Hippokampus nicht detektierbar. Größenbalken 1 mm.

Um die Effizienz der Rekombination zwischen Nex-CAR-KO-Tieren und CamKII α -CAR-KO-Tieren vergleichen zu können, wurde der Kortex zusammen mit dem Hippokampus vom restlichen Gehirn sieben Tage alter Mäuse separiert, da in diesen Arealen das CAR-Signal in beiden CAR-KO-Modellen reduziert war. Aus diesen Geweben wurde sowohl mRNA als auch Proteinlysate gewonnen. Der Nachweis des Expressionsniveaus erfolgte durch quantitative *reverse-transcriptase*-PCR (qRT-PCR) bzw. Westernblot-Analyse. Auf mRNA-Ebene war die Expression von CAR in beiden KO-Modellen stark verringert. Auf Proteinebene war jedoch ein höherer Verlust von CAR in CamKII α -CAR-KO-Tieren erkennbar als in Nex-CAR-KO-Mäusen, eventuell auf Grund unterschiedlicher CAR-Proteinstabilität in verschiedenen Zelltypen.

Zur weiteren Charakterisierung der CAR-KO-Modelle wurde die Rekombinationseffizienz beider Cre-Rekombinasen an isolierten hippocampalen Neuronen überprüft. Expressionsstudien an zwei Wochen alten Kulturen mittels qRT-PCR zeigten eine Reduktion der CAR-mRNA auf unter 5% in Neuronen von CamKII α -CAR-KO-Tieren (CamKII α +) im Vergleich zu Neuronen aus Kontrollgeschwistertieren (CamKII α -). In gleichaltrigen Neuronen aus Nex-CAR-KO-Tieren (Nex+) war die CAR-Expression auf circa 75% reduziert im Vergleich zu Kontrollzellen (Nex-; Abb. 10A). Eine Detektion des CAR-Proteins mittels anti-CAR Antikörper und sekundären fluorophorkonjugiertem Antikörper in hippocampalen Neuronen aus CamKII α -CAR-KO- und Kontrolltieren demonstrierte einen Rückgang der CAR-Proteinmenge ab Tag 4 *in vitro* (*days in vitro*; div) und einen Verlust des CAR-Signals an Tag 7 in Kultur (Abb. 10B). Zusätzlich zeigte die Immunfärbung der hippocampalen Neurone eine Lokalisierung von CAR in der Zellmembran des Zellkörpers und der Zellfortsätze.

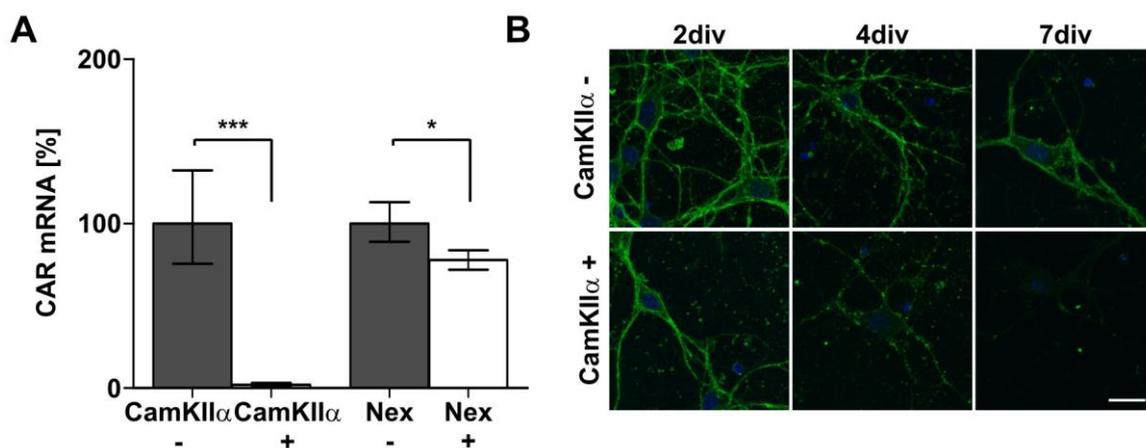


Abb. 10: Expression und Lokalisation von CAR in hippocampalen Neuronen. (A) Ein Vergleich der CAR-Expression in 14 Tage alten Kulturen hippocampaler Neurone belegte eine stärkere Reduktion der CAR-mRNA-Menge in CamKII α -CAR-KO- (CamKII α +) Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (CamKII α -) als in Nex-CAR-KO- (Nex+) Neuronen im Vergleich zu Kontrollzellen (Nex-) (Normalisierung auf 18S-RNA; T-Test, * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$, $n = 4$ pro Genotyp). (B) Immunodetektion von CAR mittels anti-CAR Antikörper (grün) in CamKII α -CAR-KO- und CamKII α -CAR-Kontrollneuronen, zeigte eine Reduktion von CAR in CamKII α -CAR-KO- (CamKII α +) Zellen ab Tag 4 in Kultur (div). In 7 Tage alten Kulturen war kein CAR-Signal mehr in den CamKII α -CAR-KO-Neuronen detektierbar. Größenbalken 50 μm .

Die Quantifizierung der CAR-mRNA-Menge in den hippocampalen Neuronen bestätigte, dass die CamKII α -Cre-Rekombinase sowohl in Gehirngewebe, als auch in hippocampalen Neuronenkulturen zu einer effizienteren Verringerung der CAR-Expression führte, als die Nex-Cre-Rekombinase. Zusätzlich zeigte die zeitliche Verfolgung des CAR-Verlustes in den hippocampalen Neuronen, dass sich die Zellen des CamKII α -CAR-KO Stamms ab Tag 7 in Kultur als Modellsystem für zelluläre Untersuchungen eignen.

5.3 Unauffällige morphologische Entwicklung in CAR-defizienten Tieren

Verschiedene Arbeitsgruppen vermuten eine Funktion von CAR während der Zellmigration (Zen et al., 2005; Mirza et al., 2007; Fok et al., 2007; Hotta et al., 2003). Dies ist ein Prozess, der vorwiegend während der pränatalen aber auch während der postnatalen Gehirnentwicklung stattfindet (Rice and Barone, 2000; Daston et al., 2004).

Um zu untersuchen, ob ein embryonaler (Nex-CAR-KO-Tiere) oder neonataler (CamKII α -CAR-KO-Tiere) Verlust des CAR-Proteins im Gehirn zu einer Veränderung der neuronalen Zellwanderung führt, wurde eine Nissl-Färbung an Gehirnschnitten sieben Tage alter Mäuse durchgeführt (Abb. 11, Abb. 31 im Anhang). Bei dieser Methode werden die Nissl-Schollen am Axonhügel im Soma einer Nervenzelle mittels Thionin blau angefärbt, wodurch die Zellkörper der Nervenzellen erkennbar werden. Die Abfolge von zellkörperreichen und zellkörperarmen Abschnitten ist bei Mäusen stark konserviert und sehr gut charakterisiert (Dong and Science, 2008). Ein Vergleich von KO-Tieren beider CAR-KO-Modelle mit Kontrollgeschwistertieren ergab keinen Unterschied in der Anordnung der Nervenzellen, wie Abbildung 11 für den CamKII α -CAR-KO-Stamm belegt.

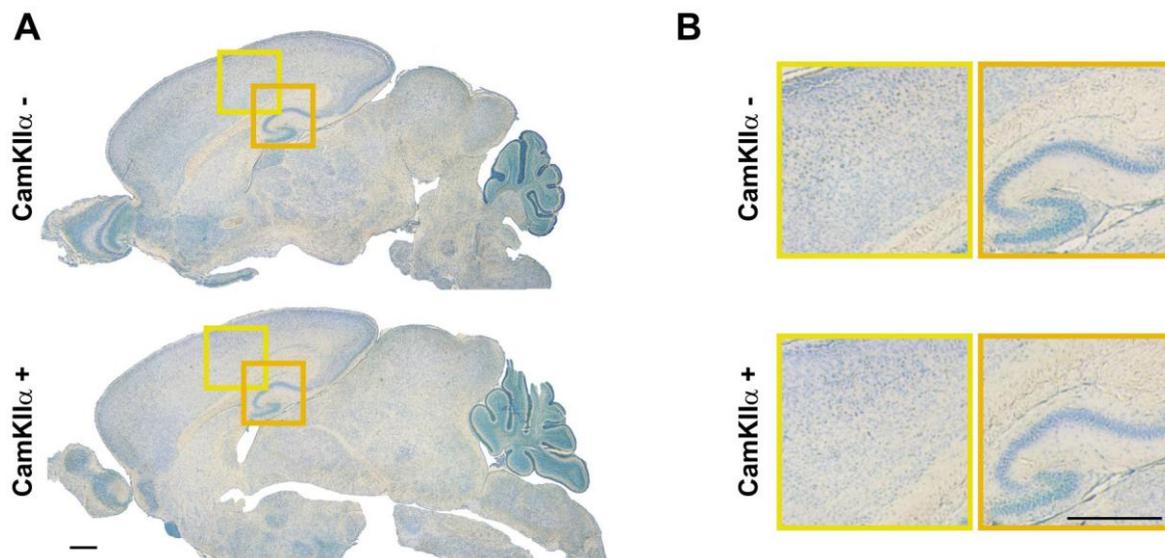


Abb. 11: Morphologische Untersuchung des CamKII α -CAR-KO-Stamms mittels Nissl-Färbung. (A) Durch Thionin wurden in Paraffinschnitten von Gehirnen 7 Tage alter Mäuse die Nissl-Schollen der Nervenzellen angefärbt. Die Anordnung der Nervenzellkörper in CamKII α -CAR-KO-Gehirnen (CamKII α +) unterscheidet sich nicht von der Anordnung in Kontrollgehirnen (CamKII α -). (B) Vergrößerung eines Teils des Kortex und Hippokampus von (A). Größenbalken 500 μ m.

Im Gehirn werden Zell-Zellkontakte zwischen und innerhalb verschiedener Zelltypen gebildet wie beispielsweise zwischen Oligodendrozyten und Nervenzellen bei der Bildung der Myelinscheide. Proteine der IgSF sind in diesen Prozess involviert, wie auch in die Bündelung und dem Längenwachstum von Axonen (Stoeckli, 2004; Maurel et al., 2007; Thompson et al., 2002; Lemmon et al., 1989; Niethammer et al., 2002). Die Myelinscheide der Axone kann mit Hilfe der Schwarzgold-Färbung sichtbar gemacht werden. Um zu überprüfen, ob der Verlust von CAR sich auf die Myelinierung oder die Anordnung der Axone auswirkt, wurden Gehirnschnitte 70 Tage alter Mäuse mit dieser Methode gefärbt. Der Vergleich der gefärbten Gehirnschnitte von Nex-CAR-KO-Tieren und CamKII α -CAR-KO-Mäusen mit ihren Geschwisterkontrolltieren ergab eine Übereinstimmung der Farbintensität und der Anordnung der Axone zwischen den Genotypen, wie Abbildung 12 für den CamKII α -CAR-KO-Stamm zeigt. Die Nissl- und die Myelinfärbung des Nex-CAR-KO-Stamms sind im Anhang Abbildung 31 zusammengefasst.

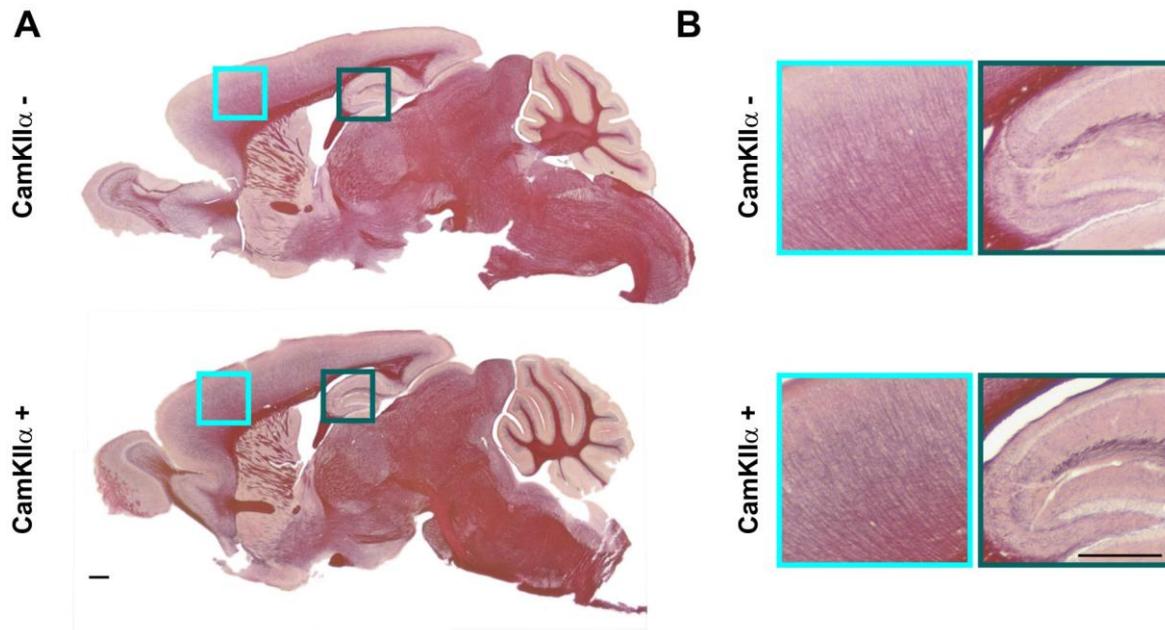


Abb. 12: Vergleich des CamKII α -CAR-KO-Stamms hinsichtlich Myelinierung und Axonstruktur. (A) Die Myelinscheiden wurden in 40 μm *Floating*-Gehirnschnitten von 70 Tage alten CAR-KO-Gehirnen (CamKII α +) und Kontrollgehernen (CamKII α -) mittels Schwarzgold-Methode angefärbt. (B) Die höhere Vergrößerung zeigt hinsichtlich der Signalstärke und der Anordnung der myeliniierten Axone eine hohe Übereinstimmung zwischen beiden Genotypen. Größenbalken 500 μm .

Neuronale Zelladhäsionsproteine der IgSF spielen nicht nur eine Rolle im Längenwachstum der Axone, sondern auch der Dendriten. Um eine Auswirkung des CAR-Verlustes auf das Wachstum dieser Fortsätze zu beurteilen, wurden isolierte hippocampale Neurone mittels Sholl-Analyse untersucht (Gutierrez and Davies, 2007). Da die Rekombinationseffizienz in den hippocampalen Neuronen der CamKII α -CAR-KO-Mäuse höher war, als in Nex-CAR-KO-Tieren, wurde der Versuch an Nervenzellen des CamKII α -CAR-KO-Stamms durchgeführt. Die Dendriten wurden mittels eines Antikörpers gegen das Zytoskelettprotein MAP2 (*microtubuli assoziiated proteine 2*) und entsprechendem sekundären fluorophorkonjugierten Antikörper angefärbt. Unter Verwendung des CorelDraw-Zeichenprogrammes wurden konzentrische Ringe mit definiertem Radius um das Soma der fotografierten Nervenzellen gezeichnet (Abb. 13A). Die Anzahl der Kreuzungspunkte zwischen den Dendriten und den Ringen wurde gegen den Abstand der Ringe vom Zellkörper aufgetragen (Abb. 13B). Die Dendritenlänge und die Verzweigung der Dendriten in 11 Tage alten hippocampalen Neuronenkulturen stimmten zwischen CamKII α -CAR-KO-Zellen und Kontrollzellen annähernd überein.

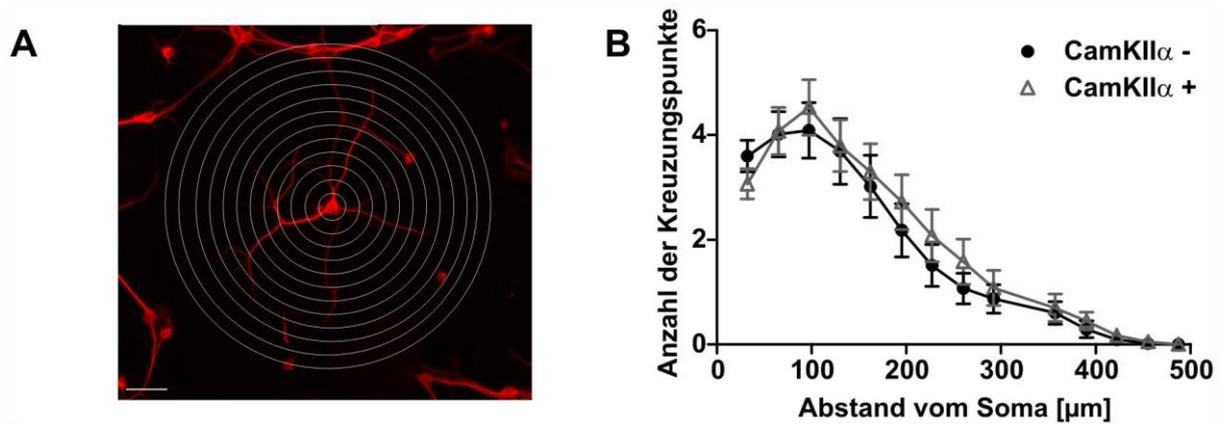


Abb. 13: Morphologische Untersuchung des Dendritenbaums hippocampaler Neurone mittels Sholl-Analyse. (A) Die Dendriten hippocampaler Neurone aus CamKII α -CAR-KO- (CamKII α +) und Kontrolltieren (CamKII α -) wurden mit anti-MAP2 Antikörper und entsprechendem sekundären Antikörper gefärbt. Mittels CorelDraw-Software wurden Ringe mit definiertem Radius um das Soma einzelner fotografiierter Nervenzellen gelegt. (B) Die graphische Darstellung der Anzahl an Dendriten im Verhältnis zur Entfernung vom Soma ergab eine hohe Übereinstimmung zwischen CamKII α -CAR-KO- und Kontrollzellen nach 11 Tagen in Kultur. (CamKII α +, n = 60; CamKII α -, n = 55). Größenbalken 50 μ m.

Die morphologischen Untersuchungen ergaben somit keine strukturellen Auffälligkeiten der Gehirne aus CamKII α -CAR-KO-Tieren oder Nex-CAR-KO-Mäusen. Da die Deletion von CAR im CamKII α -CAR-KO effizienter war als in Nex-CAR-KO-Tieren, wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung von CAR im ZNS am CamKII α -CAR-KO-Stamm durchgeführt.

Im Folgenden werden CamKII α -Cre exprimierende CAR $^{recf/recf}$ Tiere oder Zellen (CamKII α -CAR-KO) als KO und CAR $^{recf/recf}$ Tiere oder Zellen als Kontrollen (Ktr) bezeichnet.

5.4 CAR kolokalisiert mit Proteinen der Prä- und Postsynapse

Die subzelluläre Lokalisierung eines Proteins kann Hinweise auf die Funktion des Proteins geben. Arbeiten von Excoffon und Welsch zeigten eine Interaktion von CAR mit PSD95 (*postsynaptic density 95*) und β -Catenin in COS-7 bzw. humanen Endothelzellen des Atemtrakts (Excoffon et al., 2004). PSD95 ist Bestandteil des elektronendichten Bereiches der Postsynapse, β -Catenin kommt in Neuronen sowohl prä- als auch postsynaptisch vor (Arikkath and Reichardt, 2008; Okuda et al., 2007). Dies weist darauf hin, dass CAR auch in der Synapse lokalisiert ist.

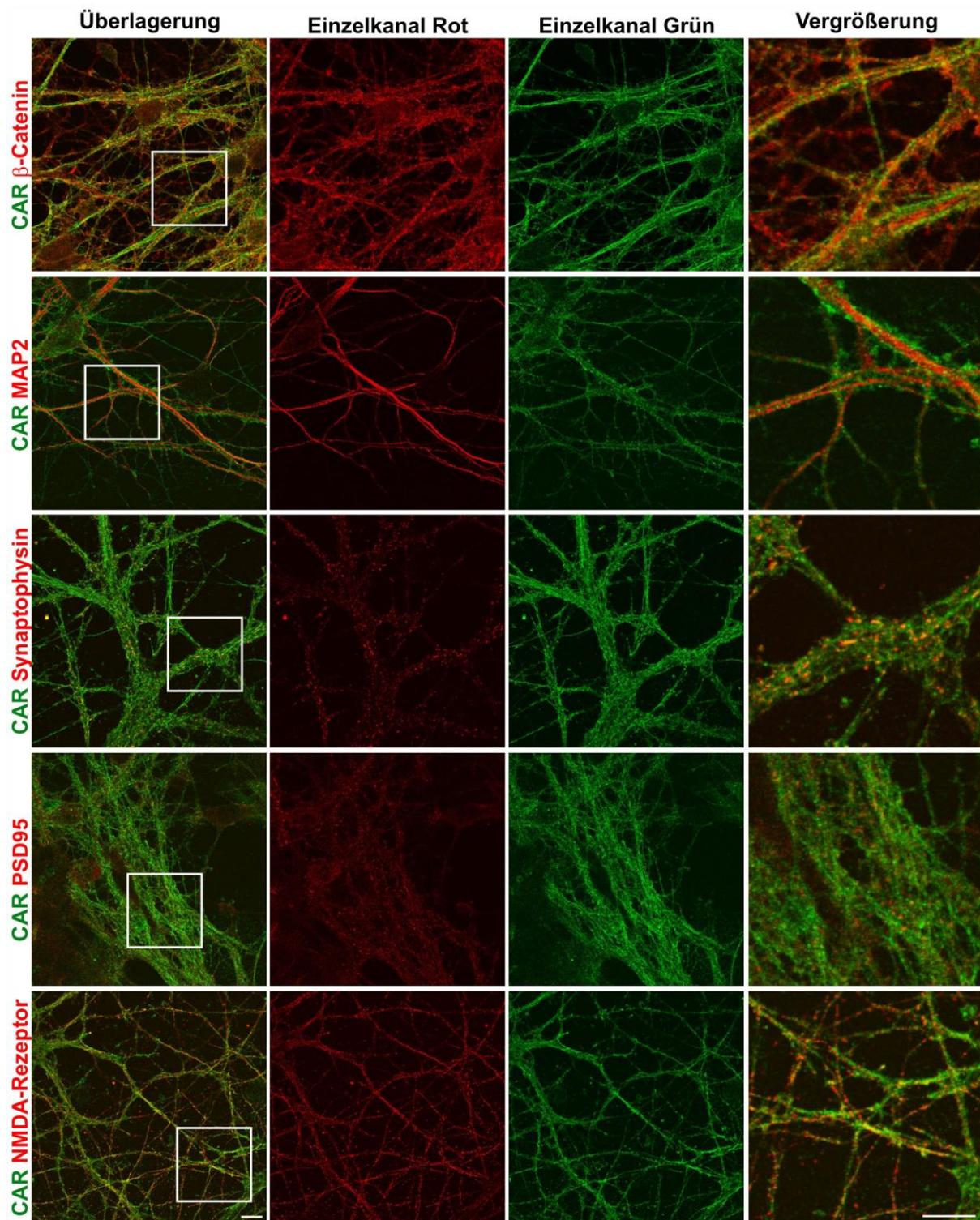


Abb. 14: CAR-Lokalisation in Neuronen. Immunfluoreszenzfärbung an 10 Tage alten hippocampalen Wildtyp-Neuronen zeigte eine partielle Kollokalisierung von CAR (grün) mit β -Catenin und MAP2, mit dem präsynaptischen Marker Synaptophysin und den postsynaptischen Proteinen PSD95 und NMDA-Rezeptor (jeweils rot). Größenbalken 10 μ m.

Um die Lokalisierung von CAR in hippocampalen Wildtyp-Neuronen zu überprüfen, wurden Ko-Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen CAR und prä- und postsynaptische Marker durchgeführt. Da eine Interaktion von CAR mit Zytoskelettproteinen bekannt war, wurden zusätzlich Zellen mit anti-CAR und anti-MAP2 und entsprechenden fluorophorkonjugierten sekundären Antikörpern gefärbt (Abb. 14).

Die Immunfluoreszenzfärbung ergab eine partielle Überlagerung des Fluoreszenzsignals von CAR mit allen fünf Proteinen und verweist auf eine Lokalisation von CAR in Synapsen.

5.5 CAR-Defizienz führt zu erhöhter synaptischer Transmission

Untersuchungen an herzspezifischen adulten CAR-KO-Mäusen zeigten eine Veränderung in der kardialen Reizweiterleitung (Lisewski et al., 2008; Lim et al., 2008). Um zu überprüfen ob CAR auch im Gehirn eine Rolle bei der Signalweiterleitung spielt, wurden elektrophysiologische Experimente an Gehirnschnitten adulter Mäuse des CamKII α -CAR-Stamms durchgeführt. Für die Bestimmung der synaptischen Transmission in den Schaffer-Kollateralen wurden AMPA-Rezeptor-vermittelte Feld exzitatorische postsynaptische Potentiale (fEPSP) im *Stratum radiatum*, einer Zellschicht des Hippokampus, evoziert. Da der Anteil an inhibitorischen Synapsen im *Stratum radiatum* unter 2,5% liegt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um exzitatorische und nicht inhibitorische postsynaptische Potentiale handelt (Hiscock et al., 2000). Das Verhältnis zwischen der Reizstärke (*Fiber volley* Amplitude) und dem gemessenen Anstieg des fEPSP in CamKII α -CAR-KO-Gehirnen und Kontrollgehirnen ist in Abbildung 15A graphisch dargestellt. Es wurde ein um circa 70% höheres Verhältnis zwischen Eingangssignal und Ausgangssignal in CamKII α -CAR-KO-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren gemessen. Die postsynaptische Antwort auf die jeweilige Reizstärke war in den CAR-KO-Tieren kontinuierlich höher als in den Kontrolltieren.

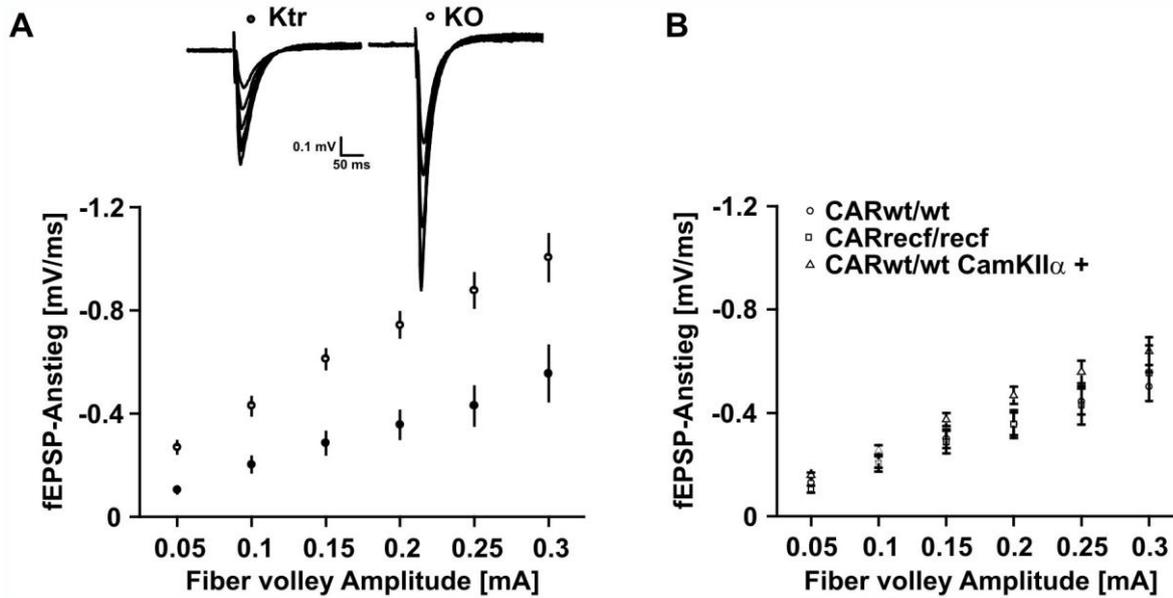


Abb. 15: Ermittlung der synaptischen Transmission in CAR-KO- und Kontrolltieren. (A) Der Stimulus (*Fiber volley* Amplitude) wurde gegen den gemessenen Wert (fEPSP-Anstieg) extrapoliert. Dieses Verhältnis zwischen Eingangs- und Ausgangssignal veranschaulichte eine erhöhte synaptische Transmission in CAR-KO-Gehirnschnitten im Vergleich zu Kontrolltieren (Ktr) ($P \leq 0.005$, $n = 10$ pro Genotyp). (B) Die gleiche Messung wurde an Kontrolltieren (CARrecf/recf; $n = 10$), CARwt/wt ($n = 10$) und CARwt/wt CamKII α + Tieren ($n = 9$) durchgeführt. Das Verhältnis zwischen Eingangs- und Ausgangssignal stimmte in allen drei Genotypen überein.

Um auszuschließen, dass die CamKII α -Cre oder die loxP-Sequenzen einen Effekt auf die synaptische Transmission haben, wurde die exzitatorische synaptische Transmission zwischen CARwt/wt CamKII α -Cre exprimierenden (CAR wt/wt CamKII α +), CARwt/wt und CARrecf/recf Tieren verglichen (Abb. 15B). Dabei sind die CARrecf/recf Tiere die generell als Kontrollen verwendeten Tiere, wie auch in Abb. 15A (Ktr). Die CARwt/wt Tiere sind homozygot für das CAR-Wildtyp-Allel und enthalten keine CamKII α -Cre-Rekombinase. Die CARwt/wt CamKII α + Tiere sind homozygot für das CAR-Wildtyp-Allel und exprimieren die CamKII α -Cre-Rekombinase. Der Vergleich des Eingangs- zu Ausgangssignal-Verhältnisses zwischen CARwt/wt CamKII α + Tieren und Wildtyptieren zeigte, dass die Cre-Rekombinase keinen Einfluss auf die synaptische Transmission hat. Die CARrecf/recf-Tiere sind homozygot für das Recf-Allel und enthalten keine CamKII α -Cre. Die Übereinstimmung des Eingangs- zu Ausgangssignal-Verhältnisses zwischen den CARrecf/recf-Tieren und den Wildtyptieren zeigt, dass die loxP-Sequenzen des Recf-Allels die synaptische Transmission nicht beeinflussen.

5.6 CAR-Knockout-Neurone zeigen Veränderungen in der Präsynapse

Die Weiterleitung elektrischer Reize von einer Zelle zur Nachbarzelle geschieht im ZNS vorwiegend über chemische Synapsen. Um zu untersuchen, ob die erhöhte exzitatorische Transmission in CAR-KO-Tieren durch veränderte Freisetzung von Vesikeln erfolgt, wurde die Vesikel-Exozytose in hippocampalen Neuronenkulturen untersucht. Hierfür wurden Vesikel zwei Wochen alter Kulturen mit dem Fluoreszenzfarbstoff FM1-43 beladen. Dies geschieht durch Depolarisierung der Zellmembran durch 90 mM Kaliumchloridlösung und der daraus resultierenden Exo- und Endozytose von Vesikeln. Die Bindung von FM1-43 an Lipide erhöht die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes im Vergleich zum lipidfreien Zustand. Auf Grund dieser Eigenschaft wird FM1-43 zur Analyse von Exozytosevorgängen eingesetzt (Betz and Bewick, 1992). Nach Beladung der Vesikel wurden die Zellen erneute durch Zugabe von 90 mM Kaliumchloridlösung depolarisiert. Dies hat eine Freisetzung von Vesikeln zur Folge und die Reduktion der Fluoreszenzintensität in den Synapsen. Die Auswertung der Signalintensitäten über Zeit ergab eine höhere Freisetzungsgeschwindigkeit von FM1-43 in CamKII α -CAR-KO-Neuronen, wie ein Vergleich der Halbwertszeit von CAR-KO- und Kontrollzellen verdeutlicht (Abb. 16).

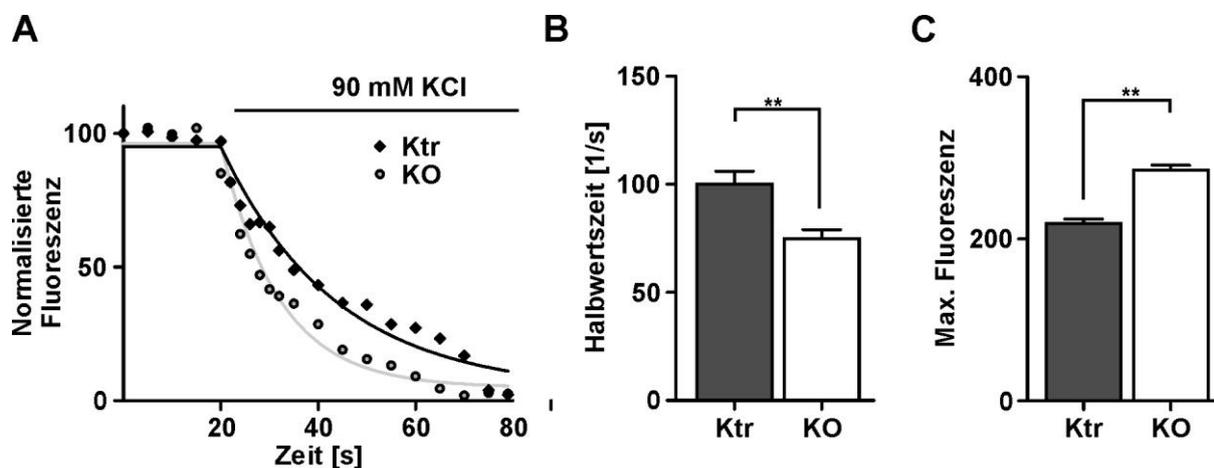


Abb. 16: Untersuchung der Vesikelfreisetzung in hippocampalen Neuronen mittels FM1-43. Vesikel hippocampaler Neuronenkulturen wurden nach 13 Tagen in Kultur über Endozytose mit dem Farbstoff FM1-43 beladen. (A) Die Analyse der Vesikelentladung durch Zugabe von 90 mM Kaliumchloridlösung ergab eine veränderte Kinetik in CAR-KO-Neuronen (KO) im Vergleich zu Kontrollzellen (Ktr). (Normalisierung der Fluoreszenzsignale vor Kaliumchloridzugabe auf 100%) (B) Die Halbwertszeit war in CAR-KO-Synapsen geringer als bei Kontrollsynapsen (errechnet aus (A)). (C) Die nicht-normalisierte Fluoreszenzintensität vor der Exozytose war in KO-Zellen höher als in den Kontrollen. (T-Test, $**P \leq 0.01$, Ktr, $n = 396$ Synapsen; KO, $n = 311$ Synapsen).

Um zu überprüfen, ob diese Veränderung strukturell bedingt ist, wurden zwei Wochen alte hippocampale Neuronenkulturen elektronenmikroskopisch untersucht. Ultradünnschnitte unabhängiger Präparationen wurden am Elektronenmikroskop untersucht und ausgewertet. Ein Vergleich von CamKII α -CAR-KO- und Kontrollsynapsen ergab keinen Unterschied in der Synapsenfläche, der Länge der postsynaptischen Dichte (PSD) oder der Gesamtvesikeldichte. Jedoch war die Vesikeldichte im präsynaptischen Bereich von 150 nm entlang der aktiven Zone in CAR-KO-Neuronen geringer als in den Kontrollzellen (Abb. 17).

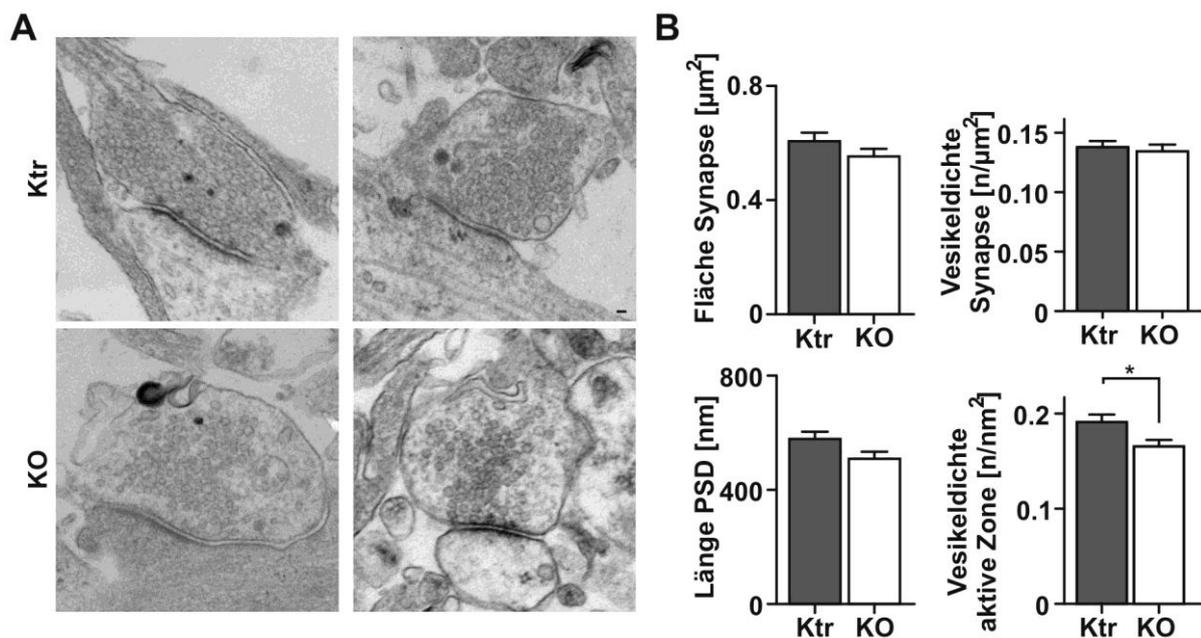


Abb. 17: Ultrastrukturanalyse der Synapsen. (A) Die Ultrastruktur der Synapsen 13 Tage alter hippocampaler Neurone wurde verglichen und statistisch ausgewertet. (B) Ein Vergleich von CAR-KO- und Kontrollsynapsen (Ktr) ergab keinen Unterschied in der Synapsenfläche, der Länge der postsynaptischen Dichte (PSD) oder der Vesikeldichte in der gesamten Synapse. Jedoch war die Vesikeldichte entlang des intrazellulären Bereiches (150 nm) der aktiven Zone in KO-Synapsen minimiert. (T-Test, $*P \leq 0.05$, Ktr, $n = 97$; KO, $n = 95$). Größenbalken 50 nm.

5.7 Veränderte postsynaptische Potenzierung in CAR-defizienten Tieren

Durch die Applikation von 90 mM Kaliumchloridlösung für eine definierte Zeit wurden die Nervenzellen kontinuierlich stimuliert. Um zu überprüfen, ob wir auch in Gehirnschnitten der CAR-KO-Tiere einen Effekt des CAR-Verlustes auf kontinuierliche Stimulierung haben, wurden CAR-KO- und Kontrollgehirnschnitte für 60 s mit 10 Hz im *Stratum radiatum* des

Hippokampus stimuliert. Eine solche Reiz-Applikation führt zu einer verstärkten Exozytose präsynaptischer Vesikel (Zucker and Regehr, 2002). Im Vergleich zu Kontrollgehirnschnitten aus Geschwistertieren kam es zu einem langsameren und geringeren Absinken der fEPSP-Amplitude während der 10 Hz Applikation. Nach Beendigung des Stimulus erholten sich beide Gruppen anfänglich zu gleichem Maße, jedoch erreichten die gemessenen fEPSP-Amplituden in den KO-Tieren schneller das Ausgangsniveau als in Kontrolltieren (Abb. 18A).

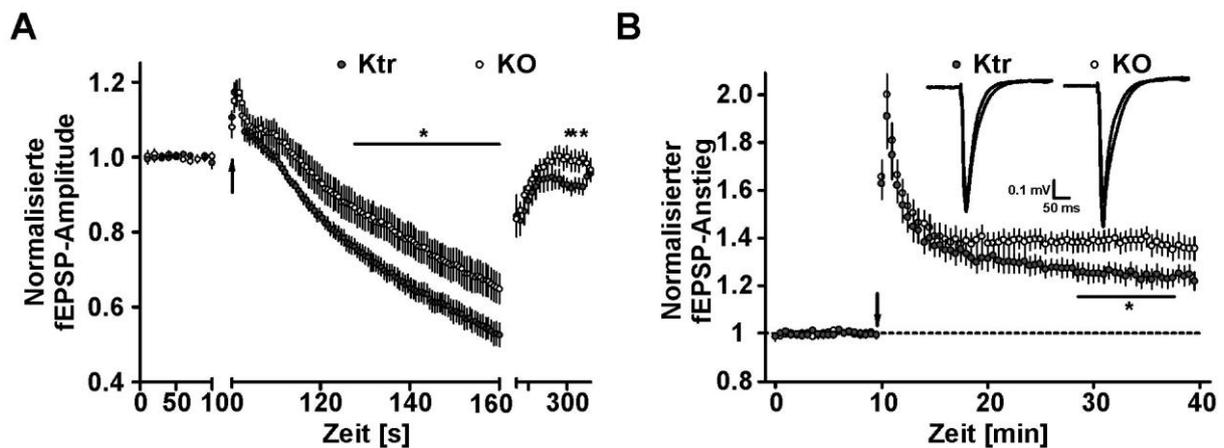


Abb. 18: Verlängerte 10 Hz Stimulierung und Induktion von Langzeit-Potenzierung (LTP). (A) Die Gehirnschnitte wurden im *Stratum radiatum* 60 s mit 10 Hz stimuliert (Pfeil). Die fEPSP-Amplitude sank in CAR-KO-Gehirnschnitten langsamer und geringer als in Kontrollgehirnschnitten (Ktr). (Normalisierung der fEPSP-Amplitude zu fEPSP vor repetitiver Stimulierung; $*P \leq 0.05$, $n = 8$ pro Genotyp). (B) LTP wurde durch tetanische Stimulierung der Schaffer-Kollateralen (Pfeil, zwei 100 Hz Stimuli für 1 s separiert durch 20 s) induziert. Ein höheres LTP wurde in CAR-KO-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet. (Normalisierung des fEPSP-Anstiegs zu fEPSP vor Stimulierung; $*P \leq 0.05$, Ktr, $n = 10$; KO, $n = 12$).

Da die CAR-KO-Tiere bereits während der kontinuierlichen 10 Hz Stimulierung der Schaffer-Kollateralen eine höhere exzitatorische postsynaptische Potenzierung aufwiesen, als die Kontrollen, vermuteten wir eine Veränderung der Langzeit-Potenzierung (LTP) in diesen Tieren. Ein weiterer Grund war die Tatsache, dass der Verlust von Zelladhäsionsproteinen der IgSF, wie NCAM zu einer Veränderung der Langzeit-Potenzierung führt (Bukalo et al., 2004; Markram et al., 2007).

Die Gehirnschnitte von CamKII α -CAR-KO- und Kontrolltieren wurden durch zweifache tetanische Applikationen von 100 Hz im Abstand von 20 s stimuliert (Abb. 18B). In den

Schaffer-Kollateralen konnte in beiden Gruppen LTP induziert werden. Dabei war das LTP in CAR-KO-Schnitten circa 10 min nach Stimulierung höher als in Kontrolltieren.

5.8 CAR-Knockout-Tiere zeigen normales Lernverhalten

Langzeit-Potenzierung wird mit der Ausbildung von Gedächtnis und Lernvermögen in Verbindung gebracht (Morris, 1989; Lynch, 2004). Dabei spielt der Hippokampus besonders bei räumlichen Lernverhalten eine Rolle (Ahi et al., 2004; Desmond et al., 1988; Morris et al., 1986). Auf Grund dessen wurde das Verhalten und das Lernvermögen der CAR-KO- und Kontrolltiere untersucht. Zuerst wurde das Verhalten der Mäuse für 3 Minuten im Käfig beobachtet (*Open-Field*). Dafür wurden die Tiere einzeln in einen Käfig gesetzt. Mittels Lichtschranken konnte die Bewegung der Maus und ihr Aufenthalt im Käfig beobachtet werden. Die CamKII α -CAR-KO-Tiere und Geschwisterkontrolltiere zeigten ein ähnliches Verhalten. Beide Versuchsgruppen bewegten sich circa 80% der Zeit (Abb. 19A). Innerhalb der 3 Minuten hielten sich die CamKII α -CAR-KO- und Kontrolltiere vorwiegend in der Peripherie des Käfigs auf (Abb. 19B).

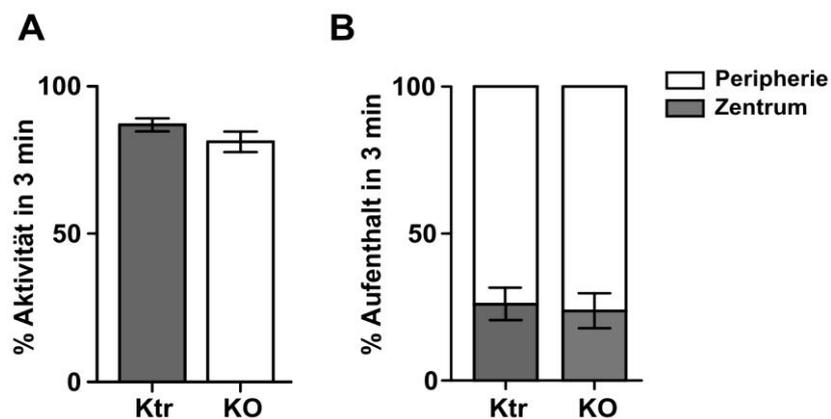


Abb. 19: Verhaltensanalyse im *Open-Field*-Versuch. (A) Die Tiere wurden in Käfige - mit Lichtschranken in x-y-Richtung - platziert und ihre Aktivität für 3 min beobachtet. Innerhalb dieser Zeit bewegten sich die CAR-KO-Tiere und Kontrolltiere im gleichen Maße (circa 80% der Zeit). (B) Beide Gruppen hielten sich vorwiegend in der Käfigperipherie und zu geringerem Anteil im Käfigzentrum auf. (Ktr, n = 7; KO, n = 14).

Eine Möglichkeit um räumliches und akustisches assoziatives Lernen zu untersuchen ist das *Context-Fear-Conditioning* (Barrett et al., 2010). Bei diesem Versuch wird ermittelt, ob eine Maus eine Umgebung (Kontext) oder einen Ton mit einer negativen Erfahrung assoziieren

kann. Ist dies der Fall, reagiert die Maus mit verringerter Bewegung (*freezing*, Stillstehen). Wie in Abbildung 20A graphisch dargestellt, wird die Maus zuerst konditioniert. Hierfür wurde die Maus in eine Versuchsbox platziert. Nach erklingen eines Tons wurde ein elektrischer Reiz über die Fußplatte appliziert. Dies wurde einmal wiederholt (Konditionierung, Kond). Am Folgetag wurde die Maus in die gleiche Box gesetzt und getestet, ob sie den Raum wiedererkennt und mit ängstlichem Verhalten, also höherem Anteil an Stillstehen reagiert (Kontext). Nach einer Pause von mindestens zwei Stunden wurden die Mäuse erneut getestet, diesmal auf Assoziation des Tons mit der negativen Erfahrung (elektrischer Reiz). Hierfür wurde die Maus in eine umgestaltete Testbox mit einem anderen Geruchsstoff gesetzt (prä Ton) und dann der Ton eingeschaltet (Ton).

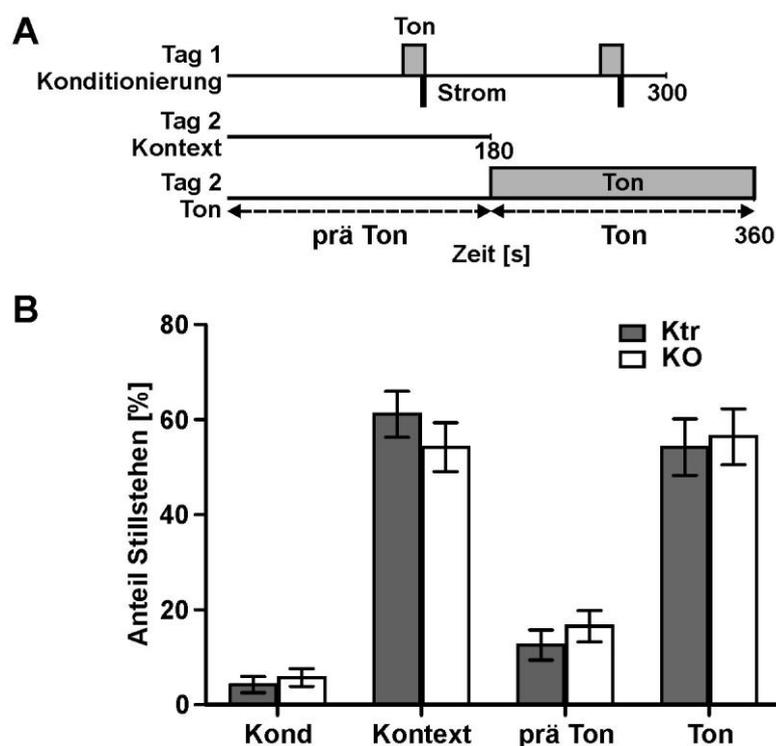


Abb. 20: Untersuchung des assoziativen Lernvermögens. (A) Versuchsablauf des *Context-Fear-Conditionings*. Die Tiere wurden am ersten Tag konditioniert, indem zusammen mit einem Ton ein elektrischer Stimulus appliziert wurde (Kond). Am nächsten Tag erfolgte der Test auf Wiedererkennung des Raumes (Kontext) und des Tones in einer neuen Umgebung (Ton). (B) CAR-KO-Tiere (KO) und Kontrolltiere (Ktr) erkannten gleich gut den Raum wieder (Kontext) und reagierten mit erhöhtem Stillstehen. Gleiches galt für die Erkundung einer neuen Umgebung (prä Ton) und die Reaktion auf den Ton (Ton). (Ktr, n = 18; KO, n = 17).

Ein Vergleich aller vier Testpunkte zeigte eine Übereinstimmung der CAR-KO-Tiere und Kontrollen hinsichtlich ihres Verhaltens (Abb. 20B). Beide Gruppen erkundeten die Versuchsbox im gleichen Maße, wie bereits im *Open-Field*-Versuch. Auf den Raum (Kontext) und den Ton in neuer Umgebung (Ton) reagierten beide Genotypen mit erhöhtem Stillstehen.

Zur Bestimmung des räumlichen Lernvermögens wurde der Barnes-Labyrinth-Versuch durchgeführt (Sunyer, 2007). Bei diesem Versuch wurden die Mäuse für vier Tage trainiert eine Fluchtbox unterhalb einer runden Plattform zu finden. Die Box konnte nur über eines der 20 am Rand konzentrisch angeordneten Löcher erreicht werden. Für die Beurteilung des Lernvermögens der CAR-KO-Tiere und der Kontrollgeschwistertieren, wurde die Zeit bis zum erstmaligen Erreichen des Zielloches, unter dem sich die Fluchtbox befand, und die Zeit bis zum Eintritt in die Box verglichen. Versuchsmäuse aus beiden Gruppen fanden jeden Tag schneller die Fluchtbox und zeigten ein gleiches Lernvermögen ohne Unterschiede zwischen den Genotypen.

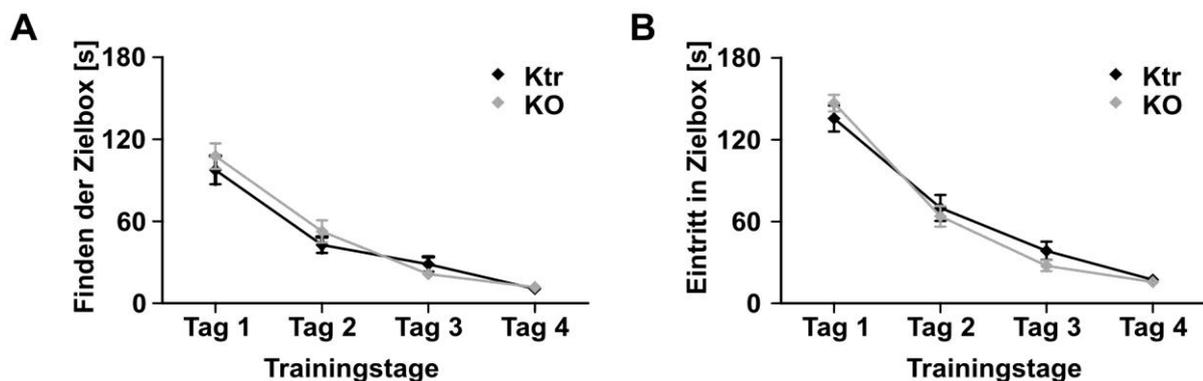


Abb. 21: Analyse des räumlichen Lernverhaltens im Barnes-Labyrinth. CAR-KO- (KO) und Kontrolltiere (Ktr) wurden für vier Tage trainiert eine Box unterhalb der Labyrinthplatte zu finden. Es wurde die Zeit gestoppt, bis sie zum ersten Mal das Loch zur Box erreichten (A) und bis sie in die Box eintraten (B). In beiden Fällen konnte kein Unterschied zwischen CAR-KO- und Kontrolltieren beobachtet werden. (Ktr, n = 18; KO, n = 17).

Das Barnes-Labyrinth ermöglichte zum einen die Beurteilung des Lernvermögens (Abb. 21) über die vier Trainingstage hinweg und zum anderen die Bewertung des Erinnerungsvermögens der Mäuse am 5. und am 10. Versuchstag. Dabei wurden die Mäuse zwischen Versuchstag fünf und zehn nicht trainiert (Abb. 22).

An Tag 5 und 10 wurde die Fluchtbox verschlossen und gezählt, wie oft die Maus innerhalb von 90 s welches Loch besuchte (Anzahl der Treffer). Beide Versuchsgruppen besuchten das Zielloch (T) mit durchschnittlich gleicher Häufigkeit.

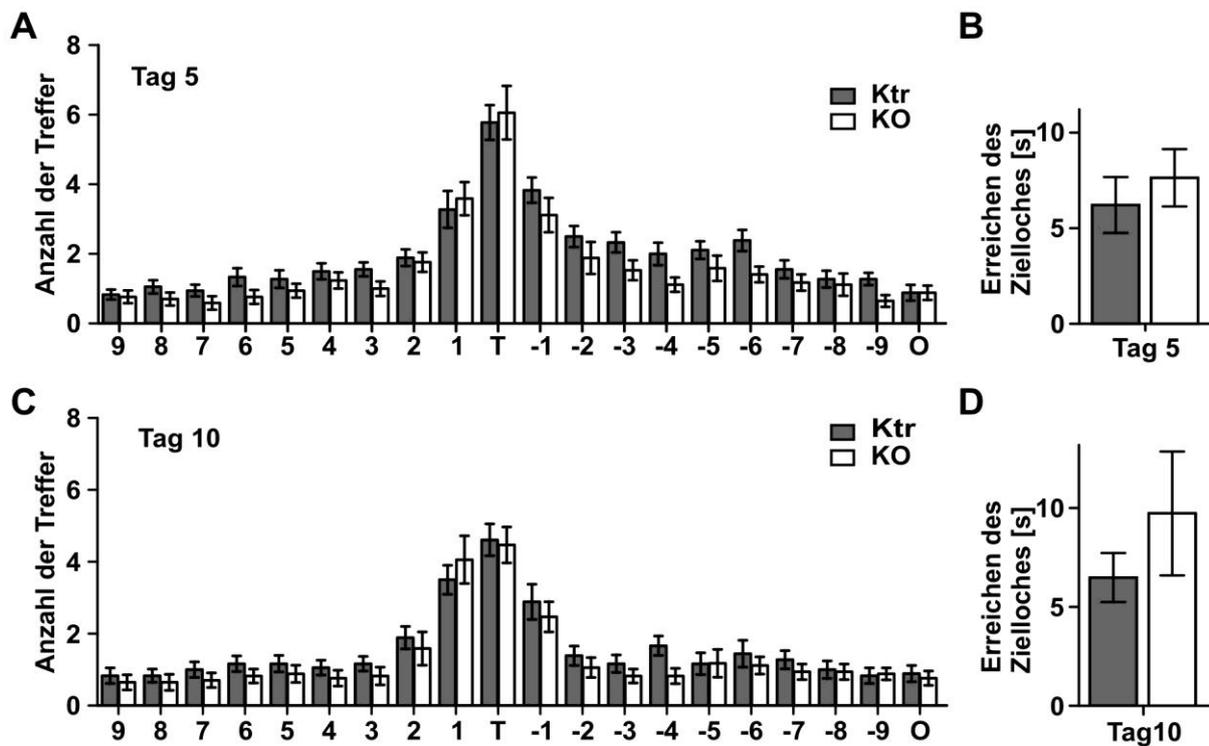


Abb. 22: Vergleich des Erinnerungsvermögens zwischen CAR-KO-Tieren und Kontrollen im Barnes-Labyrinth. (A) Am 5. Tag wurde das Eingangsloch (T) zur Box verschlossen. Es wurde gemessen, mit welcher Häufigkeit die Maus innerhalb von 90 s zu den Löchern links (-1 bis -9), rechts (1 bis 9) und gegenüber von T (O) ging. (B) zeigt die Zeit bis zum erstmaligen Erreichen von T. (C und D) Nach mehrtägiger Pause, wurde dieser Versuch an Tag 10 wiederholt. An Tag 5 und an Tag 10 besuchten CAR-KO-Tiere und Kontrolltiere (Ktr) T mit nahezu gleicher Häufigkeit und erreichten T in nahezu gleicher Zeit. (Ktr, n = 18; KO, n = 17).

Die Zeit bis zum erstmaligen Erreichen des verschlossenen Eingangslochs an Tag 5 und Tag 10 war zwischen beiden Versuchsgruppen nicht signifikant verändert.

5.9 Veränderte Gen-Expression in CAR-Knockout-Tieren

Um die molekulare Ursache für die veränderte Reizweiterleitung und die Vesikelfreisetzung zu verstehen, haben wir die Expression von CAR Interaktionspartnern untersucht. In adulten Mausherzen wurde gezeigt, dass der Verlust von CAR zu einer verringerten Expression der

Gap Junction Gene Connexin 45 und 43 (Cx45 und Cx43) sowie ZO-1 und β -Catenin führt (Lisewski et al., 2008; Lim et al., 2008). Um zu überprüfen, ob die Expression dieser Proteine im gehirnspezifischen CAR-KO verändert ist, wurde deren Expression mittels qRT-PCR untersucht. Zusätzlich wurde die Expression der auch neuronal exprimierten Gene Cx36 und MUPP1 mittels qRT-PCR überprüft.

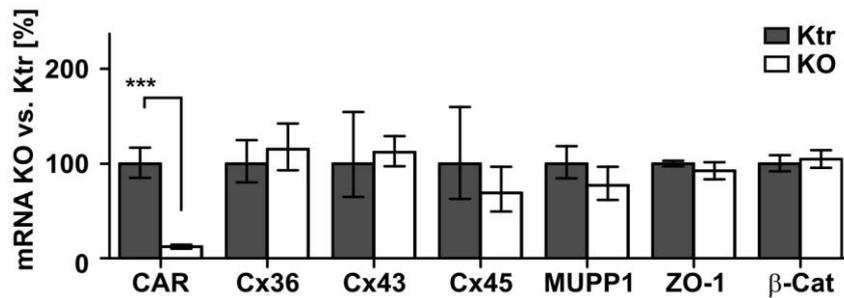


Abb. 23: Überprüfung der Expression CAR assoziierter Gene mittels qRT-PCR. Vergleich der mRNA-Menge von Connexinen (Cx) und CAR interagierenden Proteinen ergab keinen Unterschied zwischen CAR-KO-Tieren und Kontrolltieren. Verglichen wurden die Gene im Bereich Hippokampus und Kortex drei Wochen alter Mäuse. (Normalisierung auf 18S-RNA; T-Test, *** $P \leq 0.001$, $n = 4$ pro Gruppe).

Das Expressionsniveau der Connexine, MUPP1, ZO-1 und β -Catenin stimmte zwischen CAR-KO- und Kontrolltieren überein.

Um zu untersuchen, ob die Expression anderer Gene durch die Deletion von CAR beeinflusst ist, wurde eine Affymetrix-Chip-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde das Genexpressionsprofil der Hippokampi von 10 Tage alten CamKII α -CAR-KO-Tieren und Kontrollgeschwistertieren verglichen. Tabelle 10 stellt veränderte Gene dar, die einen Signifikanzwert von weniger als $P \leq 0,02$ haben, eine *Stepup* P-Wert $< 0,8$ und eine um mindestens 1,2-mal geringere oder höhere Expression im CAR-KO als in den Kontrollen aufweisen (Verhältnis KO/Ktr).

Neben der Signifikanzberechnung (P-Wert) wurde zusätzlich der *Stepup* P-Wert berechnet. Dieser gibt an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass die ermittelte signifikante Veränderung zufällig ist. Je kleiner also der *Stepup* P-Wert, desto wahrscheinlicher, dass der signifikante Unterschied (P-Wert) wahr ist. Eine Liste der regulierten Gene mit einem P-Wert $\leq 0,05$ und einem KO/Kontrollverhältnis $\leq -1,2$ oder $\geq 1,2$ ohne Einschränkung durch den *Stepup* P-Wert ist in Tabelle 13 und Tabelle 14 im Anhang zusammengestellt.

Tab. 10: Übersicht regulierter Gene in CAR-KO-Hippcampi 10 Tage alter Mäuse

Gen	Name (Englisch)	P-Wert	<i>Stepup</i> P-Wert	Verhältnis (KO/Ktr)	Lokalisation	Funktion
Cxadr	Coxsackievirus- and Adenovirusreceptor	0,00001	0,106	-10,413	Membran	Zelladhäsion
Eln	Elastin	0,0001	0,283	-1,416	Extrazellulär	Struktur
Pla2g2d	Phospholipase A2, group IID	0,0003	0,727	1,209	Zytoplasma	kalzium-abhängige Hydrolyse von Phospholipiden
Traf1	Tnf receptor-associated factor 1	0,0004	0,762	1,213	Membran	Signaltransduktion
Slc6a7 (PROT)	Solute carrier family 6 (Prolin-Transporter)	0,00002	0,161	2,283	Membran	Prolin-Transporter
Syt2	Synaptotagmin 2	0,0001	0,353	2,344	Membran	Vesikel-Exozytose, Kalziumsensor

Die am stärksten regulierten Gene nach CAR waren PROT und Synaptotagmin 2 (Syt2).

5.10 Erhöhte Synaptotagmin 2 und PROT-Expression in CAR-defizienten Tieren

Die Expressionsdaten von Syt2 und PROT der Affymetrix-Chip-Analyse wurde mittels qRT-PCR überprüft. Die qRT-PCR ergab eine signifikant erhöhte Expression von PROT und Syt2 im Hippokampus 10 Tage alter KO-Mäuse und in isolierten hippokampalen KO-Neuronen (Abb. 24).

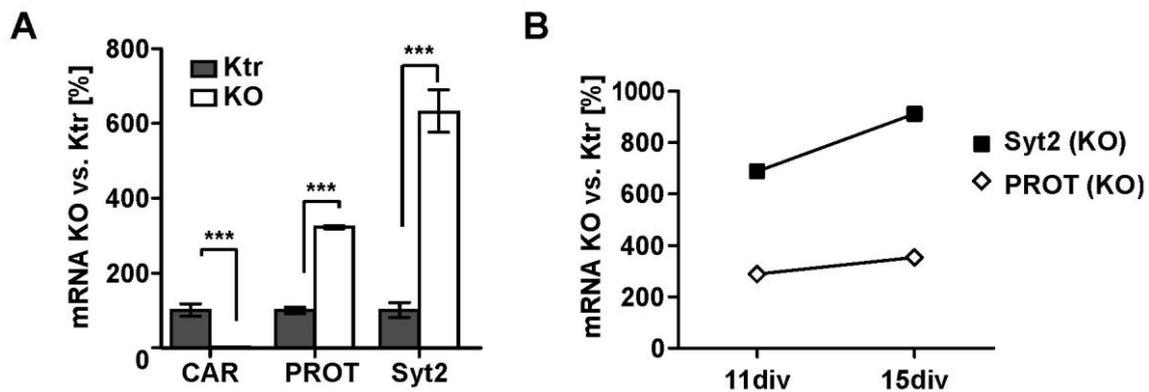


Abb. 24: Verifizierung der Affymetrix-Daten für Syt2 und PROT mittels qRT-PCR. (A) Die Expression von PROT und Syt2 auf mRNA-Ebene war in CAR-KO-Hippokampi höher als in Kontroll-Hippokampi 10 Tage alter Geschwistermäuse. (B) Der Vergleich der PROT- und Syt2-mRNA-Menge in isolierten hippocampalen Neuronen ergab einen höheren mRNA-Gehalt beider Gene in KO-Neuronen als in Kontrollzellen (100%, nicht eingezeichnet). Im Vergleich zu den Kontrollzellen stieg die PROT- und Syt2-mRNA-Menge in KO-Neuronen zwischen 11 div und 15 div (Normalisierung auf 18S-RNA; T-Test, $***P \leq 0.001$, $n = 4$ pro Genotyp).

Ein Vergleich der mRNA-Menge von PROT und Syt2 in 11 Tage und 15 Tage alten neuronalen Kulturen zeigte, dass die PROT- und Syt2-Expression in den CAR-KO-Neuronen im Vergleich zu Kontrollzellen (100%, nicht eingezeichnet) mit der Zeit stieg (Abb. 24B).

Die Expression von Syt2 und PROT wurde auch auf Proteinebene überprüft (Abb. 25).

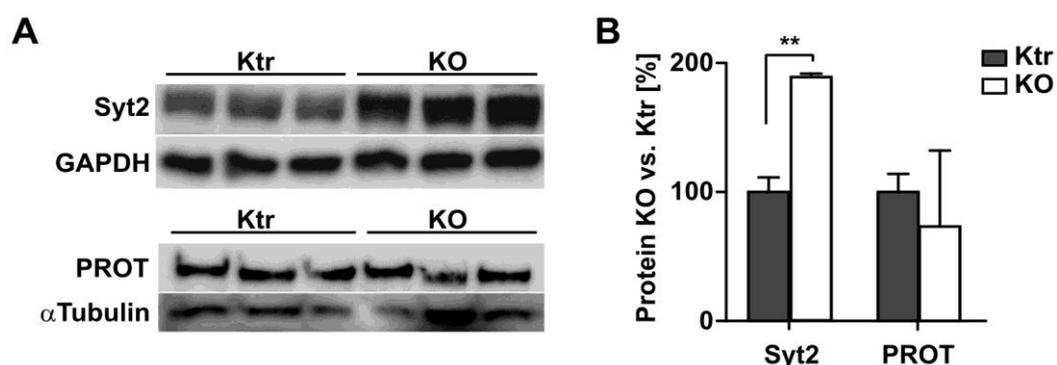


Abb. 25: Überprüfung der Syt2- und PROT-Proteinmenge. (A) Durch Westernblot-Analyse wurde die Proteinmenge von Syt2 und PROT in hippocampalen Neuronenkulturen überprüft. (B) Die quantitative Auswertung von (A) ergab einen signifikant höheren Syt2-Proteingehalt in CAR-KO-Zellen als in Kontrollzellen, während die PROT-Proteinmenge unverändert war. (Normalisierung auf GAPDH bzw. α -Tubulin; T-Test, $**P \leq 0,01$, $n = 3$ pro Genotyp).

Die quantitative Westernblot-Analyse zeigte eine höhere Syt2-Proteinmenge in CAR-KO-Neuronen im Vergleich zu Kontrollzellen, während die PROT-Proteinmenge im CAR-KO mit der Proteinmenge in Kontrolltieren übereinstimmte.

Um auszuschließen, dass die verstärkte Syt2-Expression nicht auf die Cre-Aktivität zurückzuführen ist, wurde die Expression von CAR und Syt2 in zwei Wochen alten hippocampalen Neuronenkulturen von CARwt/wt CamKII α + Tieren untersucht. Auf Grund der Verpaarungsstrategie mussten zwei individuelle Zellpräparationen miteinander verglichen werden, zum einen aus CARwt/wt CamKII α + und CARwt/wt Tieren und zum anderen die Zellpräparation aus CARref/ref CamKII α + (KO) und CARref/ref Tieren (Ktr). Da die Syt2-Expression über die Zeit steigt und die CAR-mRNA-Menge sinkt, wurden die auf 18S-RNA normalisierten Δ Ct-Werte von CAR und Syt2 in den jeweiligen Kulturen auf den CAR-Wert von CARwt/wt bzw. CARref/ref (Ktr) normalisiert.

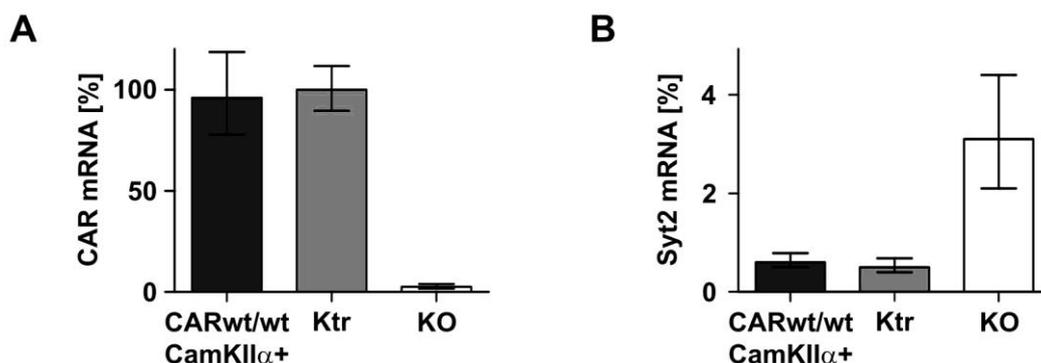


Abb. 26: Vergleich der CAR- und Syt2-Expression in CARwt/wt CamKII α + mit Kontroll- und CAR-KO-Zellen. A) Die Expression von CAR stimmt in CARwt/wt CamKII α + und Kontrollneuronen (Ktr) überein. In CAR-KO-Zellen war die CAR-mRNA-Menge stark reduziert. (B) Der Gehalt an Syt2-mRNA stimmt in CARwt/wt CamKII α + Neuronen und Kontrollneuronen überein. In CAR-KO-Zellen war die Syt2-Expression erhöht (Normalisierung auf 18S-RNA und Normalisierung der CAR- und Syt2-Expression von CARwt/wt CamKII α + Zellen auf die CAR-Expression von CARwt/wt Zellen und von KO-Zellen auf die CAR-Expression von Kontrollzellen; 11 div; n = 4 pro Genotyp).

Ein Vergleich der Expression ergab ein ähnliches mRNA-Niveau von CAR und Syt2 in CARwt/wt CamKII α + und Kontrollzellen (Ktr). Die CAR-mRNA-Menge in den CAR-KO-Zellen war stark reduziert, während die Syt2-mRNA-Menge erhöht war (Abb. 26).

5.11 Synaptotagmin 1-Expression ist in CAR-Knockout-Tieren unverändert

Syt2 ist sequenzhomolog zu Synaptotagmin 1 (Syt1). Beide Proteine zeigen ähnliche Funktionen bei der Exozytose von Vesikeln (Nagy et al., 2006; Stevens and Sullivan, 2003). Syt1 und Syt2 unterscheiden sich hinsichtlich ihres Expressionsortes. Syt1 ist verstärkt im Hippokampus exprimiert, während Syt2 vorwiegend in kaudal gelegenen Gehirnregionen zu finden ist (Geppert et al., 1991). Um zu überprüfen, ob die Expression von Syt1 in CAR-KO-Neuronen verändert ist, wurde die Syt1-mRNA-Menge aus hippocampalen Neuronen aus Kontroll- und KO-Tieren verglichen.

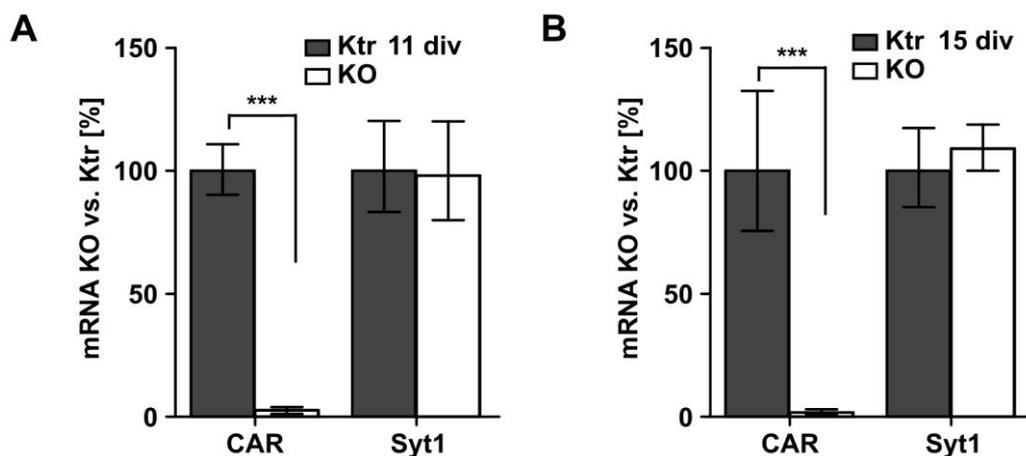


Abb. 27: Expressionsanalyse von Syt1 mittels qRT-PCR. (A) Der Vergleich der Expression von Syt1 in hippocampalen CAR-KO- und Kontrollneuronen zeigte keinen Unterschied zwischen beiden Genotypen an Tag 11 in Kultur. (B) Gleiches galt für 15 Tage alte hippocampale Zellkulturen. Währenddessen war in 11 div und in 15 div Neuronen das CAR-mRNA-Niveau im KO stark reduziert. (Normalisierung auf 18S-RNA; T-Test, *** $P \leq 0.001$, $n = 4$ pro Genotyp).

Die Analyse der Expression von Syt1 in 11 Tage und 15 Tage alten hippocampalen Neuronenkulturen zeigte ein unverändertes Syt1-mRNA-Niveau in CAR-KO-Zellen im Vergleich zu Kontrollneuronen (Abb. 27).

5.12 Identifizierung neuronaler CAR-Interaktionspartner

Für CAR wurden bereits einige Interaktionspartner identifiziert (siehe 3.2.4, Abb. 5). Nicht alle diese Proteine kommen im zentralen Nervensystem vor. Um neuronale Interaktionspartner von CAR zu identifizieren, wurden *Pulldown*-Experimente mit murinem Gehirnlisat durchgeführt. Für diese Versuche wurden zum einen das Fusionsprotein GST-CARtail, in dem der zytoplasmatische Bereich der CAR-Isoform A N-terminal mit Glutathion-S-Transferase fusioniert war (Abb. 28A), und zum anderen ein Peptid verwendet, welches aus den letzten 14 Aminosäuren der CAR-Isoform A bestand (Abb. 28B). Beide Konstrukte enthalten das C-terminale PDZ-Domänen-Bindemotiv, welches durch die letzten drei Aminosäuren -SIV charakterisiert ist.

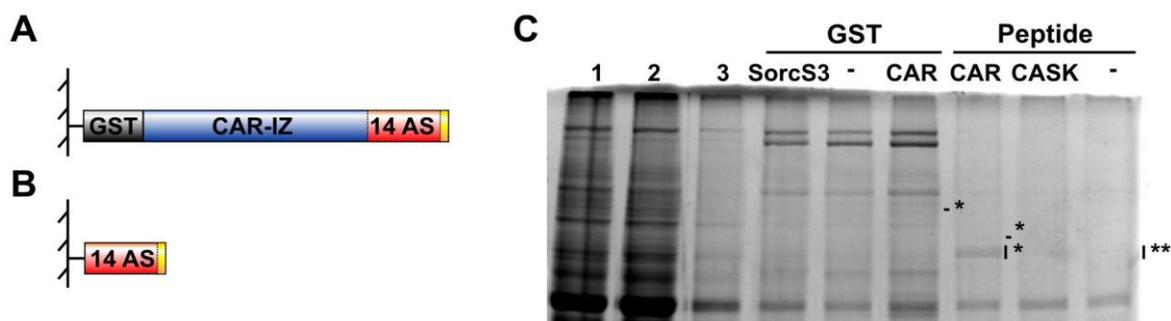


Abb. 28: Interaktionsstudie mit dem GST-CARtail-Fusionsprotein und dem CAR-Peptid. Für die Interaktionsstudie wurde das GST-CARtail-Fusionsprotein mit dem intrazellulären (IZ) Abschnitt des CAR-Proteins (A) und das CAR-Peptid der 14 C-terminalen AS des CAR-Proteins (B) eingesetzt. Beide enthielten das C-terminale PDZ-Domänen-Bindemotiv (gelb). (C) SDS-PAGE zur Auftrennung der *Pulldown*-Kandidaten. Der *Pulldown* erfolgte mit Gehirnlisat und den Konstrukten: GST-CARtail, CAR-Peptid und zur Kontrolle: GST-SorcS3 (zytoplasmatische Abschnitt), CASK-Peptid (14 C-terminalen AS) und den entsprechenden *Beads* (-). Es wurden die *Pulldowns* und das Proteinlysate (*Input*; 1), der erste Durchlauf (2) und der zweite Durchlauf (3) aufgetrennt. Spezifische Banden (*) wurden ausgeschnitten und durch Massenspektrometrie analysiert. Zur Kontrolle wurden die mit ** markierten Banden charakterisiert.

Präzipitierte Proteine wurden nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Massenspektrometrie analysiert (Abb. 28C).

Tabelle 11 zeigt die Liste identifizierter Proteine unter Auslassung von *heat-shock* Proteinen und Keratin. In den Kontrollbanden (Abb. 28C: **) wurden nur Keratin und *heat-shock* Proteine identifiziert.

Tab. 11: Massenspektrometrische Analyse der präzipitierten Proteine

Symbol	Name (Englisch)	Lokalisation	Funktion
TRPM1 ⁺	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	Membran	Ca ⁺⁺ -abhängiger Kationenkanal
Srpm	Small muscle protein	Zytoskelett	-
mylk2	Myosin light chain kinase 2	Zytoskelett	-
Lama3	Laminin 5 subunit	Membran	Involviert in Zelladhäsion
usp24	Ubiquitin specific protease 24	Zytoplasma	-
Snapi ⁺	Synaptosomal-associated protein 25-binding protein	membranassoziiert	Involviert in Exozytose
cpne8 ⁺	Copine-8	membranassoziiert	Eventuell Kalziumsensor wie Syt1 und Syt2
col3a1	Collagen type III alpha 1	extrazellulär	Struktur
negr1 ⁺	Neuronal growth regulator 1	Membran	Eventuell Zelladhäsion über extrazelluläre Ig-Domänen
eef1a2	Elongation factor 1 A-2	Zytoplasma	
colla1	Alpha-1 type I collagen	extrazellulär	Struktur
gpm6a	Glycoprotein M6A	Membran	
mapt ⁺	Microtubule-associated protein Tau	Zytoskelett	Intrazellulärer Transport
thy1	Thy-1 membrane glycoprotein	Membran	
ntng2	Netrin g2	Membran	
grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	Membran	
fmnl2	Formin-like 2		
kif26a	Kinesin family member 26A	Zytoskelett	
vps26b	Vacuolar protein sorting 26 homolog B	Membran	
actn4 ⁺	Alpha-actinin 4	Zytoskelett	Postulierter CAR Interaktionspartner
drebn	Drebrin	Zytoskelett	Intrazellulärer Transport

Die Auswertung der Massenspektrometrie-Daten ergab, dass die Mehrheit der identifizierten Proteine Membran- bzw. membranassoziierte Proteine sind oder zum Zytoskelett gehören.

Die mit ⁺ markierten Proteine heben sich durch verschiedene Besonderheiten von den anderen Proteinen ab. Mehrere Arbeitsgruppen hatten bereits eine Interaktion von CAR mit dem Zytoskelett gezeigt (Fok et al., 2007; Coyne and Bergelson, 2005). So wurde Alpha-actinin-4 von Coyne und Bergelson über MAGI1-1b mit CAR in Verbindung gebracht und Tau interagiert mit Tubulin (siehe 3.2.4 Abb. 5) (Coyne et al., 2005). Negr1 gehört genauso wie CAR zur IgSF. Copine-8 besitzt wie Syt1 und Syt2 zwei C2-Domänen und bindet Kalzium-abhängig Phospholipide. Snapin bindet Syt1 (Pan et al., 2009; Ilardi et al., 1999) und ist in Exozytoseprozesse involviert. TRPM1 ist ein Kalzium-abhängiger Kationenkanal.

Um den molekularen Zusammenhang zwischen CAR und der erhöhten Syt2-Expression zu klären, sollte die Interaktion und Kolokalisation von CAR mit Copine-8, Snapin und TRPM1 als erstes untersucht werden. Für Copine-8 ist kein Antikörper kommerziell erhältlich. Somit wurde vorrangig die Kolokalisation von Snapin und TRPM1 mit CAR untersucht.

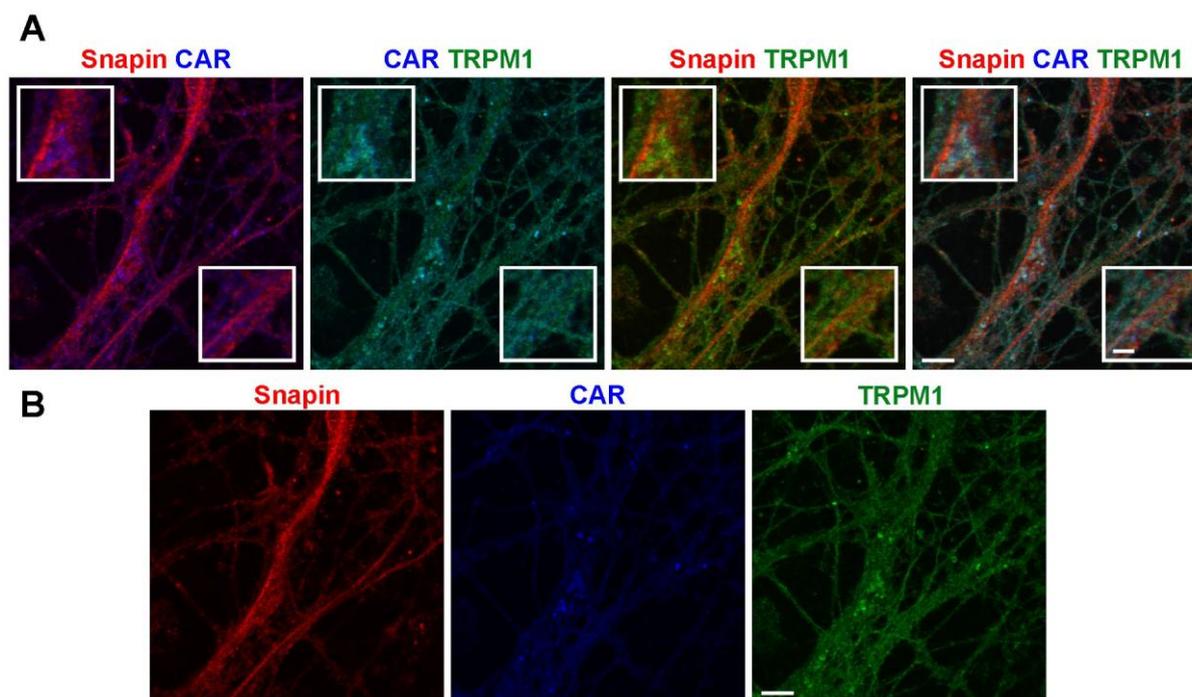


Abb. 29: Kolokalisation von CAR mit Snapin und TRPM1. (A) Wildtyp hippocampale Neurone wurden mit anti-CAR (blau), anti-TRPM1 (grün) und anti-Snapin (rot) Antikörpern und entsprechenden sekundären fluorophorkonjugierten Antikörpern markiert. Dabei konnte eine partielle Kolokalisation zwischen CAR und TRPM1, CAR und Snapin und zwischen Snapin und TRPM1 beobachtet werden. (B) Darstellung der Einzelkanäle. Größenbalken 5 µm.

Abbildung 29 zeigt eine partielle Kolokalisation von CAR mit TRPM1 und Snapin, während TRPM1 und Snapin nur gering kolokalisierten. Dies zeigte, dass sich CAR und Snapin bzw. CAR und TRPM1 in räumlicher Nähe befinden. Die Kolokalisation von Snapin und CAR weist auf eine Interaktion zwischen beiden Proteinen hin. Auf Grund der Interaktion von Snapin mit dem SNARE-Protein Snap-25 und Syt1 weist dies auf eine Assoziation von CAR mit dem Exozytosemaschinerie hin.

6 Diskussion

CAR vermittelt die Bindung von Coxsackie- und Adenoviren an die Zelloberfläche und ist an deren Aufnahme in die Zelle beteiligt. Eine Infektion mit Coxsackie- und Adenoviren kann zu Erkrankungen der Hirnhaut (Meningitis), der Bauchspeicheldrüse (Pankreatitis) oder des Herzens (Kardiomyopathie) führen. Auf Grund seiner extrazellulären Ig-Domänen zählt CAR zu der IgSF. Wie andere Mitglieder dieser Protein-Familie wirkt CAR als Zelladhäsionsprotein (Cohen et al., 2001; Honda et al., 2000; Patzke et al., 2010). In vielen Organen ist CAR in dichten Zell-Zellkontaktbereichen (*Tight Junctions*) lokalisiert. Die physiologische Rolle von CAR ist jedoch kaum untersucht. Schwerpunkt der vergangenen Jahre war die Charakterisierung von CAR im Herzen. Untersuchungen an CAR-KO-Modellen zeigten, dass CAR wichtig für die Herzentwicklung ist. Die Deletion von CAR in der Keimbahn oder spezifisch im embryonalen Herzen führt zu kardialer Einblutung und embryonaler Letalität (Fischer et al., 2009). Nach der Geburt nimmt CAR eine wichtige Rolle in der Herzfunktion ein, wie adulte herzspezifische CAR-KO-Modelle zeigten. Diese KO-Tiere entwickeln eine Störung der Reizweiterleitung von den Vorhöfen über den atrioventrikulären Knoten zu den Herzkammern (Lisewski et al., 2008; Lim et al., 2008). Über die Funktion von CAR im zentralen Nervensystem ist nur wenig bekannt, auch wenn CAR in vielen Gehirnregionen lokalisiert ist und in Endothelzellen, Astrozyten und Neuronen nachgewiesen wurde (Honda et al., 2000; Hotta et al., 2003; Persson et al., 2006; Raschperger et al., 2006). Sowie im Herzen ist die CAR-Expression im Gehirn während der Embryonalentwicklung hoch und sinkt eine Woche nach der Geburt stark ab (Honda et al., 2000). Interaktionsstudien weisen darauf hin, dass CAR mit den neuronalen Proteinen PSD95 und PICK1 interagiert.

Ziel dieser Arbeit war es die Funktion von CAR im zentralen Nervensystem zu charakterisieren. Hierfür wurden gehirnspezifische CAR-KO-Modelle unter Verwendung des Cre/lox-Systems generiert. Mit Hilfe der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CamKII α -Promotors (CamKII α -Cre) bzw. des Nex-Promotors (Nex-Cre) wurde CAR gehirnspezifisch deletiert. Die durchgeführten Untersuchungen der CamKII α -CAR-KO-Tiere weisen auf eine Funktion von CAR in der neuronalen Reizweiterleitung hin.

6.1 Nex- und CamKII α -Cre führen zu unterschiedlicher neuronaler CAR-Deletion

Das hohe Expressionsniveau von CAR während der embryonalen Entwicklungsphase ließ vermuten, dass CAR für die pränatale Gehirnentwicklung wichtig ist. Um dies zu untersuchen, wurden CAR^{ref/ref} Mäuse mit Tieren verpaart, die die Cre-Rekombinase unter dem FoxG1-Promotor exprimieren. FoxG1 ist ein putativer Transkriptionsfaktor der *winged*-Helix-Familie. Die FoxG1-Cre wird ab E8.0 in den optischen Vesikeln exprimiert und ist im weiteren Verlauf der Gehirnentwicklung im Vorderhirn aktiv (Hébert et al., 2000). Bei der Verpaarung der FoxG1-Cre-Mäuse mit CAR^{ref/ref} Tieren wurden keine FoxG1-CAR-KO-Tiere geboren. Untersuchungen der Embryonen zeigten, dass die KO-Tiere um den Zeitpunkt E12.5 starben, wie die embryonalen herzspezifischen CAR-KO-Tiere (Lisewski et al., 2008). Literaturrecherchen ergaben, dass es in Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes zu unerwarteter Cre-Aktivität außerhalb des Gehirns kommt. Im genetischen Hintergrund SvJ129 ist die FoxG1-Cre gehirnspezifisch. In dem von uns verwendeten C57Bl/6-Hintergrund kommt es zu FoxG1-Cre-Aktivität in weiteren Organen (Hébert et al., 2000). Eine Untersuchung auf Rekombination des geflochtenen CAR-Allels im Herzen der FoxG1-CAR-KO-Tiere bestätigte eine zusätzliche Cre-Aktivität in diesem Organ. Eine Rückkreuzung heterozygoter CAR-Mäuse (CAR^{ref/wt} FoxG1⁺) mit SvJ129-Mäusen war nicht erfolgreich. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sich die Deletion von CAR im Herzen auf die Gehirnentwicklung auswirkt, wurden die FoxG1-CAR-KO-Tiere nicht weiter untersucht. Für die Generierung gehirnspezifischer CAR-KO-Tiere wurden anschließend Mäuse verwendet, die die Cre-Rekombinase unter dem Nex-Promotor oder dem CamKII α -Promotor exprimieren.

Die Nex-Cre- und CamKII α -Cre-Mauslinien unterscheiden sich hinsichtlich des Orts und der Zeit der Cre-Expression (Tab. 12). Die Nex-Cre ist circa ab dem embryonalen Tag 11.5 aktiv. Für die CamKII α -Cre wurde eine Aktivität ab dem postnatalen Tag 3 gezeigt. Beide Cre-Rekombinasen werden im Großhirn, welches den Kortex und den Hippokampus umfasst, exprimiert. In den Nex-CAR-KO-Tieren war die CAR-Expression im Kortex, Hippokampus, Riechhirn und im Kleinhirn reduziert. Im Kortex (inklusive Hippokampus) sieben Tage alter Mäuse betrug die Reduktion 50% im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im CamKII α -CAR-KO war CAR in nahezu allen Gehirnregionen deletiert. Im Kortex (inklusive Hippokampus) sieben Tage alter Mäuse wurde kein CAR-Proteinsignal detektiert (siehe Abb. 9).

Tab. 12: Nex-Cre und CamKII α -Cre Aktivität

Cre-Aktivität	Nex-Cre	CamKII α -Cre
Zeit	Ab E11.5	Ab P3
Ort	Dorsale Telenzephalon, später: Großhirn, Hypothalamus, Kleinhirn, Stammhirn, Pons	Hippokampus, Kortex, Riechhirn, Amygdala; geringere Aktivität: Hypothalamus, Thalamus
Keine Cre-Aktivität	Ventrikuläre Zone	-
Zelltypen	Postmitotische Zellen	-
Keine Cre-Aktivität	Interneurone, postnatale Granulazellen	-
Autor	(Goebbels et al., 2006)	(Casanova et al., 2001)

Goebbels *et al.* schränken die Nex-Cre-Aktivität auf einige Zelltypen ein. Die Fehlende Aktivität der Nex-Cre in postmitotischen Zellen und in Interneuronen könnte Ursache für den geringeren Verlust des CAR-Proteins im Nex-CAR-KO im Vergleich zum CamKII α -CAR-KO sein, da bisher nicht bekannt ist, in welchen Neuronen CAR exprimiert wird.

Für die Generierung der Nex-Cre-Mäuse wurde ein DNA-Fragment, welches die Cre-Rekombinase und Elemente des Nex-Promotors enthält, unspezifische in das Mausgenom integriert (Goebbels et al., 2006). Die CamKII α -Cre-Mäuse wurden durch Klonierung des Cre-Rekombinasegens hinter den CamKII α -Promotor generiert. Dies ermöglicht eine bessere Regulation der Cre-Expression, da alle regulatorischen Sequenzen für die Promotoraktivität erhalten sind, und kann zu einer höheren Rekombinationseffizienz bei der Generierung von KO-Tieren führen (Casanova et al., 2001). Die Integration des Cre-Rekombinasegens in das Mausgenom kann zu Nebeneffekten führen. Für beide Cre-Mauslinien ist jedoch kein Phänotyp beschrieben. Die Klonierung des Cre-Rekombinasegens hinter den CamKII α -Promotor führt zur Deletion eines Allels des CamKII α -Gens. Heterozygote CamKII α -KO-Tiere zeigen eine Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnis ab 10 Tage nach Beendigung des Trainings in zwei Hippokampus-abhängigen Lerntests, während dies 1-3 Tage nach dem Training nicht der Fall ist. Die Induktion von Langzeit-Potenzierung (LTP) ist im Hippokampus CamKII α -heterozygoter Knockouttiere vergleichbar mit Kontrolltieren. Im Kortex hingegen ist die Induktion von LTP in CamKII α -heterozygoten Knockouttieren beeinträchtigt (Frankland et al., 2001). Die Genexpressionsanalyse in Hippokampi von CamKII α -CAR-KO- und Kontrolltieren ergab keine Veränderung der CamKII α -mRNA-

Menge in den CAR-KO-Tieren (Affymetrix-Daten). Untersuchungen des Lernverhaltens wurden von uns bis maximal 5 Tage nach Trainingsende durchgeführt, einem Zeitpunkt zu dem Tiere mit heterozygoter Deletion von CamKII α ein normales Lernverhalten aufweisen. Die Bestimmung des LTPs erfolgte im Hippokampus und nicht im Kortex. Um dennoch einen Cre-Effekt auszuschließen, wurden Kontrollmessungen an CARwt/wt CamKII α + Tieren durchgeführt.

6.2 Die Gehirnstruktur ist in CAR-Knockout-Tieren unverändert

Für einige Proteine der IgSF, wie TAG-1, NCAM oder L1, wurde gezeigt, dass sie die neuronale Zellmigration oder des Wachstums von Dendriten und Axonen beeinflussen (Kyriakopoulou et al., 2002; Niethammer et al., 2002; Cremer et al., 1994). Die Deletion von NCAM in der Keimbahn führt zu einem veränderten Aufbau der Zellschichten im Hippokampus und zur Verkleinerung des Riechhirns. L1-defiziente Tiere zeigen eine Vergrößerung der Gehirnvventrikel und Veränderung des Dendritenbaums (Dahme et al., 1997). Die Untersuchungen der Gehirnstruktur der CAR-KO-Tiere ergaben keinen Unterschied zwischen CAR-KO- und Kontrolltieren. In den Nex-CAR-KO- und in den CamKII α -CAR-KO-Tieren waren die Anordnung der Zellschichten und der myelinisierten Axone im Kortex und Hippokampus unverändert im Vergleich zu Kontrollgeschwistertieren (Abb. 11, Abb. 12, Abb. 31). Ebenso wenig war eine Veränderung des Dendritenbaums in CamKII α -CAR-KO-Neuronen im Vergleich zu Kontrollneuronen zu beobachten (Abb. 13).

Dies könnte zum einen bedeuten, dass CAR nicht relevant für die Zellmigration oder das Längenwachstum neuronaler Ausläufer ist, oder dass der Verlust von CAR in den Nex-CAR-KO-Tieren zu gering und in den CamKII α -CAR-KO-Tieren zu spät ist, um sich auf die Gehirnstruktur auszuwirken. Die Assoziation von CAR mit dem Zytoskelett (siehe 3.2.4), die Isolation von Tau oder Alpha-actinin-4 in unseren *Pulldown*-Versuchen (Tab. 11) und die Daten von Patzke *et al.* lassen vermuten, dass CAR einen Einfluss auf die neuronale Struktur hat. So führt die Applikation von Adenovirusfragmenten zu kultivierten Hühnerneuronen zu einem erhöhten Längenwachstum der Dendriten, während anti-CAR Antikörper eine Verkürzung der Dendriten bewirken (Patzke et al., 2010). Ein Vergleich des konventionellen CAR-Knockouts und des adulten herzspezifischen CAR-Knockouts deuten darauf hin, dass der Zeitpunkt der CAR-Deletion relevant ist für die Auswirkung auf die Organstruktur. So führt der Verlust des CAR-Proteins in der Keimbahn zu strukturellen Veränderungen des

Myokards, während die Herzstruktur adulter herzspezifischer CAR-KO-Tiere unverändert ist (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Lisewski et al., 2008). Ähnliches kann bei einem Vergleich der konventionellen und gehirnspezifischen L1- und NCAM-KO-Tiere festgestellt werden. Im Gegensatz zu den konventionellen KO-Tieren sind weder im gehirnspezifischen NCAM- noch im gehirnspezifischen L1-KO Veränderungen der Gehirnstruktur zu beobachten (Law et al., 2003; Bukalo et al., 2004). Eine fehlende morphologische Veränderung in den konditionellen KO-Mäusen bedeutet nicht, dass L1, NCAM oder CAR unbedeutend für die Funktion des Gehirns bzw. des Herzens sind. Die gehirnspezifische Deletion von L1 und NCAM verursacht eine Veränderung der Reizweiterleitung im Gehirn und die adulte herzspezifische Deletion von CAR zu einer Störung der Reizweiterleitung im Herzen (Bukalo et al., 2004; Law et al., 2003; Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008).

6.3 CAR beeinflusst die basale synaptische Transmission

Der Einfluss der CAR-Deletion auf die Reizweiterleitung im Gehirn, wurde durch elektrophysiologische Messungen an Gehirnschnitten von CamKII α -CAR-KO- und Kontrollmäusen untersucht. Die Schaffer-Kollaterale wurden in der CA1-Region des Hippokampus durch verschiedene Reizstärken (Eingangssignal) stimuliert und die korrespondierende postsynaptische Potenzierung (fEPSP, Ausgangssignal) ermittelt. Der Vergleich von CAR-KO- und Kontrolltieren ergab eine kontinuierlich höhere postsynaptische Potenzierung als Antwort auf die entsprechende Reizstärke in den KO-Tieren als in den Kontrolltieren. Dies zeigt, dass die Reizübertragung in den KO-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren verbessert ist (Abb. 15A). Im Gegensatz dazu wurde kein Unterschied zwischen CAR $^{wt/wt}$ CamKII α^+ , CAR $^{wt/wt}$ und CAR $^{recf/recf}$ Tieren festgestellt, wodurch die genomische Integration der Cre-Rekombinase oder der loxP-Sequenzen als Ursache für den Phänotyp ausgeschlossen werden können (Abb. 15B).

Die gehirnspezifische Deletion von NCAM oder L1 führt ebenfalls zu einer erhöhten synaptischen Transmission in den entsprechenden KO-Tieren (Bukalo et al., 2004; Law et al., 2003). Ursache für eine erhöhte Reizübertragung könnte eine höhere Anzahl an stimulierbaren Axonen in den L1-, NCAM- oder CAR-KO-Tieren sein. Für den konditionellen L1-KO wurde diese Möglichkeit durch elektrophysiologische Messung ausgeschlossen (Law et al., 2003). Die morphologische Untersuchung der CAR-KO-Tiere sprechen gegen eine erhöhte Anzahl an stimulierbaren Axonen in der hippocampalen CA1-

Region (Abb. 11, Abb. 13). Es konnte kein Unterschied in der Zelldichte in diesem Bereich festgestellt werden. Da die Deletion von CAR keinen Einfluss auf das Längenwachstum der Dendriten hat, ist zu vermuten, dass CAR ebenso wenig das Wachstum von Axonen in diesen CAR-KO-Tieren beeinflusst. Da es sich bei den Schaffer-Kollateralen um nicht-myelinierete Axone handelt, ist eine direkte Aussage über die Anzahl der Axone in dieser Gehirnregion durch die Myelinfärbung von CAR-KO- und Kontrolltieren nicht möglich (Palani et al., 2010). Jedoch deutet die Übereinstimmung der Struktur myelinierter Axone auf keine morphologische Ursache für die erhöhte Signalübertragung in den CAR-KO-Tieren hin (Abb. 12). Eine weitere Ursache könnte eine geringere Anzahl an inhibitorischen Neuronen in den CAR-KO-Tieren sein. Da die Messungen im *Stratum radiatum* durchgeführt wurden, einer Zellschicht des Hippokampus die weniger als 2,5% inhibitorische Neurone enthält (Hiscock et al., 2000), scheint diese Möglichkeit nicht ausreichend, um die 70%ige Erhöhung der synaptischen Transmission in den CAR-KO-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu erklären. So wurde im gehirnspezifischen L1-KO eine geringere Inhibierung der synaptischen Aktivität ausgeschlossen (Law et al., 2003). Im Falle des gehirnspezifischen NCAM-Knockouts ist die erhöhte synaptische Transmission von der extrazellulären Kalziumkonzentration abhängig. Während bei extrazellulären Kalziumkonzentrationen von 1,5 mM das Verhältnis zwischen postsynaptischer Potenzierung und Stimulus-Stärke im NCAM-KO höher ist als in den Kontrolltieren, ist dies bei extrazellulären Kalziumkonzentrationen von 2 mM und 2,5 mM nicht der Fall (Bukalo et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für die Konzentrationsabhängigkeit ist der Einfluss von NCAM auf Kalziumkanäle und die intrazelluläre Kalziumhomeostase (Schuch et al., 1989; Kiryushko et al., 2006). Dies lässt vermuten, dass die erhöhte synaptische Transmission in den NCAM-, L1- und CAR-KO-Tieren durch Veränderungen prä- oder/und postsynaptischer Prozesse verursacht wird und weniger durch morphologische Veränderungen (Bukalo et al., 2004; Law et al., 2003).

6.4 CAR als Mediator bei der Exozytose von Vesikeln

Um zu untersuchen, ob die erhöhte synaptische Reizweiterleitung in den Schaffer-Kollateralen durch präsynaptische Veränderungen hervorgerufen wird, wurde die Freisetzung von Vesikeln mittels des Fluoreszenzfarbstoffes FM1-43 untersucht.

Dieser Farbstoff wird durch Endozytose in präsynaptische Vesikel aufgenommen und durch Exozytose der Vesikel wieder abgegeben. Da der Farbstoff eine höhere Fluoreszenzintensität aufweist, wenn er an Lipide gebunden ist, ermöglicht diese Eigenschaft eine Verfolgung der Vesikelfreisetzung mittels Fluoreszenzmikroskop (Betz et al., 1992; Betz et al., 1996; Biederer et al., 2002). Die Exozytose von Vesikeln wurde in zwei Wochen alten hippocampalen Neuronenkulturen von CAR-KO- und Kontrolltieren durchgeführt. In den CAR-KO-Neuronen kam es nach Depolarisierung der Membran zu einer schnelleren Reduktion des FM1-43-Fluoreszenzsignals im Vergleich zu Kontrollzellen, wobei die Synapsen der CAR-KO-Zellen eine höhere Fluoreszenzintensität vor der Vesikelfreisetzung aufwiesen als Synapsen der Kontrollzellen (Abb. 16).

Die Ursache für die erhöhte Ausgangsfluoreszenz in den CAR-KO-Synapsen kann beispielsweise an einer veränderten Aufnahme des FM1-43-Farbstoffes liegen. Dies konnte auf Grund der technischen Eigenschaften des Mikroskops nicht untersucht werden. Veränderungen der Vesikelendozytose kann unter anderem durch Beeinflussung von Proteinen der Endozytosemaschinerie oder der Lipidzusammensetzung der Zellmembran verursacht werden. So stimuliert Cholesterin die Internalisierung von Adenoviren nach Bindung an CAR und ein verringerter Cholesteringehalt in der Zellmembran führt zur Beeinträchtigung von Endo- und Exozytoseprozessen (Linetti et al., 2010; Thiele et al., 2000; Imelli et al., 2004). CAR befindet sich in speziellen *lipid-raft* Bereichen der Zellmembran, welche reich an Lipiden, wie z. B. Cholesterin, sind (Ashbourne Excoffon et al., 2003). Ob jedoch die Deletion eines Membranproteins dieser Mikrodomänen die Lipidzusammensetzung der Zellmembran beeinflusst, ist kaum untersucht.

Eine veränderte Expression von Proteinen der Endozytosemaschinerie beeinträchtigt ebenfalls die Endozytose von Vesikeln. So führt die Deletion von Syt1, einem Protein, das in Vesikel-Endo- und Exozytose involviert ist, zu einer verlangsamten Vesikelaufnahme und -abgabe (Nicholson-Tomishima and Ryan, 2004). Interessanterweise ist in den CAR-KO-Tieren die Expression von Syt2 erhöht. Syt1 und Syt2 sind sich funktionell sehr ähnlich (Stevens et al., 2003; Pang et al., 2006; Young and Neher, 2009). Es ist zu vermuten, dass die Erhöhung des Syt2-Proteingehaltes zusätzlich zu einer unveränderten Expression von Syt1 zu einer Umkehrung des Phänotyps des Syt1-KO führt, demzufolge zu einer beschleunigten Vesikelaufnahme und Vesikelabgabe. In Syt1-KO-Tieren wurde weiterhin eine Verkleinerung des *Recycling-Pools* festgestellt, also einer Verringerung an Vesikeln, die endo- und exozytiert werden (Nicholson-Tomishima et al., 2004; Ryan and Smith, 1995; Sudhof, 2004).

Somit könnte die höhere Fluoreszenzintensität der CAR-KO-Synapsen nach der Aufnahme von FM1-43 auf einen größeren *Recycling-Pool* in den CAR-KO-Synapsen hinweisen. Die Ergebnisse der repetitiven 10 Hz Applikation in den Schaffer-Kollateralen der CAR-KO- und Kontrolltiere unterstützen die Annahme eines vergrößerten *Recycling-Pools* in den CAR-KO-Synapsen. Bei diesem Versuch wurde während der 10 Hz Stimulierung eine geringere Depression der fEPSP-Amplitude in CAR-KO-Tieren als in Kontrollmäusen beobachtet. Nach Beendigung des Stimulus erhöhten sich die fEPSP-Amplituden anfänglich gleich schnell, wobei diese in CAR-KO-Gehirnschnitten im weiteren Verlauf schneller das Ausgangsniveau erreichten als in den Kontrollschnitten (Abb. 18A). Die kontinuierliche Applikation von 10 Hz führte zu einer nahezu vollständigen Entleerung des *Recycling-Pools* innerhalb von 60 s und hat somit eine Verringerung der postsynaptischen Potenzierung als Folge (Ryan et al., 1995). Auf Grund dessen ist eine geringere Depression in den CAR-KO-Gehirnschnitten ein Hinweis auf eine erhöhte Vesikelanzahl, die durch die kontinuierliche 10 Hz Stimulierung exozytiert werden (Ryan et al., 1995; Polo-Parada et al., 2001; Kavalali, 2007).

Die erhöhte Fluoreszenzintensität vor der FM1-43-Farbstofffreisetzung und die schnellere Reduktion des Fluoreszenzsignals in den CAR-KO-Zellen ließen eine höhere Gesamtvesikeldichte bzw. eine höhere Vesikeldichte in der Nähe der aktiven Zone erwarten. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an hippokampalen Kulturen ergaben keine Veränderung der Gesamtvesikeldichte, aber eine Verringerung der Vesikeldichte in der Nähe der aktiven Zone (Abb. 17). Dies deutet darauf hin, dass die Erhöhung des *Recycling-Pools* durch Rekrutierung von Vesikeln aus dem *Resting-Pool* erfolgt (siehe 3.1.3.2). Da Vesikel des *Recycling-Pools* gleichmäßig in der Synapse verteilt sind und nicht alle Vesikel dieses *Pools* an der aktiven Zone angelagert sind, muss dies kein Widerspruch zu der schnelleren FM1-43-Freisetzung sein (Schikorski et al., 1997; Sudhof, 2004; Ariel and Ryan, 2010). Es lässt jedoch vermuten, dass die schnellere Reduktion des Fluoreszenzsignals in CAR-KO-Zellen durch eine beschleunigte Rekrutierung der Vesikel an die aktive Zone oder an Membranbereiche außerhalb der aktiven Zone verursacht wird (Kavalali, 2007; Sudhof, 2004; Ryan, 2006; Yan et al., 2002; Polo-Parada et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit ist die Exozytose von fusionierten Vesikel, einem Prozess an dem das im CAR-KO verstärkt exprimierte Syt2 beteiligt ist. Dies würde zu einer erhöhten Freisetzung von FM1-43 während der Exozytose dieser Vesikel führen (He et al., 2009).

Bei einer schnelleren Exozytose von Vesikeln an der aktiven Zone würde man eine stärkere Depression bei der kontinuierlichen 10 Hz Stimulierung vermuten. Wir beobachten jedoch

eine verringerte Depression in den CAR-KO-Tieren. Eine mögliche Erklärung ist ein vergrößerter *Recycling-Pool* oder, eine Vesikelfreisetzung, die nicht nur an der aktiven Zone stattfindet. Dies vermuten Polo-Parada *et al.* als Ursache für ihre Beobachtung an neuromuskulären Endplatten des konventionellen NCAM-Knockouts. Die neuromuskuläre Endplatte ist eine chemische Synapse, in der elektrische Reize mittels Transmitter an die postsynaptische Muskelzellen übertragen werden. An den neuromuskulären Endplatten ist die FM1-43-Freisetzung in den NCAM-KO-Tieren schneller als in den Kontrolltieren. Da die Ausschüttung von Neurotransmittern in den neuromuskulären Endplatten der KO-Tiere unverändert ist, vermuten Polo-Parada *et al.* eine erhöhte Exozytose der Vesikel außerhalb der aktiven Zone (Polo-Parada *et al.*, 2001).

Jedoch kann die geringere Depression in den CAR-KO-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren auch andere Ursachen haben. Bei der FM1-43-Freisetzung werden nur Vesikel betrachtet, die vor der Depolarisierung der Membran durch 90 mM Kaliumchloridlösung mit FM1-43 beladen waren. Neu endozytierte Vesikel werden nicht beobachtet, da der FM1-43-Farbstoff während der Vesikelentladung kontinuierlich entfernt wurde und neu endozytierte Vesikel erst nach 90 s für eine erneute Exozytose bereit stehen (Ryan *et al.*, 1993). Da die erneute Exozytose von endozytierten Vesikeln bei der kontinuierlichen 10 Hz Stimulierung schneller ist als bei der Depolarisierung der Membran mit 90 mM Kaliumchloridlösung, wird bei diesem Versuch auch teilweise die Exozytose neuer Vesikel betrachtet (Ryan *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1995). Somit kann die geringere Depression in den CAR-KO-Tieren durch ein verbesserte erneute Rekrutierung (*Re-priming*) der Vesikel verursacht sein. Auf Grund der Tatsache, dass bei der 10 Hz Stimulierung die postsynaptische Potenzierung gemessen wird, kann ein Unterschied zwischen CAR-KO- und Kontrollzellen nicht nur durch Veränderungen präsynaptischer Prozesse verursacht werden, sondern auch durch Veränderungen an der Postsynapse. In Interaktionsstudien wurde festgestellt, dass CAR mit den postsynaptischen Proteinen PSD95 und PICK1 interagiert (Excoffien 2004). PICK1 bindet an die GluR2-Untereinheit des AMPA-Rezeptors und der Phosphokinase C. Der AMPA-Rezeptor ist hauptsächlich für die postsynaptische Antwort auf die Glutamatfreisetzung im Hippokampus bzw. hippocampalen Neuronen verantwortlich. Dabei ist die Lokalisierung der AMPA-Rezeptoren wichtig für die Effizienz der postsynaptischen Antwort, da AMPA-Rezeptoren im Allgemeinen akkumuliert an der Zelloberfläche vorliegen (Lisman and Raghavachari, 2006; Raghavachari and Lisman, 2004; Franks *et al.*, 2002). AMPA-Rezeptoren und andere Membranproteine zirkulieren zwischen der Zellmembran und intrazellulären Kompartimenten

(Bredt and Nicoll, 2003). Diese Wanderung der AMPA-Rezeptoren wird unter anderem durch die Interaktion mit PDZ-haltigen Proteinen wie PICK1 und die Phosphorylierung der GluR2-Untereinheit durch die Phosphokinase C gesteuert (Kim et al., 2001; Hirbec et al., 2003; Lu et al., 2005; Chung et al., 2000; Daw et al., 2000). Es besteht die Möglichkeit, dass die CAR-Deletion in den CAR-KO-Tieren die Funktion von PICK1 bei der Wanderung der AMPA-Rezeptoren beeinflusst und dadurch zu einer geringeren Depression der postsynaptischen Potenzierung während der verlängerten 10 Hz Stimulierung führt. Dies könnte zum Beispiel durch Analyse der AMPA-Rezeptor-Menge an der Zelloberfläche nach verlängerter Stimulierung überprüft werden oder durch Inhibierung der Phosphokinase C während der kontinuierlichen 10 Hz Applikation (Chung et al., 2000).

6.5 CAR beeinflusst hippocampale Langzeit-Potenzierung

Die erhöhte synaptische Transmission, die Veränderung in der Vesikelfreisetzung und die geringere Depression der postsynaptischen Potenzierung während der verlängerten 10 Hz Stimulierung zeigen, dass CAR die Signalübertragung zwischen Neuronen beeinflusst. Um zu testen ob dies Auswirkung auf eine langzeitliche Kommunikation zwischen Neuronen hat, wurden CAR-KO- und Kontrolltiere auf Langzeit-Potenzierung (LTP) untersucht.

Die Applikation von zwei tetanischen 100 Hz Stimuli im *Stratum radiatum* führte zur Induktion von LTP in CAR-KO- und Kontrolltieren. Ab zehn Minuten nach der Induktion war eine höhere Potenzierung in CAR-KO-Tieren als in Kontrolltieren zu beobachten (Abb. 18B). Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die CAR-Deletion auch auf die Verstärkung der synaptischen Signalübertragung auswirkt. In diesem Vorgang sind vor allem postsynaptische aber auch präsynaptische Veränderungen involviert (Stanton et al., 2005; Lisman et al., 2006; Zakharenko et al., 2001; Ahmed and Siegelbaum, 2009). Auf der postsynaptischen Seite kommt es unter anderem zu erhöhtem Einbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran und zur Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Gomperts, 1996; Park et al., 2008). Die Deletion von CAR könnte, über die in 6.4 besprochene Interaktion von PICK1 und der GluR2-Untereinheit, die Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren an die Zelloberfläche oder die Lokalisierung der NMDA-Rezeptoren beeinflussen. NMDA-Rezeptoren interagieren mit PSD95 (Kornau et al., 1995), welches ebenfalls als Interaktionspartner von CAR identifiziert wurde (Excoffon et al., 2004).

Nach der Induktion von LTP kommt es in erster Linie zu biochemischen Umbauprozessen auf der postsynaptischen Seite, während Veränderungen von präsynaptischen Prozessen, wie eine

verstärkte Transmitterfreisetzung, langsamer erfolgen (Stanton et al., 2005; Zakharenko et al., 2001; Bayazitov et al., 2007). Da wir erst 10 Minuten nach LTP-Induktion eine höhere Potenzierung in den CAR-KO-Tieren als in den Kontrolltieren beobachten und keine Veränderung kurz nach der Induktion (maximale fEPSP-Anstieg), lässt dies vermuten, dass die erhöhte Potenzierung durch Beeinflussung präsynaptischer Abläufe hervorgerufen wird. Ein Hinweis dafür ist die veränderte Vesikelfreisetzung in den CAR-KO-Neuronen im Vergleich zu Kontrollzellen.

LTP wird mit Lernverhalten und Gedächtnisbildung in Zusammenhang gebracht. Explizit der Hippokampus ist wichtig für räumliches Lernvermögen (Winson, 1978; Grant et al., 1992; Schmitt et al., 2004). Auf Grund der Assoziation von LTP im Hippokampus mit räumlichem Lernen, wurden die CAR-KO-Tiere und Kontrollen im *Context-Fear-Conditioning*-Versuch und im Barnes-Labyrinth untersucht. Beides sind Methoden um Hippokampus-abhängiges Lernverhalten zu untersuchen (Sanders et al., 2003; Ahi et al., 2004; Barrett et al., 2010). Im *Context-Fear-Conditioning*-Versuch wird das assoziative Lernverhalten einer Maus und im Barnes-Labyrinth das räumliche Lern- und Erinnerungsvermögen getestet (Sanders et al., 2003). In beiden Versuchen zeigten die CAR-KO-Tiere ein ähnliches Verhalten wie die Kontrolltiere. Beide Versuchsgruppen assoziierten sowohl den Ton als auch den Raum mit der Stromapplikation während der Konditionierung im *Context-Fear-Conditioning* und zeigten ein ähnliches räumliches Lern- und Erinnerungsvermögen im Barnes-Labyrinth.

Die pharmakologische Blockierung von NMDA-Rezeptoren oder die Deletion jeweils einer der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors verhindert die Induktion von LTP und beeinträchtigt das räumliche Lernvermögen (Morris et al., 1986; D'Hooge and De Deyn, 2001; Kiyama et al., 1998). Im gleichen Sinne führt die Überexpression der NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2B zu einer verstärkten Langzeit-Potenzierung und Steigerung des Lernvermögens (Wang et al., 2009). Auf Grund dieser und weiterer Beobachtungen in KO-Tieren wird vermutet, dass LTP ein Modell für die molekularen Abläufe bei der Bildung von Erinnerungsvermögen ist. Ob die molekularen Veränderungen, die LTP zu Grunde liegen, die gleichen sind wie beim Lernen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Lynch, 2004; Frey and Frey, 2008). So wird als Argument angeführt, dass bei der Induktion von LTP nur eine geringe Anzahl an Nervenzellen involviert ist, da es nur in einem definierten Bereich des Gehirns induziert wird. Im Gegensatz dazu sind bei dem Erlernen und Speichern von Information mehrere Gehirnareale beteiligt (Lynch, 2004; Frey et al., 2008). Auch zeigen einige KO-Modelle keinen direkten Zusammenhang zwischen erhöhtem LTP und

verbessertem Lernverhalten bzw. vermindertem LTP und verschlechtertem Lernvermögen (Reisel et al., 2002; Rutten et al., 2008; Lynch, 2004; Chan et al., 2010; Migaud et al., 1998; Zamanillo et al., 1999). So führt beispielsweise die Mutation von PSD95 zu einer erhöhten Langzeit-Potenzierung, aber zu einer Verschlechterung des Lernvermögens der modifizierten Mäuse (Migaud et al., 1998).

Somit muss eine Veränderung im LTP nicht mit verändertem Lernverhalten einhergehen. Die erhöhte Langzeit-Potenzierung in den CAR-KO-Tieren aber zeigt, dass CAR die Kommunikation zwischen Synapsen auch langfristig beeinflusst.

6.6 Veränderte Synaptotagmin 2 Expression in CAR-Knockout-Tieren

Im adulten herzspezifischen CAR-KO-Modell wurde ein Zusammenhang zwischen CAR und den *Gap Junction* Proteinen (Connexinen) beschrieben. Die KO-Tiere zeigten eine Störung der elektrischen Reizweiterleitung von den Vorhöfen zu den Herzkammern. Dabei war eine Reduktion des CAR interagierenden Proteins ZO-1 und der Connexine 45 und 43 (Cx45 und Cx43) zu beobachten (Lisewski et al., 2008). Parallel konnten Lim *et al.* eine Interaktion von CAR mit Cx45 unter Beteiligung des PDZ-Domänen enthaltenden Proteins ZO-1 nachweisen (Lim et al., 2008). Auf Grund dessen wurde die Expression der Connexine 36, 43 und 45 sowie der CAR interagierenden Proteine ZO-1, MUPP1 und β -Catenin in Gehirnen von CamKII α -CAR-KO-Tieren und Kontrolltieren überprüft. Es konnte keine Veränderung in der mRNA-Menge dieser Proteine im CAR-KO festgestellt werden (Abb. 23). Dies lässt vermuten, dass die physiologischen Veränderungen im gehirnspezifischen CAR-KO durch andere molekulare Mechanismen hervorgerufen werden als im adulten herzspezifischen CAR-KO. So lässt die eingeschränkte Signalübertragung im Herzen der adulten herzspezifischen CAR-KO-Tiere im Vergleich zu der verbesserten Signalübertragung im Gehirn der gehirnspezifischen CAR-KO-Tiere vermuten, dass CAR in beiden Organen in unterschiedliche Funktionswege involviert ist.

Auf Grund dessen wurde mittels Genexpressionsanalyse überprüft, ob die Expression weiterer Gene durch die Deletion von CAR beeinflusst ist. Die Analyse wurde in Hippokampi 10 Tage alter Mäuse des CamKII α -CAR-KO-Stamms durchgeführt. Im Gegensatz zu Kontrolltieren ist das CAR-Protein zu diesem Zeitpunkt im CAR-KO nicht mehr nachweisbar. Die am stärksten regulierten Gene im Hippokampus waren PROT und Syt2 (Tab. 10). Die erhöhte Expression beider Gene in den CAR-KO-Tieren konnten wir auf mRNA-Ebene mittels qRT-

PCR bestätigen (Abb. 24). Im Gegensatz zu PROT war eine Veränderung der Syt2-Expression auch auf Proteinebene nachweisbar (Abb. 25).

PROT ist ein Natrium- und Chlorid-abhängiger hoch-affiner L-Prolin-Transporter der im Hippokampus ausschließlich in glutamatergen Neuronen exprimiert wird. In diesen Neuronen ist PROT vorwiegend in Vesikeln und teilweise in der präsynaptischen Membran lokalisiert (Cohen and Nadler, 1997; Renick et al., 1999). Eine erhöhte Prolinkonzentration führt zu erhöhter synaptischer Transmission ohne die Freisetzungswahrscheinlichkeit der Vesikel zu beeinflussen (Cohen et al., 1997). Die Funktion von L-Prolin im Gehirn ist kaum untersucht, es gibt jedoch Hinweise, dass L-Prolin ein Neurotransmitter ist (Takemoto and Semba, 2006). Es wird vermutet, dass PROT durch die Beseitigung von Prolin aus dem extrazellulären Raum eine Rolle bei der Regulation der synaptischen Transmission spielt (Fremeau et al., 1992; Crump et al., 1999; Renick et al., 1999). Wir sehen keine Veränderung der PROT-Proteinmenge in den CAR-KO-Tieren. Dies könnte auf einer fehlenden Proteinsynthese oder auf einer erhöhten Instabilität des Proteins beruhen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich bei der erhöhten mRNA-Menge um eine besondere Spleiß-Variante von PROT handelt, die der Antikörper gegen das PROT-Protein nicht unterscheidet. Jedoch sind keine weiteren Isoformen von PROT bekannt. Es ist zu vermuten, dass PROT nicht in die veränderte Signalübertragung in den CAR-KO-Tieren involviert ist.

Die Expression von Syt2 war sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene im CAR-KO erhöht. Syt2 ist eines von 16 verschiedenen Synaptotagminen und ist zu 76% sequenzidentisch zu Syt1 (Pang et al., 2010). Beide Synaptotagmine ähneln sich hinsichtlich ihrer Funktion (Pang et al., 2006; Stevens et al., 2003; Young et al., 2009). Sie sind in der Membran von Vesikeln lokalisiert und binden über ihre zwei C-terminalen C2-Domänen Kalziumionen, wobei die Kalziumbindung die Affinität zu Phospholipiden erhöht (Fernandez et al., 2001; Pang et al., 2006). Beide Synaptotagmine sind Bestandteil der Exozytosemaschinerie in Neuronen und endokrinen Zellen und spielen besonders als Kalziumsensoren bei der schnellen (synchronen) Kalzium-abhängigen Vesikelfreisetzung eine wichtige Rolle (Bommert et al., 1993; Geppert et al., 1994; Pang et al., 2006).

Synaptische Vesikel werden durch die partielle Assemblierung der SNARE-Proteine Syntaxin, Snap-25 und Synaptobrevin an die aktive Zone der Präsynapse heran gezogen und für die Exozytose vorbereitet (Abb. 30). Eine Möglichkeit ist eine langsame asynchrone Kalzium-abhängige Exozytose von Vesikeln, die verzögert nach der Ankunft eines Aktionspotentials stattfindet, aber scheinbar durch die Komponenten der synchronen Vesikel-

Exozytose unterdrückt wird. So verhindert die Bindung von Complexin die Vesikel-Exozytose bis Syt1 oder Syt2 Kalziumionen gebunden hat. Durch die Depolarisierung der Zellmembran kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle und zum kurzzeitigen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Nach der Bindung von Kalziumionen interagieren Syt1 und Syt2 mit dem SNARE-Komplex und Phospholipiden und entfernt Complexin. Dies ermöglicht die Öffnung der Fusionspore und führt zur schnellen synchronen Vesikel-Exozytose (Rickman et al., 2004; Pang et al., 2006; Chicka and Chapman, 2009; Pang et al., 2010).

Syt1-defiziente Tiere sterben 48 h nach der Geburt, während die Syt2-Defizienz zu einer Lethalität nach 3 Wochen führt. Beide KO-Tiere zeigen eine Beeinträchtigung der schnellen, synchronen Kalzium-abhängigen Transmitterfreisetzung (Geppert et al., 1994; Pang et al., 2006). In hippokampalen Neuronen des Syt1-KO fehlt die schnelle Kalzium-abhängige Transmitterfreisetzung völlig, während sie in Syt2-KO-Zellen aus dem Vorderhirn nur verlangsamt ist. Eine stärkere Beeinträchtigung ist im Syt2-KO in neuromuskulären Zellen zu beobachten (Pang et al., 2006; Geppert et al., 1994). Ein Grund dafür ist die unterschiedliche Expression von Syt1 und Syt2. So wird Syt1 im Vorderhirn exprimiert, während Syt2 vorwiegend in kaudalen Gehirnarealen vorkommt (Geppert et al., 1991). Neben der Lokalisation unterscheiden sich die beiden Synaptotagmine in ihrer Kalzium-Affinität für die Phospholipidbindung. So ist die Kalzium-Affinität von Syt2 leicht geringer, als von Syt1 (Nagy et al., 2006). Dennoch kompensiert Syt2 in hohem Maße den Verlust von Syt1 in Syt1-KO-Zellen. Die Überexpression von Syt2 in Syt1-KO-Zellen führt zu einer nahezu vollständigen Wiederherstellung der synaptischen Transmission (Stevens et al., 2003; Nagy et al., 2006).

Die erhöhte Syt2-Proteinmenge in den CAR-KO-Tieren ist neben der veränderten Vesikel-Exozytose ein weiterer Hinweis, dass sich die CAR-Deletion auf präsynaptische Prozesse auswirkt. Des Weiteren weisen die Ergebnisse der *Pulldown*-Versuche darauf hin, dass CAR mit Proteinen der Präsynapse interagiert. Unter den isolierten Proteinen befinden sich TRPM1, Snapin, Copine-8 und Negr1. TRPM1 (*transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1*) ist ein Membranprotein mit verschiedenen Isoformen. Die längste Isoform hat ein Molekulargewicht von 180 kDa und ist ein Kalzium-abhängiger Kationenkanal. Von uns wurde die 55 kDa Isoform isoliert. Über die Funktion des Proteins und insbesondere der verkürzten Isoform ist wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass TRPM1 wichtig für die Depolarisierung von bipolaren Retinanervenzellen ist (Križaj et

al., 2010). Snapin ist ein Snap-25-Bindeprotein und befindet sich in der Membran neuronaler Vesikel. Snapin spielt eine Rolle bei der Synchronisierung der Vesikelfreisetzung und vermittelt eine verstärkte Interaktion von Snap-25 und Syt1 (Pan et al., 2009; Iardi et al., 1999). Copine-8 enthält, wie Syt1 und Syt2, zwei C2-Kalziumbindedomänen und bindet ebenso wie Syt1 und Syt2 Phospholipide in Abhängigkeit von Kalziumionen. Von Pang *et al.* wird vermutet, dass die Proteine der Copine-Familie eine Rolle bei der Kalzium-abhängigen Exozytose von Vesikeln einnehmen (Pang et al., 2010). Negr1 (*neuronal growth regulator 1*) gehört genauso wie CAR zu der IgSF. Es enthält drei extrazelluläre Ig-Domänen und vermittelt möglicherweise Zell-Zelladhäsion (Funatsu et al., 1999).

Die Isolierung von Snapin und Copine-8 zeigen eine potentielle Assoziation von CAR mit Proteinen der Exozytosemaschinerie. Somit ist denkbar, dass eine fehlende Wechselwirkung zwischen CAR und Snapin sich auf die Vesikel-Exozytose auswirkt, zumal die Deletion von Snapin einen negativen Einfluss auf die Vesikelfreisetzung und Größe des RRP hat (Pan et al., 2009). In den CAR-KO-Tieren ist die Syt2-Expression hochreguliert, während die Syt1-Expression unverändert ist (Abb. 27). Dies könnte eine erhöhte Vesikelfreisetzung und eine verstärkte synaptische Transmission verursachen (Abb. 30). So bewirkt die Überexpression von Syt1 über das Syt1-Wildtyp-Niveau hinaus eine Vergrößerung des RRP und einer Verstärkung der schnellen Vesikelfreisetzung (Nagy et al., 2006). Die Deletion von Syt2 bzw. eine instabile dominant-negative Form von Syt2 führt in neuromuskulären Verbindungen (*neuro-muscular junctions*; NMJ) zu einer verminderten und verlangsamteten Antwort auf Aktionspotentiale in Form einer verminderten Kalzium-abhängigen Transmitterfreisetzung (Pang et al., 2006, 2006; Young et al., 2009). Bei einer Überexpression von Syt2 würde man einen entgegengesetzten Phänotyp erwarten. Tatsächlich sehen wir eine beschleunigte Vesikelfreisetzung in den CAR-KO-Neuronen und ein höheres EPSP als Reaktion auf die Applikation von Aktionspotentialen. Als Kontrolle zu dem Effekt der dominant-negativen Form von Syt2 in der *Calyx-of-Held* wurde Syt2 in dieser Region überexprimiert (Young et al., 2009). Diese Überexpression führt zu einer erhöhten Antwort auf die Depolarisierung der Membran durch Aktionspotentiale. Diese Erhöhung war im post-hoc Test nicht signifikant, laut Angaben der Autoren auf Grund mangelnder Sensitivität des post-hoc-Tests. Dies deutet jedoch darauf hin, dass eine Syt2-Überexpression zu einer erhöhten Signaltransmission beiträgt (Young et al., 2009). Somit ist es möglich, dass die erhöhte Syt2-Konzentration die verstärkte Signaltransmission und Vesikelfreisetzung verursacht.

Neben der Beeinflussung der Syt2-Expression durch fehlende Interaktion von CAR mit Snapin oder Copine-8 sind auch andere Signalwege denkbar. Eine Möglichkeit ist die Beeinflussung von Kalziumströmen, die zu einer veränderten Expression des Kalziumsensors Syt2 führt (Abb. 30, blaue Pfeile). Für das IgSF-Protein NCAM wurde beispielsweise gezeigt, dass es die Funktion von Kalziumkanälen beeinflusst (Schuch et al., 1989; Kiryushko et al., 2006). Weiterhin ist eine Auswirkung der CAR-Deletion auf Calmodulin denkbar. Die Syt2-Expression wird im Vorderhirn durch Calmodulin inhibiert. So führt die Deletion von Calmodulin oder der Kalziumbindedomänen von Calmodulin zu einer CamKII α -unabhängigen Steigerung der Syt2-Expression im Kortex um das 5fache (Pang et al., 2010). Dies zeigt, dass die Expression von Syt2 stark reguliert ist und durch Beeinflussung von Proteinen in vorderen Gehirnregionen aktiviert werden kann.

Zusammenfassung der Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig mittels gehirnspezifischer CAR-KO-Tiere die Funktion von CAR im zentralen Nervensystem untersucht werden. Die Deletion von CAR führte in unseren CAR-KO-Modellen zu keiner morphologischen Veränderung im Gehirn, jedoch zu einer erhöhten Reizübertragung im Hippokampus. Dies konnte zum einen während der Applikation verschiedener Reizstärken und zum anderen bei der repetitiven Stimulation mit 10 Hz beobachtet werden. Weiterhin führte die CAR-Deletion zu einer erhöhten Langzeit-Potenzierung (LTP) ohne Veränderungen in räumlichen oder assoziativen Lerntests. Die fehlende Interaktion zwischen CAR und PSD95 oder PICK1 in CAR-KO-Zellen könnte zu einer Veränderung der synaptischen Reizübertragung führen (Abb. 30). Unsere Untersuchungen auf der zellulären Ebene weisen jedoch auf eine Funktion von CAR auf präsynaptischer Seite hin. So kommt es in CAR-defizienten hippocampalen Neuronen zu einer veränderten Vesikel-Exozytose und zu einer erhöhten Expression von Syt2, einem wichtigen Protein für die Kalzium-abhängige Vesikelfreisetzung. Durch Interaktionsstudien konnten wir potentielle neuronale Interaktionspartner von CAR identifizieren, wie Snapin und Copine-8, welche ebenfalls an der Exozytose von Vesikeln beteiligt sind (Pan et al., 2009; Ilardi et al., 1999; Chheda et al., 2001; Pang et al., 2010).

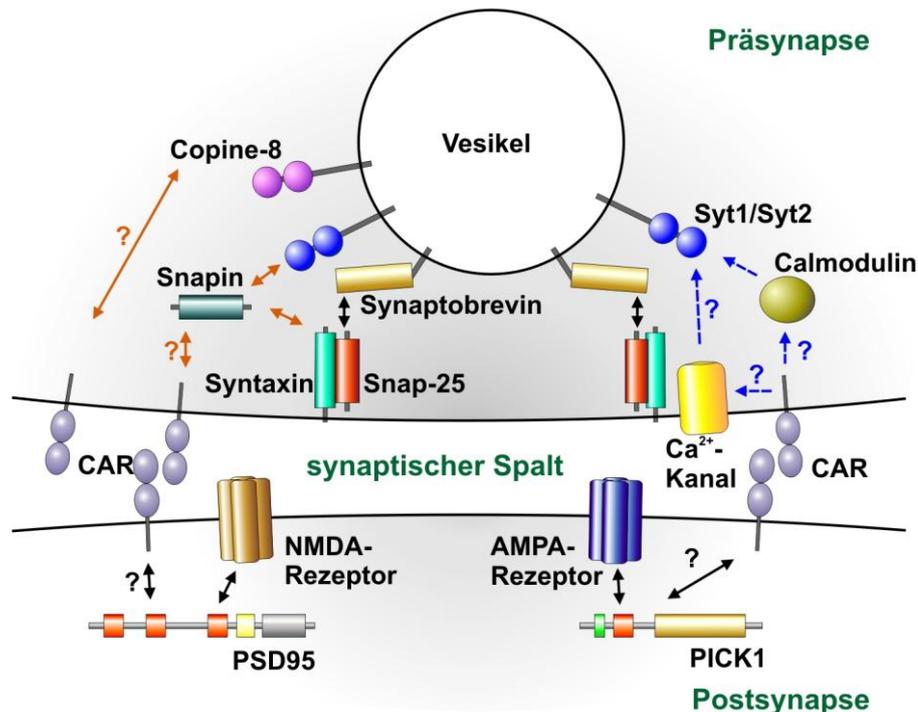


Abb. 30: Zusammenfassung möglicher Funktionswege von CAR in der Synapse. Die erhöhte synaptische Reizübertragung in den CAR-KO-Tieren könnte durch Beeinflussung von AMPA- und NMDA-Rezeptoren in der Postsynapse verursacht sein (schwarze Pfeile). In den CAR-KO-Tieren ist die Syt2-Expression erhöht. Dies könnte auf Beeinflussung von Kalziumkanälen oder/und Calmodulin, als Regulator der Syt2-Expression, in den CAR-KO-Tieren beruhen (blaue Pfeile). Die Ergebnisse der *Pulldown*-Experimente weisen auf eine Interaktion (orangene Doppelpfeile) von CAR mit Copine-8 und Snapin hin. Copine-8 enthält wie Syt1/Syt2 zwei Kalziumbindedomänen und ist eventuell an der Vesikel-Exozytose beteiligt. Snapin interagiert mit Syt1 und Snap-25. Die Interaktion von Snap-25, Syntaxin und Synaptobrevin ist wichtig für die Vesikel-Exozytose (grüne Doppelpfeile). Somit könnte CAR durch die Interaktion mit Snapin oder/und Copine-8 an der Regulierung der Vesikelfreisetzung beteiligt sein.

Somit weisen unsere Daten darauf hin, dass CAR mit Proteinen der Exozytosemaschinerie interagiert und einen Einfluss auf die synaptische Transmission hat.

7 Ausblick

Unsere Daten zeigen, dass die Deletion von CAR zu einer gesteigerten Signalweiterleitung im Gehirn führt und lassen vermuten, dass CAR eine regulierende Funktion in der synaptischen Reizweiterleitung einnimmt. Die veränderte synaptische Transmission in den CAR-KO-Tieren könnte durch Veränderungen auf Seiten der Post- oder auf Seiten der Präsynapse verursacht werden. Excoffon *et al.* zeigen eine Interaktion von CAR mit PSD95 und PICK1, welche mit den postsynaptischen AMPA- und NMDA-Rezeptoren interagieren (Excoffon *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Christopherson *et al.*, 1999). In weiterführenden Studien ist zu klären, ob CAR in postsynaptische Prozesse, wie die Lokalisierung der AMPA- und NMDA-Rezeptoren, involviert ist. Dies könnte unter anderem durch immunologische Lokalisationsstudien, wie Oberflächenbiotinylierung oder durch elektrophysiologische Untersuchungen unter Verwendung selektiver Blocker, geklärt werden. Unsere Ergebnisse weisen vorwiegend auf eine Funktion von CAR auf der präsynaptischen Seite hin. In *Pulldown*-Experimenten mit der zytoplasmatischen CAR-Region wurden Proteine der Exozytosemaschinerie, Copine-8 und Snapin, isoliert. Da beide Proteine keine PDZ-Domänen besitzen, vermuten wir eine Interaktion von Copine-8 oder Snapin mit anderen Bindemotiven innerhalb des CAR-Proteins oder eine indirekte Interaktion mit CAR. Dies könnte mittels verschiedener CAR-Proteinkonstrukte und Tandem-Affinitäts-Aufreinigung oder Yeast-two-Hybrid-Screen untersucht werden. Es ist zu vermuten, dass CAR durch Beeinflussung der Snapin- oder Copine-8-Funktion die Exozytose von Vesikeln reguliert. Die Überexpression von Snapin oder Copine-8 in den CAR-KO- und Wildtypzellen und deren Analyse würde darüber Aufschluss geben. Ein potentieller Effekt von CAR auf Calmodulin oder Kalziumströme (siehe 6.6) kann durch Untersuchung der Calmodulin-Expression und mittels Kalzium-Imaging durch Aktivierung von CAR durch Zugabe von extrazellulären Liganden, wie Viruspartikel oder anti-CAR Antikörper, geklärt werden. Die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die der erhöhten synaptischen Signaltransmission in den CAR-KO-Tieren zu Grunde liegen, ermöglicht ein besseres Verständnis der Reizübertragung im Gehirn. Veränderte synaptische Reizweiterleitungen sind nicht nur Grundlage des Lernens und des Erinnerungsvermögens, sie können auch pathologische Folgen haben. Somit kann durch weiterführende Studien geklärt werden, in wie weit CAR ein therapeutischer Ansatzpunkt für neurologische Erkrankungen mit deregulierter Reizübertragung ist.

8 Anhang

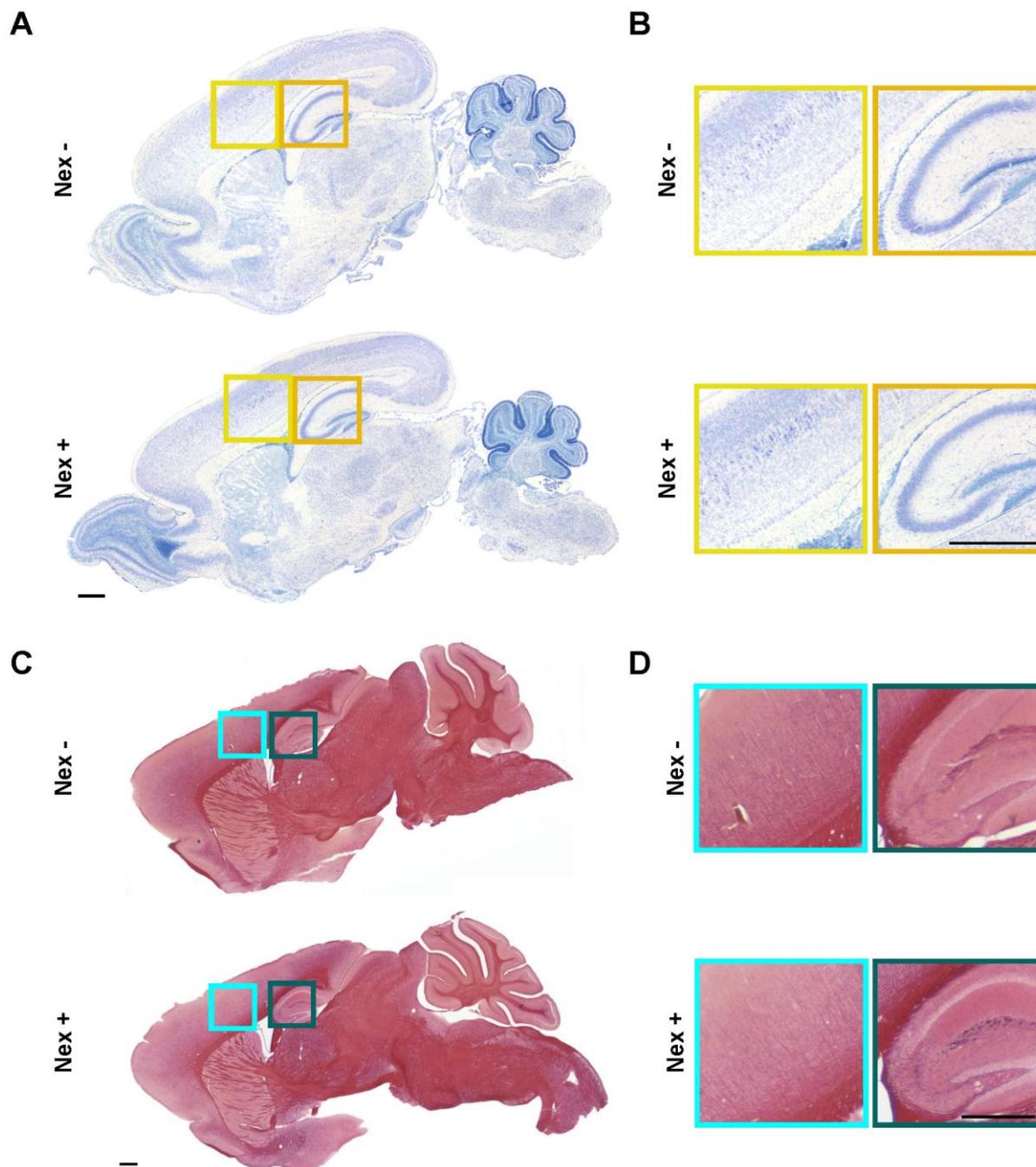


Abb. 31 Morphologische Untersuchung des Nex-CAR-KO-Stamms mittels Nissl-Färbung und Myelinfärbung. (A) Die Neuronen in Gehirnschnitten 7 Tage alter Mäuse wurden mittels Färbung der Nissl-Schollen angefärbt. Die Anordnung der Neuronen in den Nex-KO-Tieren (Nex+) ist vergleichbar mit der Neuronenschichtung in Kontrolltieren (Nex-). (B) Vergrößerung von (A). (C) Färbung der Myelinscheide durch Schwarzgold-Färbung. Die Signalintensität und Anordnung der myelinisierten Axone stimmte zwischen Gehirnschnitten 70 Tage alter KO- und Kontrolltiere überein. (D) Vergrößerung von (C). Größenbalken 500 μm .

Tab. 13: Regulierte Gene mit verringerter Expression in CAR-KO-Hippokampus (P-Wert $\leq 0,05$; KO/Kontrollverhältnis $\leq -1,2$)

Gen-Symbol	RefSeq	Chromosom	P-Wert	Stepup (P-Wert)	Durchschnitt (KO)	Durchschnitt (Ktr)	Verhältnis (KO/Ktr)
Cxadr	NM_001025192	chr16	0,000	0,106	7,458	10,839	-10,413
Acta2	NM_007392	chr19	0,002	0,997	8,698	9,446	-1,679
Olfir530	NM_146519	chr7	0,035	0,997	6,299	7,017	-1,644
Pramel5	NM_001085418	chr4	0,047	0,997	7,047	7,692	-1,564
Olfir628	NM_147097	chr7	0,001	0,997	6,549	7,174	-1,543
Olfir283	NM_147036	chr15	0,029	0,997	6,347	6,953	-1,522
Zfp60	BC094367	chr7	0,030	0,997	7,328	7,896	-1,483
Gnrhr	NM_010323	chr5	0,025	0,997	7,836	8,400	-1,479
Eml5	NM_001081191	chr12	0,001	0,997	8,111	8,669	-1,471
Abca16	NR_024051	chr7	0,005	0,997	6,697	7,221	-1,437
Pira3	NM_011090	chr7	0,032	0,997	6,756	7,263	-1,422
Nme2	NM_008705	chr11	0,028	0,997	7,195	7,698	-1,417
Eln	NM_007925	chr5	0,000	0,283	8,913	9,415	-1,416
Eif3e	NM_008388	chr15	0,049	0,997	9,741	10,232	-1,405
Lmbr1	NM_020295	chr5	0,036	0,997	7,318	7,805	-1,402
Cd70	NM_011617	chr17	0,039	0,997	7,749	8,229	-1,395
Gngl1	NM_025331	chr6	0,027	0,997	6,731	7,190	-1,374
Tmem18	NM_172049	chr12	0,031	0,997	9,453	9,882	-1,346
Nudt11	NM_021431	chrX	0,009	0,997	9,071	9,481	-1,328
M6pr	NM_010749	chr6	0,022	0,997	8,494	8,901	-1,326
Olfir360	NM_146622	chr2	0,048	0,997	6,500	6,903	-1,323
Mx1	EU638327	chr16	0,005	0,997	7,916	8,315	-1,318
Pigw	NM_027388	chr11	0,038	0,997	7,984	8,354	-1,293
Eif4a2	NM_001123038	chr16	0,015	0,997	10,717	11,083	-1,289
Cyp2c50	NM_134144	chr19	0,022	0,997	7,442	7,806	-1,287
Gp5	NM_008148	chr16	0,002	0,997	6,836	7,187	-1,275
Clps	NM_025469	chr17	0,009	0,997	7,823	8,173	-1,275
Mapksp1	NM_019920	chr7	0,032	0,997	7,149	7,492	-1,269
Zmynd19	NM_026021	chr2	0,031	0,997	7,934	8,270	-1,262
Ebag9	NM_019480	chr15	0,017	0,997	8,443	8,777	-1,261
Higd1a	NM_019814	chr9	0,023	0,997	10,147	10,478	-1,258
EG224180	XR_035108	chr16	0,035	0,997	7,033	7,361	-1,255
Osgin2	NM_145950	chr4	0,019	0,997	8,495	8,821	-1,253
Duxbl	NM_183389	chr14	0,003	0,997	6,935	7,260	-1,253
Gabra2	NM_008066	chr5	0,041	0,997	11,071	11,394	-1,251
Arl6ip6	NM_022989	chr2	0,029	0,997	8,658	8,974	-1,245
Ccnd3	NM_001081636	chr17	0,018	0,997	7,646	7,960	-1,244
Helt	NM_173789	chr8	0,004	0,997	6,613	6,927	-1,243
Crip1	NM_007763	chr12	0,017	0,997	7,944	8,232	-1,221
Ckap2l	NM_181589	chr2	0,042	0,997	7,345	7,630	-1,219
Polr2d	NM_027002	chr18	0,009	0,997	9,017	9,301	-1,218
Spcs2	NM_025668	chr7	0,005	0,997	10,280	10,561	-1,215
Tas2r129	NM_207029	chr6	0,028	0,997	7,488	7,768	-1,214
Rrm2b	NM_199476	chr15	0,024	0,997	8,502	8,782	-1,214
Frat1	NM_008043	chr19	0,039	0,997	8,751	9,025	-1,209
Gpbp1l1	NM_029868	chr4	0,008	0,997	8,774	9,047	-1,208
Slc35c1	NM_211358	chr2	0,028	0,997	8,184	8,456	-1,207

Gen-Symbol	RefSeq	Chromosom	P-Wert	Stepup (P-Wert)	Durchschnitt (KO)	Durchschnitt (Ktr)	Verhältnis (KO/Ktr)
Zfp326	NM_018759	chr5	0,040	0,997	8,667	8,939	-1,207
Gpx2	NM_030677	chr12	0,047	0,997	6,953	7,222	-1,205
Fen1	NM_007999	chr19	0,016	0,997	7,543	7,811	-1,204
Psm7	NM_011969	chr2	0,038	0,997	9,440	9,707	-1,204
Trnt1	NM_027296	chr6	0,043	0,997	8,578	8,846	-1,203
Mtrf1	NM_145960	chr14	0,020	0,997	7,707	7,972	-1,202
BC016423	NM_134063	chr13	0,034	0,997	8,943	9,207	-1,201
Myom1	NM_010867	chr17	0,013	0,997	7,155	7,419	-1,201

Tab. 14: Regulierte Gene mit erhöhter Expression in CAR-KO-Hippokampus (P-Wert \leq 0,05; KO/Kontrollverhältnis \geq 1,2)

Gen-Symbol	RefSeq	Chromosom	P-Wert	Stepup (P-Wert)	Durchschnitt (KO)	Durchschnitt (Ktr)	Verhältnis (KO/Ktr)
Fmc1	NM_025363	chr6	0,031	0,997	7,757	7,494	1,200
Rpl26	NM_009080	chr11	0,024	0,997	8,430	8,167	1,200
Calm4	NM_020036	chr13	0,029	0,997	8,355	8,089	1,203
Ocell	NM_029865	chr8	0,009	0,997	7,857	7,590	1,203
Qrfp	NM_183424	chr2	0,032	0,997	8,615	8,347	1,204
Hist1h1t	NM_010377	chr13	0,029	0,997	7,461	7,191	1,206
Ankrd33	NM_144790	chr15	0,043	0,997	7,658	7,388	1,206
Ildr1	NM_134109	chr16	0,015	0,997	7,885	7,614	1,207
EG406223	NM_001003670	chr15	0,010	0,997	7,549	7,277	1,208
Pla2g2d	NM_011109	chr4	0,000	0,727	7,734	7,460	1,209
Lyplal1	NM_146106	chr1	0,045	0,997	9,728	9,454	1,210
Twist1	NM_011658	chr12	0,033	0,997	8,152	7,877	1,210
Catsper1	NM_139301	chr19	0,022	0,997	7,499	7,224	1,211
Olfr522	NM_146952	chr7	0,021	0,997	7,580	7,303	1,211
Traf1	NM_009421	chr2	0,000	0,762	7,718	7,439	1,213
Serpinb7	NM_027548	chr1	0,033	0,997	9,993	9,715	1,213
Tnni3k	NM_177066	chr3	0,031	0,997	7,693	7,414	1,213
St6galnac1	NM_011371	chr11	0,047	0,997	7,456	7,173	1,216
Gm1574	BC064117	chr13	0,021	0,997	7,551	7,266	1,219
Calhm2	NM_133746	chr19	0,016	0,997	7,348	7,061	1,220
Ripply3	NM_133229	chr16	0,021	0,997	8,294	8,006	1,220
Mfap5	NM_015776	chr6	0,025	0,997	7,217	6,925	1,225
Olfr319	NM_146500	chr11	0,028	0,997	7,392	7,098	1,226
Apol10b	NM_177820	chr15	0,043	0,997	7,251	6,956	1,227
Btn3a3	NM_030746	chr17	0,034	0,997	7,748	7,452	1,227
Aim2	NM_001013779	chr1	0,007	0,997	7,547	7,251	1,228
Olfr557	NM_146361	chr7	0,009	0,997	7,704	7,400	1,235
EG272350	NR_003622	chr7	0,030	0,997	7,910	7,603	1,238
Sds	NM_145565	chr5	0,012	0,997	7,827	7,515	1,242

Gen-Symbol	RefSeq	Chromosom	P-Wert	Stepup (P-Wert)	Durchschnitt (KO)	Durchschnitt (Ktr)	Verhältnis (KO/Ktr)
Rab17	NM_008998	chr1	0,036	0,997	8,552	8,239	1,242
AY702102	AY702102	chr2	0,019	0,997	7,033	6,719	1,243
Krt25	NM_133730	chr11	0,035	0,997	8,946	8,631	1,244
Olfr170	NM_146957	chr16	0,035	0,997	8,031	7,716	1,244
Olfr1389	NM_147066	chr11	0,017	0,997	7,649	7,334	1,244
Btk	NM_013482	chrX	0,039	0,997	6,920	6,600	1,248
Olfr614	NM_147100	chr7	0,039	0,997	7,428	7,106	1,250
Gdf2	NM_019506	chr14	0,039	0,997	7,726	7,403	1,251
Fut2	NM_018876	chr7	0,005	0,997	7,330	7,002	1,255
Slfn9	NM_172796	chr11	0,040	0,997	8,047	7,714	1,259
Olfr341	NM_146950	chr2	0,034	0,997	7,064	6,727	1,263
Olfr223	NM_146429	chr11	0,014	0,997	8,676	8,338	1,264
Asb18	NM_139152	chr1	0,001	0,997	7,551	7,211	1,266
Tshb	NM_009432	chr3	0,043	0,997	7,168	6,824	1,269
Ntf5	NM_198190	chr7	0,030	0,997	8,267	7,917	1,275
Olfr1015	NM_146571	chr2	0,023	0,997	7,102	6,751	1,275
Gdf6	NM_013526	chr4	0,049	0,997	7,433	7,081	1,277
Zswim2	NM_027964	chr2	0,047	0,997	7,640	7,277	1,286
Gjd4	NM_153086	chr18	0,018	0,997	7,578	7,214	1,287
Fbxw13	NM_177598	chr9	0,019	0,997	7,446	7,073	1,295
Wdr20b	NM_027614	chr12	0,010	0,997	7,256	6,879	1,299
Olfr1153	NM_146640	chr2	0,036	0,997	6,922	6,541	1,302
Pyy	NM_145435	chr11	0,010	0,997	7,364	6,982	1,303
Vpreb3	NM_009514	chr10	0,026	0,997	7,376	6,988	1,309
H2-t9	AB267093	chr17	0,036	0,997	8,906	8,516	1,310
Ninj2	NM_016718	chr6	0,047	0,997	7,390	6,995	1,315
Pgcp	NM_018755	chr15	0,048	0,997	9,010	8,614	1,316
Angptl3	NM_013913	chr4	0,009	0,997	7,228	6,830	1,317
Tuba3b	NM_009449	chr6	0,044	0,997	8,368	7,970	1,318
Nppb	NM_008726	chr4	0,044	0,997	7,235	6,833	1,322
Aicda	NM_009645	chr6	0,036	0,997	7,127	6,715	1,331
Ndufa12	ENSMUST0000020209	chr5	0,022	0,997	12,473	12,058	1,333
V1rh5	NM_134214	chr13	0,021	0,997	7,185	6,765	1,337
Ido1	NM_008324	chr8	0,007	0,997	8,007	7,582	1,342
Txndc3	NM_181591	chr13	0,043	0,997	7,376	6,946	1,346
EG433365	NM_001008426	chr1	0,010	0,997	7,755	7,324	1,348
Lyzl1	NM_026092	chr18	0,023	0,997	7,003	6,572	1,348
Acot6	NM_172580	chr12	0,046	0,997	7,629	7,191	1,354
Olfr1217	NM_146901	chr2	0,040	0,997	7,689	7,240	1,365
Btg4	NM_019493	chr9	0,044	0,997	7,106	6,656	1,365
Srd5a212	NM_153801	chr5	0,028	0,997	7,567	7,114	1,369

Gen-Symbol	RefSeq	Chromosom	P-Wert	Stepup (P-Wert)	Durchschnitt (KO)	Durchschnitt (Ktr)	Verhältnis (KO/Ktr)
Gjc2	NM_080454	chr11	0,028	0,997	7,862	7,408	1,370
Nkg7	NM_024253	chr7	0,007	0,997	9,685	9,201	1,399
V1rc22	NM_134177	chr6	0,023	0,997	7,627	7,140	1,402
Tnnc2	NM_009394	chr2	0,036	0,997	8,084	7,597	1,402
Tyms-ps	NR_000040	chr10	0,039	0,997	7,414	6,923	1,406
Procr	NM_011171	chr2	0,025	0,997	7,976	7,471	1,420
H2-M2	NM_008204	chr17	0,016	0,997	7,371	6,853	1,432
Rdh1	NM_080436	chr10	0,041	0,997	9,062	8,543	1,433
Olfrc394	NM_147007	chr11	0,034	0,997	7,553	7,019	1,448
Olfrc745	NM_146299	chr14	0,047	0,997	6,925	6,391	1,448
Olfrc1388	NM_146467	chr11	0,047	0,997	7,570	7,033	1,452
LOC100042767	XM_001477460	chr18	0,049	0,997	8,704	8,152	1,466
Hoxd10	NM_013554	chr2	0,017	0,997	8,066	7,509	1,471
Hoxb8	NM_010461	chr11	0,035	0,997	7,418	6,812	1,522
Cyp4a12b	NM_172306	chr4	0,048	0,997	6,972	6,349	1,540
Olfrc20	NM_146923	chr11	0,047	0,997	6,996	6,350	1,565
Olfrc202	NM_146995	chr16	0,006	0,997	7,148	6,444	1,629
Cd209c	NM_130903	chr8	0,022	0,997	7,346	6,636	1,636
Olfrc862	NM_146562	chr9	0,027	0,997	6,688	5,828	1,816
Slc6a7	NM_201353	chr18	0,000	0,161	11,289	10,098	2,283
Syt2	NM_009307	chr1	0,000	0,353	9,139	7,910	2,344

9 Literaturverzeichnis

- Ahi, J., Radulovic, J., and Spiess, J. (2004). The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. *Behav. Brain Res* 149, 17-31.
- Ahmed, M. S., and Siegelbaum, S. A. (2009). Recruitment of N-Type Ca(2+) channels during LTP enhances low release efficacy of hippocampal CA1 perforant path synapses. *Neuron* 63, 372-385.
- Ahn, J., Jee, Y., Seo, I., Yoon, S. Y., Kim, D., Kim, Y. K., and Lee, H. (2008). Primary neurons become less susceptible to coxsackievirus B5 following maturation: the correlation with the decreased level of CAR expression on cell surface. *J. Med. Virol* 80, 434-440.
- Alfonso, A., Grundahl, K., Duerr, J. S., Han, H. P., and Rand, J. B. (1993). The *Caenorhabditis elegans* unc-17 gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science* 261, 617-619.
- Anders, M., Christian, C., McMahon, M., McCormick, F., and Korn, W. (2003). Inhibition of the Raf/MEK/ERK pathway up-regulates expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cancer cells. *Cancer Res* 63, 2088-2095.
- Ariel, P., and Ryan, T. A. (2010). Optical mapping of release properties in synapses. *Front Neural Circuits* 4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20802854> [Accessed October 18, 2010].
- Arikkath, J., and Reichardt, L. F. (2008). Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 31, 487-494.
- Ashbourne Excoffon, K., Moninger, T., and Zabner, J. (2003). The coxsackie B virus and adenovirus receptor resides in a distinct membrane microdomain. *J Virol* 77, 2559-2567.
- Asher, D., Cerny, A., Weiler, S., Horner, J., Keeler, M., Neptune, M., Jones, S., Bronson, R., Depinho, R., and Finberg, R. (2005). Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. *Genesis* 42, 77-85.
- Barnett, M. W., and Larkman, P. M. (2007). The action potential. *Pract Neurol* 7, 192-197.
- Barrett, G. L., Reid, C. A., Tsafoulis, C., Zhu, W., Williams, D. A., Paolini, A. G., Trieu, J.,

- and Murphy, M. (2010). Enhanced spatial memory and hippocampal long-term potentiation in p75 neurotrophin receptor knockout mice. *Hippocampus* 20, 145-152.
- Bayazitov, I. T., Richardson, R. J., Fricke, R. G., and Zakharenko, S. S. (2007). Slow presynaptic and fast postsynaptic components of compound long-term potentiation. *J. Neurosci* 27, 11510-11521.
- Bayer, K. U., De Koninck, P., Leonard, A. S., Hell, J. W., and Schulman, H. (2001). Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* 411, 801-805.
- Bekkers, J. M., and Stevens, C. F. (1991). Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 7834-7838.
- Bergelson, J., Cunningham, J., Droguett, G., Kurt-Jones, E., Krithivas, A., Hong, J., Horwitz, M., Crowell, R., and Finberg, R. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320-1323.
- Bergelson, J., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M., Wickham, T., Crowell, R., and Finberg, R. (1998). The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol* 72, 415-419.
- Betz, W. J., and Bewick, G. S. (1992). Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255, 200-203.
- Betz, W. J., Mao, F., and Smith, C. B. (1996). Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol* 6, 365-371.
- Bewley, M. C., Springer, K., Zhang, Y. B., Freimuth, P., and Flanagan, J. M. (1999). Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 286, 1579-1583.
- Biederer, T., Sara, Y., Mozhayeva, M., Atasoy, D., Liu, X., Kavalali, E. T., and Südhof, T. C. (2002). SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297, 1525-1531.
- Bommert, K., Charlton, M. P., DeBello, W. M., Chin, G. J., Betz, H., and Augustine, G. J. (1993). Inhibition of neurotransmitter release by C2-domain peptides implicates synaptotagmin in exocytosis. *Nature* 363, 163-165.

- Bowles, K., Gibson, J., Wu, J., Shaffer, L., Towbin, J., and Bowles, N. (1999). Genomic organization and chromosomal localization of the human Coxsackievirus B-adenovirus receptor gene. *Hum Genet* *105*, 354-359.
- Bredt, D. S., and Nicoll, R. A. (2003). AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* *40*, 361-379.
- Bukalo, O., Fentrop, N., Lee, A. Y. W., Salmen, B., Law, J. W. S., Wotjak, C. T., Schweizer, M., Dityatev, A., and Schachner, M. (2004). Conditional ablation of the neural cell adhesion molecule reduces precision of spatial learning, long-term potentiation, and depression in the CA1 subfield of mouse hippocampus. *J. Neurosci* *24*, 1565-1577.
- Carew, T. J., Hawkins, R. D., Abrams, T. W., and Kandel, E. R. (1984). A test of Hebb's postulate at identified synapses which mediate classical conditioning in *Aplysia*. *J. Neurosci* *4*, 1217-1224.
- Carson, S. (2001). Receptor for the group B coxsackieviruses and adenoviruses: CAR. *Rev Med Virol* *11*, 219-226.
- Casanova, E., Fehsenfeld, S., Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Greiner, E., Stewart, A., and Schutz, G. (2001). A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis* *31*, 37-42.
- Ceccarelli, B., and Hurlbut, W. P. (1980). Ca²⁺-dependent recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol* *87*, 297-303.
- Chan, C., Chen, H., Bradley, A., Dragatsis, I., Rosenmund, C., and Davis, R. L. (2010). Alpha8-integrins are required for hippocampal long-term potentiation but not for hippocampal-dependent learning. *Genes Brain Behav* *9*, 402-410.
- Chen, J., Ghosh, R., Finberg, R., and Bergelson, J. (2003). Structure and chromosomal localization of the murine coxsackievirus and adenovirus receptor gene. *DNA Cell Biol* *22*, 253-259.
- Chen, J., Zhou, B., Yu, Q., Shin, S., Jiao, K., Schneider, M., Baldwin, H., and Bergelson, J. (2006). Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle and abnormalities of sinuatrial valves. *Circ Res* *98*, 923-930.
- Chheda, M. G., Ashery, U., Thakur, P., Rettig, J., and Sheng, Z. H. (2001). Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nat. Cell Biol*

3, 331-338.

Chicka, M. C., and Chapman, E. R. (2009). Concurrent binding of complexin and synaptotagmin to liposome-embedded SNARE complexes. *Biochemistry* 48, 657-659.

Christopherson, K. S., Hillier, B. J., Lim, W. A., and Bredt, D. S. (1999). PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274, 27467-73.

Chung, H. J., Xia, J., Scannevin, R. H., Zhang, X., and Huganir, R. L. (2000). Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J. Neurosci* 20, 7258-7267.

Cohen, C., Shieh, J., Pickles, R., Okegawa, T., Hsieh, J., and Bergelson, J. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15191-15196.

Cohen, S. M., and Nadler, J. V. (1997). Proline-induced potentiation of glutamate transmission. *Brain Res* 761, 271-282.

Collingridge, G. L., Randall, A. D., Davies, C. H., and Alford, S. (1992). The synaptic activation of NMDA receptors and Ca²⁺ signalling in neurons. *Ciba Found. Symp* 164, 162-171; discussion 172-175.

Connors, B. W., and Long, M. A. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci* 27, 393-418.

Coyne, C., Voelker, T., Pichla, S., and Bergelson, J. (2004). The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. *J Biol Chem* 279, 48079-48084.

Coyne, C. B., and Bergelson, J. M. (2005). CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv. Drug Deliv. Rev* 57, 869-882.

Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., and Scheff, S. (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367, 455-459.

Crump, F. T., Fremeau, R. T., and Craig, A. M. (1999). Localization of the brain-specific

- high-affinity l-proline transporter in cultured hippocampal neurons: molecular heterogeneity of synaptic terminals. *Mol. Cell. Neurosci* 13, 25-39.
- Dahme, M., Bartsch, U., Martini, R., Anliker, B., Schachner, M., and Mantei, N. (1997). Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat. Genet* 17, 346-349.
- Daston, G., Faustman, E., Ginsberg, G., Fenner-Crisp, P., Olin, S., Sonawane, B., Bruckner, J., Breslin, W., and McLaughlin, T. J. (2004). A framework for assessing risks to children from exposure to environmental agents. *Environ. Health Perspect* 112, 238-256.
- Daw, M. I., Chittajallu, R., Bortolotto, Z. A., Dev, K. K., Duprat, F., Henley, J. M., Collingridge, G. L., and Isaac, J. T. (2000). PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 28, 873-886.
- Desmond, N. L., and Levy, W. B. (1988). Synaptic interface surface area increases with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res* 453, 308-314.
- D'Hooge, R., and De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev* 36, 60-90.
- Dittman, J., and Ryan, T. A. (2009). Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 25, 133-160.
- Dobrunz, L. E., and Stevens, C. F. (1997). Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18, 995-1008.
- Dong, H. W., and Science, T. A. I. F. B. (2008). The Allen Reference Atlas, (Book + CD-ROM): A Digital Color Brain Atlas of the C57BL/6J Male Mouse (Wiley).
- Dorner, A., Grunert, H., Lindig, V., Chandrasekharan, K., Fechner, H., Knowlton, K., Isik, A., Pauschinger, M., Zeichhardt, H., and Schultheiss, H. (2006). Treatment of coxsackievirus-B3-infected BALB/c mice with the soluble coxsackie adenovirus receptor CAR4/7 aggravates cardiac injury. *J Mol Med* 84, 842-851.
- Dorner, A., Xiong, D., Couch, K., Yajima, T., and Knowlton, K. (2004). Alternatively spliced soluble coxsackie-adenovirus receptors inhibit coxsackievirus infection. *J Biol Chem* 279, 18497-18503.

- Dorner, A., Wegmann, F., Butz, S., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Mack, A., Nasdala, I., August, B., Westermann, J., Rathjen, F., et al. (2005). Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J Cell Sci* *118*, 3509-3521.
- Drachman, D. A. (2005). Do we have brain to spare? *Neurology* *64*, 2004-2005.
- Edwards, F. A. (1995). LTP--a structural model to explain the inconsistencies. *Trends Neurosci* *18*, 250-255.
- Emson, P. C. (2007). GABA(B) receptors: structure and function. *Prog. Brain Res* *160*, 43-57.
- Excoffon, K., Traver, G., and Zabner, J. (2005). The role of the extracellular domain in the biology of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* *32*, 498-503.
- Excoffon, K. J. D. A., Gansemer, N. D., Mobily, M. E., Karp, P. H., Parekh, K. R., and Zabner, J. (2010). Isoform-specific regulation and localization of the coxsackie and adenovirus receptor in human airway epithelia. *PLoS ONE* *5*, e9909.
- Excoffon, K. J. D. A., Gansemer, N., Traver, G., and Zabner, J. (2007). Functional effects of coxsackievirus and adenovirus receptor glycosylation on homophilic adhesion and adenoviral infection. *J. Virol* *81*, 5573-5578.
- Excoffon, K. J. D. A., Hruska-Hageman, A., Klotz, M., Traver, G. L., and Zabner, J. (2004). A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and growth. *J. Cell. Sci* *117*, 4401-4409.
- Fechner, H., Haack, A., Wang, H., Wang, X., Eizema, K., Pauschinger, M., Schoemaker, R., Veghel, R., Houtsmuller, A., Schultheiss, H., et al. (1999). Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther* *6*, 1520-1535.
- Fechner, H., Noutsias, M., Tschoepe, C., Hinze, K., Wang, X., Escher, F., Pauschinger, M., Dekkers, D., Vetter, R., Paul, M., et al. (2003). Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism. *Circulation* *107*, 876-882.
- Fernandez, I., Araç, D., Ubach, J., Gerber, S. H., Shin, O., Gao, Y., Anderson, R. G., Südhof, T. C., and Rizo, J. (2001). Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-

- domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* 32, 1057-1069.
- Fischer, R., Poller, W., Schultheiss, H., and Gotthardt, M. (2009). CAR-diology--a virus receptor in the healthy and diseased heart. *J. Mol. Med* 87, 879-884.
- Fok, P., Huang, K., Holland, P., and Nalbantoglu, J. (2007). The Coxsackie and adenovirus receptor binds microtubules and plays a role in cell migration. *J Biol Chem* 282, 7512-7521.
- Frankland, P. W., O'Brien, C., Ohno, M., Kirkwood, A., and Silva, A. J. (2001). Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* 411, 309-313.
- Franks, K. M., Bartol, T. M., and Sejnowski, T. J. (2002). A Monte Carlo model reveals independent signaling at central glutamatergic synapses. *Biophys. J* 83, 2333-2348.
- Freneau, R. T., Caron, M. G., and Blakely, R. D. (1992). Molecular cloning and expression of a high affinity L-proline transporter expressed in putative glutamatergic pathways of rat brain. *Neuron* 8, 915-926.
- Freneau, R. T., Burman, J., Qureshi, T., Tran, C. H., Proctor, J., Johnson, J., Zhang, H., Sulzer, D., Copenhagen, D. R., Storm-Mathisen, J., et al. (2002). The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99, 14488-14493.
- Frey, S., and Frey, J. U. (2008). 'Synaptic tagging' and 'cross-tagging' and related associative reinforcement processes of functional plasticity as the cellular basis for memory formation. *Prog. Brain Res* 169, 117-143.
- Funatsu, N., Miyata, S., Kumanogoh, H., Shigeta, M., Hamada, K., Endo, Y., Sokawa, Y., and Maekawa, S. (1999). Characterization of a novel rat brain glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (Kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. *J. Biol. Chem* 274, 8224-8230.
- Fuxe, J., Liu, L., Malin, S., Philipson, L., Collins, V. P., and Pettersson, R. F. (2003). Expression of the coxsackie and adenovirus receptor in human astrocytic tumors and xenografts. *Int. J. Cancer* 103, 723-729.
- Fykse, E. M., and Fonnum, F. (1996). Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochem. Res* 21, 1053-1060.

- Garthe, A., Behr, J., and Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS ONE* 4, e5464.
- Geppert, M., Archer, B. T., and Südhof, T. C. (1991). Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin. *J. Biol. Chem* 266, 13548-13552.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., and Südhof, T. C. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79, 717-727.
- Goebbels, S., Bormuth, I., Bode, U., Hermanson, O., Schwab, M., and Nave, K. (2006). Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. *Genesis* 44, 611-621.
- Gomperts, S. N. (1996). Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family. *Cell* 84, 659-62.
- Gonzalez-Mariscal, L., Garay, E., and Lechuga, S. (2009). Virus interaction with the apical junctional complex. *Front. Biosci* 14, 731-768.
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J., and Lagnado, L. (2006). Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron* 51, 773-786.
- Grant, S. G., O'Dell, T. J., Karl, K. A., Stein, P. L., Soriano, P., and Kandel, E. R. (1992). Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice. *Science* 258, 1903-1910.
- Gutierrez, H., and Davies, A. M. (2007). A fast and accurate procedure for deriving the Sholl profile in quantitative studies of neuronal morphology. *J. Neurosci. Methods* 163, 24-30.
- He, L., Xue, L., Xu, J., McNeil, B. D., Bai, L., Melicoff, E., Adachi, R., and Wu, L. (2009). Compound vesicle fusion increases quantal size and potentiates synaptic transmission. *Nature* 459, 93-97.
- He, Y., Chipman, P. R., Howitt, J., Bator, C. M., Whitt, M. A., Baker, T. S., Kuhn, R. J., Anderson, C. W., Freimuth, P., and Rossmann, M. G. (2001). Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nat. Struct. Biol* 8, 874-878.

- Hebb, D. O., and Hebb (2002). *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. Parental Adviso. (Lawrence Erlbaum Assoc Inc).
- Hébert, J. M., and McConnell, S. K. (2000). Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev Biol* 222, 296-306.
- Hirbec, H., Francis, J. C., Lauri, S. E., Braithwaite, S. P., Coussen, F., Mülle, C., Dev, K. K., Coutinho, V., Meyer, G., Isaac, J. T. R., et al. (2003). Rapid and differential regulation of AMPA and kainate receptors at hippocampal mossy fibre synapses by PICK1 and GRIP. *Neuron* 37, 625-638.
- Hiscock, J. J., Murphy, S., and Willoughby, J. O. (2000). Confocal microscopic estimation of GABAergic nerve terminals in the central nervous system. *J. Neurosci. Methods* 95, 1-11.
- Hodgin, A. L., and Horowicz, P. (1959). The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 148, 127-160.
- Hodgin, A. L., and Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J. Physiol. (Lond.)* 108, 37-77.
- Honda, T., Saitoh, H., Masuko, M., Katagiri-Abe, T., Tominaga, K., Kozakai, I., Kobayashi, K., Kumanishi, T., Watanabe, Y., Odani, S., et al. (2000). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 77, 19-28.
- Hotta, Y., Honda, T., Naito, M., and Kuwano, R. (2003). Developmental distribution of coxsackie virus and adenovirus receptor localized in the nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res* 143, 1-13.
- Huang, K., Yasrael, Z., Guerin, C., Holland, P., and Nalbantoglu, J. (2007). Interaction of the Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) with the cytoskeleton: binding to actin. *FEBS Lett* 581, 2702-2708.
- Hung, A. Y., and Sheng, M. (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J. Biol. Chem* 277, 5699-5702.
- Ilardi, J. M., Mochida, S., and Sheng, Z. H. (1999). Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. *Nat. Neurosci* 2, 119-124.

- Imelli, N., Meier, O., Boucke, K., Hemmi, S., and Greber, U. F. (2004). Cholesterol is required for endocytosis and endosomal escape of adenovirus type 2. *J. Virol* 78, 3089-3098.
- Ito, M., Kodama, M., Masuko, M., Yamaura, M., Fuse, K., Uesugi, Y., Hirono, S., Okura, Y., Kato, K., Hotta, Y., et al. (2000). Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* 86, 275-280.
- Jiang, S., and Caffrey, M. (2005). NMR assignment and secondary structure of the Coxsackievirus and Adenovirus receptor domain 2. *Protein Pept. Lett* 12, 537-539.
- Jiang, S., and Caffrey, M. (2007). Solution structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor domain 2. *Protein Sci* 16, 539-542.
- Jiang, S., Jacobs, A., Laue, T. M., and Caffrey, M. (2004). Solution structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor domain 1. *Biochemistry* 43, 1847-1853.
- Jung, N., and Haucke, V. (2007). Clathrin-mediated endocytosis at synapses. *Traffic* 8, 1129-1136.
- Kallewaard, N. L., Zhang, L., Chen, J., Guttenberg, M., Sanchez, M. D., and Bergelson, J. M. (2009). Tissue-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor protects mice from virus-induced pancreatitis and myocarditis. *Cell Host Microbe* 6, 91-98.
- Kashimura, T., Kodama, M., Hotta, Y., Hosoya, J., Yoshida, K., Ozawa, T., Watanabe, R., Okura, Y., Kato, K., Hanawa, H., et al. (2004). Spatiotemporal changes of coxsackievirus and adenovirus receptor in rat hearts during postnatal development and in cultured cardiomyocytes of neonatal rat. *Virchows Arch* 444, 283-292.
- Kavalali, E. T. (2007). Multiple vesicle recycling pathways in central synapses and their impact on neurotransmission. *J. Physiol. (Lond.)* 585, 669-679.
- Kim, C. H., Chung, H. J., Lee, H. K., and Huganir, R. L. (2001). Interaction of the AMPA receptor subunit GluR2/3 with PDZ domains regulates hippocampal long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98, 11725-11730.
- Kim, M., Sumerel, L. A., Belousova, N., Lyons, G. R., Carey, D. E., Krasnykh, V., and Douglas, J. T. (2003). The coxsackievirus and adenovirus receptor acts as a tumour suppressor in malignant glioma cells. *Br. J. Cancer* 88, 1411-1416.

- Kirby, I., Davison, E., Bevil, A. J., Soh, C. P., Wickham, T. J., Roelvink, P. W., Kovesdi, I., Sutton, B. J., and Santis, G. (2000). Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. *J. Virol* 74, 2804-2813.
- Kiryushko, D., Korshunova, I., Berezin, V., and Bock, E. (2006). Neural cell adhesion molecule induces intracellular signaling via multiple mechanisms of Ca²⁺ homeostasis. *Mol. Biol. Cell* 17, 2278-2286.
- Kiyama, Y., Manabe, T., Sakimura, K., Kawakami, F., Mori, H., and Mishina, M. (1998). Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor epsilon1 subunit. *J. Neurosci* 18, 6704-6712.
- Koenig, J. H., and Ikeda, K. (1996). Synaptic vesicles have two distinct recycling pathways. *J. Cell Biol* 135, 797-808.
- Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., and Seeburg, P. H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737-1740.
- Križaj, D., Huang, W., Furukawa, T., Punzo, C., and Xing, W. (2010). Plasticity of TRPM1 expression and localization in the wild type and degenerating mouse retina. *Vision Res.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20801142> [Accessed October 12, 2010].
- Kyriakopoulou, K., de Diego, I., Wassef, M., and Karagogeos, D. (2002). A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development* 129, 287-296.
- Law, J. W. S., Lee, A. Y. W., Sun, M., Nikonenko, A. G., Chung, S. K., Dityatev, A., Schachner, M., and Morellini, F. (2003). Decreased anxiety, altered place learning, and increased CA1 basal excitatory synaptic transmission in mice with conditional ablation of the neural cell adhesion molecule L1. *J. Neurosci* 23, 10419-10432.
- Lemmon, V., Farr, K. L., and Lagenaur, C. (1989). L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2, 1597-1603.
- Lim, B., Xiong, D., Dorner, A., Youn, T., Yung, A., Liu, T. I., Gu, Y., Dalton, N. D., Wright, A. T., Evans, S. M., et al. (2008). Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart. *J. Clin. Invest* 118, 2758-2770.

- Linetti, A., Fratangeli, A., Taverna, E., Valnegri, P., Francolini, M., Cappello, V., Matteoli, M., Passafaro, M., and Rosa, P. (2010). Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *J. Cell. Sci* 123, 595-605.
- Lisewski, U., Shi, Y., Wrackmeyer, U., Fischer, R., Chen, C., Schirdewan, A., Jüttner, R., Rathjen, F., Poller, W., Radke, M. H., et al. (2008). The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. *J Exp Med* 205, 2369-79.
- Lisman, J., and Raghavachari, S. (2006). A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses. *Sci. STKE* 2006, re11.
- Lu, J., Koay, K., Ramers, C., and Milazzo, A. (2005). Neonate with coxsackie B1 infection, cardiomyopathy and arrhythmias. *J Natl Med Assoc* 97, 1028-1030.
- Lu, W., and Ziff, E. B. (2005). PICK1 interacts with ABP/GRIP to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* 47, 407-421.
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev* 84, 87-136.
- MacDonald, J. F., Jackson, M. F., and Beazely, M. A. (2006). Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. *Crit Rev Neurobiol* 18, 71-84.
- Malenka, R. C., and Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5-21.
- Markram, K., Gerardy-Schahn, R., and Sandi, C. (2007). Selective learning and memory impairments in mice deficient for polysialylated NCAM in adulthood. *Neuroscience* 144, 788-796.
- Maurel, P., Einheber, S., Galinska, J., Thaker, P., Lam, I., Rubin, M. B., Scherer, S. S., Murakami, Y., Gutmann, D. H., and Salzer, J. L. (2007). Nectin-like proteins mediate axon Schwann cell interactions along the internode and are essential for myelination. *J. Cell Biol* 178, 861-874.
- Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L. C., Watabe, A. M., Makhinson, M., He, Y., Ramsay, M. F., Morris, R. G., Morrison, J. H., et al. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396, 433-9.

- Mirza, M., Hreinsson, J., Strand, M., Hovatta, O., Soder, O., Philipson, L., Pettersson, R., and Sollerbrant, K. (2006). Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) is expressed in male germ cells and forms a complex with the differentiation factor JAM-C in mouse testis. *Exp Cell Res* 312, 817-830.
- Mirza, M., Petersen, C., Nordqvist, K., and Sollerbrant, K. (2007). Coxsackievirus and adenovirus receptor is up-regulated in migratory germ cells during passage of the blood-testis barrier. *Endocrinology* 148, 5459-5469.
- Modlin, J. F., and Rotbart, H. A. (1997). Group B coxsackie disease in children. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 223, 53-80.
- Morris, R. G. (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J. Neurosci* 9, 3040-3057.
- Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774-776.
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G., and Kiss, J. Z. (1996). PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 17, 413-422.
- Murthy, V. N., and Stevens, C. F. (1999). Reversal of synaptic vesicle docking at central synapses. *Nat. Neurosci* 2, 503-507.
- Myers, S. E., Brewer, L., Shaw, D. P., Greene, W. H., Love, B. C., Hering, B., Spiller, O. B., and Njenga, M. K. (2004). Prevalent human coxsackie B-5 virus infects porcine islet cells primarily using the coxsackie-adenovirus receptor. *Xenotransplantation* 11, 536-546.
- Nagy, G., Kim, J. H., Pang, Z. P., Matti, U., Rettig, J., Südhof, T. C., and Sørensen, J. B. (2006). Different effects on fast exocytosis induced by synaptotagmin 1 and 2 isoforms and abundance but not by phosphorylation. *J. Neurosci* 26, 632-643.
- Nalbantoglu, J., Pari, G., Karpati, G., and Holland, P. (1999). Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. *Hum Gene Ther* 10, 1009-1019.

- Neves, G., Cooke, S. F., and Bliss, T. V. P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci* 9, 65-75.
- Nicholson-Tomishima, K., and Ryan, T. A. (2004). Kinetic efficiency of endocytosis at mammalian CNS synapses requires synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 16648-16652.
- Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K., and Schachner, M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuriteogenesis. *J. Cell Biol* 157, 521-532.
- Noutsias, M., Fechner, H., de Jonge, H., Wang, X., Dekkers, D., Houtsmuller, A., Pauschinger, M., Bergelson, J., Warraich, R., Yacoub, M., et al. (2001). Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 104, 275-280.
- Okegawa, T., Pong, R., Li, Y., Bergelson, J., Sagalowsky, A., and Hsieh, J. (2001). The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res* 61, 6592-6600.
- Okegawa, T., Pong, R., Li, Y., and Hsieh, J. (2004). The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim. Pol* 51, 445-457.
- Okuda, T., Yu, L. M. Y., Cingolani, L. A., Kemler, R., and Goda, Y. (2007). beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 13479-13484.
- Palani, D., Baginskaskas, A., and Raastad, M. (2010). Bursts and hyperexcitability in non-myelinated axons of the rat hippocampus. *Neuroscience* 167, 1004-1013.
- Pan, P., Tian, J., and Sheng, Z. (2009). Snapin facilitates the synchronization of synaptic vesicle fusion. *Neuron* 61, 412-424.
- Pang, Z. P., Melicoff, E., Padgett, D., Liu, Y., Teich, A. F., Dickey, B. F., Lin, W., Adachi, R., and Südhof, T. C. (2006). Synaptotagmin-2 is essential for survival and contributes to Ca²⁺ triggering of neurotransmitter release in central and neuromuscular synapses. *J. Neurosci* 26, 13493-13504.

- Pang, Z. P., and Südhof, T. C. (2010). Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol* 22, 496-505.
- Pang, Z. P., Sun, J., Rizo, J., Maximov, A., and Südhof, T. C. (2006). Genetic analysis of synaptotagmin 2 in spontaneous and Ca²⁺-triggered neurotransmitter release. *EMBO J* 25, 2039-2050.
- Pang, Z. P., Xu, W., Cao, P., and Südhof, T. C. (2010). Calmodulin suppresses synaptotagmin-2 transcription in cortical neurons. *J Biol Chem*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20729199> [Accessed October 1, 2010].
- Park, C. S., Elgersma, Y., Grant, S. G. N., and Morrison, J. H. (2008). alpha-Isoform of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II and postsynaptic density protein 95 differentially regulate synaptic expression of NR2A- and NR2B-containing N-methyl-d-aspartate receptors in hippocampus. *Neuroscience* 151, 43-55.
- Patzke, C., Max, K. E. A., Behlke, J., Schreiber, J., Schmidt, H., Dörner, A. A., Kröger, S., Henning, M., Otto, A., Heinemann, U., et al. (2010). The coxsackievirus-adenovirus receptor reveals complex homophilic and heterophilic interactions on neural cells. *J. Neurosci* 30, 2897-2910.
- Persson, A., Fan, X., Widegren, B., and Englund, E. (2006). Cell type- and region-dependent coxsackie adenovirus receptor expression in the central nervous system. *J. Neurooncol* 78, 1-6.
- Peters, N. (2006). Gap junctions: clarifying the complexities of connexins and conduction. *Circ Res* 99, 1156-1158.
- Petrella, J., Cohen, C., Gaetz, J., and Bergelson, J. (2002). A zebrafish coxsackievirus and adenovirus receptor homologue interacts with coxsackie B virus and adenovirus. *J Virol* 76, 10503-10506.
- Pinkert, S., Westermann, D., Wang, X., Klingel, K., Dörner, A., Savvatis, K., Grössl, T., Krohn, S., Tschöpe, C., Zeichhardt, H., et al. (2009). Prevention of cardiac dysfunction in acute coxsackievirus B3 cardiomyopathy by inducible expression of a soluble coxsackievirus-adenovirus receptor. *Circulation* 120, 2358-2366.
- van den Pol, A. N. (2006). Viral infections in the developing and mature brain. *Trends Neurosci* 29, 398-406.
- Polo-Parada, L., Bose, C. M., and Landmesser, L. T. (2001). Alterations in transmission,

- vesicle dynamics, and transmitter release machinery at NCAM-deficient neuromuscular junctions. *Neuron* 32, 815-828.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., McNamara, J. O., and White, L. E. (2007). *Neuroscience* 4th ed. (Palgrave Macmillan).
- Raghavachari, S., and Lisman, J. E. (2004). Properties of quantal transmission at CA1 synapses. *J. Neurophysiol* 92, 2456-2467.
- Raschperger, E., Thyberg, J., Pettersson, S., Philipson, L., Fuxe, J., and Pettersson, R. (2006). The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis. *Exp Cell Res* 312, 1566-1580.
- Reisel, D., Bannerman, D. M., Schmitt, W. B., Deacon, R. M. J., Flint, J., Borchardt, T., Seeburg, P. H., and Rawlins, J. N. P. (2002). Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. *Nat. Neurosci* 5, 868-873.
- Renick, S. E., Kleven, D. T., Chan, J., Stenius, K., Milner, T. A., Pickel, V. M., and Fremeau, R. T. (1999). The mammalian brain high-affinity L-proline transporter is enriched preferentially in synaptic vesicles in a subpopulation of excitatory nerve terminals in rat forebrain. *J. Neurosci* 19, 21-33.
- Rice, D., and Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect* 108 Suppl 3, 511-533.
- Richmond, J. (2006). Synaptic function. WormBook. Available at: http://www.wormbook.org/chapters/www_synapticfunction/synapticfunction.html [Accessed August 16, 2010].
- Rickman, C., Archer, D. A., Meunier, F. A., Craxton, M., Fukuda, M., Burgoyne, R. D., and Davletov, B. (2004). Synaptotagmin interaction with the syntaxin/SNAP-25 dimer is mediated by an evolutionarily conserved motif and is sensitive to inositol hexakisphosphate. *J. Biol. Chem* 279, 12574-12579.
- Rizo, J., and Rosenmund, C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol* 15, 665-674.
- Rizzoli, S. O., and Jahn, R. (2007). Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles. *Traffic* 8, 1137-1144.

- Rutten, K., Misner, D. L., Works, M., Blokland, A., Novak, T. J., Santarelli, L., and Wallace, T. L. (2008). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in phosphodiesterase 4D-knockout (PDE4D) mice. *Eur. J. Neurosci* 28, 625-632.
- Ryan, T. A., Reuter, H., Wendland, B., Schweizer, F. E., Tsien, R. W., and Smith, S. J. (1993). The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons. *Neuron* 11, 713-724.
- Ryan, T. A., and Smith, S. J. (1995). Vesicle pool mobilization during action potential firing at hippocampal synapses. *Neuron* 14, 983-989.
- Ryan, T. A. (2006). A pre-synaptic to-do list for coupling exocytosis to endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol* 18, 416-421.
- Sagné, C., El Mestikawy, S., Isambert, M. F., Hamon, M., Henry, J. P., Giros, B., and Gasnier, B. (1997). Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett* 417, 177-183.
- Sanders, M. J., Wiltgen, B. J., and Fanselow, M. S. (2003). The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur. J. Pharmacol* 463, 217-223.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85, 5166-5170.
- Schaffner, W., and Weissmann, C. (1973). A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* 56, 502-514.
- Schikorski, T., and Stevens, C. F. (1997). Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci* 17, 5858-5867.
- Schmidt, R. F., Lang, F., and Thews, G. (2004). *Physiologie des Menschen*. MIT Pathophysiologie 29th ed. (Springer-Verlag GmbH).
- Schmitt, W. B., Deacon, R. M. J., Reisel, D., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Rawlins, J. N. P., and Bannerman, D. M. (2004). Spatial reference memory in GluR-A-deficient mice using a novel hippocampal-dependent paddling pool escape task. *Hippocampus* 14, 216-223.

- Schmitz, D., Mellor, J., Breustedt, J., and Nicoll, R. A. (2003). Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Nat. Neurosci* 6, 1058-1063.
- Schuch, U., Lohse, M. J., and Schachner, M. (1989). Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron* 3, 13-20.
- Sheng, M., and Kim, M. J. (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298, 776-780.
- Shi, Y., Chen, C., Lisewski, U., Wrackmeyer, U., Radke, M., Westermann, D., Sauter, M., Tschöpe, C., Poller, W., Klingel, K., et al. (2009). Cardiac deletion of the Coxsackievirus-adenovirus receptor abolishes Coxsackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo. *J Am Coll Cardiol* 53, 1219-26.
- Smith, S. M., Renden, R., and von Gersdorff, H. (2008). Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval. *Trends Neurosci* 31, 559-568.
- Sollerbrant, K., Raschperger, E., Mirza, M., Engstrom, U., Philipson, L., Ljungdahl, P., and Pettersson, R. (2003). The Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) forms a complex with the PDZ domain-containing protein ligand-of-*numb* protein-X (LN_X). *J Biol Chem* 278, 7439-7444.
- Stanton, P. K., Winterer, J., Zhang, X., and Müller, W. (2005). Imaging LTP of presynaptic release of FM1-43 from the rapidly recycling vesicle pool of Schaffer collateral-CA1 synapses in rat hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci* 22, 2451-2461.
- Stevens, C. F., and Williams, J. H. (2000). "Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 12828-12833.
- Stevens, C. F., and Sullivan, J. M. (2003). The synaptotagmin C2A domain is part of the calcium sensor controlling fast synaptic transmission. *Neuron* 39, 299-308.
- Stoeckli, E. T. (2004). Ig superfamily cell adhesion molecules in the brain. *Handb Exp Pharmacol*, 373-401.
- Südhof, T. C. (2000). The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28, 317-320.
- Südhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci* 27, 509-547.

- Sunyer (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Nat Protoc.* Available at: http://www.natureprotocols.com/2007/10/04/barnes_maze_a_useful_task_to_a.php [Accessed November 9, 2010].
- Sweatt, J. D. (1999). Toward a molecular explanation for long-term potentiation. *Learn. Mem* 6, 399-416.
- Sweitzer, S. M., and Hinshaw, J. E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93, 1021-1029.
- Takemoto, Y., and Semba, R. (2006). Immunohistochemical evidence for the localization of neurons containing the putative transmitter L-proline in rat brain. *Brain Res* 1073-1074, 311-315.
- Thiele, C., Hannah, M. J., Fahrenholz, F., and Huttner, W. B. (2000). Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol* 2, 42-49.
- Thoelen, I., Magnusson, C., Tagerud, S., Polacek, C., Lindberg, M., and Van Ranst, M. (2001). Identification of alternative splice products encoded by the human coxsackie-adenovirus receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 216-222.
- Thompson, A. J., Cronin, M. S., and Kirschner, D. A. (2002). Myelin protein zero exists as dimers and tetramers in native membranes of *Xenopus laevis* peripheral nerve. *J. Neurosci. Res* 67, 766-771.
- Tomko, R., Xu, R., and Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3352-3356.
- Verdino, P., Witherden, D. A., Havran, W. L., and Wilson, I. A. (2010). The molecular interaction of CAR and JAML recruits the central cell signal transducer PI3K. *Science* 329, 1210-1214.
- Vernadakis, A. (1988). Neuron-glia interrelations. *Int. Rev. Neurobiol* 30, 149-224.
- Vincent, T., Pettersson, R. F., Crystal, R. G., and Leopold, P. L. (2004). Cytokine-mediated downregulation of coxsackievirus-adenovirus receptor in endothelial cells. *J. Virol* 78, 8047-8058.

- Walters, R., Freimuth, P., Moninger, T., Ganske, I., Zabner, J., and Welsh, M. (2002). Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* *110*, 789-799.
- Wang, C., Mruk, D., Lee, W., and Cheng, C. (2007). Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) is a product of Sertoli and germ cells in rat testes which is localized at the Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interface. *Exp Cell Res* *313*, 1373-1392.
- Wang, D., Cui, Z., Zeng, Q., Kuang, H., Wang, L. P., Tsien, J. Z., and Cao, X. (2009). Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats. *PLoS ONE* *4*, e7486.
- Wang, J., Wilhelmsson, H., Graff, C., Li, H., Oldfors, A., Rustin, P., Bruning, J., Kahn, C., Clayton, D., Barsh, G., et al. (1999). Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *NatGenet* *21*, 133-137.
- Wehner, J. M., and Radcliffe, R. A. (2004). Cued and contextual fear conditioning in mice. *Curr Protoc Neurosci Chapter 8*, Unit 8.5C.
- Williams, R. W., and Herrup, K. (1988). The control of neuron number. *Annu. Rev. Neurosci* *11*, 423-453.
- Winson, J. (1978). Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* *201*, 160-163.
- Yamagata, M., Sanes, J. R., and Weiner, J. A. (2003). Synaptic adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol* *15*, 621-632.
- Yan, Z., Chi, P., Bibb, J. A., Ryan, T. A., and Greengard, P. (2002). Roscovitine: a novel regulator of P/Q-type calcium channels and transmitter release in central neurons. *J. Physiol. (Lond.)* *540*, 761-770.
- Young, S. M., and Neher, E. (2009). Synaptotagmin has an essential function in synaptic vesicle positioning for synchronous release in addition to its role as a calcium sensor. *Neuron* *63*, 482-496.
- Zakharenko, S. S., Zablow, L., and Siegelbaum, S. A. (2001). Visualization of changes in presynaptic function during long-term synaptic plasticity. *Nat. Neurosci* *4*, 711-717.

- Zamanillo, D., Sprengel, R., Hvalby, O., Jensen, V., Burnashev, N., Rozov, A., Kaiser, K. M., Köster, H. J., Borchardt, T., Worley, P., et al. (1999). Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284, 1805-1811.
- Zen, K., Liu, Y., McCall, I. C., Wu, T., Lee, W., Babbin, B. A., Nusrat, A., and Parkos, C. A. (2005). Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional adhesion molecule-like protein on neutrophils. *Mol. Biol. Cell* 16, 2694-2703.
- Zucker, R. S., and Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol* 64, 355-405.

Wissenschaftlicher Werdegang

„Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten“

Publikationen

Mehlgarten, C., Jablonowski, D., **Wrackmeyer, U.**, Tschitschmann, S., Sondermann, D., Jäger, G., Gong, Z., Byström, A. S., Schaffrath, R., and Breunig, K. D. (2010). Elongator function in tRNA wobble uridine modification is conserved between yeast and plants. *Mol Microbiol*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398216> [Accessed April 25, 2010].

Shi, Y., Chen, C., Lisewski, U., **Wrackmeyer, U.**, Radke, M., Westermann, D., Sauter, M., Tschöpe, C., Poller, W., Klingel, K., et al. (2009). Cardiac deletion of the Coxsackievirus-adenovirus receptor abolishes Coxsackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo. *J Am Coll Cardiol* 53, 1219-26.

Lisewski, U., Shi, Y., **Wrackmeyer, U.**, Fischer, R., Chen, C., Schirdewan, A., Jüttner, R., Rathjen, F., Poller, W., Radke, M. H., et al. (2008). The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. *J Exp Med* 205, 2369-79.

Wrackmeyer, U., Hansen, G. H., Seya, T., and Danielsen, E. M. (2006). Intelectin: a novel lipid raft-associated protein in the enterocyte brush border. *Biochemistry* 45, 9188-9197.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Gotthardt für die Vergabe dieses spannenden Projektes und seiner guten Betreuung bedanken. In seiner Arbeitsgruppe ermöglichte er ein sehr angenehmes Arbeiten mit kontinuierlicher Motivation Neues zu entdecken und zu erlernen. Bei Prof. Haucke bedanke ich mich für sein Interesse und die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Ich möchte mich bei den gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Gotthardt sehr herzlich für die angenehme Zusammenarbeit bedanken. Besonderer bei Beate Golbrich-Hannig, Nora Bergmann, Michael Radke und Katharina Rost sowie den (Ex-) Auszubildenden Mandy Terne, Carolin Schmidt und Melanie Manzke bedanke ich mich für ihre Ideen und ihre Teilnahme an diesem Projekt.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Facility Elektronenmikroskopie, Facility Massenspektrometrie, AG Jentsch, AG Hübner, AG Willnow und AG Schmitz. Durch die Bereitstellung besonderer Geräte, technischer Hilfestellungen und die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen in einer hervorragenden Kooperation haben alle einen großen Anteil an dieser Arbeit.

Dr. Tilman Breiderhoff (AG Willnow) danke ich für die unermüdliche Unterstützung. Er hatte immer ein offenes Ohr, ob es nun um technische oder theoretische Fragestellungen ging.

Zu guter Letzt möchte ich mich sehr herzlich bei meinen Freunden und meiner Familie für ihre unglaubliche Unterstützung, Geduld und Inspiration bedanken.