

2. Molekulare Plastizität inhibitorischer Synapsen: Rezeptorverankerung und Synaptogenese

2.1 Rezeptorclusterbildung versus Rezeptorverankerung

Es muß zwischen der Rezeptorclusterbildung und der postsynaptischen Rezeptorverankerung unterschieden werden. Aus historischen Gründen wurden diese beiden physiologisch unabhängigen Prozesse jedoch gleichgesetzt. Die ersten Rezeptorcluster wurden nämlich in postsynaptischen Domänen gefunden, wo die lokale Verankerung über entsprechende Ankerproteine zu einer Anhäufung von Rezeptoren führt. Auch wenn der Rezeptorcluster meist zufällig mit dem Auftreten postsynaptischer Rezeptoranhäufungen koinzidiert, tritt ein Rezeptorcluster ortsunabhängig auf, wobei seine Entstehung Ankerprotein-unabhängig sein kann. Der Ausdruck "postsynaptische Verankerung" hingegen beschreibt die lokale Stabilisierung (und damit Anhäufung) von Rezeptoren durch Bindung an das Zytoskelett der Zelle gegenüber den entsprechenden Transmitter-Freisetzungstellen. Dabei handelt es sich um diejenigen Rezeptoren, die sich bereits an der Zelloberfläche befinden und sich lateral in der Plasmamembran bewegen können. Fundamentale Fragen, die sich mit den molekularen Grundlagen der Rezeptorclusterbildung und der postsynaptischen Rezeptorverankerung befassen, werden nachfolgend diskutiert.

2.1.1 Rezeptorclusterbildung

Der Terminus "Rezeptorcluster" ist ursprünglich auf elektronenmikroskopische Untersuchungen zurückzuführen. Vor rund 20 Jahren wurden die ersten Studien zur Verteilung von GlyR im Rückenmark durchgeführt (Triller et al., 1985; Seitanidou et al., 1988). Die Autoren konnten erstmalig zeigen, daß GlyR tatsächlich Transmembranproteine sind, die an bestimmten Stellen in der postsynaptischen Membran gegenüber von präsynaptischen Terminalien gehäuft anzutreffen sind. Solche postsynaptischen Anhäufungen wurden als Rezeptorcluster bezeichnet.

Kurze Zeit später konnte die molekulare Identität des GlyR-Ankerproteins entschlüsselt werden. Gephyrin (übersetzt "Brücke") wurde als GlyR-interagierendes Protein aus dem Rückenmark der Ratte isoliert (Kirsch et al., 1991). Seine Eigenschaft, nicht nur die GlyR- β -Untereinheit (Grenningloh et al., 1990), sondern auch Tubulin zu binden (Prior

et al., 1992), demaskierte Gephyrin als postsynaptisches GlyR-Ankerprotein. Dies konnte bald darauf auch durch experimentelle *antisense*-Strategien bestätigt werden (Kirsch et al., 1993).

Eine der sich hieraus unmittelbar ergebenden Fragen beschäftigte sich mit der Thematik der Regulation der postsynaptischen GlyR-Verankerung (siehe 2.1.3.1). Auch wenn die Clusterbildung bislang immer mit der postsynaptischen Anhäufung von GlyR einherging, war nicht eindeutig geklärt, ob die Rezeptorclusterbildung als solche einen autonomen Prozeß darstellt und damit auch Gephyrin-unabhängig stattfinden kann; schließlich wurden die Rezeptor-assoziierten Proteine seither immer für deren Clusterbildung verantwortlich gemacht. An der neuromuskulären Synapse beispielsweise sorgt ein molekulares Zusammenspiel von Neuregulin und Agrin/MuSK für die Rapsyn-vermittelte postsynaptische ACh-Rezeptor (AChR)-Anhäufung (Colledge & Froehner, 1998; Feng et al., 1998). Ebenso greifen die sogenannten *scaffolding molecules* durch Einsatz ihrer PDZ (*postsynaptic, discs large, zonula occludens*)-Domänen entscheidend in den Zusammenbau glutaminerger postsynaptischer Domänen ein (Kim & Huganir, 1999). Die spezifische Assemblierung von Molekülen zu Makromolekül-Komplexen wird dabei durch die Verwendung von sogenannten Erkennungsmotiven gewährleistet. So sorgt das Erkennungsmotiv T/SXV im N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor (NMDAR) für die Erkennung des Bindungspartners PSD-95, das Erkennungsmotiv SVKI im α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)-Rezeptor (AMPA) entsprechend für die Bindung von *glutamate receptor interacting protein* (GRIP), und das Erkennungsmotiv FERM im Na^+/H^+ -exchanger regulatory factor (NHERF) für die Wechselwirkung mit Ezrin (Kim & Huganir, 1999).

Die Clusterbildung als solche ist jedoch ein generelles Phänomen, das nicht ausschließlich in den Neurowissenschaften anzutreffen ist. Sie ist insofern ein eigenständiger Prozeß, als sie bereits als autonomer Mechanismus bei Prokaryonten zur Feineinstellung der Sensibilität von Rezeptoren gegenüber Nährstoffen, wie beispielsweise Aspartat, beschrieben wurde (Bray et al., 1998). Ein anderes Beispiel, welches die generelle und autonome Bedeutung der Clusterbildung unterstreicht, ist die Assemblierung von Mikrotubuli, die in einer polarisierten Form verläuft und den Aufbau des Zytoskeletts

orchestriert. Die Clusterbildung ist ein dynamisch-kooperativer Prozeß, der auf der Trennung einer ursprünglich homogenen Phase in zwei Phasen, verdünnt und verdichtet, beruht (Guo & Levine, 1999). Oft spielen dabei homophile Interaktionen zwischen Proteinen eine wesentliche Rolle. Ein prominentes Beispiel für die homophile Protein-Protein-Interaktion wurde im Golgi-Apparat entdeckt. Bei der sogenannten *kin recognition* sorgt die homophile Interaktion der Golgi-Enzyme untereinander für den Erhalt der Integrität des gesamten Golgi-Apparates (Nilsson et al., 1994). Auch AChR interagieren in homophiler Weise miteinander. Diesbezüglich konnten elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, daß die statistische Verteilung der AChR-Einzelkanalöffnungen zwar durch die Gesetzmäßigkeiten der Poisson-Verteilung beschrieben werden kann, die Einzelkanalöffnungen jedoch nicht unabhängig voneinander stattfinden (Yeramian et al., 1986). Es wurde spekuliert, daß die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den α -Helices der Transmembrandomänen der einzelnen AChR-Untereinheiten an deren homophilen Interaktion beteiligt sind und die Kopplung der Einzelkanalöffnungen verursachen (Yeramian et al., 1986). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, daß die Aminosäure Asparagin die Helix-Helix-Interaktion favorisiert (Zhou et al., 2000).

Durch die Überexpression von GlyR- α 1- und - α 2-Untereinheiten in Neuronen ist es uns gelungen, die Frage nach der möglichen Eigenständigkeit der GlyR-Clusterbildung zu beantworten (Abb. 2.1.1-1). GlyR- α 1- und - α 2-Untereinheiten wurden zu diesem Zweck gewählt, weil sie Gephyrin nicht binden können.

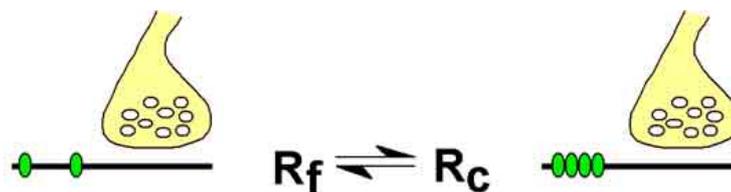


Abb. 2.1.1-1: Modell zur Veranschaulichung der GlyR-Clusterbildung. GlyR-Clusterbildung kann an nicht-synaptischen Stellen in der neuronalen Plasmamembran stattfinden und Gephyrin-unabhängig sein. GlyR (grün) liegen in der nicht-synaptischen Plasmamembran entweder vereinzelt (R_f) oder in Form von Rezeptorclustern (R_c) vor.

So konnten wir zeigen, daß die GlyR- α 1- und - α 2-Untereinheiten funktionelle Kanäle ausbilden, die an nicht-synaptischen Stellen in der neuronalen Plasmamembran in Abwesenheit von Gephyrin Cluster ausbilden (Meier et al., 2000b). Obwohl die Mechanis-

men, die zur Gephyrin-unabhängigen Clusterbildung führen, weiterhin ungeklärt sind, konnten wir die physiologischen Konsequenzen der GlyR-Clusterbildung beschreiben. Zu diesem Zweck wurde eine chimäre GlyR- α 1-Untereinheit hergestellt (α 1- β gb), die das Gephyrin-Bindungsmotiv (gb) (Meyer et al., 1995) der β -Untereinheit trägt (Abb. 2.1.1-2A). Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) wurden mit GlyR- α 1- β gb entweder alleinig oder zusammen mit Gephyrin transfiziert und die Chloridströme infolge Glyzin-Applikation charakterisiert (Abb. 2.1.1-2B).

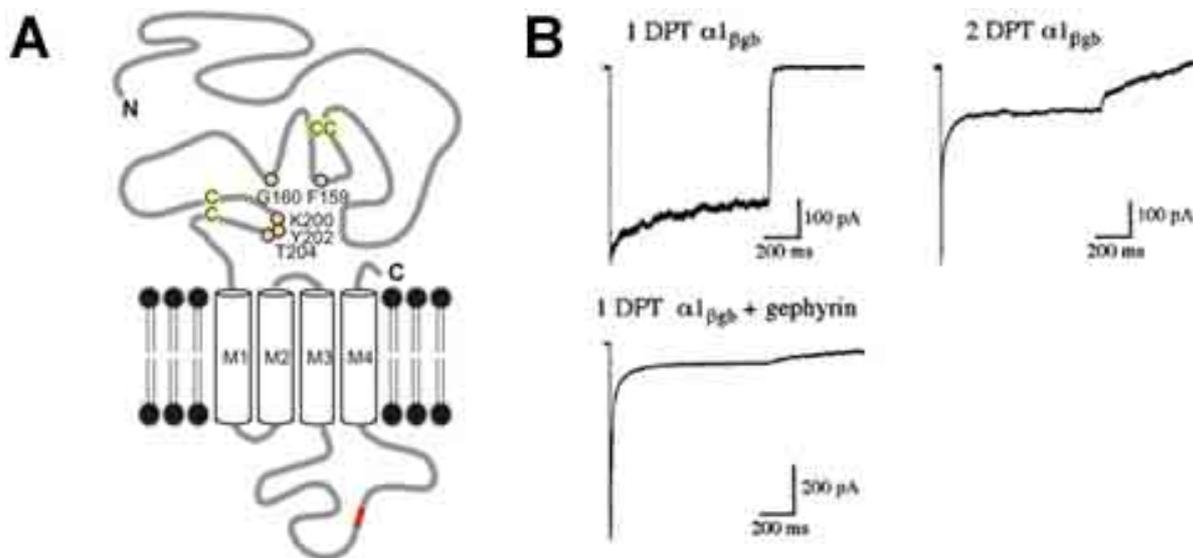


Abb. 2.1.1-2: Struktur der chimären GlyR- α 1- β gb-Untereinheit und physiologische Konsequenzen, die sich aus der GlyR-Clusterbildung ergeben. (A) GlyR- α 1- β gb-Struktur. Die α 1- β gb-Untereinheit besteht aus einer N-terminalen Ligandenbindungsdomäne und vier Transmembrandomänen, die über Schleifen miteinander verbunden sind. Das Gephyrin-Bindungsmotiv der GlyR- β -Untereinheit, welches in die große zytoplasmatische Schleife zwischen M3 und M4 eingebaut wurde, ist in roter Farbe hervorgehoben. Zystein-di-Sulfidbrücken und Aminosäurepositionen, die in Glyzin- bzw. Strychninbindung involviert sind, sind farblich gekennzeichnet. (B) Die GlyR-Clusterbildung übt einen wesentlichen Einfluß auf die schnell desensitisierende Komponente der Glyzin-induzierten Antwort aus. Nach 24 Stunden Proteinexpression (1 DPT) ist die schnell desensitisierende Komponente noch nicht ausgeprägt. Zunehmende Dauer der Proteinexpression (2 DPT) hat die GlyR-Clusterbildung zufolge, die sich in dem Auftreten einer schnell desensitisierenden Antwort äußert. Dieser Prozeß wird durch die gleichzeitige Gegenwart von Gephyrin zwar beschleunigt, findet aber unabhängig davon auch statt. (B) nach (Legendre et al. 2002).

Dabei wurde deutlich, daß die GlyR-Clusterbildung einen Einfluß auf die Rezeptordesensitierung ausübt (Abb. 2.1.1-2B). Die Stärke der Proteinexpression bestimmt das Ausmaß der Clusterbildung (Legendre et al., 2002), und die Clusterbildung wiederum verursacht das Auftreten einer schnell desensitisierenden Komponente in der Glyzin-induzierten Antwort. Die Anwesenheit von Gephyrin spielt dabei nur eine beschleunigende Rolle und ist für den Clusterbildungsprozeß als solchen abdingbar. GlyR kön-

nen demnach in Form von vereinzelt Rezeptoren oder als Cluster in der nicht-synaptischen Plasmamembran vorliegen. Verglichen mit postsynaptischen GlyR werden die vereinzelt, nicht-synaptischen Rezeptoren andersartige Funktionen wahrnehmen. Postsynaptische GlyR-Cluster sind aufgrund ihrer schnelleren und stärker ausgeprägten Desensibilisierung durchaus besser zur Informationsverarbeitung geeignet als vereinzelt GlyR. Sie bieten dem postsynaptischen Neuron nämlich ein wesentlich breiteres Informationsspektrum an, weil unter diesen Umständen die größere Präzision der postsynaptischen Hemmung dafür sorgt, daß das präsynaptisch-afferente Aktionspotentialmuster genauer auf das postsynaptische Neuron übertragen werden kann (Jones & Westbrook, 1996). Nicht-synaptische, vereinzelt GlyR dagegen könnten durch Glyzinspillover aus dem synaptischen Spalt infolge repetitiver synaptischer Transmission aktiviert werden und aufgrund ihrer nicht-desensibilisierenden Eigenschaft effektiver zur tonischen Inhibition der neuronalen Erregbarkeit beitragen (Faber & Korn, 1988). Die graduelle GlyR-Clusterbildung als Funktion der Stärke der Proteinexpression (Legendre et al., 2002) läßt vermuten, daß es Übergangszustände zwischen vereinzelt GlyR und GlyR-Clustern geben muß. Im folgenden Paragraph soll nun die Existenz solcher Übergangszustände gezeigt werden.

2.1.2 Bestätigung des *diffusion-trap*-Modells

Bislang war nicht bekannt, auf welche Weise Neurotransmitter-Rezeptoren zu den entsprechenden postsynaptischen Domänen gelangen, weil die Darstellung postsynaptisch verankerter Rezeptoren lediglich eine Momentaufnahme von den sich im Fließgleichgewicht (*steady state*) befindlichen Rezeptoren widerspiegelt.

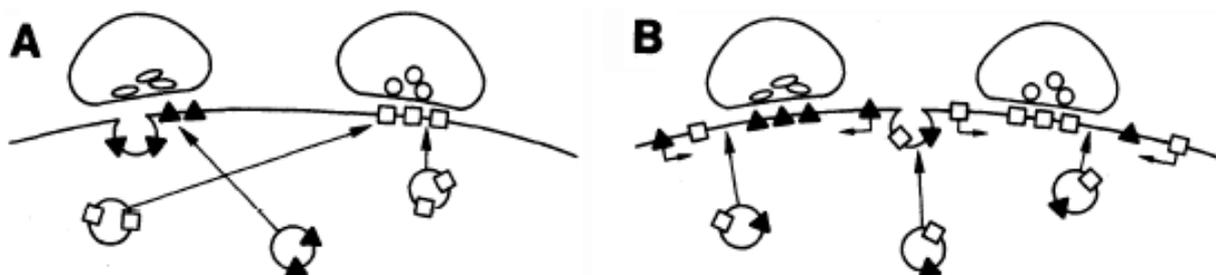


Abb. 2.1.2-2: Hypothesen zur postsynaptischen Rezeptorverankerung. (A) Dieses Modell befaßt sich mit der Zielsteuerung der Rezeptoren zu den entsprechenden postsynaptischen Domänen. (B) Alternativ besteht die Möglichkeit, daß die Neurotransmitter-Rezeptoren an beliebigen Stellen in die Plasmamembran eingefügt werden und im Zuge ihrer Oberflächendiffusion auf die entsprechenden postsynaptischen Do-

mänen treffen, wo sie schließlich durch Bindung an die passenden Ankerproteine stabilisiert werden. Nach (Craig et al., 1994).

Allein die Manipulation des Fließgleichgewichts kann Einblicke in die zugrundeliegenden Mechanismen gewähren. Ursprünglich wurde postuliert, daß GlyR ausschließlich in Aggregatform in postsynaptischen Domänen anzutreffen sind (siehe auch 2.1.1) (Triller et al., 1985). Die Existenz von nicht-synaptischen Oberflächen-GlyR wurde explizit verneint (Triller et al., 1985). Insofern favorisierten diese Ergebnisse zunächst die Hypothese einer Zielsteuerung von Rezeptoren zu postsynaptischen Domänen (*targeting*). Diese Problematik wurde 1994 aufgegriffen und diskutiert (Craig et al., 1994). Zwei Hypothesen zur Rezeptorverankerung wurden formuliert (Abb. 2.1.2-2).

In einem der denkbaren Szenarien würden sich die Rezeptoren zielgerichtet zu den entsprechenden postsynaptischen Domänen bewegen und durch Bindung an entsprechende Ankerproteine lokal stabilisiert werden (Abb. 2.1.2-2A, *targeting*). Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die Rezeptoren an beliebigen Stellen in die Plasmamembran einzufügen und sie schließlich im Zuge ihrer Oberflächendiffusion den entsprechenden postsynaptischen Domänen, wo sie stabilisiert werden können (Abb. 2.1.2-2B, *diffusion-trap*), begegnen zu lassen.

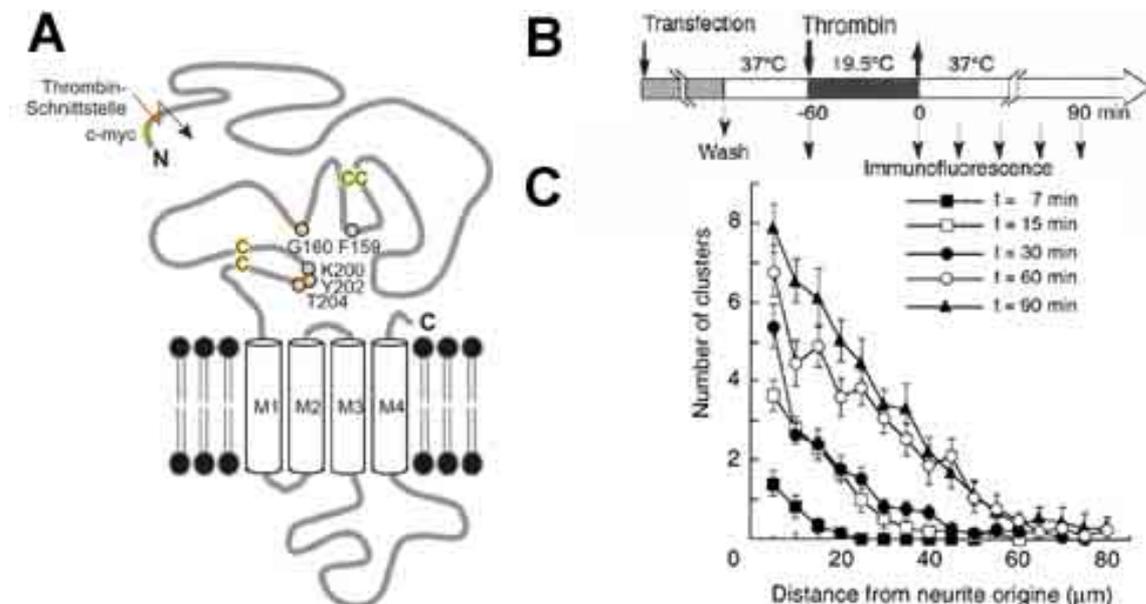


Abb. 2.1.2-3: Struktur der chimären GlyR-myc-Thr::α1-Untereinheit und experimentelles Vorgehen zur Demonstration der ortsunabhängigen GlyR-Oberflächeninsertion. (A) GlyR-myc-Thr::α1-Struktur. Die myc-Thr::α1-Untereinheit besteht aus einer N-terminalen Ligandenbindungsdomäne und vier Trans-

membrandomänen, die über Schleifen miteinander verbunden sind. C-terminal vom c-myc-Etikett (grün, Aminosäuresequenz EQKLISEEDL) gelegen, befindet sich die Thrombinschnittstelle (rot, Aminosäuresequenz LVPRGS). (B) Experimentelles Vorgehen: 24 Stunden nach Transfektion der Rückenmarkneuronen wird durch Herabsetzen der Temperatur auf 19,5°C die Synchronisierung der Abschnürung von Transportvesikeln aus dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) gewährleistet und gleichzeitig die Entfernung der c-myc-Etiketten von der Zelloberfläche durch Thrombinverdau vollzogen. Der anschließende Temperatursprung auf 37°C leitet den synchronen Transport der Vesikel hin zur Zelloberfläche ein. Zu unterschiedlichen Zeiten werden die Neuronen fixiert und immunzytochemisch untersucht. Diese Strategie ermöglichte es uns zu zeigen, daß GlyR ortsunabhängig in die neuronale Plasmamembran eingefügt werden. (C) Orts- und Zeitabhängigkeit des Vorkommens von GlyR-Clustern gemäß dem experimentellen Vorgehen in (B). (B, C) nach (Rosenberg et al., 2001).

Zur Überprüfung der beiden Hypothesen war es erforderlich, sowohl die räumlichen Gegebenheiten der GlyR-Oberflächeninsertion als auch die zeitlichen Parameter der GlyR-Verankerung bestimmen zu können. Mit Hilfe einer weiteren chimären GlyR- α 1-Untereinheit, die N-terminal ein c-myc-Etikett gefolgt von einer Thrombinschnittstelle enthält (Abb. 2.1.2-3A), konnte die ortsunabhängige GlyR-Oberflächeninsertion wie folgt gezeigt werden.

Ein enzymatischer Thrombinverdau entfernt das c-myc-Etikett während die GlyR-Oberflächeninsertion blockiert ist (bei exakt 19,5°C; (Matlin & Simons, 1983)). Dieses Vorgehen läßt die Definition eines Zeitpunkts "0" zu, bei dem virtuell keine c-myc-Immunreaktivität mehr an der neuronalen Zelloberfläche nachweisbar ist. Nachfolgend wird die GlyR-Oberflächeninsertion durch die Erhöhung der Temperatur auf 37°C synchronisiert stattfinden können, so daß der Ort der Insertion der ersten GlyR-Cluster bestimmt werden kann. Dabei stellte sich heraus, daß GlyR im Bereich des Soma sowie der proximalen Dendriten (Abb. 2.1.2-3C) in die neuronale Plasmamembran integriert werden (Rosenberg et al., 2001). Die Kurve, die den Zeitpunkt 7 Minuten nach Synchronisierung wiedergibt, verdeutlicht das Soma-nahe Auftreten der ersten GlyR-Cluster. Mit zunehmender Zeit nach Synchronisierung wird diese Kurve nach rechts verschoben. Diese Beobachtung suggerierte, daß GlyR in die somatische Plasmamembran eingefügt werden und infolge ihrer Oberflächendiffusion schließlich auch die distalen Bereiche der Dendriten erreichen (Abb. 2.1.2-3C).

Somit bestätigten diese Ergebnisse die erste Voraussetzung, die zur Bestätigung des *diffusion-trap*-Modells erforderlich ist, nämlich die ortsunabhängige GlyR-Oberflächeninsertion. Zudem gewährleisteten sie Einblick in die Zeitkonstanten, welche die

stante $D = 2,85 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ für GlyR- α 1- β gb bestimmt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die Bindung an Gephyrin die Oberflächendiffusion erheblich – aber reversibel – einschränkt (Meier et al., 2001). Treffen die beweglichen GlyR auf ein Gephyrin-Aggregat, welches die GlyR- β -Untereinheit binden kann, fällt der Diffusionskoeffizient um das 10fache ab, und die Rezeptoren bewegen sich räumlich eingeschränkt innerhalb der Fläche des Gephyrin-Aggregats (Meier et al., 2001). Diese Erkenntnisse wurden schließlich auf Einzelmolekül-Ebene bestätigt (Dahan et al., 2003). AMPAR sind ebenfalls frei in der Plasmamembran beweglich und werden postsynaptisch durch Bindung an die entsprechenden Ankerproteine stabilisiert (Borgdorff & Choquet, 2002; Tardin et al., 2003). Mit diesen Ergebnissen wurden nicht nur alle Erfordernisse zur Bestätigung des *diffusion-trap*-Modells erfüllt, sondern auch der Grundstein für das folgende Modell zur Erklärung der stetigen Fluktuation der Anzahl postsynaptischer Rezeptoren gelegt (Abb. 2.1.2-5).

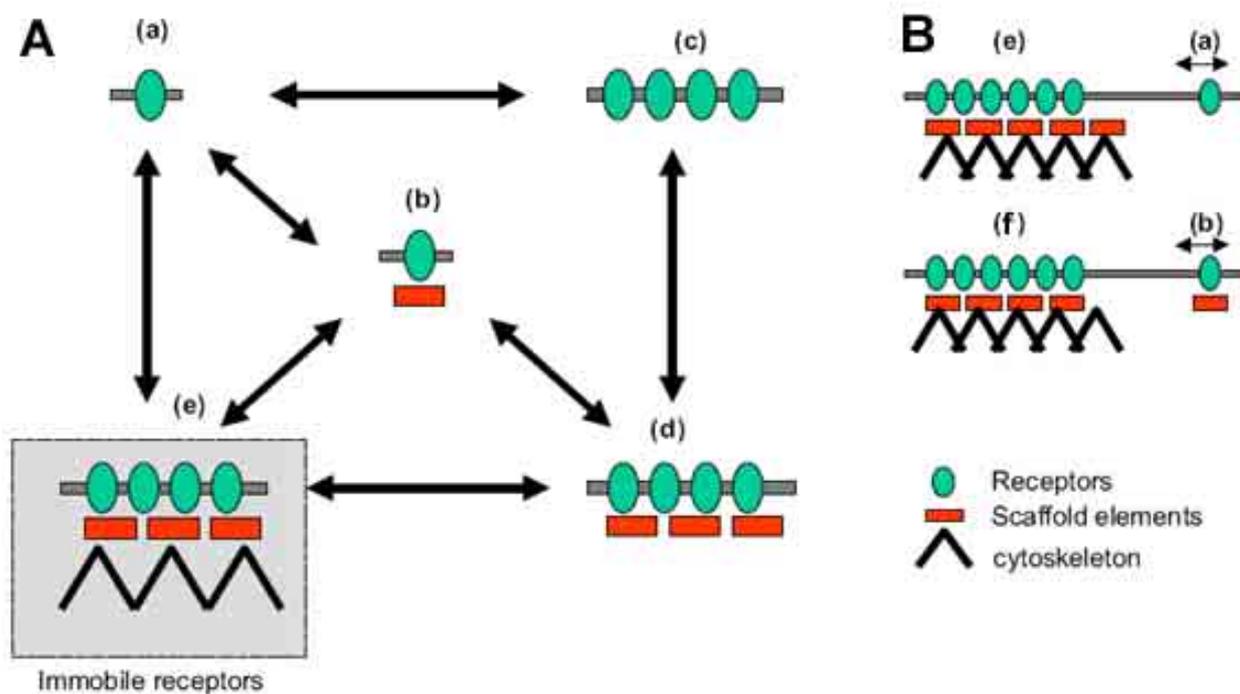


Abb. 2.1.2-5: Die inhibitorische postsynaptische Domäne im Gleichgewichtszustand, molekulare Grundlage der Rezeptorfluktuation in inhibitorischen Synapsen. (A) Oberflächen-GlyR befinden sich im Gleichgewicht zwischen den Zuständen: "einzeln, nicht-synaptisch" (a), "einzeln, nicht-synaptisch, gebunden an ein Ankerprotein" (b), "Cluster, nicht-synaptisch" (c), "Cluster, nicht-synaptisch, gebunden an ein Ankerprotein" (d) und "Cluster, synaptisch, mit dem Zytoskelett verankert durch Bindung an das postsynaptische Ankerprotein" (e). (B) Synaptische Rezeptorfluktuationen. Bewegliche, einzelne, nicht-synaptische Oberflächen-GlyR (a oder b) können in die synaptische Zytomatrix entweder in Ab- (e) oder in Anwesenheit (f) von Gephyrin eingebunden werden. Nach (Triller & Choquet, 2003).

Die Erkenntnis, daß es deutliche Schwankungen in der Anzahl der postsynaptischen Rezeptoren gibt, steht im Gegensatz zur bisherigen, statischen Sichtweise der Synapse. Dies wurde besonders deutlich am Beispiel postsynaptischer AMPAR, die in ihrer Anzahl zwischen Null (*silent synapse*) und durchschnittlich 50 variieren (Nusser et al., 1998; Kennedy, 2000). Die Anzahl der postsynaptischen NMDAR muß ebenfalls einer derartigen Fluktuation unterliegen, weil eine Wiederherstellung der postsynaptischen NMDAR-Funktion nach irreversiblen Block durch die Substanz MK801 möglich ist (Tovar & Westbrook, 2002; Carroll & Zukin, 2002). Am Beispiel glyzinerger Synapsen wurde schließlich ersichtlich, daß Rezeptorfluktuationen infolge von Änderungen im Gleichgewicht zwischen Rezeptormembraninsertion und Rezeptordegradierung auftreten (Rasmussen et al., 2002). Die physiologischen Konsequenzen derartiger Rezeptorfluktuationen sind absehbar. Die Stärke der postsynaptischen Antwort wird sich ändern. Langzeitänderungen in der Effizienz der glutaminergen synaptischen Transmission (*long-term potentiation* (LTP) oder *long-term depression* (LTD)) beispielsweise beruhen auf einer Zunahme in der Membraninsertionsrate bzw. einer Zunahme in der Endozytoserate von Glutamat-Rezeptoren (GluR) (Ehlers, 2001; Malinow & Malenka, 2002). Änderungen in der Synapsenstruktur sowie in der Effizienz der synaptischen Transmission können sich über lange Zeiträume erstrecken und werden als neuzeitliches neurobiologisches Korrelat des Gedächtnisses angesehen (Trachtenberg et al., 2002; Grutzendler et al., 2002). Wesentlich weniger hingegen ist über die Dynamik in der postsynaptischen GABA_AR-Verankerung bekannt. Erste Hinweise auf möglicherweise vorhandene Fluktuationen in der Anzahl von Oberflächen-GABA_AR wurden bereits im Jahr 1996 publiziert (Barnes, Jr., 1996). Darüber hinaus lieferte die Elektrophysiologie auf Einzelboutonebene wertvolle Einsichten in die Plastizitätsmechanismen GABAerger Synapsen (Kirischuk et al., 1999b). Während die biochemischen Grundlagen postsynaptischer GABA_AR-Fluktuationen durchaus bekannt sind (Kittler & Moss, 2003), wurden Messungen der GABA_AR-Oberflächenmobilität bislang noch nicht dokumentiert.

2.1.3 Rezeptorverankerung

Unter "postsynaptischer Verankerung" versteht man die Bindung von Neurotransmitter-Rezeptoren an das Zytoskelett der Zelle. Mit Hilfe der Molekularbiologie konnten vielseitige Einblicke in die molekulare Struktur prä- und postsynaptischer Domänen gewonnen

werden. Dabei spielen die glutamergen vor den glyzineren/GABAergen Synapsen gewissermaßen eine Vorreiterrolle. Im Jahr 1997 waren einige wenige der molekularen Komponenten glutamerner Synapsen bekannt (Kennedy, 1997). Diese Anzahl wuchs mit Beginn des Massenspektrometrie-Zeitalters sprunghaft an. Derzeit sind einige Hundert verschiedene Proteine bekannt (Abb. 2.1.3-1), welche am Aufbau der Struktur glutamerner postsynaptischer Domänen beteiligt sind (Husi et al., 2000; Husi & Grant, 2001; Yoshimura et al., 2004).

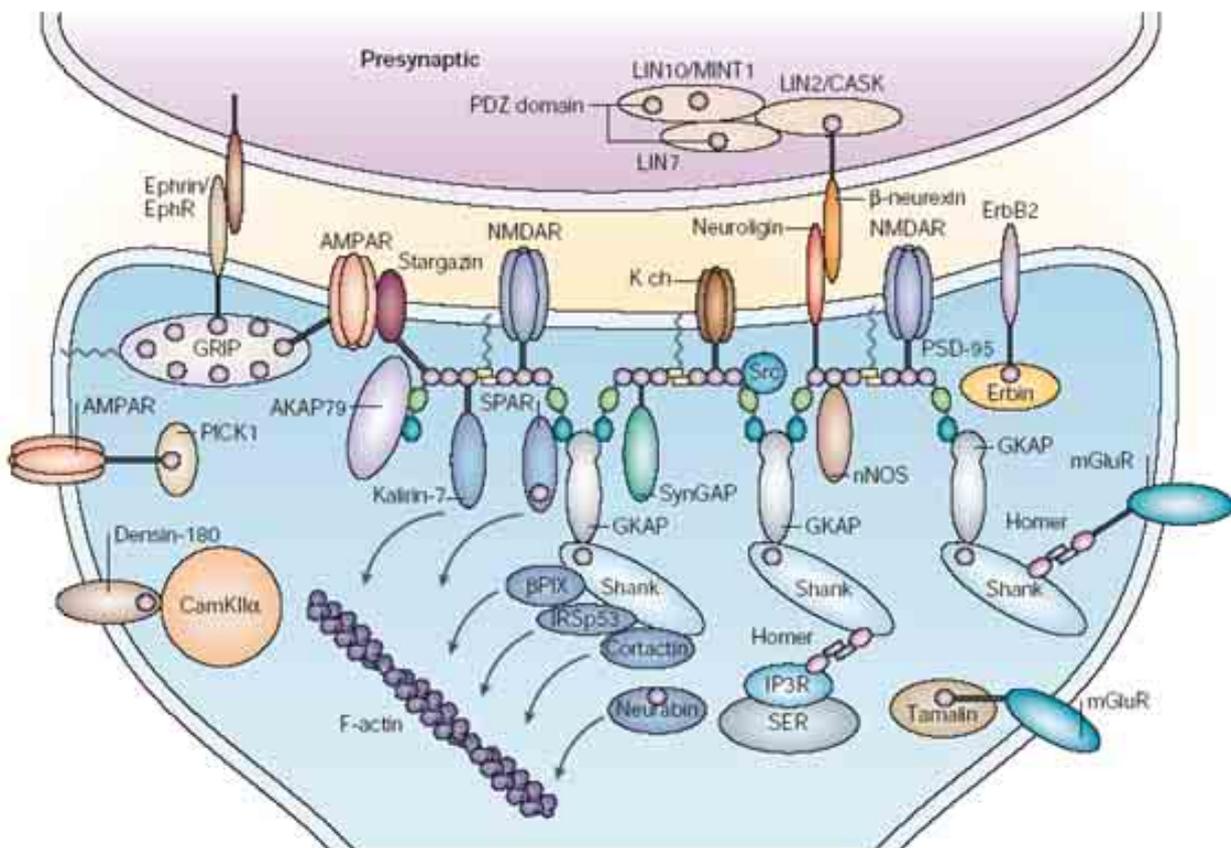


Abb. 2.1.3-1: Funktionelles Zusammenspiel der molekularen Komponenten glutamerner Synapsen. Nach (Kim & Sheng, 2004).

Stellt man die Anzahl der bekannten Proteine in postsynaptischen GABAergen Domänen dieser Zahl gegenüber, wird die Vorreiterrolle glutamerner Synapsen sehr schnell deutlich. Werden GlyR und GABA_AR einbezogen, sind aktuell nur circa 20 verschiedene Proteine als Bestandteile inhibitorischer postsynaptischer Domänen bekannt (Luscher & Keller, 2004). Werden die regulatorischen Proteine, wie beispielsweise Kinasen und

Phosphatasen und deren Adapterproteine, ausgenommen, bleiben die strukturell relevanten Komponenten Gephyrin, Collybistin, RAFT1, Profilin, Tubulin, Actin und *cell division cycle 42* (*cdc42*) übrig (siehe Abb. 2.1.3.1-2).

Aus der molekularen Vielfalt ergibt sich zwangsläufigerweise eine funktionelle Vielfalt, die auf einer übergeordneten Ebene infolge posttranslationaler Veränderung der einzelnen Komponenten noch komplexer werden kann. Eine Grundvoraussetzung für die Entstehung funktioneller Vielfalt ist die Eigenschaft dieser Komponenten, mit verschiedenen anderen Komponenten gleichzeitig zu interagieren. Infolge dessen entsteht ein komplexes Proteinnetzwerk, ähnlich dem neuronaler Verschaltungen. So stellt beispielsweise GRIP durch seine Interaktion mit sowohl AMPA- als auch Ephrin-Rezeptoren ein funktionelles Bindeglied zwischen der Rezeptorverankerung und der funktionellen Entsprechung zwischen Prä- und Postsynapse dar (Abb. 2.1.3-1).

Aufgrund seiner Eigenschaft, Neuroligin und NMDAR zu binden, ist PSD-95 ein ebenso exzellenter Kandidat für die funktionelle Entsprechung hinsichtlich postsynaptischer NMDAR-Verankerung. Metabotrope GluR (mGluR) säumen die Peripherie glutaminerger postsynaptischer Domänen. Sie werden über ein komplexes Netzwerk, welches zwischen Homer, SH3 *and ankyrin repeat-containing protein* (Shank), *guanylate kinase-associated protein* (GKAP) und PSD-95 ausgebildet wird, verankert. Im folgenden Paragraph wird die Komplexität diskutiert, die sich aus einem einzigen Protein, nämlich Gephyrin, und seinen Varianten ergibt.

2.1.3.1 Molekulare Vielfalt – Funktionelle Vielfalt, Gephyrin und Partner

Gephyrin wurde ursprünglich als GlyR-verunreinigende Komponente beschrieben (Grenningloh et al., 1990). Entwicklungsgeschichtlich gesehen ist Gephyrin vermutlich durch Genfusion (Abb. 2.1.3.1-1A) aus zwei bakteriellen Proteinen, MogA und MoeA, entstanden (Stallmeyer et al., 1999).

Auf dieser Grundlage wurde Gephyrin in eine N-terminale MogA-ähnliche und eine C-terminale MoeA-ähnliche Domäne unterteilt. Beide Domänen sind über einen sogenannten *linker* miteinander verbunden (Abb. 2.1.3.1-1A).

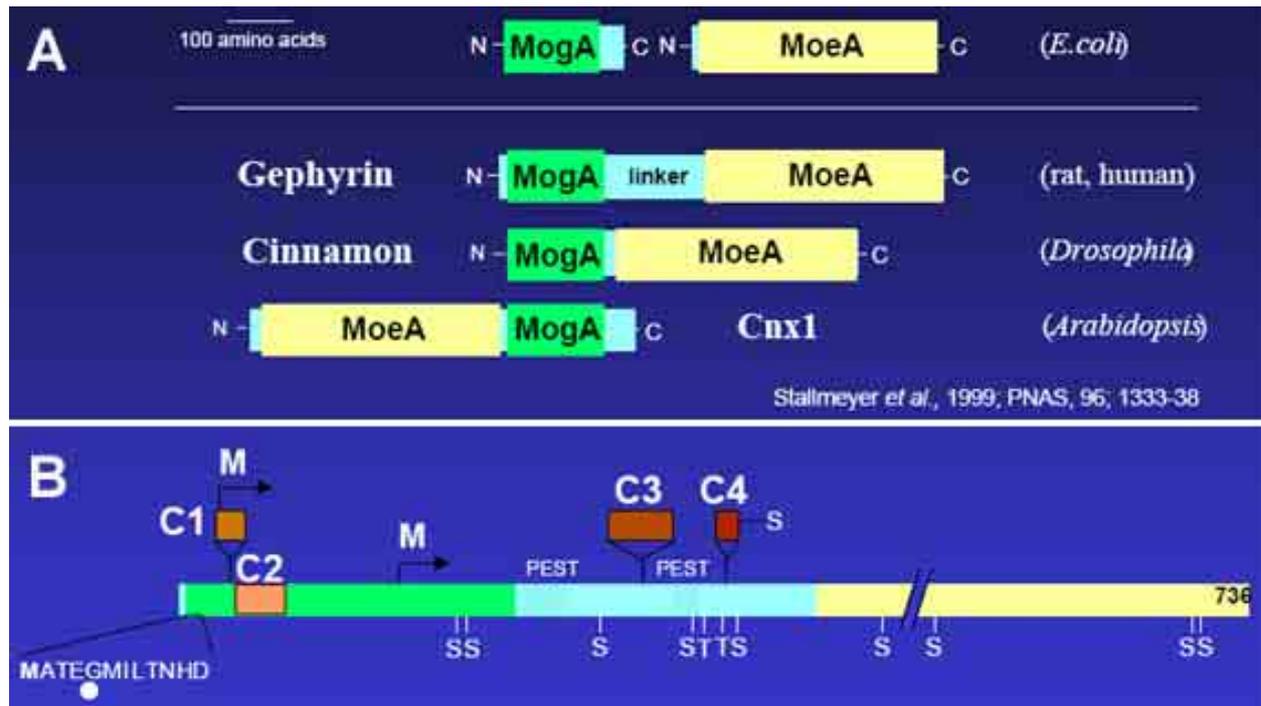


Abb. 2.1.3.1-1: Gephyrin-Struktur und Homologievergleich. (A) Gephyrin weist Homologie zu den Proteinen Cinnamon (*Drosophila*) und Cnx1 (*Arabidopsis*) auf und ist vermutlich aus der Genfusion der bakteriellen Proteine MogA und MoeA hervorgegangen. (B) Gephyrin-Primärstruktur: Die Kassetten C1-C4 werden durch alternatives Spleißen an den indizierten Stellen eingefügt. Zwei PEST-Domänen, die auf schnellen Protein-*turnover* hinweisen, eine N-terminale Myristoylierungssequenz sowie Phosphorylierungsstellen (Serin (S); Threonin (T)) sind gezeigt. (A) verändert nach (Stallmeyer et al., 1999).

Von den bakteriellen Proteinen MogA und MoeA ist bekannt, daß sie in den Molybdän-Stoffwechsel der Zelle eingreifen. Sie wirken an der Molybdän-Co-Faktor (Moco)-Biosynthese mit, in dem sie die Aktivierung und den Einbau des Molybdäns in Molybdopterin katalysieren. Moco wiederum bildet das aktive Zentrum der Enzyme, die Redox-Reaktionen zur Entgiftung katalysieren. Darunter fallen die Sulfit-, Xanthin-, und Aldehyd-Oxidasen (Stallmeyer et al., 1999). Eine genetisch bedingte Abwesenheit von Moco äußert sich in der Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte. Obwohl diese Enzyme vermehrt im Herzen sowie in der Niere, Leber und Lunge anzutreffen sind, dominieren neurologische Symptome, wie beispielsweise erhöhter Muskeltonus, starre Körperhaltung, Myoklonus bis hin zu epileptischen Anfällen (Beemer et al., 1985; Bamforth et al., 1990). Diese Erkenntnisse lieferten die ersten Hinweise dafür, daß Gephyrin neben seiner metabolischen Funktion auch eine wesentliche Rolle im ZNS spielt. Bislang ist allerdings noch nicht geklärt, wie die Moco-Biosynthese in die neuronale Signalverarbeitung eingreift.

Im Zuge der Isolierung und Klonierung Gephyrin-spezifischer komplementärer Desoxyribonukleinsäuren (cDNA) stellte sich heraus, daß es mehrere Spleißvarianten gibt. Vier sogenannte Kassetten (C1-C4, Abb. 2.1.3.1-1B) wurden seinerzeit beschrieben (Prior et al., 1992). Die funktionelle Relevanz dieser Kassetten ist jedoch noch nicht bekannt. Alle vier Kassetten wurden im ZNS nachgewiesen, wobei sich C3 und C4 gegenseitig ausschließen (Prior et al., 1992).

Gephyrin interagiert nicht nur mit GlyR, und möglicherweise auch mit GABA_AR, sondern auch mit RAFT1, Collybistin, GABARAP und Tubulin (Abb. 2.1.3.1-2). RAFT1 ist ein zytosolisches Protein, welches in den *mitogen*-stimulierten intrazellulären Signalweg eingreift. Damit kontrolliert RAFT1 zelluläre Prozesse wie die mRNA-Translation und möglicherweise auch die lokale postsynaptische Proteinsynthese (Sabatini et al., 1999; Gardiol et al., 1999). Collybistin wurde erst kürzlich isoliert und kloniert (Kins et al., 2000). Dabei ergab der Homologievergleich mit anderen Proteinen, daß Collybistin die Funktion eines GDP-GTP-Austauschfaktors wahrnehmen könnte (Kins et al., 2000). Gewöhnlicherweise aktivieren die GDP-GTP-Austauschfaktoren die GTPasen der Rho/Rac-Familie, indem sie den GDP-GTP-Austausch beschleunigen.

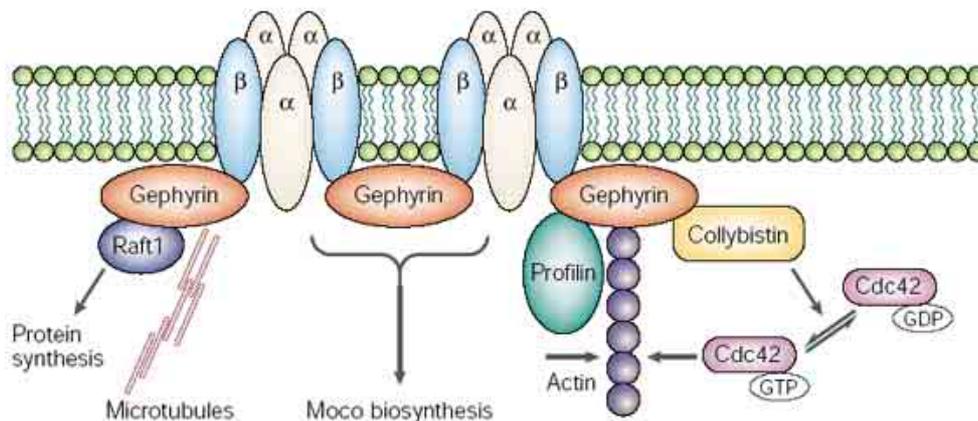


Abb. 2.1.3.1-2: Zusammensetzung inhibitorischer postsynaptischer Domänen. Nach (Moss & Smart, 2001).

Die in Collybistin enthaltene Pleckstrin-Homologie-Domäne ermöglicht die Zielsteuerung des Proteins zu Phosphatidylinositol-bis-phosphat (PIP₂)-haltigen Plasmamembran-Bereichen und stellt damit eine direkte Verbindung zum Diacylglycerol (DAG)-

Protein-Kinase-C (PKC)-Signalweg her (Harlan et al., 1994). Zudem konnte gezeigt werden, daß die Expression von Collybistin, Gephyrin und GlyR eine hinreichende Bedingung für die sub-membranäre Anreicherung und Kolo-kalisierung aller drei Proteine in nicht-neuronalen Zellen darstellt (Kins et al., 2000). GABARAP wurde als GABA_AR-assoziiertes Protein identifiziert und kloniert (Wang et al., 1999). In seiner Eigenschaft, GABA_AR und Mikrotubuli zu binden, wäre es theoretisch – in Analogie zu Gephyrin – ein ausgezeichneter Kandidat für die postsynaptische GABA_AR-Verankerung. Es wurde jedoch gezeigt, daß GABARAP eher für den intrazellulären Transport von GABA_AR zur Plasmamembran zuständig ist, als für die postsynaptische GABA_AR-Verankerung (Kneussel et al., 2000).

An der postsynaptischen GlyR-Verankerung ist ausschließlich Gephyrin beteiligt. Gephyrin eignet sich aufgrund seiner Fähigkeit, über die *linker*-Sequenz Tubulin zu binden (Ramming et al., 2000), sehr gut zur postsynaptischen Rezeptorverankerung. Die GlyR-β-Untereinheit spielt dabei eine entscheidende Rolle, weil sie über eine kurze, 18 Aminosäuren lange Sequenz (gb-Sequenz, siehe auch 2.1.1, (Meyer et al., 1995)) mit Gephyrin interagiert (Sola et al., 2004; Schwarz et al., 2004b). Eine direkte Bindung des GABA_AR an Gephyrin konnte bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es gibt jedoch neuerdings Hinweise dafür, daß dies infolge einer Aktivierung der PKC möglich ist (Meier & Grantyn, 2004b).

Die Stabilität der Bindung des GlyR an Gephyrin, die sogar der Behandlung mit bestimmten Lösungsmitteln (z.B. Triton X-100) standhält (Pfeiffer et al., 1982; Kirsch et al., 1991), ist bemerkenswert. Die Interaktion der GlyR-β-Untereinheit mit Gephyrin ist jedoch nicht so starr und irreversibel wie ursprünglich angenommen. Zum einen belegen die Studien der GlyR-Oberflächendiffusion eindeutig, daß diese Bindung reversibel ist (siehe 2.1.2). Ferner haben neuere Studien gezeigt, daß bestimmte Gephyrin-Spleißvarianten entweder permissiv oder nicht-permissiv hinsichtlich ihrer Bindung an GlyR sind. Die erst kürzlich identifizierte Kasette C5, die in den N-terminalen MogA-ähnlichen Bereich eingefügt werden kann (Abb. 2.1.3.1-3), schließt die Interaktion mit dem GlyR aus (Meier et al., 2000a).

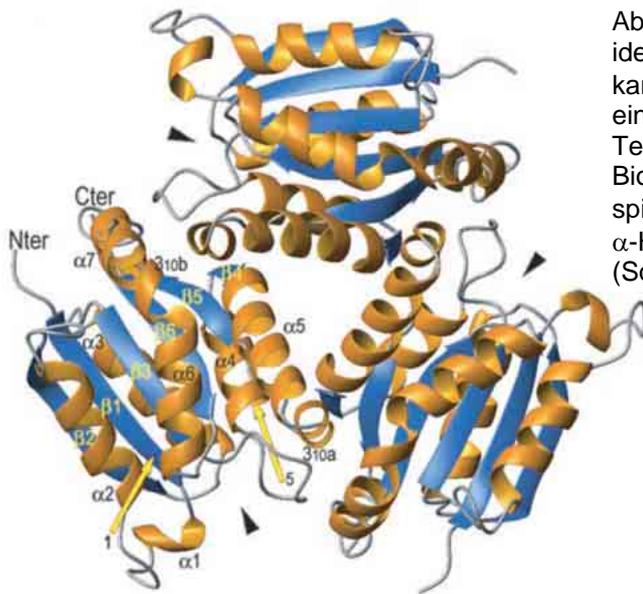


Abb. 2.1.3.1-3: Trimere MogA-Struktur. Die kürzlich identifizierte Kasette C5 (KFPTFPFCGLQKG) kann infolge alternativen Spleißens in α -Helix 4 eingefügt werden (gelber Pfeil, "5"). N- und C-Termini (Nter, Cter) sowie funktionell für die Moco-Biosynthese relevante Bereiche (schwarze Pfeilspitzen) sind dargestellt. β -Faltblätter sind blau und α -Helices sind gelb wiedergegeben. Verändert nach (Sola et al., 2001).

Diese Erkenntnis lieferte Anlaß zur Spekulation über den Ort der GlyR-Bindungsstelle in Gephyrin. Anfängliche Annahmen über eine N-terminale Lokalisierung der GlyR-Bindungsstelle konnten nicht bestätigt werden (Sola et al., 2001). Die GlyR-Bindungsstelle wurde schließlich der C-terminalen MoeA-ähnlichen Domäne zugeordnet (Rees et al., 2003). Gephyrin besitzt die Eigenschaft, hochmolekulare Proteinnetzwerke auszubilden. Die N-terminale Domäne ist dabei wesentlich an der Ausbildung trimerer Proteinstrukturen beteiligt (Abb. 2.1.3.1-3), während die C-terminale Domäne für eine Dimerisierung verantwortlich ist. Das Resultat einer solchen konzertierten Protein-Protein-Interaktion ist die Ausbildung einer hexagonalen Proteinschicht (Xiang et al., 2001). Die Kasette C5 wird in unmittelbarer Nähe zur Trimer-Schnittstelle (Abb. 2.1.3.1-4) in die N-terminale Domäne eingefügt (Schwarz et al., 2001). Es ist daher davon auszugehen, daß die Gegenwart der Kasette C5 eine Konformationsänderung hervorruft, die sich nicht nur auf das Aggregationsverhalten sondern auch auf die entfernt in der C-terminalen Domäne befindliche GlyR-Bindungsstelle auswirken wird (Schwarz et al., 2001).

Nachdem die strukturellen Auswirkungen der C5-Insertion erkannt worden waren, ergab sich die Frage nach einer möglichen funktionellen Relevanz. Eine Gephyrin-Isoform, welche die Fähigkeit zur GlyR-Bindung verliert, könnte für den Ausschluß der GlyR von der postsynaptischen Verankerung gegenüber GABA-freisetzenden präsynaptischen Endigungen zuständig sein.

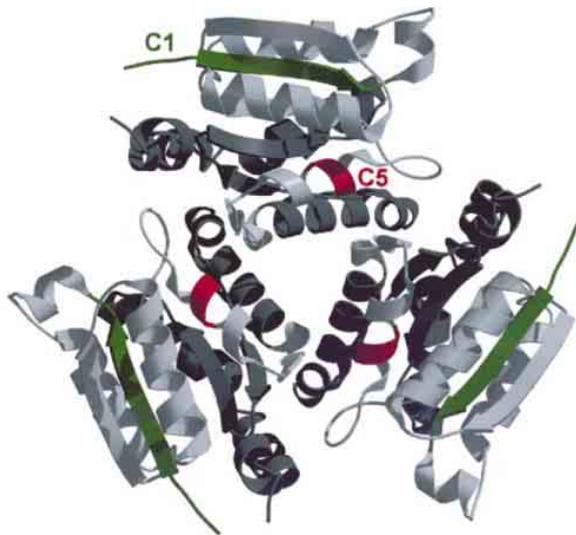


Abb. 2.1.3.1-4: Strukturelle Basis der C5-verursachten Konformationsänderung in der Gephyrin-Struktur. Die Kasette C5 kann infolge alternativen Spleißens in α -Helix 4 eingefügt werden (rot). α -Helix 4 bildet die Schnittstelle zur MogA-Trimer-Bildung. Nach (Schwarz et al., 2001).

Tatsächlich konnte diese Hypothese kürzlich in hippocampalen Neuronen durch Anwendung von *antisense*-Versuchen bestätigt werden (Meier & Grantyn, 2004a). Dies war der erste Hinweis darauf, daß die GlyR-Gephyrin-Bindung regulierbar ist. Schließlich kamen noch weitere Erkenntnisse hinzu – so wurde beispielsweise deutlich, welche Rolle der pH-Wert auf die GlyR-Gephyrin-Bindung ausübt. Eine Absenkung des pH-Wertes begünstigt die Ausbildung von Gephyrin-Trimeren ebenso wie die Entstehung von zwei GlyR-Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten *in vitro* (Sola et al., 2004). Bedenkt man, daß GlyR nicht ausschließlich Chlorid-permeabel sind, sondern auch Bikarbonat-leitfähig, wird die Bedeutung dieser Entdeckung sofort augenscheinlich. Eine solche pH-Wert-Senkung kann nämlich direkt infolge der Aktivierung der Rezeptoren erfolgen (Kaila & Voipio, 1987). In diesem Fall würde die Entstehung von Gephyrin-Aggregaten auf der Aktivierung des GlyR oder GABA_AR *per se* beruhen, und nicht, wie seither angenommen, auf einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels (siehe 2.2.1).

2.1.3.2 Die GABA_AR- γ 2-Untereinheit und ihre Spleißvarianten

Vor rund 17 Jahren wurde deutlich, daß GlyR und GABA_AR in den gleichen postsynaptischen Domänen gehäuft vorkommen können (Triller et al., 1987). Rund zehn Jahre später wurde die physiologische Bestätigung dieses Sachverhaltes geliefert, indem die gleichzeitige Freisetzung von Glyzin und GABA aus einem präsynaptischen Vesikel gezeigt werden konnte (Jonas et al., 1998). Bislang sind 19 verschiedene GABA_AR-

Untereinheiten beschrieben worden. Diese umfassen die Untereinheiten α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ρ 1-3, ϵ , π und θ (Luscher & Keller, 2004). GABA_AR-Kanäle können aufgrund ihrer bevorzugten zellulären Lokalisierung in zwei Gruppen unterteilt werden. Dabei werden δ -haltige, vorwiegend nicht-synaptische von γ -haltigen, vorwiegend synaptischen GABA_AR unterschieden. Wie *gene-targeting*-Studien bewiesen, sind die GABA_AR-Untereinheiten γ 1-3 als einzige befähigt GABA_AR postsynaptisch zu verankern (Essrich et al., 1998; Baer et al., 1999; Schweizer et al., 2003). Diesbezüglich ergibt sich direkt die Frage nach dem zellulären Bindungspartner. Bis dato schlugen alle Versuche fehl, ein Protein zu isolieren, welches zu einer direkten Interaktion mit den GABA_AR- γ -Untereinheiten befähigt ist, gleichzeitig postsynaptisch lokalisiert ist und darüber hinaus Elemente des Zytoskeletts binden kann. Hierfür in Frage kamen die Proteine GABARAP, AP2, BIG2, GODZ, Plic-1, und Gephyrin. GABARAP wäre ein ausgezeichneter Kandidat hierfür gewesen, weil es direkt mit der GABA_AR- γ 2-Untereinheit und Tubulin interagiert (Wang et al., 1999). Eine postsynaptische Lokalisierung von GABARAP konnte jedoch leider nicht nachgewiesen werden (Kneussel et al., 2000). AP2 und BIG2 binden an die GABA_AR- β - (AP2 und BIG2) und γ - (BIG2) Untereinheiten (Kittler et al., 2000; Charych et al., 2004). Beide Proteine werden in postsynaptischen Domänen gefunden, sind jedoch für die Regulierung der Endo- bzw. Exozytose von GABA_AR und damit für Steuerung der Oberflächenexpression zuständig. Ebenso wird von Plic-1 angenommen, daß es die GABA_AR-Oberflächenexpression steuert, indem es mit den α - und β -Untereinheiten interagiert und deren Degradierung verhindert (Bedford et al., 2001). Schließlich wurde GODZ als GABA_AR-bindendes Protein beschrieben, welches die Palmitoylierung und damit die intrazelluläre Zielsteuerung von γ -haltigen GABA_AR reguliert (Keller et al., 2004).

Die mRNA der GABA_AR- γ 2-Untereinheit wird alternativ gespleißt (Whiting et al., 1990; Wang & Burt, 1991). Die sogenannte lange Isoform (γ 2L) unterscheidet sich dabei von der kurzen (γ 2S) durch Einfügen einer 8 Aminosäuren langen Sequenz (LLRMFSFK). Diese wird in die zytosolische Schleife zwischen Transmembrandomänen 3 und 4 eingefügt. Interessanterweise bietet diese kurze, 8 Aminosäuren lange Sequenz Angriffsfläche für eine PKC-vermittelte Phosphorylierung (Moss et al., 1992). Gephyrin trägt zweifelsohne zur postsynaptischen GABA_AR-Verankerung bei (Essrich et al., 1998;

Baer et al., 1999; Schweizer et al., 2003). Mit Entdeckung der $\gamma 2S$ - und $\gamma 2L$ -Isoformen bestand die Möglichkeit zu zeigen, daß eine der beiden Varianten zu einer direkten Interaktion mit Gephyrin befähigt sein könnte. Studien, die an $\gamma 2$ -gendifizienten Mäusen durchgeführt wurden, konnten diese Hoffnung jedoch nicht nähren, da sie zeigten, daß beide Spleißvarianten hinsichtlich ihrer postsynaptischen Verankerung funktionell gleichwertig sind (Baer et al., 2000). Diesbezüglich sollte jedoch bedacht werden, daß Wiederherstellungsexperimente, die auf Grundlage der genetisch bedingten Abwesenheit einer funktionellen Komponente durchgeführt werden, nicht zwangsläufigerweise einen physiologischen Zustand widerspiegeln müssen. So kann beispielsweise auch die $\gamma 3$ -Untereinheit, die bekannterweise eine wesentlich geringere Affinität zu postsynaptischen Domänen aufweist, den genetisch bedingten Ausfall der $\gamma 2$ -Untereinheit kompensieren (Baer et al., 1999).

Um schließlich herauszufinden, ob es Unterschiede zwischen den $\gamma 2$ -Spleißvarianten hinsichtlich ihrer postsynaptischen Verankerung gibt, haben wir chimäre Proteine hergestellt. Diese bestehen aus der zytosolischen Schleife der $\gamma 2$ -Untereinheit ($\gamma 2S$ oder $\gamma 2L$) zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4, die zur Sichtbarmachung an DsRed gekoppelt wurden. Die Expression dieser Reporterproteine in Neuronen sowie in nicht-neuronalen Zellen erlaubte es uns schließlich, Unterschiede in der Bindungskapazität an postsynaptische Strukturen sichtbar zu machen. So konnten wir zunächst feststellen, daß die $\gamma 2L$ -Schleife häufiger in postsynaptischen Domänen angetroffen wird als die $\gamma 2S$ -Schleife (Meier & Grantyn, 2004b). Schließlich stellte sich heraus, daß die augenscheinlich größere Affinität der $\gamma 2L$ -Schleife zu postsynaptischen Domänen auf die PKC-Phosphorylierungsstelle innerhalb der 8 Aminosäuren langen Sequenz LLRMFSFK zurückzuführen ist. Die Aktivierung der PKC mittels Phorbol ester begünstigte dabei selektiv die postsynaptische Anhäufung der GABA_AR- $\gamma 2L$ -Schleifen (Meier & Grantyn, 2004b). Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode gegenüber herkömmlichen *in vitro*-Bindungsstudien liegt in der natürlichen zellulären Umgebung, die das Zytosol bietet, begründet. Frühere *in vitro*-Bindungsstudien mußten folgerichtig aufgrund der Abwesenheit einer PKC-Aktivität im Eppendorfröhrchen fehlschlagen. Diese Fragestellung bedarf jedoch der Durchführung weiterer Versuche, bevor sie vollständig beantwortet werden kann. So müßte die direkte Interaktion beider Proteine

werden kann. So müßte die direkte Interaktion beider Proteine mit Hilfe von phosphorylierten γ 2L-Schleifen *in vitro* bestätigt werden.

2.1.3.3 RNA-*editing* der GlyR- α 3-Untereinheit

Auch wenn es für diagnostische Zwecke wünschenswert wäre, ist nicht jede Krankheit von einem bestimmten Genotyp geprägt. Der Vorgang des RNA-*editing* unterbricht diese strikte klinische Genotyp-Phänotyp-Zuordnung insofern, als er eine funktionelle Vielfalt über das genetisch mögliche Maß hinaus generiert. Mit der Entdeckung editierter GluR-Untereinheiten in Säugetieren erfuhr die Thematik des RNA-*editing* einen spürbaren Popularitätszuwachs. Die Arbeitsgruppe um Peter Seeburg konnte Anfang der Neunziger Jahre zeigen, daß die Aminosäure Glutamin (Q) innerhalb der GluR-B-Untereinheit durch RNA-*editing* in ein Arginin (R) umgewandelt wird. Es stellte sich heraus, daß diese Aminosäuresubstitution weitreichende physiologische Konsequenzen hatte. Liegt die GluR-B-Untereinheit in ihrer nicht-editierten Form (Q) vor, weisen AMPAR eine geringfügige Durchlässigkeit für Kalzium-Ionen auf. Dagegen haben Kanäle, welche die (R)-Form beinhalten, eine deutlich größere Permeabilität für Kalzium-Ionen (Herb et al., 1992). Später wurden weitere Fälle des RNA-*editing* in Säugetier-mRNA entdeckt. Diejenigen mRNA, die Serotonin-Rezeptoren bzw. Kaliumkanäle kodieren, werden ebenfalls editiert. Dies hat Änderungen in der G-Protein-Aktivierung (Gurevich et al., 2002) bzw. in der Kaliumkanal-Inaktivierungskinetik (Bhalla et al., 2004) zufolge. Die Liste der aufgeführten Beispiele, die auf dem Adenosin-zu-Inosin (A-zu-I)-RNA-*editing* beruhen, kann um all diejenigen Proteine, die aus einer Cytosin-zu-Uracil (C-zu-U)-Editierung (Abb. 2.1.3.3-1) hervorgehen, erweitert werden. Die mRNA, die das Apolipoprotein B bzw. Neurofilament kodieren, werden C-zu-U editiert (Powell et al., 1987; Skuse et al., 1996). C-zu-U-Editierungen in mRNA, die Neurotransmitter-Rezeptoren kodieren, waren bislang jedoch nicht bekannt.

Die molekulare Grundlage der häufig beobachteten, ungewöhnlich großen Empfindlichkeit von GlyR gegenüber Glyzin, die besonders in höheren Hirnregionen deutlicher ausgeprägt zu sein scheint, blieb unergründet. Die intensive Durchforstung GlyR- α 3-spezifischer mRNA zog die Entdeckung einer atypischen GlyR- α 3-Untereinheit nach sich. Verglichen mit der ursprünglich publizierten DNA-Sequenz (Kuhse et al., 1990)

trug diese mutierte GlyR- α 3-Untereinheit ein Uracil anstelle eines Cytosins an Position 554.

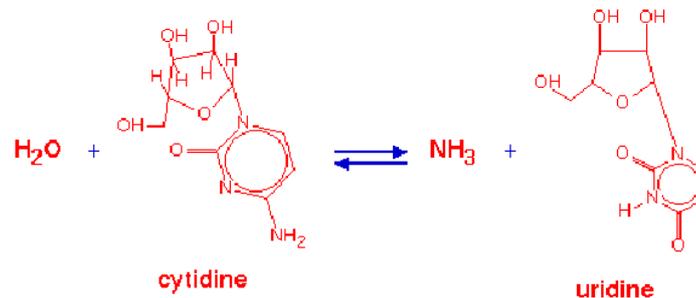


Abb. 2.1.3.3-1: C-zu-U-mRNA-Editierung. Das Enzym Cytosindeaminase katalysiert die Umwandlung von Cytidin in Uracil durch Abspaltung einer Aminogruppe vom Nucleotid Cytidin.

Wir haben diese atypische GlyR- α 3-Untereinheit schließlich " α 3_{P185L}" getauft, weil das Uracil-554 die Aminosäuresubstitution Prolin-zu-Leucin an Position 185 verursacht (Meier et al., 2005). Die elektrophysiologische Charakterisierung der Untereinheit α 3_{P185L} in transfizierten hippocampalen Neuronen ergab eine Verringerung des EC₅₀-Wertes um das 15fache. Glücklicherweise konnten wir ausschließen, daß ein PCR-Artefakt Ursache für den Einzelnucleotidaustausch C554U war, denn die Wirksamkeit des Antagonisten der Cytosindeaminase Zebularine sowie die Abwesenheit der Mutation vom Genom sprachen vielmehr für einen RNA-Editierungsprozeß (C-zu-U). Für einen RNA-Editierungsprozeß sprach zudem die Tatsache, daß das GlyR- α 3_{P185L}-Vorkommen von der mRNA-Transkription, nicht aber von der Proteinsynthese, abhängig ist. Actinomycin D führte nämlich zu einer Abregulierung des GlyR- α 3_{P185L}-Vorkommens (vergleichbar mit Zebularine), wohingegen Cycloheximid eine leichte Aufregulierung zufolge hatte.

Interessanterweise gibt es große Schwankungen hinsichtlich des endogenen Vorkommens von GlyR- α 3_{P185L}. Beispielsweise führt die Anfertigung von embryonalen (E20) Hirnschnitten (dorsales Mittelhirn) zu einer dramatischen Aufregulierung des GlyR- α 3_{P185L}-Vorkommens. Werden Hirnschnitte des dorsalen Mittelhirns von älteren Tieren angefertigt, findet dagegen eine Abregulierung des GlyR- α 3_{P185L}-Vorkommens statt. Das GlyR- α 3_{P185L}-Vorkommen *in situ* wird demnach altersabhängig unterschiedlich infolge der Läsion reguliert. Mit der Entdeckung der GlyR- α 3_{P185L}-Untereinheit haben wir

die erste *gain-of-function* GlyR-Mutation beschrieben. Alle bisher beschriebenen GlyR-Nukleotidpolymorphismen hingegen führten zum Verlust der GlyR-Funktionsfähigkeit (*loss-of-function*) und stellten somit die molekulare Basis bestimmter genetisch bedingter Hypererregbarkeitserkrankungen dar (Breitinger & Becker, 2002). Unsere Ergebnisse sind daher vielversprechend hinsichtlich einer möglichen Therapie von Hypererregbarkeitserkrankungen. Zuvor müssen jedoch die Mechanismen, die das GlyR- $\alpha 3_{P185L}$ -Vorkommen regulieren, eingehender charakterisiert werden. Es wäre daher schön, in naher Zukunft eine experimentelle Bedingung zu finden, die eine Aufregulierung des GlyR- $\alpha 3_{P185L}$ -Vorkommens auslöst.

2.2 Synaptogenese

Die Anzahl der Synapsen im ZNS spiegelt einen Gleichgewichtszustand zwischen Synaptogenese und Synapseneliminierung (*pruning*) wider. Der Vorgang der Synaptogenese läßt sich unterteilen in i) axonale Wegfindung, ii) Kontaktaufnahme zwischen prä- und postsynaptischen Elementen, iii) Sicherstellung der funktionellen Entsprechung hinsichtlich Transmitterphänotyp und iv) Reifung der prä- und schließlich der postsynaptischen Elemente zu funktionellen Domänen. An der axonalen Wegfindung sind eine Vielzahl von "anlockenden" und "abstoßenden" Molekülen beteiligt (*guidance cues, attractive, repulsive*). Semaphorin IIIA und Ephrin A2 beispielsweise wirken abstoßend und lösen einen Kollaps des axonalen Wachstumskegels aus (Gallo & Letourneau, 2004). Neurotrophine, z.B. *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und *nerve growth factor* (NGF) hingegen wirken anlockend (Kaplan & Miller, 2000). Sie sind neben der Regulierung des Auswachsens von Axonen und Dendriten jedoch auch an der Kontrolle einer Vielzahl anderer zellulärer Prozesse beteiligt. Darunter fallen u.a. die Regulierung des Überlebens der Zelle sowie die Steuerung der Zellteilung.

Haben Axone schließlich ihr Zielgebiet erreicht, werden sie sich verästeln und Synapsen ausbilden. An der Kontaktaufnahme sind hauptsächlich diffundible Faktoren sowie transsynaptische Signalmoleküle beteiligt. Am Beispiel der neuromuskulären Endplatte wurde deutlich, daß der Signalfuß zwischen der präsynaptischen Terminalie und der Muskelfaser von einem mit dem Neurotransmitter gemeinsam freigesetzten Molekül namens z^+ -Agrin wahrgenommen wird (Sanes & Lichtman, 2001). Agrin bindet

und aktiviert die Rezeptortyrosinkinase MusK, welche wiederum zur lokalen Anhäufung von AChR führt. Zwischenglied in dieser Signalkaskade ist das postsynaptische Protein Rapsyn. Es spielt eine entscheidende, mit Gephyrin vergleichbare, Rolle in der Ausbildung zukünftiger cholinergischer postsynaptischer Domänen (PSD).

Die wechselseitige Anpassung zwischen Prä- und Postsynapse hinsichtlich des freigesetzten Neurotransmitters erfordert die Präsenz der entsprechenden präsynaptischen Innervation. Diesbezüglich wurde bereits auf die mögliche Bedeutung transsynaptischer Signalmoleküle, wie z.B. Neuroligin, Cadherin, SynCAM, Ephrin, und Narp hingewiesen. Sie könnten für die Koordinierung der Reifung von prä- und postsynaptischen Terminallen von entscheidender Bedeutung sein (Scheiffele, 2003). In glutaminergen Synapsen wurden mehrere solcher Zelladhäsionsmoleküle entdeckt. Neben dem klassischen Adhäsionspaar Neurexin-Neuroligin-1 konnte kürzlich ein weiteres Zelladhäsionsmolekül entdeckt werden. Tom Südhof und Kollegen (Biederer et al., 2002) haben festgestellt, daß die Expression von SynCAM und GluR in Fibroblasten (HEK293) zur Induktion heterologer glutaminergischer PSD führt. SynCAM trägt somit auch zur Kommunikation zwischen prä- und postsynaptischen Zellen bei, wodurch letztendlich die koordinierte Reifung beider Strukturen ermöglicht wird. Die Entdeckung der transsynaptischen Signalmoleküle, welche die wechselseitige Anpassung zwischen GABAergen Prä- und Postsynapsen ermöglichen, ließ lange Zeit auf sich warten. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß eine Isoform des Neuroligins, nämlich Neuroligin-2, höchstwahrscheinlich diese Rolle spielt (Graf et al., 2004). Dabei stellte sich heraus, daß Neurexin ein gemeinsames, übergeordnetes synaptogenes Signal darstellt, indem es an Neuroligin-1 und -2 binden kann. Der Neurexin-Neuroligin-Komplex würde dementsprechend das molekulare Korrelat der häufig beschriebenen wechselseitigen Fehlanpassung, die während der frühen Entwicklungsstadien häufig auftritt (Rao et al., 2000), verkörpern. Demnach müssen andere, komplementäre Mechanismen existieren, die darüber hinausgehend die Feinanpassung hinsichtlich des freigesetzten Transmitters ermöglichen. In inhibitorischen Synapsen wird dieser Prozeß vermutlich durch die Rezeptoraktivierung selbst ausgelöst. Persönlichen Mitteilungen von Dr. Günter Schwarz (TU Braunschweig) zufolge könnte eine aktivierungsbedingte Rezeptorkonformationsänderung eine der beiden GlyR-Bindungsstellen (L2-Schleife) in Gephyrin freigeben, die so-

dann zur Gephyrin-Dimerbildung genutzt werden könnte (Schwarz et al., 2004a). Demgemäß würden postsynaptische Gephyrin-Aggregate nur am Ort der Rezeptoraktivierung, also der zukünftigen postsynaptischen Domäne, entstehen (siehe auch 2.1.3.1). Hieraus wird deutlich, daß die Mechanismen der Synapsenbildung durchaus vielseitiger sind als bislang beschrieben.

Welchen Einfluß die Dendritengeometrie auf diesen Prozeß ausüben kann, wird im folgenden Kapitel besprochen. Darunter fallen diejenigen Mechanismen, welche die Neubildung inhibitorischer Synapsen von der postsynaptischen Seite ausgehend steuern.

2.2.1 Dendritenwachstum und Synaptogenese

Bereits im Jahre 1975 machte Purpura die Beobachtung, daß die Gehirne geistig behinderter Menschen Störungen in der Dendritengeometrie bzw. in der Form der dendritischen Dornen aufweisen (Purpura, 1975). Die Dendritengeometrie ist entscheidend an der Verarbeitung synaptischer Signale beteiligt, indem sie die Ausbreitung postsynaptischer Ströme den Gesetzmäßigkeiten röhrenförmiger Leiter folgend entlang der Dendritenmembran bis hin zum Axonhügel beeinflusst (Whitford et al., 2002). Die entscheidende Frage, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen Dendritengeometrie und Synaptogenese besteht, blieb jedoch unbeantwortet. Dabei ist der Entstehungsort von beispielsweise inhibitorischen Synapsen von großer Bedeutung für die Signalverarbeitung. Verglichen mit den inhibitorischen Synapsen, die am distalen Ende eines Dendritenbaumes lokalisiert sind, werden diejenigen Synapsen, die ihre Wirkung am Neuron-soma ausüben, einen viel größeren Einfluß auf die Verhinderung der Aktionspotential-generierung und damit der Erregungsweiterleitung haben.

Die Faktoren, die das Auswachsen von Dendriten und den Grad ihrer Verzweigung regulieren, sind vielseitig. Wir konnten kürzlich herausfinden, wie sich die Zelldichte auf die Anzahl der Primärdendriten sowie deren Verästelung und Längenwachstum auswirkt (Salama-Cohen et al., 2005). Die Bindung eines Notch-Liganden (Delta, Serrate, Lag-2 (DSL)) führt dabei zur Abspaltung der intrazellulären Notch-Domäne (NICD), welche wiederum die Hes1/5-Transkription im Zellkern stimuliert (Mumm & Kopan, 2000).

Diese Signalkaskade ist wesentlich an der Steuerung der Zelldifferenzierung beteiligt (Abb. 2.2-1).

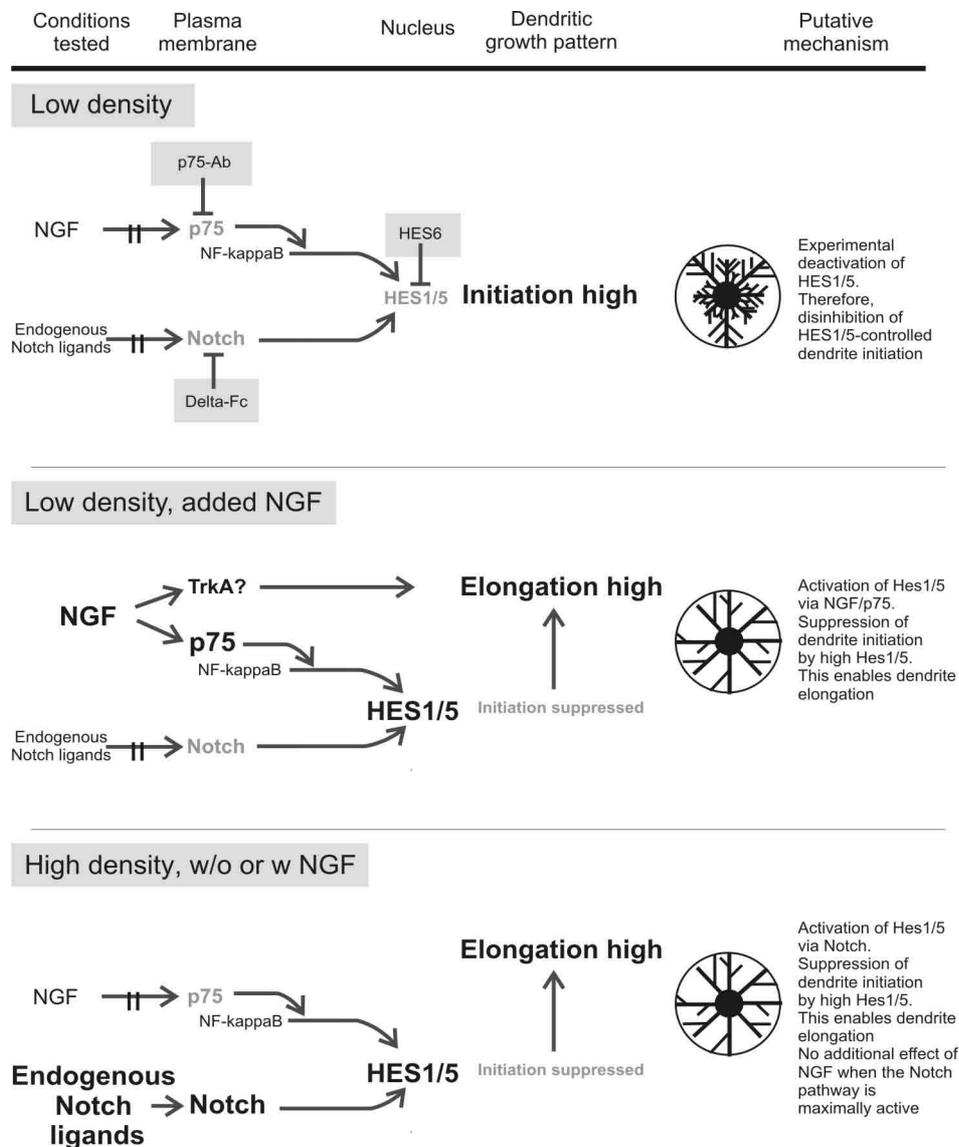


Abb. 2.2-1: Schematische Darstellung der Kontrolle des Dendritenwachstums über das Notch-p75-Rezeptor-System. Die Hes1/5-Transkription wird vom Notch- und p75-Rezeptor (über NF-kappaB) kontrolliert und wirkt sich negativ auf das Auswachsen neuer Dendriten aus. Negativ auf die Hes1/5-Aktivität wirkt sich der Gegenspieler Hes6 aus. Insofern stellen geringe Zelldichte und experimentelle Deaktivierung von Hes1/5 durch Hes6-Überexpression Versuchsbedingungen dar, die das Auswachsen neuer Dendriten sowie deren Verästelung fördern. Wird Hes1/5 jedoch aktiviert, entweder durch NGF über den p75-Rezeptor oder aber durch endogene Notch-Liganden bei hoher Zelldichte, wird das Längenwachstum der bereits vorhandenen Dendriten gefördert.

Hes1/5 wirkt sich dabei negativ auf das Auswachsen neuer Dendriten aus (Salama-Cohen et al., 2005). Die Hes1/5-Aktivität wiederum wird negativ durch den Gegenspie-

ler Hes6 kontrolliert. Insofern fördern eine geringe Zelldichte sowie die experimentelle Deaktivierung von Hes1/5 durch Hes6-Überexpression das Auswachsen neuer Dendriten sowie deren Verästelung. Eine Hes1/5-Aktivierung, entweder durch NGF über den p75-Rezeptor oder durch endogene Notch-Liganden bei hoher Zelldichte infolge des Zell-zu-Zell-Kontakts, fördert hingegen das Längenwachstum der bereits vorhandenen Dendriten (Abb. 2.2-1).

Eine andere Studie ergab eine BDNF-Überexpressions-vermittelte, p75-Rezeptor-abhängige, Aufregulierung der Anzahl der Primärdendriten und deren Verästelungen in transfizierten *bdnf*^{-/-} Neuronen des Hippocampus (Singh et al., 2005). Wie jedoch zuvor gezeigt wurde, führt die Gegenwart von BDNF auch zu einer Aufregulierung der Hes1/5-mRNA (Salama-Cohen et al., 2005). Dieser Widerspruch, der sich in der scheinbaren Konvergenz der intrazellulären Signalwege beider Neurotrophine auf Hes1/5 äußert, kann jedoch unter Berücksichtigung der Tatsache, daß BDNF nur zu einer geringfügigen Aufregulierung der Hes1/5-mRNA führt, teilweise entkräftet werden. Gleichzeitig verweisen diese Ergebnisse auf die mögliche Implikation anderer, parallel geschalteter intrazellulärer Signalwege. Interessanterweise löst die autokrine Wirkung von transfiziertem GFP-gekoppeltem BDNF in *bdnf*^{-/-} Neuronen eine *tyrosin kinase B receptor* (TrkB)-Rezeptor-vermittelte Aufregulierung der Anzahl glutaminerger Synapsen bei gleichzeitiger Abregulierung der Anzahl GABAerger Synapsen aus. Elektrophysiologisch konnten wir diese Beobachtung bestätigen, indem wir eine Verschiebung der Frequenz postsynaptischer Miniaturpotentiale in Richtung glutaminerg nachweisen konnten (Singh et al., 2005). Die Aufregulierung der Anzahl glutaminerger Synapsen korreliert dabei signifikant mit dem Grad der Verästelung der Dendriten, kann aber durch TrkB-Rezeptorblockade hiervon entkoppelt werden. Zumindest hinsichtlich glutaminerger Synapsen würde diese Beobachtung die Hypothese der Kopplung der Synapsenanzahl an die Dendritengeometrie stützen.

2.2.2 Wechselwirkungen mit anderen Neurotransmittersystemen – das Kalzium-Interface

Kalzium-bildgebende Verfahren lieferten schon bald die Erkenntnis, daß die Aktivierung von GlyR oder GABA_AR erregend auf die Signalverarbeitung im ZNS wirken kann

(Obrietan & van den Pol, 1995). Später bestätigte sich diese Annahme in der Tatsache, daß zu frühen Entwicklungsstadien Chloridkanäle aufgrund der Abwesenheit von KCC2 (Gillen et al., 1996; Payne et al., 1996; Rivera et al., 1999) und der dadurch bedingten Verschiebung im Chlorid-Umkehrpotential die postsynaptische Zelle depolarisieren. Hinsichtlich der Neubildung glyzinerger Synapsen wurde erkannt, daß die GlyR-Aktivierung zu einem L-Typ-Kanal-vermittelten Kalziumeinstrom in das zukünftige postsynaptische Neuron führt, und daß dieses lokal begrenzte Kalziumsignal für die Neubildung glyzinerger PSD verantwortlich ist (Kirsch & Betz, 1998). Seither war jedoch unklar, wie es nach der entwicklungsbedingten Aufregulierung von KCC2, d.h. wenn GlyR ihre Fähigkeit verloren haben, Kalziumsignale zu generieren, noch zu einer Synaptogenese kommen kann. Ebenso unbeantwortet blieb die Frage, wie das postsynaptische Neuron zwischen einem GlyR- und einem GABA_AR-vermittelten Kalziumeinstrom differenzieren kann. Zudem finden intrazelluläre Kalziumfluktuationen auch infolge der Aktivierung vieler anderer Rezeptorsysteme statt. Heutzutage ist bekannt, daß das Zelladhäsionsmolekül Neuroligin-2 eine wesentliche Rolle in der Synaptogenese spielt (Graf et al., 2004). Intrazelluläre Kalziumfluktuationen tragen daher eher zu einer Modulation bereits vorhandener Synapsenstrukturen bei, als an deren Initiierung mitzuwirken. Wird in Erwägung gezogen, daß KCC2 infolge eines Hirntraumas bzw. nach Läsion abreguliert wird (Rivera et al., 2004), sind experimentell angefertigte Hirnschnitte als artifizielles Präparat anzusehen, welches sich sehr gut zur Studie von Plastizitätsmechanismen nach Läsion eignet. Tatsächlich finden vielseitige Restrukturierungsprozesse in Hirnschnitten statt (Whittingham et al., 1984), beispielsweise verdoppelt sich die Anzahl der glutaminergen Dornen im Hippocampus (Kirov et al., 1999). Wir konnten zeigen, daß sich die Anzahl der inhibitorischen Synapsen im embryonalen Colliculus Superior innerhalb kurzer Zeit (2-3 Stunden) verdoppelt (Meier et al., 2003). Diese Aufregulierung findet PKC-abhängig statt und reagiert empfindlich auf Antagonisten des L-Typ-Kalziumkanals, des GlyR sowie des GABA_AR. Die Blockade dieser Kanäle führt jedoch zu einer Verstärkung der Läsions-induzierten Neubildung inhibitorischer Synapsen. Demnach stand unsere Beobachtung zunächst im Widerspruch zu den von Joachim Kirsch veröffentlichten Daten zur Kalziumabhängigkeit der inhibitorischen Synaptogenese (Kirsch & Betz, 1998).

Interessanterweise konnten wir feststellen, daß nicht nur solche Eingriffe, die kausal unmittelbar mit den Komponenten inhibitorischer Synapsen verknüpft sind, die Synaptogenese stimulieren, sondern daß sich auch die Blockade von mGluR der Gruppe I förderlich auf die Neubildung inhibitorischer Synapsen auswirkt (Walter et al., 2005). Dementsprechend mußte es einen gemeinsamen Nenner in der Signalkaskade geben, die zur Läsions-induzierten Aufregulierung der Anzahl inhibitorischer Synapsen führt. Kalzium-bildgebende Verfahren haben schließlich ergeben, daß der intrazelluläre Kalziumspiegel infolge der Läsion auf sehr hohe Werte ansteigt, um im Zuge des sogenannten *slice recovery* wieder auf physiologische Werte abzusinken. Durch den Zusatz von mGluR-Gruppe-I-Antagonisten während des *slice recovery* konnten wir den Abfall des intrazellulären Kalziums auf physiologische Werte beschleunigen (Walter et al., 2005). Die Gegenwart von mGluR-Gruppe-I-Antagonisten führte auch zu einer Erhöhung der PKC-Aktivität, welche wir im *myristoylated alanine-rich C-kinase substrate* (MARCKS) Phosphorylierungsversuch nachweisen konnten (Walter et al., 2005). Interessanterweise führen NMDAR-Antagonisten auch zur Erhöhung der PKC-Aktivität (Tremblay et al., 2000). Wie sich herausstellte, ist dieses paradoxe Phänomen auf einen Schutz der PKC vor ihrer Degradierung durch pathologisch erhöhtes intrazelluläres Kalzium zurückzuführen (Durkin et al., 1996; Durkin et al., 1997; Tremblay et al., 2000). Ziehen wir die Kalziumabhängigkeit sowohl der PKC-Aktivierung (Bell, 1986) als auch der PKC-Inaktivierung in Betracht, ergibt sich folgende Arbeitshypothese zur Kalziumabhängigkeit der inhibitorischen Synaptogenese (Abb. 2.2.2-1).

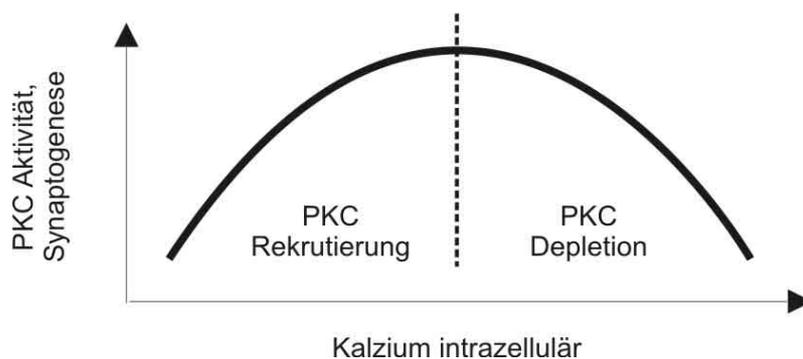


Abb. 2.2.2-1: Arbeitshypothese zur Kalziumabhängigkeit der inhibitorischen Synaptogenese. Die Neubildung inhibitorischer Synapsen geht mit einer PKC-Aktivierung einher. Der optimale Wirkungsbereich der PKC (gestrichelte Linie) ergibt sich zum einen aus der Kalziumabhängigkeit der PKC-Aktivierung und zum anderen aus der Kalziumabhängigkeit der PKC-Depletion durch Degradierung.

Dementsprechend würde ein optimaler PKC-Wirkungsgrad aus einer mittleren physiologischen intrazellulären Kalziumkonzentration resultieren. Geringere Kalziumspiegel würden die Aktivierung der PKC einschränken, ebenso wie unphysiologisch hohe Kalziumspiegel, wie sie beispielsweise nach Läsion vorliegen, zur PKC-Degradierung und -Depletion führen würden.

Es ist bekannt, daß die Phosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 (Map2) zu Änderungen in der Dendritengeometrie führen kann, wobei die PKC-vermittelte Map2-Phosphorylierung die Verästelung der Dendriten fördert (Hoshi et al., 1988; Diez-Guerra & Avila, 1993; Diez-Guerra & Avila, 1995; Guo et al., 2001; Schrenk et al., 2002). Wie bereits in Paragraph 2.2.1 erwähnt, gibt es Evidenzen für einen kausalen Zusammenhang zwischen Dendritengeometrie und Synaptogenese. Ein weiteres Argument für die Validität einer solchen Kopplung ergibt sich aus der Tatsache, daß die Synapsenbildung im Laufe der Entwicklung homogen verläuft. Hat das Axon das Zielgebiet erreicht, gibt es keine Präferenz hinsichtlich des Ortes der Synapsenbildung am Dendriten (de Lima et al., 1997). Erst im Laufe der erfahrungsbedingten Restrukturierung des Gehirns und der damit einhergehenden Synapseneliminierung findet ein Selektionsprozeß statt, welcher dem "endgültigen" räumlichen Synapsenmuster zugrunde liegt (Wong & Ghosh, 2002). In diesem Zusammenhang wurde sogar die Existenz eines übergeordneten Synapsen-induzierenden Mechanismus (2.2) vorgeschlagen, der gleichermaßen die glutaminergen wie auch die GABAergen Synapsenbildungen vereinen würde (Rao et al., 2000). Ist das räumliche Muster der Synapsenbildung das Ergebnis eines Zufallsprozesses, in Analogie zum *diffusion-trap*-Modell (siehe 2.1.2), dann würde mit zunehmendem Ausmaß der Dendritenverästelung auch die Wahrscheinlichkeit der Kontaktaufnahme mit der präsynaptischen Afferenz ansteigen. Insofern könnten Faktoren, die eine zunehmende Dendritenverästelung bedingen, den Zuwachs an inhibitorischen Synapsen nach Läsion erklären. Zudem könnte das räumliche Verteilungsmuster der Zelladhäsionsmoleküle Neuroligin-1 und -2 über den Dendritenbaum den Ort der Ausbildung von glutaminergen und GABAergen Synapsen beeinflussen, indem es die Wahrscheinlichkeit der Zelladhäsionsmolekül-vermittelten Kontaktaufnahme beeinflusst.