

Biologie

**Intrazellulärer Transport des synaptischen
Zelloberflächenmoleküls Neurexin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Christian Neupert
aus Lingen (Ems)

- 2015 -

Dekan: Prof. Dr. Michael Weber

Erster Gutachter: Prof. Dr. Markus Missler

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Püschel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2015

Tag der Promotion: 17.04.2015

**The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries,
is not “eureka!” but “that's funny...” - Isaac Asimov**

Für Jana.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 Chemische Synapsen	9
1.2 Der Neurexin/Neuroigin-Komplex	13
1.3 Autistische Erkrankungen	18
1.4 Intrazellulärer Transport	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	26
2. Material & Methoden.....	27
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Chemikalien	28
2.1.3 Oligonukleotide.....	29
2.1.4 Vektoren.....	30
2.1.5 Antikörper	31
2.1.6 Mauslinien.....	32
2.1.7 Zelllinien	32
2.1.8 Bakterienstämme.....	32
2.1.9 Nährmedien und Zusätze	33
2.1.10 Enzyme	35
2.1.11 Kits.....	36
2.1.12 Software	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	37
2.2.1.1 Klonierungsstrategien	37
2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (Expand™ High Fidelity System).....	37
2.2.1.3 <i>In vitro</i> Mutagenese (QuikChange® Site-Directed Mutagenesis).....	38
2.2.1.4 Restriktionsenzym-Verdau von DNA.....	39
2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	40
2.2.1.6 Gelextraktion (QIAEX II Agarose Gel Extraction).....	40
2.2.1.7 Phenol-Chloroform-Extraktion	41
2.2.1.8 Express Plasmid Minipräparation	41
2.2.1.9 Plasmid Minipräparation (NucleoSpin Plasmid)	42
2.2.1.10 Dephosphorylierung.....	42
2.2.1.11 Ligation	43
2.2.1.12 Elektrotransformation	43

2.2.1.13 Plasmid Maxipräparation (NucleoBond PC500)	43
2.2.1.14 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	44
2.2.1.15 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	45
2.2.2 Zellbiologische Methoden	46
2.2.2.1 Präparation und Kultivierung primärer Astrozyten	46
2.2.2.2 Präparation und Kultivierung primärer hippocampaler Neurone	47
2.2.2.3 Transfektion primärer hippocampaler Neurone.....	49
2.2.2.4 Kultivierung der Zelllinien HEK-TsA201, N2A und Cos-7.....	50
2.2.2.5 Transfektion von HEK-TsA201, N2A- und Cos-7-Zellen	51
2.2.3 Zytochemische Methoden.....	52
2.2.3.1 Fixierung und immunozytochemische Färbung.....	52
2.2.3.2 Oberflächenmarkierung	52
2.2.3.3 Fluoreszenzmikroskopie	52
2.2.3.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	53
2.2.3.5 Statistische Auswertung.....	54
3. Ergebnisse	55
3.1 Charakterisierung Nrnx-positiver Transportvesikel	55
3.2 Dynamik von Nrnx-positiven Transportvesikeln.....	64
3.3 Nrnx-Transport ist abhängig von Mikrotubuli und synaptischer Aktivität	69
3.4 KIF1A ist notwendig für den Transport von Nrnx	73
3.5 Vesikelfusion	81
4. Diskussion.....	85
4.1 Neurexin ist Bestandteil von <i>synaptic vesicle protein transport vesicles</i>	85
4.2 Cytoskelettabhängigkeit des Neurexin-Transports	87
4.3 Mechanismus des intrazellulären Transports von Neurexin.....	88
4.4 Ausblick	94
5. Zusammenfassung.....	97
6. Abstract.....	98
7. Literaturverzeichnis	99
8. Abbildungsverzeichnis.....	118
9. Tabellenverzeichnis	119
10. Abkürzungsverzeichnis.....	120

1. Einleitung

Neurone sind polarisierte Zellen, welche durch interzelluläre asymmetrische Kontakte (Synapsen) Signale empfangen und weiterleiten können. Diese Struktur muss sich in prä- und postsynaptischen Transportmechanismen widerspiegeln. Notwendige Proteine müssen zur richtigen Zeit ihre korrekte Lokalisierung erreichen (Kennedy & Ehlers, 2006). Heterologe transsynaptische Komplexe sind beteiligt an der Bildung und Differenzierung von Synapsen (Piechotta *et al.*, 2006; Scheiffele, 2003) und eignen sich somit als ideale Modelle zur Untersuchung intrazellulärer polarisierter Transportprozesse. Neurexin (Nrxn) und Neuroligin (Nlgn) bilden einen heterologen transsynaptischen Komplex, welcher an der Signalweiterleitung beteiligt ist (Missler *et al.*, 2003), und sind als *autism spectrum disorders*-assoziierte Gene etabliert (Autism Genome Project *et al.*, 2007; Jamain *et al.*, 2003). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der intrazelluläre Nrxn-Transport untersucht. Um die Erkenntnisse einordnen zu können, werden in den nachfolgenden Kapiteln zunächst Zusammenhänge zwischen chemischen Synapsen (vgl. Kap. 1.1), dem präsynaptischen Membranprotein Nrxn (vgl. Kap. 1.2), autistischen Erkrankungen (vgl. Kap. 1.3) sowie Mechanismen des intrazellulären Transports (vgl. Kap. 1.4) aufgezeigt.

1.1 Chemische Synapsen

Neurone sind postmitotische, hochspezialisierte Zellen des Nervensystems. Sie weisen eine polare Struktur auf, bestehend aus einem Zellkörper (Soma), einem Axon und mehreren, verzweigten Dendriten. Informationsübertragung und -verarbeitung erfolgt durch chemische Synapsen. Ein elektrisches Ausgangssignal (Aktionspotential) wird von der präsynaptischen Seite als chemisches Signal über den synaptischen Spalt (Gray, 1963) zur postsynaptischen Seite übertragen. Ein Aktionspotential führt zur Depolarisation der präsynaptischen Membran und zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle (Evans & Zamponi, 2006). Der Einstrom von Calcium bewirkt die Fusion neurotransmitterbeladener Vesikel mit der aktiven Zone (*cytomatrix active zone*, CAZ).

Nach Exocytose der Neurotransmitter werden die verbleibenden Vesikelbestandteile endozytiert und für neue Vesikel recycelt oder abgebaut. Die Neurotransmitter diffundieren über den ca. 20nm breiten synaptischen Spalt und binden an Rezeptoren der postsynaptischen Dichte (PSD, (Collins *et al.*, 2006)). Ihre Wirkung richtet sich nach Art der Neurotransmitter und der Rezeptoren. Glutamat kann an exzitatorischen Synapsen an ionotrope Kainat-, AMPA- (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure) oder NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren (Hollmann & Heinemann, 1994) und metabotrope

Glutamatrezeptoren (mGluR1-8, (Sugiyama *et al.*, 1989)) binden. Die Bindungen führen zu einem Natrium-/Calciumeinstrom und einem Kaliumausstrom infolgedessen die postsynaptische Membran depolarisiert wird. Metabotrope Rezeptoren haben keinen direkten Einfluss auf Ionenverhältnisse, sondern wirken über intrazelluläre Signalkaskaden (*second messenger*, (Nalepa & Vetulani, 1990)). An inhibitorischen Synapsen kann GABA (γ -Aminobuttersäure) an ionotrope GABA_A- und metabotrope GABA_B-Rezeptoren binden und einen Chlorideinstrom auslösen, es kommt zur Hyperpolarisation. Alle eingehenden exzitatorischen und inhibitorischen Signale werden im Axonhügel zeitlich und räumlich integriert, wodurch das Neuron entweder ein Aktionspotential über sein Axon schickt oder die Signalweiterleitung beendet wird (Garrido *et al.*, 2003).

Die Fusion neurotransmitterbeladener Vesikel an der CAZ stellt einen hoch regulierten Prozess unter Beteiligung verschiedener Proteine der aktiven Zone, SNARE- (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) und SM- (Sec1/Munc18-*like*) Proteinen dar. Die Proteine der aktiven Zone interagieren über verschiedene Domänen miteinander, von denen bisher Zinkfinger, *coiled-coil*, PDZ, C1 und C2 bekannt sind. Zu diesen Proteinen gehören Bassoon, Piccolo, CAST (*cytomatrix at the active zone-associated structural protein*)/ELKS, Liprina und Munc. Des Weiteren RIMs (*Rab-interacting molecule*) und RIM-BPs (*RIM-binding proteins*), welche sowohl untereinander als auch Calciumkanäle binden können (Davydova *et al.*, 2014; Fenster *et al.*, 2000; Gundelfinger & Fejtova, 2012; Hida & Ohtsuka, 2010; Maximov *et al.*, 1999; Ohtsuka *et al.*, 2002; tom Dieck *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1997; Zhen & Jin, 1999). Intrazellulär liegt zunächst eine geringe Calciumkonzentration vor, deshalb müssen die Calciumkanäle dicht an den Exocytoseapparat gekoppelt sein (*positional priming*, (Neher & Sakaba, 2008)). Der spannungsabhängige Calciumeinstrom, welcher durch ein Aktionspotential ausgelöst wird, bewirkt eine Reihe zeitlich abgestimmter Proteinkomplexbildungen innerhalb der hoch dynamischen CAZ, die durch Complexin und den Calciumsensor Synaptotagmin initiiert werden. Die Komplexbildungen basieren überwiegend auf Helix-Helix-Interaktionen. So bindet Munc18 an die geschlossene Konformation von Syntaxin1 und löst eine Konformationsänderung aus. Die offene Konformation von Syntaxin1 kann mit Synaptobrevin und SNAP25 (*soluble NSF attachment protein*) interagieren und ermöglicht die Bildung eines SNARE-Komplexes. Dieser Komplex bringt die Membranen des Vesikels und der CAZ in die erforderliche räumliche Nähe zueinander (Kaeser *et al.*, 2011; Südhof, 2004; Südhof, 2013).

Die Lokalisierung dieser Proteine ist zentraler Bestandteil der Bildung chemischer Synapsen (Synaptogenese). Diese durchläuft mehrere Phasen beginnend mit dem primären Kontakt

zwischen präsynaptischem Axon und postsynaptischem Dendrit, gefolgt vom Transport prä- und postsynaptischer Proteine, der funktionellen Spezialisierung der synaptischen Kontakte und schließlich der aktivitätsabhängigen strukturellen und funktionellen Plastizität (Missler *et al.*, 2012).

Ein Teil der Kontakte zwischen Neuronen wird durch Zelladhäsionsmoleküle (*synaptic cell adhesion molecules*, (Akins & Biederer, 2006)) stabilisiert und ermöglicht die Bildung chemischer Synapsen. Die Stabilisierung des Kontaktes zwischen Axon und Dendrit wird von transsynaptischen Komplexen initiiert, an denen meistens Zelladhäsionsmoleküle beteiligt sind. Die transsynaptischen Vorgänge sind jedoch nicht auf Zelladhäsionsmoleküle beschränkt, da Pentraxine derartige Komplexe z.B. auch mit AMPA-Rezeptoren bilden können (Koch & Ullian, 2010; O'Brien *et al.*, 2002). Definitionsgemäß sind Zelladhäsionsmoleküle synaptisch lokalisiert, an interzellulären Interaktionen beteiligt und beeinflussen nachweislich die Bildung oder Funktion von Synapsen (Missler *et al.*, 2012). Hierzu gehören Cadherine, Ephrine, Immunoglobuline, Integrine, NCAMs (*neuronal cell adhesion molecules*), Nectine, Neurexine, Neuroligine, Pentraxine, SALMs (*synaptic adhesion-like molecules*) und SynCAMs (*synaptic cell adhesion molecules*) (McAllister, 2007). In ausgereiften Neuronen finden sich viele dieser Moleküle am präsynaptischen Terminal und der PSD, in sich entwickelnden Neuronen können diese Moleküle zur Akkumulierung von synaptischen Vesikeln und NMDA-/AMPA-Rezeptoren beitragen (Montgomery *et al.*, 2001; Washbourne *et al.*, 2002; Washbourne *et al.*, 2004). In heterologen Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass ohne die Ausschüttung von Neurotransmittern und nur durch Sekretion von Zelladhäsionsmolekülen eine Akkumulation synaptischer Proteine auf beiden Seiten des synaptischen Spalts stattfinden kann (Boucard *et al.*, 2005; Fogel *et al.*, 2007; Graf *et al.*, 2004; Kayser *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 1999; Nikonenko *et al.*, 2003; Tseng *et al.*, 2003).

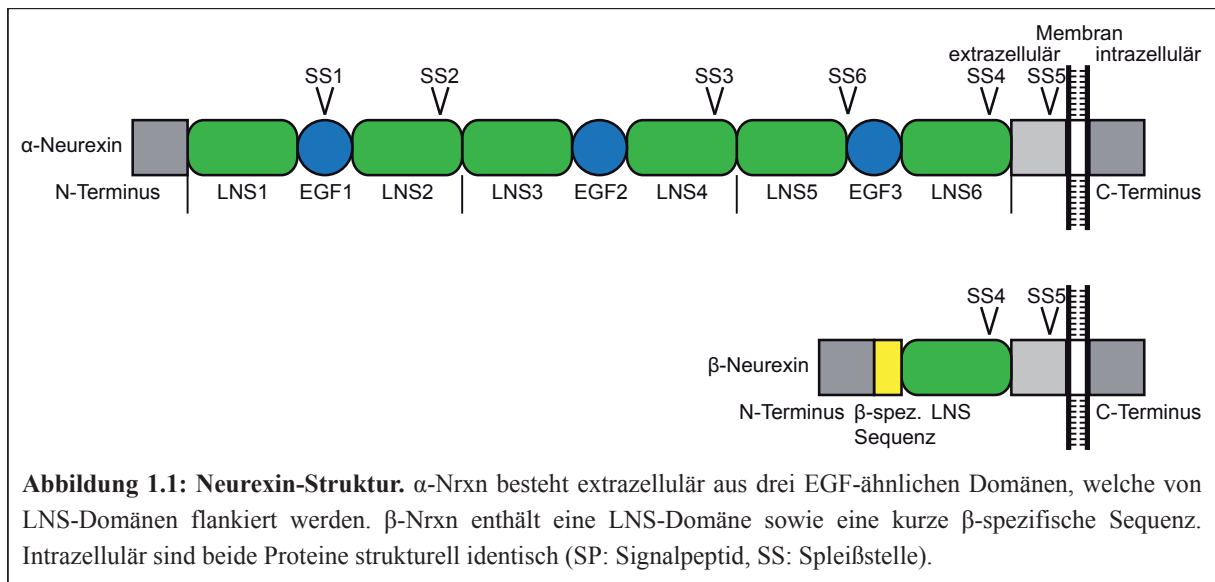
Alle synaptogenetischen Lokalisationsprozesse basieren auf intrazellulärem Transport vom Zellkörper zur finalen Position. Proteine können sowohl durch cytosolische und membranständige Diffusion, über den langsamen axonalen Transport als auch über den klassischen sekretorischen Transportweg mittels Vesikeln zur Präsynapse gelangen. Für viele MAGUKs (*membrane associated guanylate kinase*) konnte gezeigt werden, dass sie nicht vom vesikulären Transport abhängig sind (Manneville *et al.*, 2010; Roy, 2014; Winckler & Mellman, 2010). Es wurden bisher zwei Vesikelklassen intensiv beschrieben, welche sich morphologisch, biochemisch und anhand ihrer Transporteigenschaften unterscheiden lassen (Sabo *et al.*, 2006). PTVs (*piccolo-bassoon transport vesicles*) sind elektronendichte Vesikel

mit einem Durchmesser von etwa 80nm. Sie transportieren in erster Linie Proteine der CAZ wie Bassoon, Piccolo, N-Cadherin, Syntaxin, Munc13, Munc18 und SNAP25 (Zhai *et al.*, 2001). STVs (*synaptic vesicle protein transport vesicles*) hingegen existieren als pleiomorphe und tubulovesikuläre Strukturen und transportieren Vesikel-assoziierte Proteine wie Synaptophysin, Synaptotagmin und Synaptobrevin (Ahmari *et al.*, 2000). Die ersten Vesikel die während der Synaptogenese die postsynaptische Membran erreichen, enthalten NMDA-, und in einer Unterklasse zusätzlich AMPA-, Rezeptoren (Washbourne *et al.*, 2002).

1.2 Der Neurexin/Neuroigin-Komplex

Primär präsynaptisch lokalisiertes Nrnx und postsynaptisch lokalisiertes Nlgn, welche einen heterologen, transsynaptischen Komplex bilden können, gehören wie in Kap 1.1 beschrieben zu den an Synaptogenese und Neurotransmission beteiligten Zelladhäsionsproteinen.

Nrnx wurde ursprünglich aus Rattenhirnlysat isoliert und als Rezeptor für das Spinnengift α -Latrotoxin identifiziert (Ushkaryov *et al.*, 1992). Nachfolgend wurde jedoch gezeigt, dass es spezifische Latrotoxinrezeptoren gibt (Ushkaryov *et al.*, 2008) und Nrnx andere, davon unabhängige Funktionen ausführt. Vertebraten besitzen drei Nrnx-Gene (*Nrxn1-3*), die beim Menschen mit 1.1Mbp (*Nrxn1*) und 1.6Mbp (*Nrxn3*) zu den längsten Genen gehören. Sie weisen jeweils zwei Promotoren auf, die das extrazellulär längere α -Nrnx und das kürzere β -Nrnx regulieren (Missler *et al.*, 1998). α -Nrnx besteht aus sechs extrazellulären LNS- (*Laminin-Nrxn-Sex hormone binding globulin*) Domänen, welche drei EGF-ähnliche (*epidermal growth factor*) Domänen flankieren. β -Nrnx ist identisch zum C-Terminus von α -Nrnx beginnend ab der LNS6 und besitzt N-terminal eine kurze β -spezifische Sequenz ((Ushkaryov *et al.*, 1994), vgl. Abb. 1.1).



α -Nrnx enthält fünf Spleißstellen, von denen sich drei (SS#2-SS#4) in LNS-Domänen befinden. Für Nrnx1 α und Nrnx3 α konnte kürzlich die Existenz einer weiteren Spleißstelle (SS#6) zwischen LNS5 und EGF3 nachgewiesen werden. Daher lässt sich schlußfolgern, dass zwischen Nrnx1 α und Nrnx3 α eine höhere phylogenetische Verwandtschaft besteht als zu Nrnx2 α (Treutlein *et al.*, 2014). β -Nrnx enthält nur die Spleißstellen SS#4 und SS#5. Die Anzahl alternativ eingebauter Aminosäuren variiert je nach Spleißstelle, es können zwischen 4 und 194 Aminosäuren eingebaut werden. Bei der am besten untersuchten Spleißstelle SS#4

können in allen Neurexinen bei Maus und Mensch 30 Aminosäuren eingebaut werden. Die Anzahl aller Isoformen und Spleißvarianten übersteigt die zuletzt angenommenen 3.908 möglichen Nrnx-Transkripte (Missler *et al.*, 1998; Reissner *et al.*, 2013).

Neurexine besitzen ein Signalpeptid, welches der Translation ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums dient (Missler *et al.*, 1998; Ushkaryov *et al.*, 1994). Die C-terminale Domäne enthält ein Klasse II-PDZ-Bindungsmotiv (EYYV, benannt nach PSD95/SAP90, Dlg1 aus *Drosophila melanogaster* und Zonula occludens-1, (Hung & Sheng, 2002)). Über diese Domäne kann Nrnx mit verschiedenen präsynaptisch lokalisierten Proteinen wie den MAGUKs CASK (*Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase*, (Hata *et al.*, 1996) und Mint1 (Biederer & Südhof, 2000) sowie *Drosophila* Syd1 (Owald *et al.*, 2012) interagieren.

Der am besten untersuchte Bindungspartner für Nrnx ist das postsynaptisch lokalisierte Transmembranprotein Nlgn (vgl. Abb. 1.2). Die Bindung erfolgt extrazellulär an der LNS6 im α -Nrnx und der LNS-Domäne im β -Nrnx. Diese Komplexbildung ist calciumabhängig und hydrophobe Reste, die um die Calcium-Bindungsstelle liegen, sind hierfür notwendig (Arac *et al.*, 2007; Fabrichny *et al.*, 2007; Reissner *et al.*, 2008).

In Säugetieren sind generell vier Nlgn-Gene (*Nlgn1-4*) vorhanden (Bolliger *et al.*, 2001), nur beim Menschen kommt ein zusätzliches Gen (*Nlgn5*) vor. Nlgn enthält eine extrazelluläre Domäne, welche zur Acetylcholinesterase strukturell ähnlich, jedoch im Nlgn für die Dimerisierung verantwortlich und katalytisch inaktiv ist. Die kurze intrazelluläre Domäne enthält ein PDZ-Bindungsmotiv, wodurch Nlgn mit PSD95/SAP90 postsynaptisch verankert wird (Irie *et al.*, 1997). Nur Nlgn1 enthält beide Spleißstellen SSA und SSB, Nlgn2/3 nur SSA, für Nlgn4 existieren keine alternativ gespleißten Formen (Bolliger *et al.*, 2001; Ichtchenko *et al.*, 1995; Ichtchenko *et al.*, 1996). Nlgn1/3 sind an exzitatorischen Synapsen lokalisiert (Budreck & Scheiffele, 2007; Rosales *et al.*, 2005), Nlgn2/4 kommen an inhibitorischen Kontakten vor (Hoon *et al.*, 2011; Varoqueaux *et al.*, 2004). Eine genauere Lokalisation von Nrnx-Varianten wurde aufgrund fehlender, Isoform-spezifischer Antikörper bisher nicht durchgeführt (Südhof, 2008). Durch ursprüngliche Beobachtungen, dass nur bestimmte Spleißvarianten von Nrnx (\pm SS#4) und Nlgn (\pm SSA, \pm SSB) einen transsynaptischen Komplex bilden können, wurde ein *splice*-Code vorgeschlagen (Boucard *et al.*, 2005). Dieser beschreibt eine bidirektionale Kommunikation zwischen Prä- und Postsynapse basierend auf Kombinationen von *splice*-Insertionen in Nrnx und Nlgn. Demnach können β -Nrnx oder Nlgn ohne *splice*-Insertion den transsynaptischen Komplex unabhängig von der *splice*-Variante des Bindungspartners bilden. Die Bindungsfähigkeit

verringert sich durch den Einbau einer bzw. beider Insertionen (Chih *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2008; Reissner *et al.*, 2008).

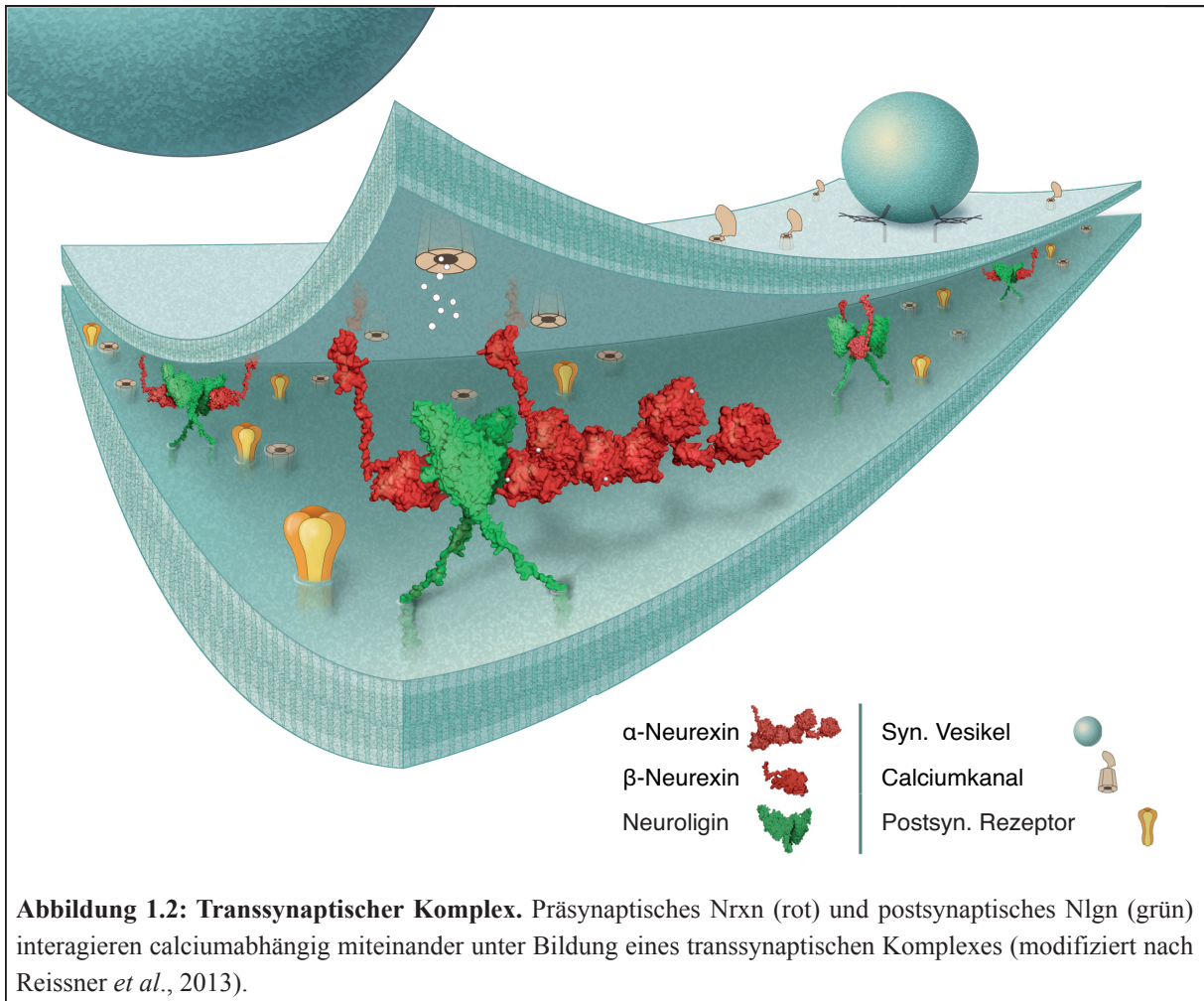


Abbildung 1.2: Transsynaptischer Komplex. Präsynaptisches Nrnx (rot) und postsynaptisches Nlgn (grün) interagieren calciumabhängig miteinander unter Bildung eines transsynaptischen Komplexes (modifiziert nach Reissner *et al.*, 2013).

Nach Aufklärung der Kristallstruktur der beteiligten Proteine und weiterer biochemischer Experimente musste der *splice*-Code neu formuliert werden, da jede Nrnx-Variante jedes Nlgn binden kann, abgesehen von der Ausnahme, dass Nrnx+SS#4 nicht mit Nlgn1+SSB interagieren kann (Koehnke *et al.*, 2010; Leone *et al.*, 2010).

Weitere Interaktionspartner von Nrnx sind Neurexophilin, welches *splice*-unabhängig an die LNS2-Domäne von α-Nrnx binden kann (Missler *et al.*, 1998), Dystroglycan (Sugita *et al.*, 2001) und LRRTM2 (*leucine-rich repeat transmembrane protein*, (Siddiqui *et al.*, 2010)), die nur ohne *splice*-Insertionen binden, sowie Cerebellin, welches direkt mit dem *insert* in der SS4 interagiert (Uemura *et al.*, 2010).

Funktionelle Untersuchung durch *knock out* (KO) Experimente von α-Nrnx in Mäusen (Missler *et al.*, 2003) zeigten eine erhöhte postnatale Lethalität, beim KO von zwei α-Nrnx-Genen innerhalb der ersten Woche, beim KO aller drei α-Nrnx-Gene bereits am Tag der Geburt. Der Grund liegt in einer unzureichenden Funktion des Atemzentrums im Hirnstamm.

Die Anatomie des Gehirns und die Ultrastruktur der Synapsen unterschieden sich nicht wesentlich vom Wildtyp, jedoch zeigte der Doppel-KO eine geringere Dichte inhibitorischer Synapsen im Neocortex (Dudanova *et al.*, 2007), welche für den Dreifach-KO zusätzlich im Hirnstamm gezeigt werden konnte. Entgegen diesem milden strukturellen Phänotyp konnte ein deutlicher funktioneller Phänotyp gefunden werden. Elektrophysiologische Messungen ergaben, dass α -Nrnx für die calciumabhängige Exocytose an Synapsen notwendig ist. Die Deletion von zwei oder drei α -Nrnx-Isoformen führte zu einem verminderten Calciumeinstrom durch spannungsgesteuerte Kanäle und einer massiven Beeinflussung der spontanen und induzierten Neurotransmitterausschüttung an exzitatorischen sowie inhibitorischen Synapsen im Hirnstamm und Neocortex. Bereits die Deletion einer einzigen Isoform (Nrnx1 α) verursachte eine Reduktion der Ausschüttung von Neurotransmittern an exzitatorischen Synapsen hippocampaler Neurone (Etherton *et al.*, 2009; Kattenstroth *et al.*, 2004; Missler *et al.*, 2003). Eine direkte Bindung zwischen Nrnx und der porenbildenden Untereinheit von Calciumkanälen ist unwahrscheinlich, da Nrnx nicht generell für Calciumströme notwendig ist. Möglich wäre eine Beeinflussung über die bereits beschriebenen Interaktionen zwischen Nrnx und CASK sowie Mint1, welche ihrerseits mit Calciumkanälen interagieren. Dem widerspricht allerdings der vergleichsweise milde Phänotyp synaptischer Transmission der CASK und Mint1 KO-Mäuse (Atasoy *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2008). Es wurde zudem gezeigt, dass der Phänotyp nicht durch β -Nrnx gerettet werden kann (Zhang *et al.*, 2005), demnach könnte die in beiden Nrnx-Varianten unterschiedliche extrazelluläre Domäne für diesen Effekt verantwortlich sein (Tanaka *et al.*, 2012).

Den Erkenntnissen aus den KO-Experimenten gegenüber steht die Akkumulation prä- und postsynaptischer Proteine durch die Sekretion von Nrnx oder Nlgn (Graf *et al.*, 2004; Scheiffele *et al.*, 2000). Die Oberflächenpräsenz von Nrnx akkumuliert postsynaptisch Gephyrin und PSD95 an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen (Dean *et al.*, 2003; Giannone *et al.*, 2013). Nlgn bewirkt selbiges mit präsynaptischen Proteinen, wobei Nlgn1/3 für die Bildung exzitatorischer und Nlgn2/4 für die Bildung inhibitorischer Kontakte zuständig sind (Chih *et al.*, 2005; Chubykin *et al.*, 2007).

Nrnx-Gene sind über die bisher genannten Spezies hinaus in weiteren Vertebraten (*Danio rerio*, (Rissone *et al.*, 2007)) und Invertebraten (*Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, (Tabuchi & Südhof, 2002)) vorhanden, wobei β -Nrnx bisher nur in *C. elegans* nachgewiesen wurde (Haklai-Topper *et al.*, 2011). Die Sequenzen von Nrnx in den verschiedenen Spezies sind homolog, wodurch ein Vergleich der Funktion möglich wird.

Während *D. melanogaster* nur ein α -Nrxn besitzt, dessen *loss-of-function* Mutanten Veränderungen in der synaptischen Ultrastruktur aufweisen (Li *et al.*, 2007), sind derartige Veränderungen im Maus *knock out* nicht vorhanden (Missler *et al.*, 2003). Beeinträchtigung der Ausschüttung von Neurotransmittern sind in beiden Modellsystemen zu beobachten.

1.3 Autistische Erkrankungen

Durch humangenetische Studien konnte in den letzten Jahrzehnten gezeigt werden, dass autistischen Erkrankungen (*autism spectrum disorders*, ASD) auch genetische Ursachen zu Grunde liegen (Folstein & Rosen-Sheidley, 2001; Veenstra-VanderWeele & Cook, 2004). Neurexine zählen zu jenen etablierten Genen, die mit ASD in Zusammenhang stehen (Autism Genome Project *et al.*, 2007).

Autismus ist eine Entwicklungsstörung, welche sich durch begrenzte oder nicht vorhandene verbale Kommunikation, gestörte soziale Interaktion und stereotype, repetitive Verhaltensmuster auszeichnet (Bailey *et al.*, 1996; Risch *et al.*, 1999). *Autism spectrum disorders* definiert darüber hinaus weitere Phänotypen, die zum Asperger-Syndrom (Gillberg, 1998), Rett-Syndrom (Hagberg *et al.*, 1985) und *pervasive developmental disorder-otherwise nonspecified* zählen (Association, 2013; Chen *et al.*, 2014; Pardo & Eberhart, 2007).

Die Interaktionen spezifisch exzitatorisch oder inhibitorisch exprimierter Nlgn-Isoformen mit Neurexinen legten die Hypothese nahe, dass diese Proteine über die Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen an Pathomechanismen von ASD beteiligt sind (Bourgeron, 2009; Doherty *et al.*, 2012; Ey *et al.*, 2011; Levinson *et al.*, 2012; Reichelt *et al.*, 2011; Südhof, 2008; Yizhar *et al.*, 2011). ASD-assoziierte Mutationen sind Veränderungen der Anzahl der Kopien von DNA-Fragmenten (*copy number variation*) und vererbare Mutationen einzelner Basenpaare (*single nucleotide polymorphism*) in *Nrxn1*, *Nrxn3* (Ching *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Kirov *et al.*, 2009; Vaags *et al.*, 2012), *Nlgn3*, *Nlgn4* (Jamain *et al.*, 2003; Laumonier *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2005) sowie *Shank2* und *Shank3*, welche mit der zytoplasmatischen Domäne von Nlgn interagieren können (Arons *et al.*, 2012; Berkel *et al.*, 2010; Durand *et al.*, 2007; Gauthier *et al.*, 2009; Moessner *et al.*, 2007). Die mit den genannten Krankheitsbildern assoziierten Mutationen bewirken den Verlust der Proteinsynthese oder verhindern den Transport (Retention im endoplasmatischen Retikulum (Chih *et al.*, 2004; Comoletti *et al.*, 2004; De Jaco *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009)). Aus diesem Grund ist die Erforschung der Dynamik dieser Proteine notwendig.

1.4 Intrazellulärer Transport

Die Fähigkeit zur Übertragung und Verarbeitung von Informationen basiert auf der polarisierten Struktur der Neurone (Craig & Banker, 1994). Die grundlegendste strukturelle Einordnung erfolgt in drei funktionell und morphologisch unterscheidbare subzelluläre Domänen: den Zellkörper (Soma), ein Axon, welches einen konstanten Durchmesser aufweist und durch den Axonhügel (*axon initial segment*, AIS) vom Zellkörper getrennt ist (Ogawa & Rasband, 2008), sowie meist mehrere, verzweigte Dendriten ((Winckler & Mellman, 1999), vgl. Abb 1.3). Der intrazelluläre Transport muss diese

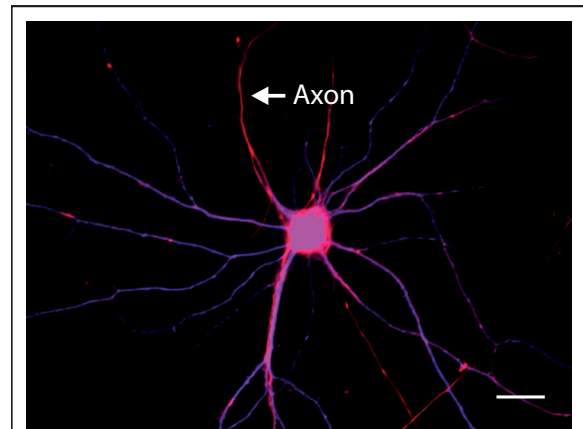


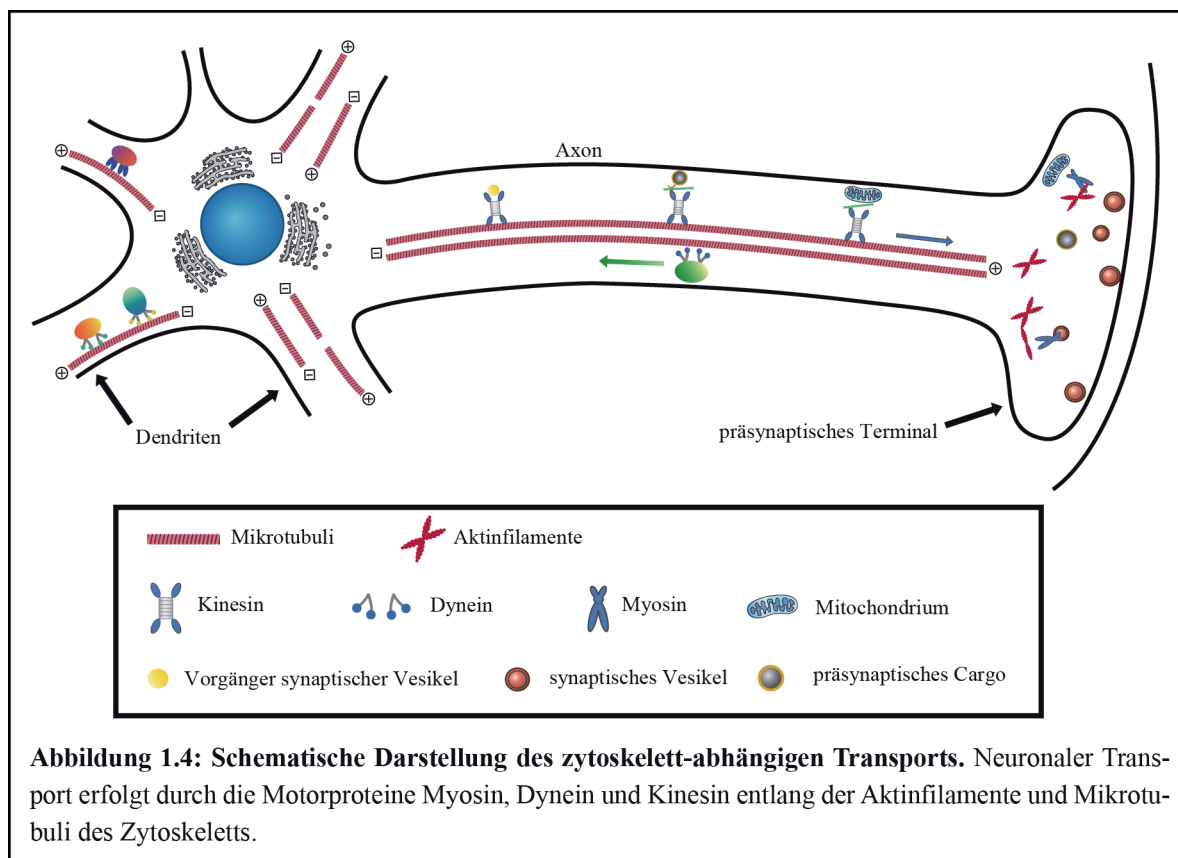
Abbildung 1.3: Polarität von Neuronen. Neurone weisen eine polare Struktur mit somatodendritischem und axonalem Kompartiment auf, erkennbar durch immunozytochemische Färbung mit anti-MAP2 (blau), welches spezifisch in Dendriten vorkommt und anti-Neurofilament (rot), welches sowohl in Dendriten als auch im Axon lokalisiert ist (Maßstab: 20µm).

Asymmetrie in Bezug auf prä- und postsynaptische Proteine widerspiegeln.

Unser Verständnis über den intrazellulären Transport begann mit der Entdeckung, dass Mikrotubuli notwendig sind für die anterograde Mobilität von Acetylcholinesterase im Axon (Kreutzberg, 1969). Die erste Studie über den Transport synaptischer Proteine in Neuronen erfolgte wesentlich später und ging einher mit der Entwicklung eGFP-gekoppelter Proteine (Nakata *et al.*, 1998). Die weit verbreitetsten Mechanismen intrazellulären Transports basieren auf molekularen Motorproteinen, welche die jeweilige Ladung (Cargo) entlang des Zytoskeletts der Neurone transportieren. Das Zytoskelett wird aus drei verschiedenen Bestandteilen aufgebaut: Aktinfilamente, Mikrotubuli und Neurofilamente, wobei nur die ersten beiden transportrelevant sind. Es existieren drei Klassen von Motorproteinen, die für den Transport in Neuronen verantwortlich sind: Myosine, welche sich primär entlang von Aktinfilamenten bewegen. Dyneine, welche sich als Minus-Ende gerichtete Motoren in Axonen primär retrograd entlang der Mikrotubuli bewegen. Und schließlich eine hohe Anzahl Kinesine, welche als Plus-Ende gerichtete Motoren primär für den anterograden, axonalen Transport verantwortlich sind (Buss *et al.*, 2002; Conde & Caceres, 2009; Kapitein & Hoogenraad, 2010).

Der Cargo wird meist über große Strecken entlang der Mikrotubuli transportiert, bevor er für kurze Strecken in lokalen aktinreichen Strukturen wie dem präsynaptischen Terminal, dendritischen *spines* und nahe der Plasmamembran auf Aktinfilamente übertragen wird ((Cai

& Sheng, 2009; Hirokawa & Noda, 2008; Langford, 2002; Schlager & Hoogenraad, 2009), vgl. Abb. 1.4). Sowohl dem Aktin- als auch dem Mikrotubuli-basiertem Transport liegt die Energiegewinnung durch Hydrolyse von Adenosintri-phosphat (ATP) zugrunde (Schliwa & Woehlke, 2003; Vale, 2003). Die durch ein ATP-Molekül erreichte Schrittlänge der Motoren (Gennerich & Vale, 2009) in Kombination mit der Gesamtstrecke und Verteilung von Mitochondrien innerhalb der Zelle erfordert zu mitochondrialer ATP-Bereitstellung zusätzliche Möglichkeiten. Ein weiterer Mechanismus wurde in Form von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-abhängiger Glykolyse gefunden, wobei das Enzym durch Huntingtin am Vesikel verankert wird (Zala *et al.*, 2013). Einige Organellen und zu transportierende Proteine weisen eine bidirektionale Bewegung auf und sind in der Lage, sowohl Aktinfilamente als auch Mikrotubuli für den Transport zu verwenden (Karcher *et al.*, 2002). Der Transport kann unspezifisch zu Axon und Dendriten stattfinden, worauf eine Verankerung der Proteine nur im korrekten Kompartiment oder eine selektive Entfernung aus dem falschen Bereich erfolgt (Bel *et al.*, 2009; Leterrier *et al.*, 2006; Wisco *et al.*, 2003) oder spezifisch für präsynaptische Proteine zum Axon (Kaether *et al.*, 2000; Pennuto *et al.*, 2003) und für postsynaptische Proteine zu den Dendriten (Craig *et al.*, 1993; Ruberti & Dotti, 2000; Stowell & Craig, 1999) verlaufen.



Aktinfilamente setzen sich aus G-Aktin (globuläre Aktinmonomere) zusammen und bilden eine doppelsträngige Helixstruktur, welche zwei morphologisch unterscheidbare Enden, das „*barbed end*“ und das „*pointed end*“, aufweist. In reifen Neuronen liegt Aktin in 1-2µm kurzen, verzweigten Filamenten vor, welche zur Plasmamembran orientiert sind (Bearer & Reese, 1999). Aktinwachstum erfolgt meist am *barbed end*, wobei gleichzeitig Aktinmonomere vom *pointed end* dissoziieren können. Besonders aktinreiche Strukturen sind der axonale Wachstumskegel, die Präsynapse und dendritische *spines* (Hotulainen & Hoogenraad, 2010; Matus, 2000; Pak *et al.*, 2008).

Mikrotubuli sind hohle Röhren mit einem Durchmesser von etwa 24nm, bestehend aus 10-15 Protofilamenten (in Säugerzellen meist 13 Protofilamente), die sich aus Heterodimeren von α - ($\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 4$) und β - (βI , βII , βIII , βIVa und βIVb) Tubulin zusammensetzen (Desai & Mitchison, 1997; Lowe *et al.*, 2001; Nogales, 2001). Mikrotubuli befinden sich im Zustand des GTP (Guanosintriphosphat)-abhängigen Wachstums (Polymerisation) oder der Verminderung (Depolymerisation) (Conde & Caceres, 2009). Elongation weiterer Tubulinfragmente erfolgt nur am Plus-Ende, an dem selektiv +TIPs (*plus-tip interacting proteins*) akkumuliert sind (Akhmanova & Steinmetz, 2008). Die am besten untersuchten polarisierten, mikrotubuli-assoziierten Proteine sind Tau, welches im Axon und in Dendriten vorkommt und im distalen Axon angereichert ist, sowie MAP2, welches ausschließlich in Dendriten vorkommt (Dehmelt & Halpain, 2005). In Axonen ist das Plus-Ende den synaptischen Terminalen zugewandt und das Minus-Ende dem Zellkörper. In Dendriten findet sich eine gemischte Orientierung der Mikrotubuli, wobei diese am distalen Ende wieder der Orientierung in Axonen folgt (Baas *et al.*, 1988; Cai & Sheng, 2009; Jaworski *et al.*, 2009). Diese eindeutige Orientierung ist ausschlaggebend für den polarisierten Transport vieler Proteine und ist Alleinstellungsmerkmal neuronalen Transports gegenüber anderen Zelltypen. Über dynamische Mikrotubuli (Halbwertszeit mehrere Minuten) hinaus existiert eine Reihe von posttranslatorischen Modifikationen (PTMs) an Mikrotubuli, welche ihre Stabilität erhöhen (Halbwertszeit mehrere Stunden) und Bindungseigenschaften verändern können. Diese PTMs sind Polyglutamylierung, Polyglycylierung, Detyrosinierung, Acetylierung, Phosphorylierung und Palmitoylierung (Conde & Caceres, 2009; Verhey & Hammond, 2009; Westermann & Weber, 2003). Detyrosinierung und Acetylierung sind die an neuronalen Mikrotubuli am häufigsten vorkommenden Modifikationen (Fukushima *et al.*, 2009), detyrosinierte Mikrotubuli finden sich vermehrt im Axon (Erck *et al.*, 2005; Hammond *et al.*, 2010; Witte *et al.*, 2008). Besondere Bedeutung erhalten die Modifikationen durch ihren Einfluss auf die Bindungsfähigkeit molekularer Motoren. Es konnte gezeigt werden, dass

detyrosinierte Mikrotubuli eine höhere Bindungsaffinität für das Kinesin1-Mitglied KIF5 und polyglutamylierte Mikrotubuli für das Kinesin3-Mitglied KIF1A (Ikegami *et al.*, 2007; Konishi & Setou, 2009) haben.

Die Motorproteine lassen sich in Myosine, Dyneine und Kinesine einteilen. Myosine sind molekulare Motoren, welche an Aktin binden. Die meisten Myosine bestehen jeweils aus einer Motordomäne, einer Linkerdomäne sowie der Cargo-bindenden Domäne. Es existieren 18 verschiedene Klassen (Foth *et al.*, 2006), welche an Zellmigration, Muskelkontraktion, Zytokinese und Transportprozessen beteiligt sind. In Neuronen sind die Klassen I, II, V, VI, IX und X existent, wobei für die Klassen I, V, VI und X Studien vorliegen, die die Rolle dieser Myosine für den neuronalen Transport belegen (Bridgman, 2004; Hirokawa *et al.*, 2010). Die am besten untersuchte Klasse sind die MyosineV. Durch die Bildung von Dimeren wird eine Bewegung entlang der Aktinfilamente möglich, ohne die Bindung an das jeweilige Filament zu verlieren (Cheney *et al.*, 1993; Mehta *et al.*, 1999). Sowohl für MyosinV als auch für MyosinVI wurde gezeigt, dass sie sich zum *barbed end* und *pointed end* von Aktinfilamenten bewegen können. MyosinVa ist im präsynaptischen Terminal und der postsynaptischen Dichte lokalisiert und somit am Transport sowohl im Axon als auch in Dendriten beteiligt. Es wurden Assoziationen mit Synaptobrevin, Synaptophysin, EAAT3 und GluR1 beobachtet. Das Modell von Myosin als finalem Motor wurde durch den Nachweis des Transports AMPA-Rezeptoren beinhaltender Recyclingendosomen in dendritischen *spines* durch MyosinVb gestärkt (Evans & Zamponi, 2006; Lise *et al.*, 2006; Ohyama *et al.*, 2001; Prekeris & Terrian, 1997; Wang *et al.*, 2008).

Die Superfamilie der Dyneine stellt die zweite Gruppe molekularer Motoren da. Sie bewegen sich primär entlang der Mikrotubuli zum Minus-Ende. Man unterscheidet zwischen zytoplasmatischem Dynein und axonemalem Dynein, wobei nur die erste Kategorie relevant für den neuronalen Transport ist, axonemale Dyneine sind für den Transport in Cilien und Flagellen verantwortlich. Zytoplasmatische Dyneine (*cytoplasmic dynein heavy chain 1* (Dync1h1) und *cytoplasmic dynein heavy chain 2* (Dync2h1)) bestehen aus mehreren Untereinheiten, entsprechend nach ihrem Molekulargewicht aufgeteilt in zwei schwere Ketten (520kDa), welche für die ATP-Hydrolyse zuständig sind, vier intermediäre Ketten (33-59kDa) sowie mehrere leichte Ketten (10-14kDa) (Karki & Holzbaur, 1999; Pfister *et al.*, 2005). Aufgrund ihrer Beweglichkeit entlang von Mikrotubuli sind zytoplasmatische Dyneine primär verantwortlich für retrograden Transport. Darüber hinaus scheinen sie sowohl notwendig als auch hinreichend für dendritischen Transport zu sein (Kapitein & Hoogenraad, 2010; Vale, 2003; Welte, 2004). Dynein-abhängige Cargos sind zum Beispiel TrkA und TrkB

(Ha *et al.*, 2008; Saxena *et al.*, 2005), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF, (Gauthier *et al.*, 2004)), Piccolo und Bassoon im Axon (Fejtova *et al.*, 2009) sowie Rab5- und Rab7-positive Endosomen in Dendriten (Johansson *et al.*, 2007; Satoh *et al.*, 2008). Um die Funktion im retrograden Transport ausführen zu können, muss Dynein selbst durch KIF5 anterograd transportiert werden (Yamada *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 2008).

Die dritte Gruppe molekularer Motoren bilden die Kinesine, welche sich primär entlang der Mikrotubuli zum Plus-Ende bewegen und deshalb eine wichtige Rolle im anterograden Transport spielen. Die in Säugern vorkommenden 45 KIF (*Kinesin superfamily protein*)-Gene, 38 davon im ZNS exprimiert, lassen sich anhand der Position der Motordomäne in N-KIFs (N-terminale Motordomäne), M-KIFs (Motordomäne in der Mitte) und C-KIFs (C-terminale Motordomäne) sowie phylogenetisch in 14 Klassen (Kinesin1 bis 14) unterteilen (Aizawa *et al.*, 1992; Lawrence *et al.*, 2004; Miki *et al.*, 2001). N- und C-KIFs bestehen jeweils aus einer Motordomäne, einer Linkerdomäne sowie der Cargo-bindenden Domäne, wobei sich N-KIFs zum Plus-Ende und C-KIFs zum Minus-Ende von Mikrotubuli bewegen. Die Homologie zwischen verschiedenen Motordomänen beträgt 30-60%, der übrige Teil des Moleküls weist eine höhere Variabilität auf (Hirokawa & Noda, 2008). Es existiert eine Vielzahl Kinesin-abhängiger Cargos, dies beinhaltet synaptische Proteine sowie spezifisch präsynaptisch oder an der aktiven Zone lokalisierte Proteine (KIF1A, KIF1B β , KIF5), Neurotransmitterrezeptoren (KIF5, KIF17), Mitochondrien (KIF1B α , KIF5) und Plasmamembranvorläufer (KIF3).

Die am häufigsten genutzten Kinesine sind KIF5 aus der Kinesin1-Familie sowie KIF1A aus der Kinesin3-Familie. KIF5 ist am dendritischen Transport sowie am schnellen (Vesikel mit meist 50-400mm/Tag (0,58-4,63 μ m/s)) und langsamen (lösliche Proteine und Membranbestandteile mit etwa 8mm/Tag (0,09 μ m/s)) axonalen Transport beteiligt (Nakata & Hirokawa, 2003; Roy *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2003). Über Adapterproteine stellt KIF5 eine Interaktion mit dem jeweiligen Cargo her, dendritisch sind dies z.B. AMPA-Rezeptoren durch das Adapterprotein GRIP1 (*glutamate receptor interacting-protein*, (Setou *et al.*, 2002)) und GABA-Rezeptoren über HAP1 (*huntingtin-associated protein*, (Twelvetrees *et al.*, 2010)). Axonal transportiert KIF5 verschiedene Vesikel, Mitochondrien sowie APP (*amyloid precursor protein*) (Kamal *et al.*, 2001; Kamal *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 1998).

KIF1A, einer der schnellsten Motoren, ist insbesondere für den axonalen Transport synaptischer Vesikel (*synaptic vesicle precursor*), welche Synaptophysin und Rab3a enthalten, bekannt (Okada *et al.*, 1995). Die Bindung der *synaptic vesicle precursor* an KIF1A erfolgt

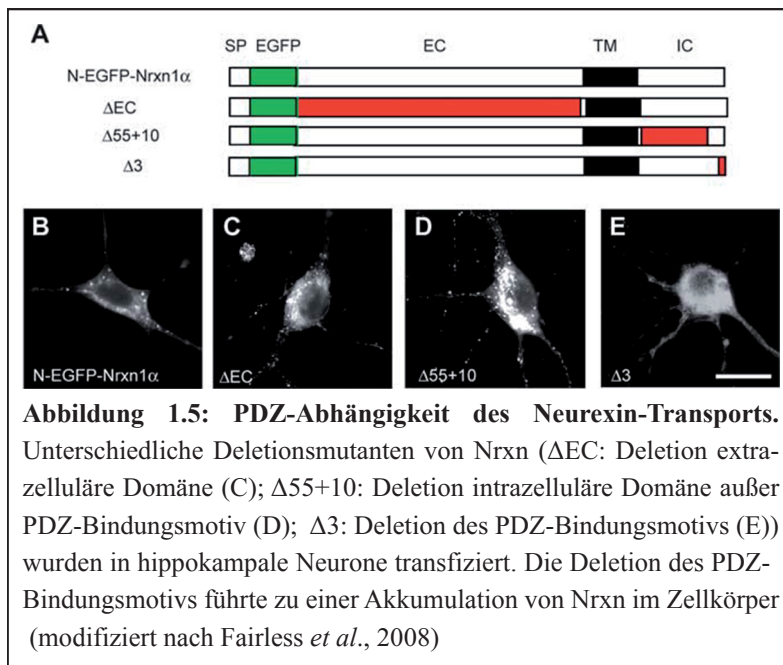
durch die GTP-gebundene Form von Rab3a und DENN/MADD (*differentially expressed in normal versus neoplastic/mitogen-activated protein kinase (MAPK) activating death domain*, (Niwa *et al.*, 2008)). Die genannten Beispiele für Motor-Cargo-Interaktionen zeigen auf, dass eine geringe Anzahl molekularer Motoren eine hohe Anzahl verschiedener Cargo spezifisch transportieren können.

Das ursprüngliche Modell der Interaktion zwischen dem neuronalen Zytoskelett und molekularen Motoren besagte, dass Kinesine und Dyneine den anterograden und retrograden Transport bewirken und Myosine für die finale Auslieferung der Proteine zuständig sind. Dieses Modell wurde mit der Zeit, wie nachfolgend beschrieben, erweitert und der Komplexität der Transportprozesse angepasst. Kinesine, welche sich primär für den axonalen, anterograden Transport verantwortlich zeichnen, finden sich ebenso im dendritischen Transport. Dies sind vor allem KIF17, welches für den Transport NR2B-positiver Vesikel (NMDA-Rezeptor-Untereinheit) notwendig ist, sowie KIF2C (Hanlon *et al.*, 1997; Saito *et al.*, 1997; Setou *et al.*, 2000). Hierbei ist das AIS von Bedeutung, welches einen Aktin-/AnkyrinG-basierten „Filter“ enthält. Das AIS bildet eine selektive Barriere für Kinesin-Cargo-Kombinationen. Es konnte gezeigt werden, dass Cargo-transportierendes KIF5 mit höherer Effizienz durch diesen Filter gelangt als Cargo-transportierendes KIF17 (Song *et al.*, 2009). Ein weiteres Modell Axon-/Dendriten-spezifischer Sortierung besagt, dass Kinesine beide Kompartimente erreichen können, MyosinVa jedoch dafür verantwortlich ist, dendritischen Cargo im AIS zum Soma zurückzuführen (Lewis *et al.*, 2009).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die meisten Daten darauf hinweisen, dass Kinesine für den axonalen Transport und Dyneine für den dendritischen Transport verantwortlich sind. Myosine dienen dem letzten Transportabschnitt entlang der Aktinfilamente und der selektiven Durchlässigkeit des AIS. Die Aktivität und Regulation verschiedener Motoren sowie die Orientierung der Mikrotubuli, die bereits bei einem gebundenem Motor einen bidirektionalen Transport ermöglichen kann (Kapitein & Hoogenraad, 2010), erfordert eine detaillierte Untersuchung des Transports von Nrnx.

Für Nlgn konnte gezeigt werden, dass ein 32 Aminosäuren langes Motiv in der zytoplasmatischen Domäne für die postsynaptische Lokalisierung hinreichend ist (Rosales *et al.*, 2005). Nlgn interagiert über PSD95 mit Dynein (Schapitz *et al.*, 2010). Über die intrazelluläre Dynamik von Nrnx ist hingegen wenig bekannt. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten Nrnx-positive Vesikel im Axon und Dendriten, wobei die Oberflächeninsertion primär im axonalen Kompartiment stattfindet. Diese Lokalisation wurde sowohl in exzitatorischen als auch in inhibitorischen Neuronen nachgewiesen. Insbesondere

wurde erstmals eine Abhängigkeit des Nrnx-Transports vom C-terminalen PDZ-Bindungsmotiv gezeigt ((Fairless *et al.*, 2008; Gokce & Südhof, 2013), vgl. Abb. 1.5).



Die bisherigen Studien zum Transport von Nrnx basierten auf fixierten Neuronen. Im Rahmen meiner Arbeit wurden diese Experimente erstmals an lebenden, hippocampalen Neuronen aus der Maus durchgeführt. Dies ermöglicht einerseits eine Beobachtung der dynamischen Transportprozesse und darüber hinaus den Einsatz pH-abhängiger Fluorophore (Miesenbock *et al.*, 1998) zur Beobachtung schneller Vorgänge an Synapsen. Intrazellulärer Transport von Membranproteinen mündet in der Fusion des Transportvesikels mit der Plasmamembran der Zelle. Zu dieser Fusion existieren mindestens zwei Modelle: *kiss-and-run* (KR, (Ceccarelli *et al.*, 1973; Fesce *et al.*, 1994)) und *full-collapse fusion* (FF, (Heuser & Reese, 1973)). KR basiert auf der kurzzeitigen Fusion von Vesikel und Plasmamembran, wobei eine nanometergroße Fusionspore entsteht. Nach dem FF-Modell wird das Vesikel komplett in die Membran eingebaut und erst durch Clathrin-vermittelte Endozytose aus der Membran entfernt und in die Zelle gebracht. Neue, optogenetische Methoden und hochauflösende Mikroskopie lieferten darüber hinaus den Nachweis ultraschneller Fusionsprozesse. Exocytose an der aktiven Zone und endozytotische Prozesse an den lateralen Enden der aktiven Zone können innerhalb von 100ms ablaufen (Watanabe *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2013). Für beide Modelle (KR und FF) wurden zunehmend experimentelle Hinweise erbracht, demnach ist es noch ungeklärt, ob einer der Mechanismen vorrangig erfolgt (Balaji & Ryan, 2007; Granseth *et al.*, 2006; Rizzoli & Jahn, 2007). Aufgrund der langsameren Kinetik von FF mit anschließender Clathrin-vermittelter Endozytose sind diese Prozesse allein ungeeigneter für

hochaktive Synapsen. Das KR Modell stellt eine Lösung für dieses Problem dar und bewahrt darüber hinaus die Proteinzusammensetzung und die Identität des Vesikels, was eine der Definitionsbedingungen des KR Mechanismus' ist (Alabi & Tsien, 2013; Rizzoli & Jahn, 2007).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Nrxn ist ein primär präsynaptisch lokalisiertes Zelloberflächenmolekül. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war weitgehend unbekannt, wie der intrazelluläre Transport von Nrxn vom Ort der Synthese (Zellkörper) zur finalen Lokalisierung (präsynaptisches Terminal) erfolgt. Diesen Transport zu verstehen ist von maßgeblicher Bedeutung, da ASD-assoziierte Mutationen in *Nrxn*, *Nlgn* und *Shank* zu einem Verlust der Proteinsynthese führen oder den intrazellulären Transport durch Retention im endoplasmatischen Retikulum verhindern. Vorangegangene Untersuchungen zum Transport von Nrxn dokumentieren, dass die Oberflächeninsertion bevorzugt im Axon stattfindet. Es wurde auch gezeigt, dass die Deletion des C-terminalen PDZ-Bindungsmotivs den Transport verhindert. Weiterhin unklar blieb, wie Nrxn zur Präsynapse gelangt und wo die Insertion in die Plasmamembran erfolgt. Gibt es beim Transport Unterschiede zwischen α - und β -Nrxn? Welche anderen Proteine werden mit Nrxn cotransportiert? Wie hängt der Transport von Nrxn mit dem neuronalen Zytoskelett und potentiellen Motorproteinen zusammen? Dementsprechend sollte in der vorliegenden Arbeit der Mechanismus des intrazellulären Transports von Nrxn umfassend analysiert werden.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK
Analysenwaage LA120S	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Bakterienschüttler Innova40	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Blotapparaturen	BioRad, München
Digitalwaagen	Sartorius, Göttingen
<i>E. coli</i> Pulser	BioRad, München
Eismaschine	Scotsman, Venon Hills, USA
Fluoreszenzmikroskop Axioskop2	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop AxioImagerZ2	Visitron, Puchheim
Geldokumentationssystem	Decon Science Tec., Hohengandern; INTAS, Göttingen
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubator (LB-Platten)	WTB-Binder, Tuttlingen
Inkubator (Zellkultur)	Sanyo, Gunma, Japan
Inkubatorschüttelhaube	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kreisschüttler	Labinco, Breda, Niederlande
Kühlschränke	Bosch, München; Liebherr, Biberach an der Riss; Sanyo, Gunma, Japan
Kühlzentrifugen 5804R/5810R	Eppendorf, Hamburg
Laserscanningmikroskop LSM5Duo	Carl Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Axiovert2	Carl Zeiss, Jena
Ligationskammer	Techne, Cambridge, UK
Magnetrührplatten	IKA, Wilmington, USA
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
pH-Meter	WTW-inoLab, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Präparierbesteck	Dumont, Montignez, Schweiz; FST, Heidelberg
Pulsgenerator 2100	A-M Systems, Carlsborg, USA
Reinstwassersystem	SG Wasseraufbereitung GmbH, Barsbüttel
Spektralphotometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilisator	FST, Heidelberg
Sterilwerkbank	Thermo Scientific, Waltham, USA
Stimulus Isolator A385	Word Precision Instruments, Berlin
Strom-/Spannungsquelle	Biometra, Göttingen
Tiefkühlschrank	Sanyo, Gunma, Japan
Tischschüttler	IKA, Wilmington, USA

Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Sorvall Discovery90	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ultrazentrifuge Sorvall RC6Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA
VisiScope Confocal Cell Explorer	Visitron, Puchheim
Vortexer	IKA, Wilmington, USA
Wärmeschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad	Julabo, Seelbach

2.1.2 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
AMBA	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	B. Braun, Melsungen
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Amersham, Freiburg
Calciumchlorid-Dihydrat	VWR, Darmstadt
Chloroquin	Sigma, Taufkirchen
DEAE-Dextran	Amersham, Freiburg
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumtetraborat-Decahydrat	Sigma, Taufkirchen
DNA-Größenstandard	Life Technologies, Darmstadt
dNTPs	Life Technologies, Darmstadt
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
ECL Western Blot Reagenz	Amersham, Freiburg
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100%	Applichem, Darmstadt
Ethanol vergällt 96%	Apotheke UKM
Ethanol vergällt 70%	Apotheke UKM
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe
<i>Fluorescence mounting medium</i>	Dako, Hamburg
Glucose	Sigma, Taufkirchen
Glutamat	Sigma, Taufkirchen
Glutamin	PAA / GE Healthcare, Cölbe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Applichem, Darmstadt
Milchpulver	BioRad, München

Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Omnichem, Wetteren, Belgien
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Paraffin	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	BioChem, Karlsruhe
PBS-Tween	Sigma, Taufkirchen
Phenol-Chloroform-Isopropanol	Diagonal, Münster
PonceauS	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Merck, Darmstadt
Protein-A Sepharose beads	GE Healthcare, München
Proteinstandard	BioRad, München
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salpetersäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Temed	Sigma, Taufkirchen
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Life Technologies, Darmstadt

2.1.3 Oligonukleotide

ID	Protein	Sequenz	RE	Richtung
MM10-78	Neurexin	CGACGAGCTAGCAAGCTT CCAGGCCCGATGGTGAGC AAGGGCGAGGAG	<i>HindIII</i>	vorwärts
MM10-79	Neurexin	CGACGAGCTAGCCGGGCC TGGCTTGTACAGCTCGTC CATGCCGC	<i>HindIII</i>	rückwärts
MM12-90	Denmark	GATATACGCGTTGACATT GATTATTGACGATATCGC GGCCGCCTCTGGCTAAC TAGAGAACCCACTGCTTA CTGGC	<i>NotI</i>	vorwärts
MM12-91	Denmark	CGGTCATTCGTCACCCAA GAGATCAATCGGTCTCCG CCGGCGCTATAGCAGTTA TTAGTTACAGTTGCGCAT ATAG	<i>NotI</i>	rückwärts
MM12-92	Neuroigin	GTATACTGACTGGGCCGA TCGCCATAACCCTGAAAC TAGAAGGAAG	<i>PvuI</i>	vorwärts
MM12-93	Neuroigin	GAAGGAAGATCAAAGTCC CAATACCGCTAGCCGGGT	<i>PvuI</i>	rückwärts

MM13-28	pSyn5	CAGTCATATG CGTATCGATAAGCTTGCGGC CCGCGCATGCCTGCAGGTC	<i>NotI</i>	vorwärts
MM13-29	pSyn5	GACCTGCAGGCATGCGCGG CCGCAAGCTTATCGATACG	<i>NotI</i>	rückwärts
MM13-32	NrxnPDZ	GGAAGCAGCCGCAAGAAG AACAAAGGATAAGGAGTATT ATGTCTAGCTTGCATGCCTG CAG	<i>HindIII</i>	vorwärts
MM13-33	NrxnPDZ	CTGCAGGCATGCAAGCTAG ACATAATACTCCTTATCCTT GTTCTTCTTGCGGCTGCTTCC	<i>HindIII</i>	rückwärts
MM14-37	pHTomato	GGGGCTAGCGTGAGCAAGGG CGAGGAGAATAACATGGCCA TCATC	<i>NheI</i>	vorwärts
MM14-32	pHTomato	CAGGCTAGCGCCTCCGCTGG CGCCGGTGGA	<i>NheI</i>	rückwärts
MM14-33	Syphys	AAGCTGCTAGCAAGGATCCG TGACCG	<i>NheI</i>	vorwärts
MM14-34	Syphys	ACCAAGCTTGCTGCCGCCA CCTACTGC	<i>NheI</i>	rückwärts
MM14-35	GCaMP6f	AGCAAGCTTGGTTCTCATCAT CATCATCATCATGGTATGGC	<i>HindIII</i>	vorwärts
MM14-36	GCaMP6f	TGCAAGCTTCGCGGCCGCTC ACTTCGCT	<i>HindIII</i>	rückwärts

2.1.4 Vektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
pCMV5-Bassoon-eGFP	eGFP-markiertes Bassoon	Prof. Thomas Dresbach, Göttingen
pCMV5-CASK	<i>full length</i> CASK	Prof. Thomas Südhof, Stanford, USA
pCMV5-CgA-RFP	RFP-markiertes ChromograninA	Prof. Laurent Taupenot, Bethesda, USA
pCMV5-Denmark	RFP-markiertes ICAM5	PD Dr. Joachim Kremerskothen, Münster
pCMV5-GCaMP6f	eGFP-basierter Calciumsensor	Addgene, Cambridge, USA
pSyn5-Ruby-GCaMP6f	Ruby-eGFP-basierter Calciumsensor	Addgene, Cambridge, USA
pGW1-KIF1A-eGFP	eGFP-markiertes KIF1A	Prof. Jae-Ran Lee, Daejeon, Südkorea
pSilencer-KIF1A shRNA	KIF1A Knock down	Prof. Judy Liu, Washington, USA
pSilencer-eGFP-KIF1A shRNA	eGFP-markierter KIF1A Knock down	Prof. Judy Liu, Washington, USA
pRK5-myc-KIF1A	RNA-resistentes KIF1A	Prof. Geri Kreitzer, Cornell, USA
pCMV5-LifeAct-GFP	eGFP-markiertes LifeAct	ibidi GmbH, Martinsried
pCMV5-LifeAct-RFP	RFP-markiertes LifeAct	ibidi GmbH, Martinsried
pCMV5-Mint1	<i>full length</i> Mint1	Prof. Thomas Südhof, Stanford, USA
pSyn5-EChNA	mCherry-markiertes Neurexin1 α	Laura Brinkhaus, Münster
pSyn5-EChNB	mCherry-markiertes Neurexin1 β	Laura Brinkhaus, Münster

Vektor	Beschreibung	Referenz
pSyn5-EENA	eGFP-markiertes Neurexin1 α	Laura Brinkhaus, Münster
pSyn5-EENB	eGFP-markiertes Neurexin1 β	Laura Brinkhaus, Münster
pSyn5-NChNA	mCherry-markiertes Neurexin1 α	Christian Neupert, Münster
pSyn5-NChNB	mCherry-markiertes Neurexin1 β	Christian Neupert, Münster
pSyn5-NENA	eGFP-markiertes Neurexin1 α	Laura Brinkhaus, Münster
pSyn5-NENB	eGFP-markiertes Neurexin1 β	Laura Brinkhaus, Münster
pCMV5-NENA- Δ 3	Neurexin1 α Δ PDZ-Motif	Henriette Masius, Mohi Ahmad, Münster
pCMV5-NENA- Δ 55+10	Neurexin1 α Δ C-Terminus, mit PDZ	Henriette Masius, Mohi Ahmad, Münster
pSyn5-NpHNA	pHluorin-markiertes Neurexin1 α	Katharina Niesmann, Münster
pSyn5-NpHNB	pHluorin-markiertes Neurexin1 β	Katharina Niesmann, Münster
pSyn5-NpHTNA	pHTomato-markiertes Neurexin1 α	Christian Neupert, Münster
pCMV5-Nrxn1 α	<i>full length</i> Neurexin1 α	Prof. Thomas Südhof, Stanford, USA
pCMV5-Rim1 α -eGFP	eGFP-markiertes Rim1 α	Prof. Susanne Schoch, Bonn
pCMV5-Rim1 α -mCherry	mCherry-markiertes Rim1 α	Prof. Susanne Schoch, Bonn
pcDNA3-PAmCherry-Synaptobrevin	mCherry-markiertes Synaptobrevin	Prof. Jürgen Klingauf, Münster
pCMV5-Synaptophysin-eGFP	eGFP-markiertes Synaptophysin	Prof. Jürgen Klingauf, Münster
pCMV5-Synaptophysin-mCherry	mCherry-markiertes Synaptophysin	Prof. Jürgen Klingauf, Münster
pSyn5-Synaptophysin-pHTomato	pHTomato-markiertes Synaptophysin	Christian Neupert, Münster
pcDNA3-PAmCherry-Synaptotagmin	mCherry-markiertes Synaptotagmin	Prof. Jürgen Klingauf, Münster
pCMV5-Veli	<i>full length</i> Veli	Prof. Thomas Südhof, Stanford, USA

2.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
polyklonal			
Anti-Bassoon	Meerschwein	1:800	SynapticSystems, Göttingen (141004)
Anti-GFP	Kaninchen	1:500	Chemicon/Millipore, Billerica, USA (AB3080)
Anti-Homer	Kaninchen	1:500	SynapticSystems, Göttingen (160003)
Anti-KIF1A	Kaninchen	1:1.000	Sigma, Taufkirchen (SAB2104191)
Anti-Liprina	Kaninchen	1:500	SynapticSystems, Göttingen (169102)
Anti-MAP2	Huhn	1:500	Abcam, Cambridge, UK (AB5392-25)
Anti-Mint1	Kaninchen	1:500	UTSW, Dallas, USA
Anti-Nbea	Kaninchen	1:1.000	SynapticSystems, Göttingen (194003)
Anti-NEEP21	Kaninchen	1:1.000	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA (sc-135089)
Anti-Neurofilament	Kaninchen	1:500	Chemicon/Millipore, Billerica, USA (AB1987)
Anti-Rab3a	Kaninchen	1:1.000	Sigma, Taufkirchen (R2776)
Anti-Rab5a	Kaninchen	1:3.000	Sigma, Taufkirchen (R4654)
Anti-Rim1 α	Kaninchen	1:500	UTSW, Dallas, USA
Anti-Synaptotagmin	Kaninchen	1:500	UTSW, Dallas, USA
Anti-vGat	Kaninchen	1:500	SynapticSystems, Göttingen (131002)
monoklonal			
Anti-CASK	Maus	1:500	Chemicon/Millipore, Billerica, USA (MAB5230)
Anti-Gephyrin	Maus	1:500	SynapticSystems, Göttingen (147011)
Anti-MAP2	Maus	1:500	Covance, Leeds, UK (SMi-52)
Anti-PSD95	Maus	1:500	Abcam, Cambridge, UK (AB2723)
Anti-Rab7b	Maus	1:1.000	Sigma, Taufkirchen (WH0338382M1)
Anti-Rab11a	Maus	1:500	Abcam, Cambridge, UK (AB78337)
Anti-Synapsin	Maus	1:500	SynapticSystems, Göttingen (106001)
Anti-Synaptophysin	Maus	1:100	Dako, Hamburg (M0776)
Anti-Tubulin	Maus	1:500	SynapticSystems, Göttingen (302211)
Anti-vGlut	Maus	1:500	SynapticSystems, Göttingen (135311)

Fluoreszenzmarker	Verdünnung	Hersteller
Hoechst33342 (DAPI)	1:100.000	Life Technologies, Darmstadt (H1399)
Phalloidin AlexaFluor488	1:100	Life Technologies, Darmstadt (A12379)
Phalloidin AlexaFluor568	1:100	Life Technologies, Darmstadt (A12380)
Phalloidin AlexaFluor633	1:100	Life Technologies, Darmstadt (A22284)
Synaptotagmin1 Oyster488	1:200	SynapticSystems, Göttingen (105311C2)
Synaptotagmin1 Oyster550	1:200	SynapticSystems, Göttingen (105311C3)

Sekundäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Huhn-IgG AlexaFluor647	Ziege	1:500	Life Technologies, Darmstadt (A-21449)
Kaninchen-IgG AlexaFluor488	Ziege	1:500	Life Technologies, Darmstadt (A-11034)
Kaninchen-IgG AlexaFluor568	Ziege	1:500	Life Technologies, Darmstadt (A-11035)
Kaninchen-IgG Cy3	Ziege	1:500	Dianova, Hamburg (111-165-003)
Maus-IgG AlexaFluor488	Ziege	1:500	Life Technologies, Darmstadt (A-11001)
Maus-IgG AlexaFluor568	Ziege	1:500	Life Technologies, Darmstadt (A-11031)
Maus-IgG Cy3	Ziege	1:500	Dianova, Hamburg (115-165-003)
Meerschwein-IgG Cy3	Ziege	1:500	Dianova, Hamburg (106-165-003)

2.1.6 Mauslinien

Die Herstellung von Primärkulturen (vgl. 2.2.2.1 und 2.2.2.2) erfolgte mit Wildtyp-Mäusen der Linie C57BL/6N. Die Tiere wurden von Janvier Labs, Saint-Berthevin, Frankreich bezogen. α -Nrnx *triple knock out* (TKO)-Mäuse wurden durch Deletion der ersten Exone von α -Nrnx in einem gemischten SV129/C57BL/6N-Hintergrund hergestellt. Die Verpaarungen für diese Experimente erfolgten mit Mäusen, welche für Nrnx1 α und Nrnx3 α KO heterozygot und für Nrnx2 α KO homozygot waren (Missler *et al.*, 2003).

2.1.7 Zelllinien

Die Expression von fluoreszenzmarkierten Proteinen sowie die Herstellung rekombinanter Proteine wurden an verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Dies waren HEK tsA201 (*human embryonic kidney*) Zellen (Life Technologies, Darmstadt), N2A-Zellen (murine Neuroblastomazellen), freundlicherweise von J. Schwamborn, Luxemburg, zur Verfügung gestellt, sowie COS-7 (simiane Nierenzellen), welche vom DSMZ, Hannover bezogen wurden.

2.1.8 Bakterienstämme

Für die Hitzeschock-Transformation von QuikChange-Produkten (vgl. 2.2.1.3) wurden *Escherichia coli* XL10-Gold ultrakompetente Zellen von Stratagene, Waldbronn, genutzt. Zur Elektrotransformation (vgl. 2.2.1.12) wurden *Escherichia coli* XL1-Blue MRF superkompetente Zellen, ebenfalls von Stratagene, Waldbronn, verwendet.

2.1.9 Nährmedien und Zusätze

Für die Kultivierung der Primärkulturen, der Zelllinien sowie der Bakterienstämme wurden nachfolgend aufgelistete Medien und Zusätze nach den entsprechenden Rezepturen verwendet.

Medien & Zusätze	Hersteller
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Apo-Transferrin	Sigma, Taufkirchen
B27 supplement	Life Technologies, Darmstadt
Cytosin Arabinosid	Sigma, Taufkirchen
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Sigma, Taufkirchen
<i>Fetal calf serum</i>	Life Technologies, Darmstadt
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	Life Technologies, Darmstadt
HEPES	Life Technologies, Darmstadt
<i>Horse serum</i>	Life Technologies, Darmstadt
Insulin	Sigma, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Laura Bertani Medium	Roth, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Life Technologies, Darmstadt
<i>Minimum Essential Medium</i>	PAA / GE Healthcare, Cölbe
Neurobasalmedium	Life Technologies, Darmstadt
<i>Normal goat serum</i>	Life Technologies, Darmstadt
NZY ⁺ -Medium	Roth, Karlsruhe
Ovalbumin	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Progesteron	Sigma, Taufkirchen
Putreszin	Sigma, Taufkirchen
Selendioxid	Sigma, Taufkirchen
HBSS, 1x	
50mL	HBSS (10x)
5mL	HEPES (1 M, pH 7,3)
5mL	Penicillin/Streptomycin (100x)
440mL	<i>Aqua ad iniectabilia</i>
Boratpuffer (0,1M, pH 8.5)	
1,24g	Borsäure
1,90g	Di-Natriumtetraborat
400mL	<i>Aqua ad iniectabilia</i>

Astrocytenmedium: Glial MEM*

425mL	1x MEM
50mL	<i>Horse serum</i>
15mL	Glucose (20%)
5mL	Natriumpyruvat (100x)
5mL	Penicillin/Streptomycin (100x)

MEM*

480mL	1x MEM
15mL	Glucose (20%)
5mL	Natriumpyruvat (100x)

Ausplattiermedium: MEM* + 10 % HS

450mL	MEM*
50mL	<i>Horse serum</i>

N2 supplement

96mL	MEM	
1mL	Insulin	(finale Konz.: 5µg/ml)
1mL	Progesteron	(finale Konz.: 20nM)
1mL	Putreszin	(finale Konz.: 100µM)
1mL	Seleniumdioxid	(finale Konz.: 30nM)
100mg	Apo-Transferrin	

Neuronales Medium: N2.1

80mL	MEM*
10mL	<i>N2 supplement</i>
10mL	Ovalbumin (1%)

Neuronales Medium: B27

100mL	Neurobasalmedium
250µL	Glutamin (finale Konz.: 0,5mM)
2mL	<i>B27 supplement</i>
1mL	Penicillin/Streptomycin (100x)

Transfektionspuffer

274mM	Natriumchlorid
40mM	HEPES
12mM	Glucose
10mM	Kaliumchlorid
1,4mM	Di-Natriumhydrogenphosphat

Live imaging-Puffer (pH 7.4)

145mM	Natriumchlorid
2,5mM	Kaliumchlorid
2mM	Calciumchlorid
2mM	Magnesiumchlorid
10mM	Glucose
10mM	HEPES

Kulturmedium Zelllinien

445mL	DMEM
50mL	<i>Fetal calf serum</i>
5mL	Penicillin/Streptomycin (100x)

Gefriermedium Zelllinien

40mL	DMEM
40mL	<i>Fetal calf serum</i>
20mL	DMSO

2.1.10 Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	NEB, Frankfurt am Main
DNase	Sigma, Taufkirchen
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt am Main
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin, 2.5%, 10x	Life Technologies, Darmstadt
Trypsin, 2.5%, 10x	PAA / GE Healthcare, Cölbe
Trypsin-EDTA, 0.25%, 1x	PAA / GE Healthcare, Cölbe

2.1.11 Kits

Kit	Hersteller
Expand™ High Fidelity PCR	Roche Applied Science, Mannheim
NucleoBond PC500	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Qiaex II Agarose Gel Extraction	Qiagen, Hilden
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis	Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA

2.1.12 Software

Programm	Anwendung	Referenz
Adobe Illustrator CS4	Bildbearbeitung	Adobe Systems, München
Adobe Photoshop CS4	Bildbearbeitung	Adobe Systems, München
Lasergene 8.0.3	DNA Sequenzanalyse	DNASar, Madison, WI, USA
ImageJ 1.47a	Bildbearbeitung/-analyse	NIH, Bethesda, MD, USA
MetaMorph 7.7.2.0	Bildanalyse	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Prism 4	Datenanalyse	GraphPad Software, La Jolly, CA, USA
VisiView 2.1.1	Mikroskopsteuerung	Visitron, Puchheim
ZEN 2011	Mikroskopsteuerung	Carl Zeiss, Jena
Blast	DNA Sequenzanalyse	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
PrimerX	Primerdesign	http://www.bioinformatics.org/primerx/
UniProtKB	Primärsequenz	http://www.uniprot.org/help/uniprotkb
WatCut	Primerdesign	http://watcut.uwaterloo.ca/

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Klonierungsstrategien

Zur Synthese mutierter Plasmide, wie Veränderung des Vektors oder Hinzufügen von Reporterproteinen (Fluoreszenz), wurden zunächst geeignete Primer entworfen, welche zur jeweiligen DNA-Sequenz komplementär waren und zur Identifizierung positiver Mutanten zusätzliche Restriktionsstellen in das Plasmid einbrachten oder bereits vorhandene entfernten. Die Oligonukleotidpaare (vgl. Kap. 2.1.3) folgten bezüglich Basenlänge und Schmelztemperatur den Parametern der jeweiligen Methodenprotokolle. Die Primer wurden in einer PCR-Reaktion (vgl. Kap. 2.2.1.2) eingesetzt, um DNA-Abschnitte aus einem Ausgangsplasmid zu amplifizieren. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kap. 2.2.1.5) voneinander getrennt und per Gelextraktion (vgl. Kap. 2.2.1.6) aufgereinigt. Es erfolgte ein Restriktionsverdau sowie eine Phenol-Chloroform Extraktion (vgl. Kap. 2.2.1.7). Über die entsprechenden Restriktionsstellen im Zielvektor wurden beide Bestandteile miteinander ligiert (vgl. Kap. 2.2.1.11), potentielle Religation des Zielplasmids wurde durch vorangehende Dephosphorylierung (vgl. Kap. 2.2.1.10) deutlich reduziert. Die erhaltenen Ligationsansätze wurden in *E. coli* elektrotransformiert (vgl. Kap. 2.2.1.12) und auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert. Positive Einzelkolonien wurden über Nacht in Nährmedium angezogen, um mit den Bakterien eine schnelle Plasmid-Isolierung (vgl. Kap. 2.2.1.8) und einen analytischen Restriktionsverdau (vgl. Kap. 2.2.1.4) durchzuführen. Nach erfolgter Identifizierung wurden einzelne, positive Klone ausgewählt, deren DNA über eine Plasmid Minipräparation (vgl. Kap. 2.2.1.9) isoliert und zur Sequenzierung (GATC, Konstanz; vgl. Kap. 2.2.1.15) gegeben wurde. Konnten die gewünschten Mutationen bestätigt werden, wurde eine Plasmid Maxipräparation (vgl. Kap. 2.2.1.13) durchgeführt und die Plasmide bei 4°C gelagert.

2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (Expand™ High Fidelity System)

Lösungen: Reaktionspuffer (10x), Template-DNA (10ng/μL), Vorwärts-/Rückwärtsprimer, dNTP-Mix (10mM), *Taq*-DNA Polymerase

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Higuchi *et al.*, 1988). Für diese enzymatische Reaktion werden zwei Primer benötigt, deren Sequenz zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge komplementär ist und die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren. Der PCR-

Zyklus besteht aus den Phasen Denaturierung des DNA-Doppelstranges, Bindung der Oligonukleotidpaare an die komplementären Sequenzen (*Annealing*) sowie Anbindung weiterer Nukleotide (Elongation). Die einzelnen Primer setzten sich aus mindestens 21 Nukleotiden zusammen und hatten eine Schmelztemperatur von mehr als 58°C. Die Temperatur während des *Annealing* richtete sich nach der Länge der Primer, die Dauer der Elongation nach der Größe des Ausgangsplasmides. Nach der PCR wurde das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen und gewünschte DNA-Fragmente wurden isoliert.

Reaktionsansatz:

13µL H₂O
 2µL Reaktionspuffer (10x)
 1µL Plasmid-DNA (10ng)
 1µL Vorwärtsprimer (OD_{260nm}: 5)
 1µL Rückwärtsprimer (OD_{260nm}: 5)
 1µL dNTP-Mix (10mM)
 1µL Enzym-Mix (*Taq*-Polymerase)

PCR-Parameter:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	96°C	5min
2	30	96°C	1min
		55-65°C	1min
		72°C	1min/kb
3	1	72°C	1min

2.2.1.3 *In vitro* Mutagenese (QuikChange® Site-Directed Mutagenesis)

Lösungen: Reaktionspuffer (10x), Template-DNA (10ng/µL), Vorwärts-/Rückwärtsprimer, dNTP-Mix (10mM), Quik-Lösung, *Pfu Turbo*-DNA Polymerase (2,5U/µL), *DpnI* (10U/µL), β-Mercaptoethanol-Mix, NZY⁺-Medium, LB-Medium

Punktmutationen, Hinzufügen oder Entfernen einzelner oder mehrerer Aminosäuren in einem Ausgangsplasmid wurden mit dem QuikChange® Mutagenese Kit (Life Technologies, Darmstadt) durchgeführt. Hierzu wurden wie bei der PCR Primer benötigt, welche komplementäre Sequenzen sowie zusätzliche Restriktionsstellen zur Identifikation positiver

Klone enthielten. Nach der Denaturierung erfolgte die Elongation durch Anlagerung der Mutageneseprimer und die *Pfu Turbo*-DNA Polymerase.

Reaktionsansatz:

5µL Reaktionspuffer (10x)
 100ng Plasmid-DNA
 125ng Vorwärtsprimer
 125ng Rückwärtsprimer
 1µL dNTP-Mix (10mM)
 1,5µL Quik-Lösung
 mit ddH₂O auf 50µL Volumen
 1µL *Pfu Turbo*-DNA Polymerase (2,5U/µL)

PCR-Parameter:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	2min
2	18	95°C	20sec
		60°C	10sec
		68°C	30sec/kb
3	1	68°C	5min

Anschließend erfolgte ein selektiver Restriktionsverdau mit 2µL *DpnI* für 5min bei 37°C, wodurch die methylierten Nukleotide des Ausgangsplasmides verdaut wurden, die mutierte DNA blieb erhalten. Zur Transformation wurden 45µL XL10-Gold ultrakompetente Zellen mit 2µL β-Mercaptoethanol-Mix versetzt und 2min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2µL *DpnI*-verdauter DNA wurden die Zellen für 30min auf Eis inkubiert, im 42°C-Wasserbad für exakt 30s einem Hitzeschock unterzogen sowie weitere 2min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 0,5mL vorgewärmtes (42°C) NZY⁺-Medium hinzugefügt und für 1h bei 250rpm und 37°C inkubiert. Schließlich konnten je 250µL auf eine LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (1:1.000) ausplattiert werden.

2.2.1.4 Restriktionsenzym-Verdau von DNA

Lösungen: Restriktionspuffer (10x) NEB 1-4, BSA (10x, 10mg/mL), Ladepuffer (10x: 57% Glycerin, 100mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA, 0,001% Bromphenolblau)

Der analytische Restriktionsverdau von 2µL DNA aus Express Plasmid Minipräparationen (vgl. Kap. 2.2.1.8) wurde in einem Gesamtvolumen von 20µL durchgeführt, darin enthalten waren 2µL 10x Restriktionspuffer sowie je 1µL Enzym. Der Verdau erfolgte für 2h bei 37°C. Für einen präparativen Restriktionsverdau von PCR-Produkten oder Zielvektoren betrug das Gesamtvolumen 60µL, davon 2-5µg DNA, 6µL 10x Restriktionspuffer und je 1µL Enzym, die Inkubation lief über Nacht bei 37°C. Die Reaktionen wurden entsprechend Herstellerangaben mit den verschiedenen Puffern und ggf. unter Zugabe von BSA (*bovine serum albumin*) durchgeführt. Die Proben wurden schließlich mit 5x Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen: TAE (50x: 2M Tris, 50mM EDTA, 4% Essigsäure, pH 8.5), Ladepuffer (10x: 57% Glycerin, 100mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA, 0,001% Bromphenolblau), Ethidiumbromid, 1kB DNA Marker (Life Technologies, Darmstadt)

DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen und Restriktionsverdauen können entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch voneinander getrennt werden. Hierfür wurden 0,8% (w/v) Agarose mit 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, Ethidiumbromid (1:10.000) zugegeben und das Gel in eine Flachbett-Elektrophoresekammer blasenfrei gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 5x Ladepuffer (1:5) versetzt, in die Gelkammern aufgetragen und bei einer Spannung von 80-120V aufgetrennt. Die Detektion erfolgte unter 70% UV-Leistung, der mitlaufende DNA-Längenstandard ermöglichte die Bestimmung der Fragmentgröße.

2.2.1.6 Gelextraktion (QIAEX II Agarose Gel Extraction)

Lösungen: Puffer QX1, Puffer QIAEX II, Puffer PE, Natriumacetat (3M, pH 5.0)

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels QIAEX II-Kit weitestgehend entsprechend Herstellerangaben. Die Banden wurden auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit 700µL des Puffers QX1 versetzt (bei 100bp-4kb Fragmentgröße). Der QIAEXII-Puffer muss für 30s gevortext werden, um eine Resuspension der Silikonpartikel zu gewährleisten. Anschließend wurden 12µL QIAEXII-Puffer (entsprechend der DNA-Menge) zu den Proben hinzugefügt und für 10min bei 50°C inkubiert. Um die Silikonpartikel in Lösung zu halten, wurde die Suspension alle 2min gevortext. Des Weiteren kann zur Stabilisierung des pH-Wertes eine Zugabe von 10µL Natriumacetat notwendig sein. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30s bei 12.000xg, der

Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die Silikonpartikel in 500µL Puffer QX1 resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde 2x mit je 500µL Puffer PE gewaschen, für 15min bei RT getrocknet und schließlich in 20µL H₂O eluiert (5min bei 50°C). Das Eluat wurde für 30s bei 12.000xg zentrifugiert, die DNA-Lösung konnte abgenommen und bei -20°C gelagert werden.

2.2.1.7 Phenol-Chloroform-Extraktion

Lösungen: Phenol-Chloroform-Isoamylethanol (25:24:1), Ethanol (100%, 70%), Natriumacetat (3,3M)

Zur Extraktion restriktionsverdauter DNA-Fragmente bzw. von PCR-Produkten wurden diese mit H₂O auf ein Volumen von 100µL aufgefüllt und 100µL Phenol-Chloroform hinzugefügt. Durch Zentrifugation für 10min bei 12.000xg bildeten sich verschiedene Phasen, die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Dieser Überstand wurde zur Entfernung von Phenolresten mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und erneut 10min bei 12.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1/10 des Gesamtvolumens Natriumacetat (ca. 10µL) sowie dem 2,5fachen Volumen 100% Ethanol (ca. 250µL) gemischt, bei -20°C wurde die DNA gefällt. Nach Zentrifugation für 15min bei 12.000xg und 4°C wurde der Überstand entfernt und das DNA-Pellet mit 300µL 70% Ethanol gewaschen. Es wurde erneut für 10min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die DNA bei Raumtemperatur (RT) getrocknet sowie abschließend in 20µL H₂O resuspendiert.

2.2.1.8 Express Plasmid Minipräparation

(nach (Holmes & Quigley, 1981))

Lösungen: STET-Puffer (8% Succrose, 0,5% Triton-X100, 10mM Tris pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0), TE-Puffer, Ethanol (100%, 70%), Lysozymlösung (10mg/mL), Natriumacetat (7,5M)

Zur Restriktionsanalyse wurden *E. coli* Einzelkulturen in 5mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (1:1.000) über Nacht bei 250rpm und 37°C inkubiert. 1,5mL der Kultur wurden abgenommen und für 1min bei 12.000xg zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 300µL STET-Puffer resuspendiert, mit 25µL Lysozymlösung versetzt und für exakt 45s bei 95°C inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10min bei 12.000xg und RT, anschließend wurde das erhaltene Pellet verworfen. Nach Zugabe von 50µL Natriumacetat und 500µL 100% Ethanol wurde für 15min bei 12.000xg und RT zentrifugiert, um die DNA zu fällen. Der Überstand wurde dekantiert und die DNA mit 500µL 70% Ethanol (-20°C)

gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet im Wasserbad (37°C) für 15min getrocknet und in 50µL TE-Puffer resuspendiert. Die erhaltene DNA konnte anschließend für den analytischen Restriktionsverdau eingesetzt werden.

2.2.1.9 Plasmid Minipräparation (NucleoSpin Plasmid)

Lösungen: Resuspensionspuffer A1, Lysepuffer A2, Neutralisierungspuffer A3, Waschpuffer AW, Elutionspuffer AE (5mM Tris-HCl, pH 8.5), Ethanol (100%)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen für Sequenzierungen wurde das NucleoSpin Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben genutzt. 1,5mL der Bakterienkultur, die zuvor die Express Plasmid Minipräparation und den analytischen Restriktionsverdau durchlief, wurden für 30s bei 11.000xg pelletiert und der Überstand entfernt. Nach Resuspension mit 250µL Puffer A1 und Zugabe von 250µL Puffer A2 wurde das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert und für 5min bei RT inkubiert, wodurch die Bakterien lysiert wurden. Die Fällung erfolgte mittels Zugabe von 300µL Puffer A3. Es wurde für 5min bei 11.000xg zentrifugiert, um das Lysat zu reinigen, anschließend wurde es auf eine Säulenmatrix aufgetragen und für 1min bei 11.000xg zwecks Bindung der DNA zentrifugiert. Die Säule wurde durch Zugabe von 500µL Puffer AW und 600µL Puffer A4 sowie jeweils Zentrifugation für 1min bei 11.000xg gewaschen. Zum Trocknen der Säule wurde 2min bei 11.000xg zentrifugiert. Die DNA wurde mit 50µL Puffer AE für 1min bei RT inkubiert und durch Zentrifugation für 1min bei 11.000xg eluiert.

2.2.1.10 Dephosphorylierung

Lösungen: Dephosphorylierungspuffer (10x, 0,5M Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0), alkalische Phosphatase (Boehringer, Mannheim)

Um die Religation von Zielvektoren zu verhindern wurden nach dem Restriktionsverdau die Phosphatreste am 5'-Ende entfernt. Zur verdauten DNA (60µL) wurden 10µL 10x Dephosphorylierungspuffer, 2µL alkalische Phosphatase sowie 28µL H₂O hinzugefügt und für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze durch Phenol-Chloroform-Extraktion (vgl. Kap. 2.2.1.7) von Phosphatase und Restriktionsenzymen gereinigt.

2.2.1.11 Ligation

Lösungen: Ligationspuffer (10x, 660mM Tris-HCl, 50mM MgCl₂, 10mM Dithioerythrol, 10mM ATP, pH 7.5), T4-Ligase (Boehringer, Mannheim)

Während der Ligation können Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente, die mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurden, verbunden werden. Dies dient z.B. dem Zusammenführen von PCR-Produkten (*insert*) mit linearisierten Zielvektoren. Die Volumina wurden so gewählt, dass die Konzentration der *insert*-DNA etwa 10x so hoch war wie die Konzentration des Zielvektors. In einem Gesamtvolumen von 20µL wurden 2µL 10x Ligationspuffer sowie 1µL T4-Ligase eingesetzt und über Nacht bei 11°C inkubiert. 4µL des Ligationsansatzes wurden am nächsten Tag zur Elektrottransformation genutzt.

2.2.1.12 Elektrottransformation

Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue MRF wurden auf einer LB-Agarplatte mit Tetracyclin (12,5µg/mL) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend wurde eine Kolonie dieser Platte in 50mL LB-Medium über Nacht bei 250rpm und 37°C inkubiert. 10mL dieser Vorkultur wurden zum Animpfen von 1L LB-Medium genutzt und für 3-5h bei 250rpm und 37°C inkubiert. Bei einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,6-0,7 war die optimale Wachstumsphase der Kultur erreicht. Die Zellen wurden schrittweise für 15min bei 4.000xg und 4°C pelettiert und das Pellet in 1L, 500mL, 250mL und 4mL eiskalter 10% Glycerinlösung resuspendiert. Die Bakterien wurden in 50µL-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten bei -80°C gelagert sowie für die Elektrottransformation genutzt werden.

Zur Elektrottransformation wurden die Bakterien auf Eis langsam aufgetaut. 4µL eines Ligationsansatzes bzw. 4µL 1:300 verdünnter Plasmid-DNA wurden zu den kompetenten Zellen gegeben und für 1min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in einer vorgekühlten Küvette einer Spannung von 2,5kV ausgesetzt. Anschließend wurde 1mL LB-Medium hinzugefügt und für 1h bei 250rpm und 37°C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden schließlich auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (1:1.000) ausplattiert.

2.2.1.13 Plasmid Maxipräparation (NucleoBond PC500)

Lösungen: Resuspensionspuffer S1 (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100µg/mL RNase A, pH 8.0), Lysepuffer S2 (200mM NaOH, 1% SDS), Neutralisierungspuffer S3 (2,8M KAc,

pH 5.1), Equilibrierungspuffer N2 (100mM Tris, 15% Ethanol, 900mM KCl, 0,15% TritonX-100, pH 6.3), Waschpuffer N3 (100mM Tris, 15% Ethanol, 1,15M KCl, pH 6.3), Elutionspuffer N5 (100mM Tris, 15% Ethanol, 1M KCl, pH 8.5), Isopropanol, Ethanol (70%), TE-Puffer (pH 8.0)

Zur Herstellung größerer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde das NucleoBond PC500-Kit (Macherey-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben genutzt. Die Bakterien wurden elektrotransformiert, eine Stunde präinkubiert, anschließend 100µL in 500mL LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (1:1.000) gegeben und über Nacht bei 250rpm und 37°C inkubiert. Je 250mL der Kultur wurden am nächsten Tag in ein Zentrifugenröhrchen im vorgekühlten SLA1500-Rotor für 15min bei 6.000xg und 4°C zentrifugiert, um den Überstand zu verwerfen und die Bakterienpellets in 12mL Puffer S1 zu resuspendieren. Nach Überführung in SS-34 Zentrifugenröhrchen wurden 12mL Puffer S2 hinzugefügt, mehrfach invertiert und 3min bei RT inkubiert, um die Bakterien zu lysieren. Es wurden 12mL Puffer S3 dazu gegeben, mehrfach invertiert und 5min auf Eis inkubiert, um das Lysat zu fällen. Danach wurde für 40min bei 12.000xg und 4°C zentrifugiert. Die Äquilibration der Säulen erfolgte mit je 6mL Puffer N2, währenddessen wurde der Überstand der letzten Zentrifugation durch einen vorgefeuchteten Filter gegeben und danach auf die Säulen aufgetragen, um die DNA zu binden. Die Säulen wurden mit 32mL Puffer N3 gewaschen und die DNA anschließend mit 15mL Puffer N5 eluiert. Die DNA wurde mit 11mL Isopropanol gefällt, für 30min bei 15.000xg und 4°C pelletiert und unter Zugabe von 70% Ethanol für 10min bei 15.000xg und RT gewaschen. Das erhaltene DNA-Pellet wurde schließlich im 42°C-Wasserbad getrocknet und in 500µL TE-Puffer resuspendiert. Die DNA-Konzentration konnte am darauffolgenden Tag bestimmt werden.

2.2.1.14 Konzentrationsbestimmung von DNA

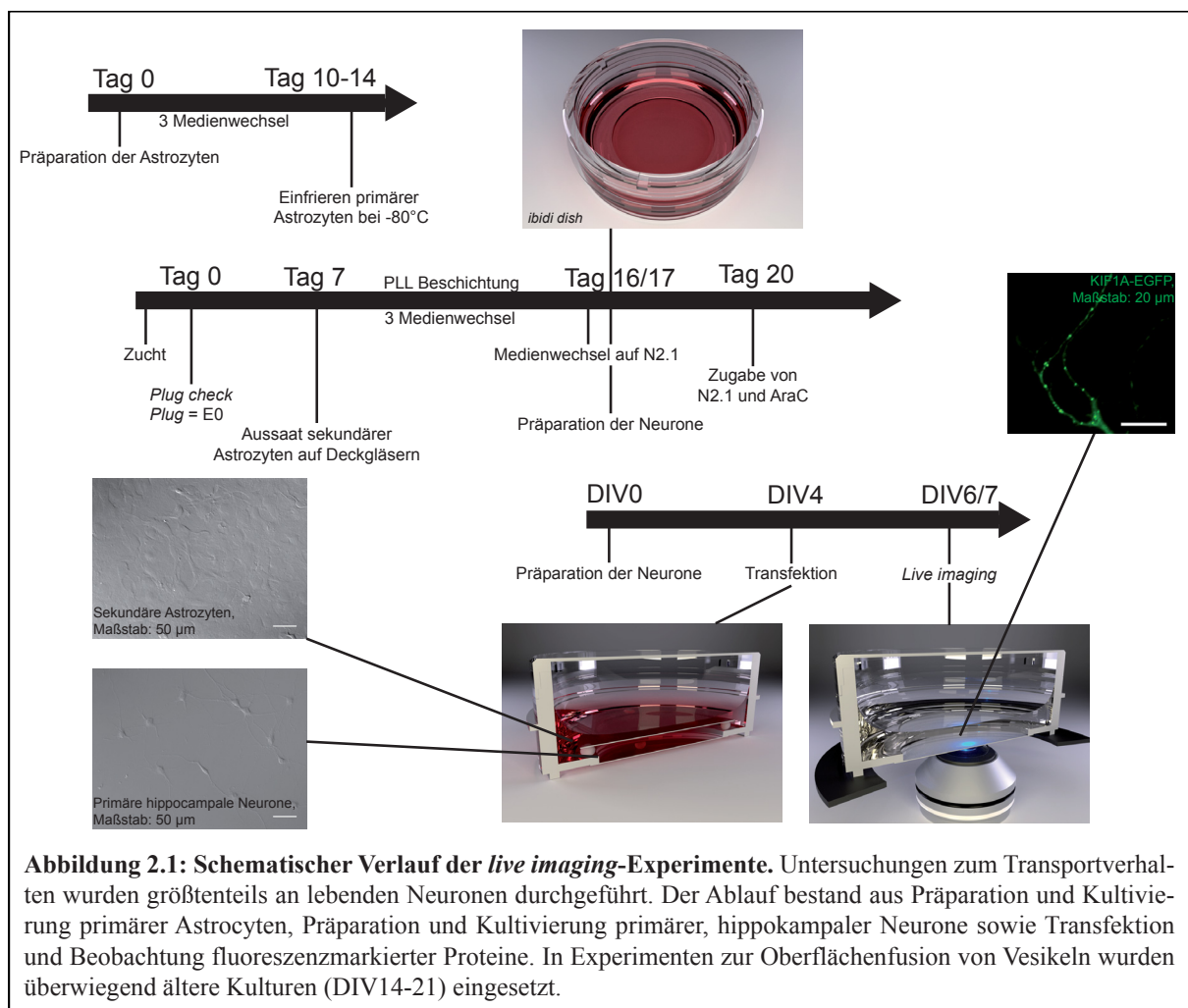
Die Konzentration einzel- bzw. doppelsträngiger DNA in Lösung wurde in einem Spektralphotometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen. In einer Küvette wurden in 60µL Gesamtvolumen 3µL Probe verdünnt und die Absorptionen bei 260nm und 280nm im Vergleich zum Leerwert gemessen. Für einzelsträngige DNA berechnet sich die Konzentration gemäß $1 A_{260} = 36\mu\text{g/mL}$ und für doppelsträngige DNA $1 A_{260} = 50\mu\text{g/mL}$. Der Quotient der Absorptionen A_{260}/A_{280} diente der Identifizierung möglicher Kontamination durch Proteine. Ein Wert von 2,0 entspricht 100% DNA, je geringer dieser Wert, desto höher die Proteinkontamination. Es wurden nur Proben mit einem Absorptionsquotienten 1,8 bis 2,0 verwendet.

2.2.1.15 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

DNA-Sequenzierungen wurden durch die Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Für Plasmid-DNA wurde eine Konzentration von 30-100ng/μL benötigt, mitgesandte Primer mussten eine Konzentration von 10pmol/μL aufweisen. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit der Lasergene-Software (DNASar, Madison, WI, USA) ausgewertet.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Maßgeblicher Bestandteil der Methoden der vorliegenden Arbeit war die Präparation und Kultivierung primärer Astrozyten, primärer hippocampaler Neurone sowie die transiente Transfektion fluoreszenzmarkierter Proteine und die Beobachtung dieser Proteine in lebenden Neuronen. Der zeitliche Ablauf dieser Experimente ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt und in den nachfolgenden Kapiteln (vgl. Kap. 2.2.2.1 bis 2.2.2.3 und 2.2.3.4) beschrieben.



2.2.2.1 Präparation und Kultivierung primärer Astrozyten

(modifiziert nach (Kaech & Banker, 2006))

Die Astrozyten wurden aus den Kortizes junger Mäuse (P1-3) isoliert. Dazu wurde der Schädel der Mäuse von der dorsalen Seite aus geöffnet, die Kortizes vom übrigen Gehirn getrennt, nach Entfernen der Meningen zerkleinert und in 12mL 1x HBSS (*Hank's balanced salt solution*) gesammelt. Es erfolgte ein enzymatischer Verdau mit 1,5mL 0,25% Trypsin

und 1,5mL 1% DNase für 15min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5mL *horse serum* beendet. 12mL des Mediums wurden, möglichst ohne Hirngewebe, abgenommen und durch einen sterilen Zellenfilter (Porengröße 70µm) filtriert. Die Gewebestücke wurden mittels zweier silikonisierter Pasteurpipetten, die zweite auf den halben Durchmesser (ca. 1,5mm) reduziert, trituriert. Anschließend wurde die Suspension über den Zellenfilter wieder mit dem zuvor entfernten Medium vereint. Es folgte eine Zentrifugation für 10min bei 1.000rpm und RT, um die Zellen zu pelletieren. Diese wurden in 15mL Glial MEM* resuspendiert, die Zellzahl durch Zählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und entsprechend 4.500.000 Zellen pro T75-Zellkulturflasche (600 Zellen/mm²) ausplattiert. Die Astrozyten wurden im Inkubationsschrank bei 37°C, 5% CO₂ in Glial MEM* kultiviert. Am Tag nach der Präparation sowie anschließend alle 3-4 Tage erfolgte ein Medienwechsel. Beim Erreichen von nahezu 100% Konfluenz (10-12 Tage) wurden die Zellen mit 3mL PBS gewaschen, mit 3mL 0,25% Trypsin/EDTA für 5min bei 37°C von der Kulturfläche gelöst und in jeweils 3mL *horse serum* gesammelt. Hierbei wurden bis zu 3 Kulturen zusammengefügt. Die Astrozyten wurden durch Zentrifugation für 10min bei 1.000rpm und RT pelletiert und in Glial MEM* (1,35mL pro Kultur) resuspendiert. Die Zellen wurden auf Kryovials aufgeteilt (entsprechend 1 Kryovial pro T75-Kulturflasche) und nach Zugabe von 150µL DMSO bei -80°C (-1°C/min) eingefroren. Die Herstellung der Kryokulturen garantierte einerseits einen Vorrat benötigter Astrozyten und verringte zudem den Anteil der Mikroglia.

Für den Einsatz bei der Kultivierung primärer Neurone wurden die Kryokulturen bei 37°C aufgetaut und in 15mL *horse serum* gegeben. Durch Zentrifugation für 6min bei 1.000rpm und RT wurden die Astrozyten pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10mL Glial MEM* resuspendiert und 55.000 Zellen pro *well* (12-*wellplate*) ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und am Tag vor der Präparation primärer Neurone gegen 1mL N2.1 ausgetauscht.

2.2.2.2 Präparation und Kultivierung primärer hippokampaler Neurone

(modifiziert nach (Kaech & Banker, 2006))

Primäre Neurone wurden auf Poly-L-Lysin (PLL) beschichteten Deckgläsern ausplattiert. Die Deckgläser wurden 30-40 Stunden in 70% Salpetersäure gereinigt, für 2x 1h und 2x 30min in *Aqua dest.* gewaschen und anschließend für 2 Stunden bei 80°C getrocknet. Danach wurden sie über Nacht bei 225°C gebacken. Die Beschichtung mit PLL (1mg/mL in Boratpuffer) erfolgte innerhalb von etwa 18 Stunden, danach wurden die Deckgläser 2x 1h mit sterilem

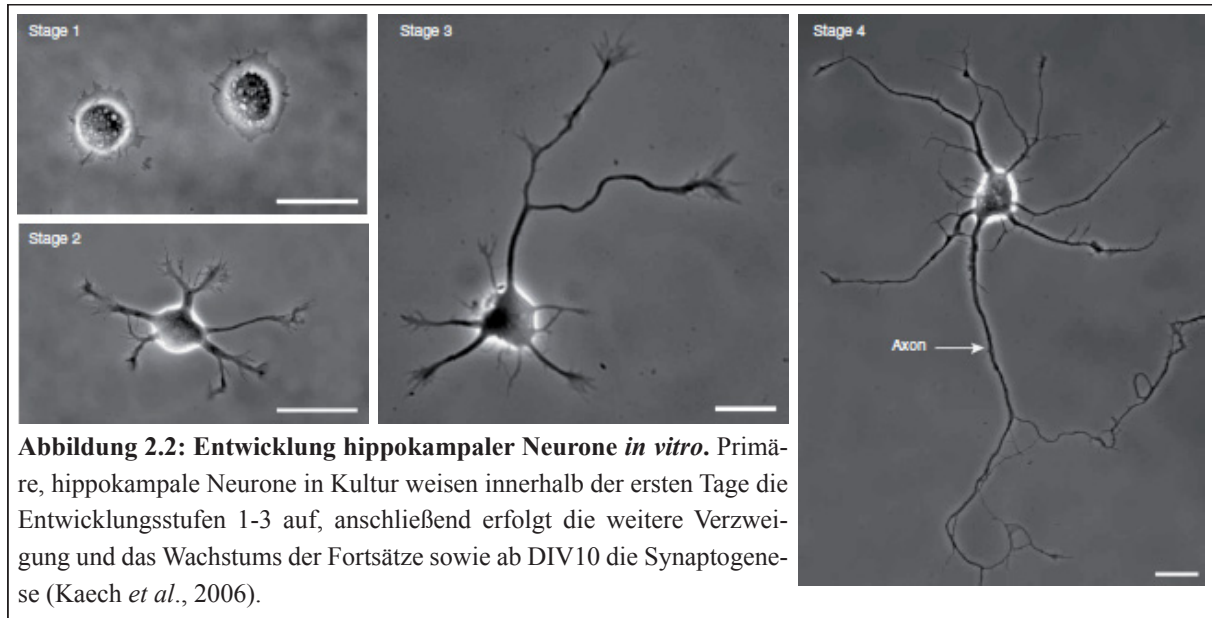
Wasser gewaschen und bis zur Verwendung bei 37°C gelagert, wobei die Deckgläser nach der Beschichtung nicht mehr austrocknen sollten. Unmittelbar vor der Präparation wurde das Wasser gegen Ausplattiermedium getauscht.

Die Neurone wurden aus den Hippokampi embryonaler Mäuse (E17.5) isoliert. Zur Präparation des Hippocampus wurde der Schädel der Tiere von dorsaler Seite geöffnet, die Kortizes abgetrennt und die Meningen entfernt, dann konnten die Hippokampi herauspräpariert werden. Nach Entfernung des *Gyrus dentatus* wurden die Hippokampi in 1x HBSS gesammelt (für später eingesetzte Kokulturen wurde der *Gyrus dentatus* nicht entfernt). Nach Präparation aller Hippokampi wurde das HBSS gegen 4,5mL neuen HBSS ausgetauscht und 0,5mL 2,5% Trypsin für den enzymatischen Verdau für 15min bei 37°C hinzugefügt. Danach wurde 3x mit HBSS gewaschen, die Zellen mittels zweier Pasteurpipetten trituriert und das Medium entsprechend der Anzahl der präparierten Tiere aufgefüllt (1mL pro Tier). Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Neurone entsprechend 150.000 Zellen pro 6cm Petrischale (50-100 Zellen/mm²) auf je 5 vorbereitete Deckgläser ausgesät. Nach 4 Stunden waren die Zellen adhärent und die Deckgläser konnten umgedreht zu den sekundären Astrozytenkulturen gegeben werden, wodurch die Neurone mit Nährstoffen versorgt wurden und eine längere Überlebensdauer aufwiesen. Zudem war die räumliche Trennung von Astrozyten und Neuronen bei späteren immunozytochemischen Färbungen (vgl. Kap. 2.2.3.1) und beim *live imaging* (vgl. Kap. 2.2.3.4) von Vorteil.

Die Zellen wurden im Inkubationsschrank bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Neurone aus Embryonen dieser späten Phase (E17.5) sind überwiegend postmitotisch, um das Wachstum glialer Zellen zu inhibieren wurde am dritten Tag in Kultur (DIV3, *day in vitro*) 5µM AraC pro *well* dazugegeben. Nachdem die Neurone ausplattiert wurden, bilden sich Fortsätze (*Stage 1*), welche nach kurzer Zeit zu wachsen beginnen (*Stage 2*). Nach ein oder zwei Tagen setzt an einem der Neuriten ein schnelleres Wachstum ein, welches sich zum Axon ausbildet (*Stage 3*), wohingegen die anderen Neuriten ihre Größe kaum verändern, sich kurz darauf jedoch zu verzweigten Dendriten entwickeln (*Stage 4*). Synaptogenese beginnt etwa ab DIV10-12, ab DIV14 lassen sich ausgebildete Synapsen finden ((Dotti *et al.*, 1988; Fletcher & Banker, 1989), vgl. Abb. 2.2)

Für *live imaging*-Experimente hingegen wurden sekundäre Astrozyten auf PLL-beschichtete Deckgläser und hippokampale Neuronen mit einer Dichte von 150.000 Zellen pro *ibidi dish* (ca. 400 Zellen/mm²) ausplattiert. Ansonsten verlief die Präparation und Kultivierung entsprechend den angegebenen Standards. In Abhängigkeit von den geplanten Experimenten wurden die Zellen in N2.1 Medium (Experimente bis DIV7) oder B27 Medium (Experimente

DIV 10 bis DIV21) kultiviert. Die geringe Dichte der Neurone lieferte einige Vorteile, so war es möglich, einzelne Neurone zu verfolgen und aufgrund der nahezu zweidimensionalen Struktur konnten dynamische Prozesse optimal beobachtet werden (Kaech *et al.*, 2012).



2.2.2.3 Transfektion primärer hippocampaler Neurone

(modifiziert nach (Dresbach *et al.*, 2003))

Primär kultivierte Neurone wurden zwecks Expression von meist fluoreszenzmarkierten Proteinen transfiziert. Die Transfektion erfolgte bei jungen Neuronen (DIV4-5) nach der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode, bei älteren Kulturen (bis DIV19) wurden Transfektionen mittels Lipofectamine 2000 durchgeführt.

Am Tag vor der Transfektion wurde dem Kulturmedium der Neurone 500µL/*well* N2.1 hinzugefügt. Zur Transfektion wurden entsprechend 500µL konditioniertes Medium und die Deckgläser mit den Zellen auf eine neue Platte überführt. Der Transfektionsmix (pro 500µL Medium) bestand aus H₂O (entsprechend auf 30µL Gesamtvolumen vorgelegt), 1µg DNA, 1,87µL 2M CaCl₂ (mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, bis eine homogene Lösung vorlag) sowie 15µL Transfektionspuffer, welcher tropfenweise über einem Vortexer (600rpm) hinzugefügt wurde. Es erfolgte eine Inkubation für 20min bei RT im Dunkeln, während der sich die Präzipitate ausbildeten. Anschließend wurden 30µL zu jedem *well* gegeben und die Zellen für 1h bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung des Präzipitats wurden die Zellen danach 2x mit je 1mL Neurobasalmedium gewaschen. Schließlich wurden die Neurone wieder im ursprünglichen Medium kultiviert. Je nach Plasmid wurden die Zellen nach 2, 7 oder 14

Tagen fixiert (4% PFA/PBS für 10 min bei RT) und ggf. immunozytochemisch gefärbt (vgl. Kap. 2.2.3.1).

Für *live imaging*-Experimente wurden gemäß der oben beschriebenen Kultivierung die Deckgläser mit Astrozyten temporär entfernt und 500µL Medium bei den Neuronen in den *ibidi dishes* belassen. Darüber hinaus erfolgte die Transfektion nach der bereits beschriebenen Methode. Nach einstündiger Inkubation wurden die Zellen 2x mit je 1mL Neurobasalmedium gewaschen, bevor die Neurone wieder mit 2mL Medium und den Astrozyten kultiviert wurden. Die Messungen erfolgten 2-3 Tage nach Transfektion.

Ältere Kulturen wurden für *live imaging*-Experimente mit Lipofectamine 2000 transfiziert, da die Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode zu späteren Zeitpunkten eine geringe Transfektionseffizienz hervorbrachte. Zunächst wurden pro *ibidi dish* 100µL Neurobasalmedium mit 6µL Lipofectamine vermischt, für 5min inkubiert und anschließend in weitere 100µL Neurobasalmedium mit 1µg DNA überführt. Der Transfektionsmix wurde für 20min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Deckgläser mit den Astrocyten wurden temporär entfernt und das Medium auf den Neuronen gegen 500µl vorgewärmtes Neurobasalmedium ausgetauscht, bevor der Transfektionsmix für 30min auf die Zellen gegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen 2x mit je 1mL Neurobasalmedium gewaschen und die Deckgläser mit den Astrozyten wieder über den Neuronen plaziert. Nach 2-3 Tagen erfolgten die weiteren Experimente.

2.2.2.4 Kultivierung der Zelllinien HEK-TsA201, N2A und Cos-7

Humane, embryonale Nierenzellen (HEK-TsA201, (Graham *et al.*, 1977)), Neuroblastoma-Zellen aus der Maus (N2A, (Schubert *et al.*, 1969)) und aus Nierengewebe von *Cercopithecus aethiops* gewonnene Zellen (Cos-7, (Gluzman, 1981)) früherer Passagen wurden bei -80°C gelagert. Um eine neue Kulturreihe zu beginnen, wurden Kryokulturen kurz bei 37°C aufgetaut, in Kulturmedium gelöst und auf 10cm Kulturschalen ausplattiert. Die Kultivierung erfolgt im Inkubationsschrank bei 37°C, 5% CO₂. Am Tag nach der Aussaat der Zellen erfolgte ein Medienwechsel.

Zur Erhaltung der Zelllinien wurden nahezu konfluente Kulturen (HEK/N2A: 10-20 Mio. Zellen; Cos: 3-6 Mio. Zellen) alle 3-4 Tage subkultiviert. Hierzu wurde das Medium entfernt, HEK/N2A-Zellen wurden für mehrere Minuten bei RT mit 0,25% 1x Trypsin-EDTA (3mL pro 10cm Kulturschale) gelöst, Cos-Zellen wurden zuvor 2x mit PBS (3mL pro 10cm Kulturschale) gewaschen und die Trypsinisierung erfolgte im Inkubationsschrank. Durch Zugabe von 6mL Kulturmedium wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen mittels

Zentrifugation für 5min bei 1.200rpm und RT pelletiert. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und 1:20 (HEK/N2A) bzw. 1:10 (Cos) ausplattiert. Für Transfektionen wurden 500.000 (6cm Kulturschale) bis 1,4 Mio. (10cm Kulturschale) HEK/N2A-Zellen bzw. 500.000 Cos-Zellen (10cm Kulturschale) genutzt.

Für die Langzeitlagerung wurden Zellen gemäß dem beschriebenen Protokoll gelöst und pelletiert, jedoch in 10mL Kultur-/Gefriermedium (1:1) resuspendiert. Anschließend wurden 1mL-Aliquots hergestellt und bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag konnten die gefrorenen Zellen für eine längere Verwahrung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.2.2.5 Transfektion von HEK-TsA201, N2A- und Cos-7-Zellen

Transfektionen von HEK-, N2A- und Cos-Zellen dienen der Expression fluoreszenzmarkierter Proteine zur Untersuchung unter dem Mikroskop.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen entsprechend den oben angegebenen Protokollen ausplattiert. Dadurch konnte die Transfektion bei einer Konfluenz von 40-60% durchgeführt werden, was eine bessere Aufnahme der DNA zur Folge hatte. Für HEK- und N2A-Zellen bestand der Transfektionsmix (für 6cm/10cm Kulturschalen) aus 3µg/8,4µg DNA, 240µL/672µL CaCl₂ (250mM) und 250µL/700µL Transfektionspuffer, welcher tropfenweise hinzugefügt wurde. Nach leichtem Mischen erfolgte eine Inkubation für 15min bei RT im Dunkeln. Anschließend wurde der Transfektionsmix vollständig auf die Zellen gegeben. Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium von transfizierten HEK-/N2A-Zellen durch 2% FCS-haltiges Medium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit PFA fixiert und ggf. immunozytochemisch gefärbt (vgl. Kap. 2.2.3.1).

Die Transfektion von Cos-Zellen erforderte einen Transfektionsmix bestehend aus 1,65mL 2x TBS, 1,25mL sterilem Wasser, 66µL DNA (0,1µg/µL) sowie 330µL DEAE. Die Zellen wurden 2x mit 6mL vorgewärmtem 1x TBS gewaschen sowie in Gegenwart des Transfektionsmixes für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, durch 10mL Medium mit 100µM Cloroquin ersetzt und für 3h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium erneut entfernt und die Zellen mit Kulturmedium versorgt. 2-3 Tage nach Transfektion erfolgten die weiteren Experimente.

2.2.3 Zytochemische Methoden

2.2.3.1 Fixierung und immunozytochemische Färbung

Zur Darstellung endogener Proteine wurden primäre Neurone fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern immunozytochemisch gefärbt. Die Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd (PFA) und 4% Saccharose in PBS für 10min bei RT fixiert. Nach drei Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen mit 0,3% Triton-X100 in PBS für 10min permeabilisiert. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen, die anschließende Blockierung mit 5% *normal goat serum* (NGS) für 30min diente der Vermeidung unspezifischer Bindungen. Primäre Antikörper (verdünnt in NGS) wurden über Nacht bei 4°C unter humiden Bedingungen inkubiert. Hierbei konnten Antikörper aus verschiedenen Spezies simultan eingesetzt werden. Am nächsten Tag wurden die Zellen 5x mit PBS gewaschen und für 1h bei RT mit sekundären Antikörpern (verdünnt in NGS) inkubiert. Schließlich wurden die Zellen 5x in PBS und 1x in destilliertem Wasser gewaschen und mit DAKO *fluorescence mounting medium* auf einem Objektträger eingebettet, 30min bei RT getrocknet und konnten dann im Dunkeln bei 4°C gelagert werden. Für einzelne Antikörper (z.B. Rab11a) wurde ein abweichendes Protokoll (Vlachos *et al.*, 2009) eingesetzt. Die Zellen wurden nach der Fixierung durch 4% PFA/PBS gewaschen und für 1h mit 10% NGS in 0,1% Triton-X100/PBS inkubiert. Der primäre und sekundäre Antikörper wurden jeweils in 10% BSA in 0,1% Triton-X100/PBS verdünnt.

2.2.3.2 Oberflächenmarkierung

Bei der Markierung von membranständigen Proteinen an der Oberfläche der Zellen (*live staining*) wurde der primäre Antikörper in 500µL Medium verdünnt. Die Deckgläser mit den Neuronen wurden aus ihrem Medium entnommen und in Petrischalen 1-4h bei 37°C, 5% CO₂ mit dem primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz in 4% Saccharose/PBS gewaschen, im Weiteren erfolgte die Fixierung durch PFA, Blockierung unspezifischer Bindungen durch NGS, Inkubation mit sekundären Antikörpern und Konservierung auf Objektträgern wie bereits in Kap. 2.2.3.1 beschrieben. Eine Permeabilisierung mittels Triton-X100 fand beim *live staining* nicht statt.

2.2.3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Aufnahmen von fluoreszenzmarkierten Antikörpern bzw. der Epifluoreszenz von markierten Proteinen wurden an zwei verschiedenen Fluoreszenzmikroskopen durchgeführt. Diese waren ein Axioskop2 mit angeschlossener Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss, Jena) sowie ein

Axio Imager.Z2 mit Spot Xplorer CCD-Kamera und Apotome (Visitron, Puchheim). In beiden Fällen wurden folgende Objektive verwendet: 20x Plan-Apochromat/NA 0.75, 40x Plan-Neofluar/NA 0.75 und 63x Plan-Apochromat/NA 1.4 Oil. Die Wellenlängen von Anregungsfilter, Strahlenteiler und Emissionsfilter betragen für den eGFP-Filter: BP 470/40, FT 495, BP 525/50, für den Cy3-Filter: BP 560/40 (545/25), FT 585, BP 630/75 (605/70) und für den 647-Filter: BP 640/30 (620/60), FT 660, BP 690/50 (700/75) (alle Angaben in nm). Die verschiedenen Kanäle wurden nacheinander aufgenommen, um ein Durchscheinen zu vermeiden. Die Mikroskope wurden mit der Software AxioVision 7.4.1 bzw. VisiView 2.1.1 gesteuert. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ64 1.47a (NIH, USA), MetaMorph 7.7.2.0 (Molecular Devices, USA) sowie Adobe Photoshop CS4 11.0.1 (Adobe Systems, München).

2.2.3.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zur Beobachtung markierter Proteine in lebenden Zellen (*live imaging*) wurde ein LSM 5 Duo (Carl Zeiss, Jena) mit beheizbarer Kammer XL-LSM 051 sowie ein *spinning disc*-Axio Observer.Z1 (Visitron, Puchheim) mit Dual CCD-Kamera Orca-D2 (Hamamatsu Photonics, Herrsching) und EM CCD-Kamera 512 sowie beheizbarer Kammer XL-5 und CO₂-Zufuhr verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einem 40x Plan-Apochromat/NA 1.4 Oil Objektiv durchgeführt. Es wurden Laser für die Wellenlängen 405nm (120mW), 488nm (100mW), 532nm (75mW), 561nm (75mW) und 640nm (100mW) eingesetzt. Die Emissionsfilter waren für den eGFP-Filter: BP 500-525 und für den mCherry-Filter: BP 560-675 sowie als Strahlenteiler NFT 535, am Axio Observer.Z1 wurden Multiband-Filter mit folgenden Werten eingesetzt: 455/50, 525/50, 605/52, 700/75 (alle Angaben in nm). Bei den Messungen wurde eine Fläche von 167,9 x 167,9µm mit einer Auflösung von 512 x 512Pixel (0,3279µm/Pixel) aufgenommen. Die Kanäle wurden im „*line frame*“-Verfahren abwechselnd dokumentiert, unter Einsatz der Orca-D2 Kamera war eine simultane Aufnahme von zwei Kanälen möglich. Es wurden verschiedene Parameter für die *time lapse*-Aufnahmen getestet und anschließend mit folgenden Werten gearbeitet: 6 *frames per second* (166,67msec/frame (LSM 5 Duo)), dabei 600 Zyklen mit einem Intervall von 500msec (Dauer einer Messung: 5 min). Die Auswertung erfolgte mit ImageJ64 1.47a (NIH, USA), MetaMorph 7.7.2.0 (Molecular Devices, USA) sowie Adobe Photoshop CS4 11.0.1 (Adobe Systems, München).

Es wurden erweiterte Methoden zur Beobachtung der Oberflächenfusion von Membranproteinen eingesetzt. Die verwendeten Konstrukte basierten auf modifizierten, pH-abhängigen Fluoreszenzproteinen (Miesenbock *et al.*, 1998) und dem Calciumsensor GCaMP6 (Chen *et al.*, 2013). Die Messungen wurden weitestgehend nach oben genannten

Parametern durchgeführt, jedoch mit einer höheren Frequenz (bis zu 10Hz) und über einen längeren Zeitraum (bis zu 3.000 *time points*). Zu Beginn wurde z.T. mittels des 405nm-FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)-Lasers die Hintergrundfluoreszenz innerhalb der ROI (*region of interest*) verringert. Die Zeit pro Pixel betrug 10ms bei einem Durchmesser des Laserstrahls von 10 Pixeln. Vor Arbeiten mit dem 405nm-FRAP-Laser war eine Fokusebenen-Kalibrierung mit dem jeweils eingesetzten Objektiv notwendig. Elektrische Stimulation durch parallele Platinelektroden wurde mittels Isolated Pulse Generator 2100 (A-M Systems, Carlsborg, USA) und Stimulus Isolator A385 (World Precision Instruments, Berlin) durchgeführt. Es wurden 1 bis 16 AP *trains* mit 50 Aktionspotentialen zu 50Hz eingesetzt.

2.2.3.5 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Bilder von fixierten Zellen wurde primär ImageJ64 verwendet, die Analyse der *live imaging*-Aufnahmen wurden überwiegend mit MetaMorph durchgeführt. Die Unterscheidung zwischen Axonen und Dendriten erfolgte aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie. Mit dem *Multi Line Tool* (MetaMorph) wurden Ausläufer der Zellen markiert, für mehrere aufgenommene Kanäle wurden so voneinander unabhängige Kymographen erstellt, anhand derer die Kinetik von Vesikeln berechnet werden konnte. Um nur vitale Neurone zu verwenden, wurden jene nicht in die Auswertung einbezogen, die keine Vesikelbewegung aufwiesen. Darüber hinaus wurden zur Pausenberechnung die Vesikel ausgeschlossen, die während der Messungen keine Beweglichkeit zeigten. Bei einer Geschwindigkeit von mehr als 0,10 $\mu\text{m/s}$ wurde der Messbereich als mobile Phase betrachtet, bei einer Geschwindigkeit von weniger als 0,10 $\mu\text{m/s}$ als immobile Phase. In allen Untersuchungen wurden Daten aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten erhoben. Zur statistischen Überprüfung wurde Prism4 (GraphPad Software) genutzt, es wurde eine Normalverteilung der Werte angenommen und mittels t-Test auf Signifikanz ($P < 0,05$ signifikant, $P > 0,05$ nicht signifikant (n.s.)) überprüft. Werte in grafischen Darstellung sind als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*) zu verstehen, wenn nicht anders angegeben. Zur Auswertung von Veränderungen der Fluoreszenzintensität wurde das Hintergrundsignal abgezogen und normalisiert ($= \Delta F/F_0$). Hierbei wurde die Region für den Hintergrund in Größe und Form der *region of interest* angepasst.

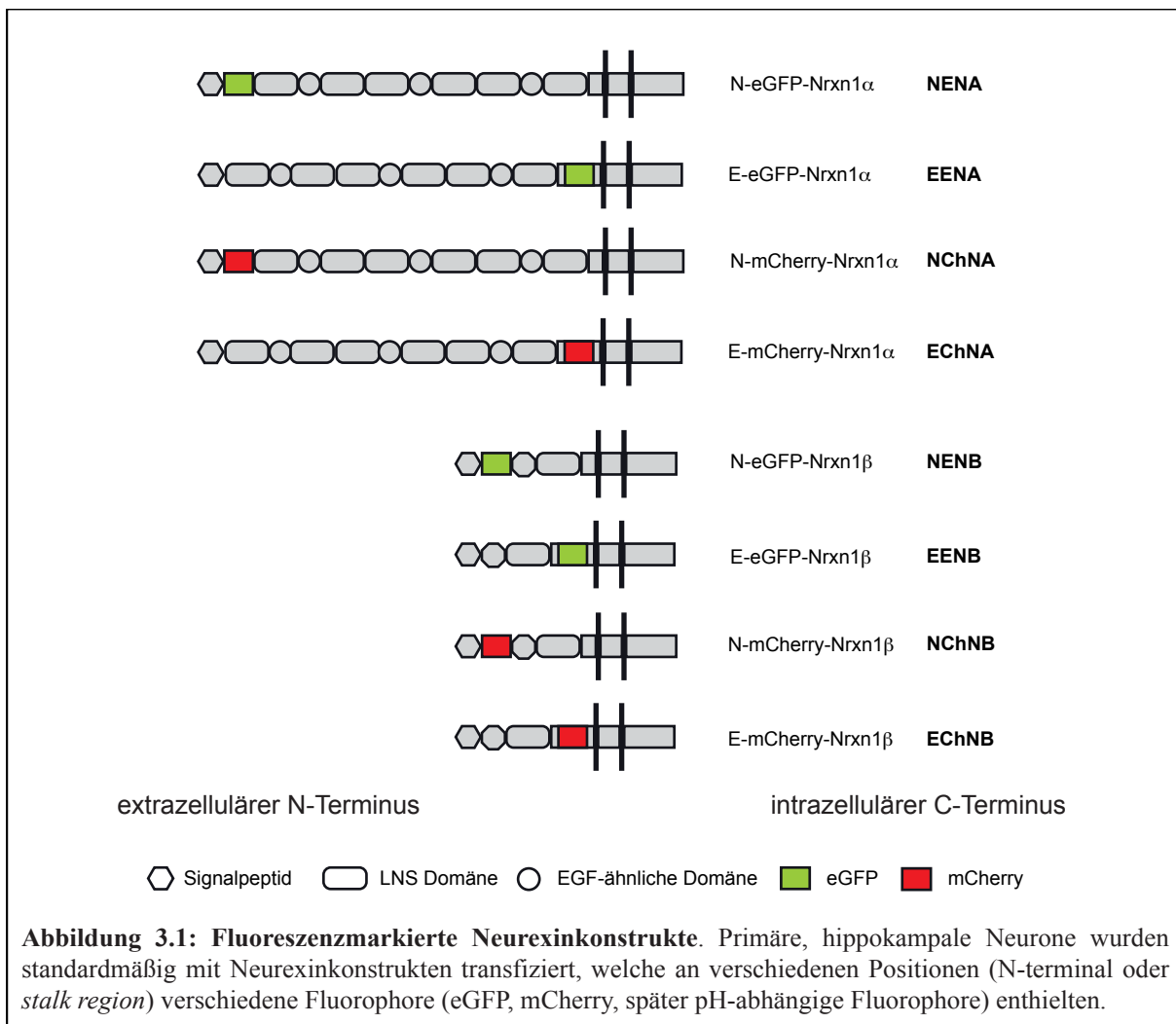
3. Ergebnisse

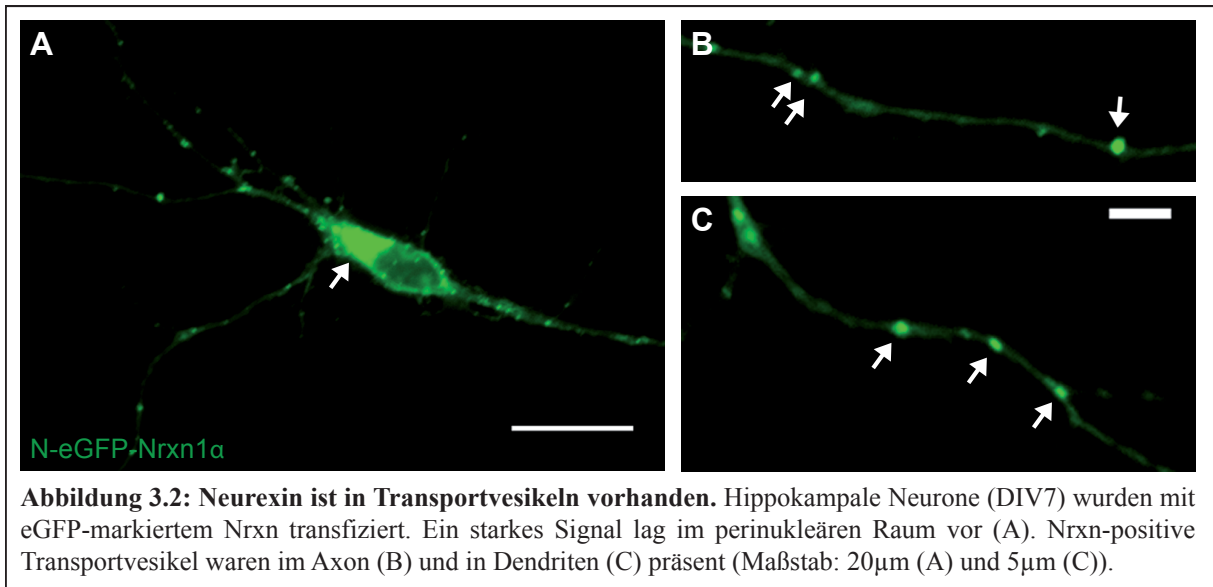
In der vorliegenden Arbeit sollten die Eigenschaften des intrazellulären Transports von Nrnx untersucht werden. Nrnx ist ein präsynaptisch lokalisiertes Transmembranprotein. Durch die Bildung eines heterologen, transsynaptischen Komplex mit dem Bindungspartner Nlgn ist Nrnx beteiligt an Synaptogenese und synaptischer Funktion. Nrnx zählt neben Nlgn und Shank zu den etablierten Proteinen, die an ASD-assoziierten Krankheiten beteiligt sind. Die Mutationen in diesen Proteinen bewirken Störungen in der Expression und im Transport, was möglicherweise eine Imbalance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Kontakten hervorruft (Chih *et al.*, 2004; Comoletti *et al.*, 2004; Reissner *et al.*, 2013; Südhof, 2008). Im Gegensatz zum Transport von Nlgn (Rosales *et al.*, 2005; Schapitz *et al.*, 2010) ist über den Transport von Nrnx nur wenig bekannt (vgl. Kap. 1.4). In vorangegangenen Studien wurden ausschließlich fixierte Neurone genutzt (Fairless *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Thema erstmals an lebenden Zellen untersucht. Daher musste ich zunächst eine verlässliche Methodik zur Beobachtung von Transportprozessen finden (vgl. Kap. 2.2.3.4 und 3.1). Daraufhin habe ich wie nachfolgend beschrieben die Art und Dynamik von Transportvesikeln (vgl. Kap. 3.1 und 3.2), deren Abhängigkeit vom neuronalen Zytoskelett und synaptischer Aktivität (vgl. Kap. 3.3) sowie die Interaktion mit Motorproteinen (vgl. 3.4) analysiert. Schließlich habe ich begonnen die Fusion der Vesikel mit der Zellmembran zu untersuchen, um intrazellulären Transport und Funktion an der Zelloberfläche in Relation zueinander setzen zu können (vgl. Kap. 3.5).

3.1 Charakterisierung Nrnx-positiver Transportvesikel

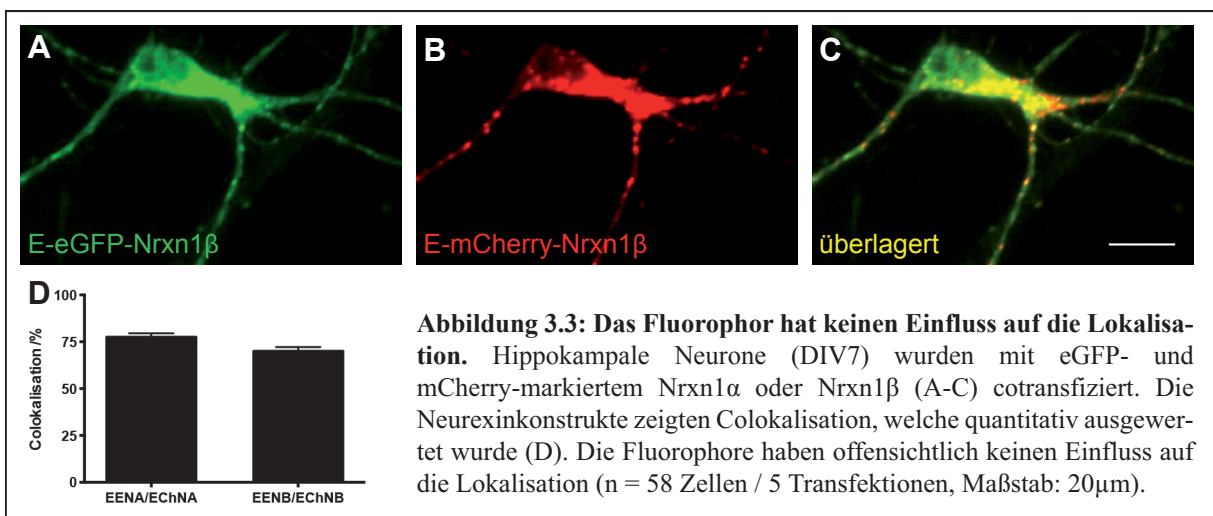
Untersuchungen zum intrazellulären Transport von Nrnx wurden durch transiente Überexpression (DIV4-19, vgl. Kap. 2.2.2.3) von fluoreszenzmarkierten Neurexinen in primären, hippocampalen Neuronen durchgeführt. Dieses Verfahren wurde gewählt, da keine α/β -spezifischen Nrnx-Antikörper existieren und die fluoreszenzmarkierten Proteine Experimente an lebenden Zellen (*live imaging*, vgl. Kap. 2.2.3.4) ermöglichen. Diese Methodik hat den Vorteil, dass Aggregation von eGFP und dessen Derivate zu vernachlässigen sind, da die gebildeten Aggregate vornehmlich statisch sind. Das Fluorophor mCherry wurde in Neurexinen zusätzlich verwendet, da es die Analyse von Coexpressionen mit eGFP-markierten Proteinen zulässt und mCherry eine höher entwickelte Variante ist, welche als Monomer vorliegt und weniger aggregiert. Spätere Experimente wurden darüber hinaus mit pH-abhängig fluoreszierenden pHluorin- und pHTomato-Neurexinen durchgeführt.

Die Beobachtung der Verteilung von Nrnx erfolgte an DIV7. Zu diesem Zeitpunkt existieren in primären Neuronenkulturen noch keine etablierten synaptischen Kontakte (vgl. Kap. 2.2.2.2), daher befinden sich Neurexine vor allem in transportrelevanten Strukturen. Durch Transfektionen verschieden markierter Neurexine (eGFP oder mCherry, N-terminal oder *stalk region*, vgl. Abb. 3.1) und anschließendem Vergleich des Verteilungsmusters in Neuronen (vgl. Abb. 3.2) konnte gezeigt werden, dass die Markierung von Nrnx keinen maßgeblichen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins hat. Alle eingesetzten Neurexinvarianten waren erwartungsgemäß in verschiedenen Stadien des sekretorischen *pathways* zu finden. Ein deutliches Signal wurde im perinukleären Raum gefunden, welches wahrscheinlich die Passage durch das endoplasmatische Retikulum (ER) und trans-Golgi-Netzwerk (tGN) widerspiegelt. Nrnx-positive Transportvesikel waren sowohl im Axon als auch in Dendriten vorhanden. Die Position der Fluorophore stellte sicher, dass die Markierung im extrazellulären Teil des Proteins und während des Transports innerhalb dieser Vesikel lag.





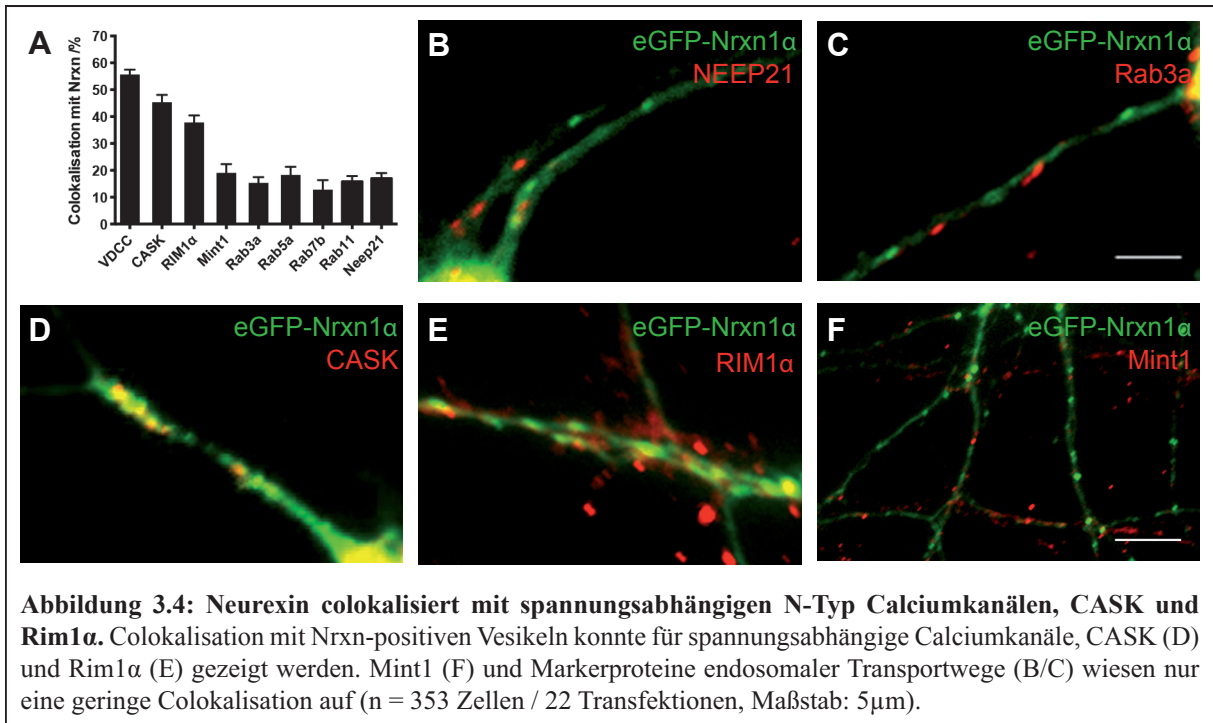
Durch Cotransfektionen verschieden fluoreszierender Nrnx1 α - oder Nrnx1 β -Konstrukte (jeweils eGFP und mCherry an identischer Position im Protein, vgl. Abb. 3.3) konnte auch quantitativ gezeigt werden, dass das Fluorophor keinen Einfluss auf die Lokalisation hat. Sowohl die eingesetzten α -Neurexine als auch die β -Neurexine colokalisierten deutlich (Nrnx1 α : 77%, Nrnx1 β : 69%, vgl. Abb. 3.3, D). Über diese Kontrollen hinaus wurde anhand von α Nrnx-triple knock outs bereits gezeigt, dass die Überexpression dieser fluoreszenzmarkierten Neurexine keinen Einfluss auf die Verteilung und die Anzahl Nrnx-positiver Markierungen hat (Fairless *et al.*, 2008). Aufgrund des identischen Verhaltens der verschieden markierten Neurexine waren die hier vorgestellten Neurexinkonstrukte geeignet für die Analyse intrazellulärer Transportprozesse. Nachfolgend konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf die Colokalisation von Nrnx mit synaptischen Proteinen, welche meistens an fixierten Zellen analysiert wurde, und auf die Bewegung der Vesikel, welche nur in lebenden Zellen gemessen werden konnte.



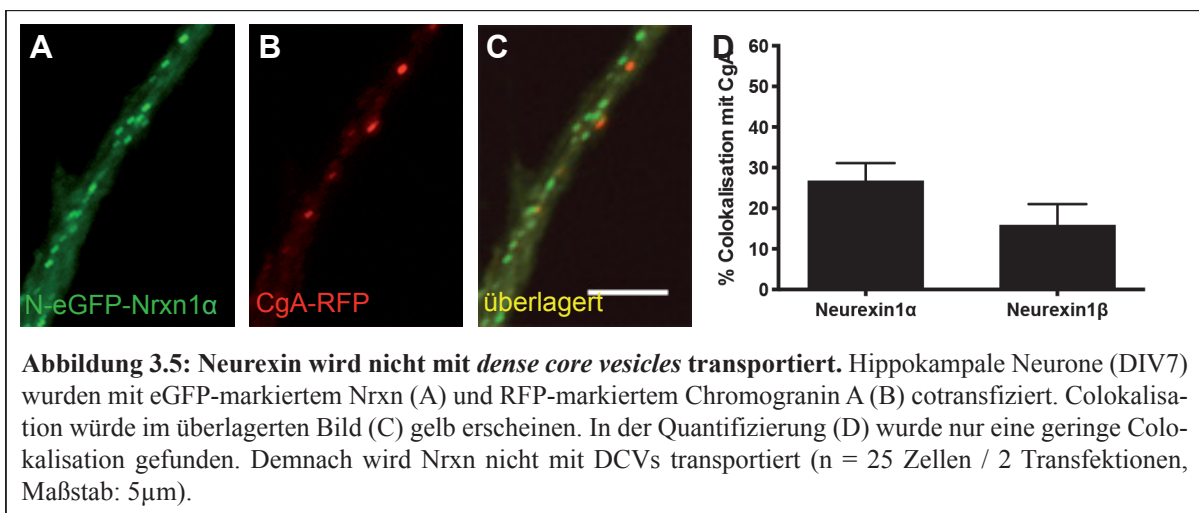
Die Entdeckung der Nrnx-positiven Transportvesikel führte direkt zu der Frage nach der Art dieser Vesikel. Intrazellulärer Transport zeichnet sich durch Vesikelklassen aus, die definierte Proteinzusammensetzungen haben, wonach sie sich neben ihrer Größe und Dichte zusätzlich klassifizieren lassen (Sytnyk *et al.*, 2004). Beispielsweise wurde für PTVs gezeigt, dass sie Bassoon, Piccolo, N-Cadherin, Syntaxin, Munc13, Munc18 und SNAP25 enthalten können (Zhai *et al.*, 2001). Synaptische Vesikel wurden mit einer Vielzahl verschiedener Proteine beschrieben (Takamori *et al.*, 2006). Daher wurde schrittweise die Colokalisation von Nrnx1 α und Nrnx1 β mit interagierenden präsynaptischen Proteinen und mit endosomalen Markerproteinen, welche für eine Vielzahl von Transportprozessen verantwortlich sind (Pfeffer & Aivazian, 2004), untersucht. Dies erfolgte zunächst durch die Transfektion der fluoreszenzmarkierten Neurexinkonstrukte und immunozytochemische Färbung gegen die entsprechenden endogenen Proteine (vgl. Kap. 2.1.5 und 2.2.3.1). Zuerst konnte die bereits publizierte Colokalisation mit spannungsabhängigen N-Typ Calciumkanälen (VDCC), CASK und RIM1 α sowie geringe Colokalisation mit Mint1 bestätigt werden (Fairless *et al.*, 2008). Anschließend wurden Markerproteine für verschiedene Kompartimente des endosomalen Transportweges untersucht. Dies waren Rab3a (*synaptic vesicle precursor*, (Coppola *et al.*, 2001)), Rab5a (frühe Endosomen, (Nielsen *et al.*, 1999)), Rab7b (Lysosomen und späte Endosomen, (Progida *et al.*, 2010)), Rab11 und NEEP21 (*neuron-enriched endosomal protein21*, Recyclingendosomen, (Steiner *et al.*, 2002)). Für keinen dieser untersuchten Marker konnte eine nennenswerte Colokalisation mit Nrnx nachgewiesen werden (vgl. Tab. 3.1 und Abb. 3.4), viel mehr ist von einer unabhängigen Lokalisation von Nrnx und den jeweils untersuchten Proteinen auszugehen. Daraus lässt sich schließen, dass der intrazelluläre Nrnx-Transport nicht auf endosomalen Mechanismen (Lasiacka & Winckler, 2011) beruht und auch die gut charakterisierten Rab3a-positiven Transportvesikel (Okada *et al.*, 1995) kommen nicht in Frage.

	VDCC	CASK	RIM1 α	Mint1	Rab3a	Rab5a	Rab7b	Rab11	NEEP21
Colok. Nrnx /%	55,7	45,3	37,8	20,7	15,7	19,5	13,2	15,7	16,9

Tab. 3.1: Colokalisation von Markerproteinen mit Nrnx (n = 353 Zellen / 22 Transfektionen)



Die präsynaptische Lokalisation von Nrnx und die Ergebnisse zu endosomalen Transportwegen führten anschließend zur Analyse vorwiegend präsynaptischer Vesikelklassen. Durch die transiente Transfektion von Nrnx und Markerproteinen wurde die Möglichkeit des Cotransportes untersucht. Zunächst wurden Nrnx und Chromogranin A cotransfiziert. Chromogranin A dient als Markerprotein für *dense core vesicles* (DCVs), welche primär Neurotrophine wie *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und Neuropeptide enthalten (Fawcett *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 2011). Es existiert nur eine geringe Colokalisation zwischen Nrnx und Chromogranin A, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass Nrnx nicht Bestandteil von DCVs ist (vgl. Abb. 3.5).



An fixierten Neuronen wurde bereits mit immunozytochemischen Färbungen gezeigt, dass kein Zusammenhang zwischen Nrnx und Bassoon besteht (Fairless *et al.*, 2008). Bassoon wird standardmäßig als Markerprotein für *piccolo-bassoon transport vesicles* (PTVs) eingesetzt. In diesen Vesikeln werden Proteine der aktiven Zone zu einem frühen Zeitpunkt der Synaptogenese zur Präsynapse gebracht (Dresbach *et al.*, 2003; Shapira *et al.*, 2003; Zhai *et al.*, 2001). Da dies eine der bedeutendsten Vesikelklassen ist, wurden Nrnx und Bassoon cotransfiziert und in ersten *live imaging*-Experimenten eingesetzt, um diesen Sachverhalt eindeutig aufzuklären. Es zeigte sich, dass sowohl Nrnx-positive Vesikel als auch PTVs in Axonen und Dendriten vorhanden und mobil waren, jedoch war nur eine geringe Colokalisation zwischen beiden Proteinen zu beobachten (vgl. Abb. 3.6). Dies steht im Einklang mit den zuvor durchgeführten Färbungen in fixierten Zellen (Fairless *et al.*, 2008). *Live imaging*-Experimente können durch Kymographen ausgewertet werden. Kymographen sind zweidimensionale Repräsentationen der Strecke gegen die Zeit (vgl. Kap. 2.2.3.5). Sie wurden für die vorhandenen Kanäle (hier: grün für eGFP-Bassoon und rot für mCherry-Nrnx) unabhängig voneinander erstellt. Abbildung 3.6 C und D zeigen Kymographen, an denen zu erkennen ist, dass zwar ein Nrnx-positives und Bassoon-positives Vesikel an der gleichen Position pausierten, beide Proteine jedoch während mobiler Phasen selten colokalisierten. Demnach konnten PTVs für den Transport von Nrnx endgültig ausgeschlossen werden.

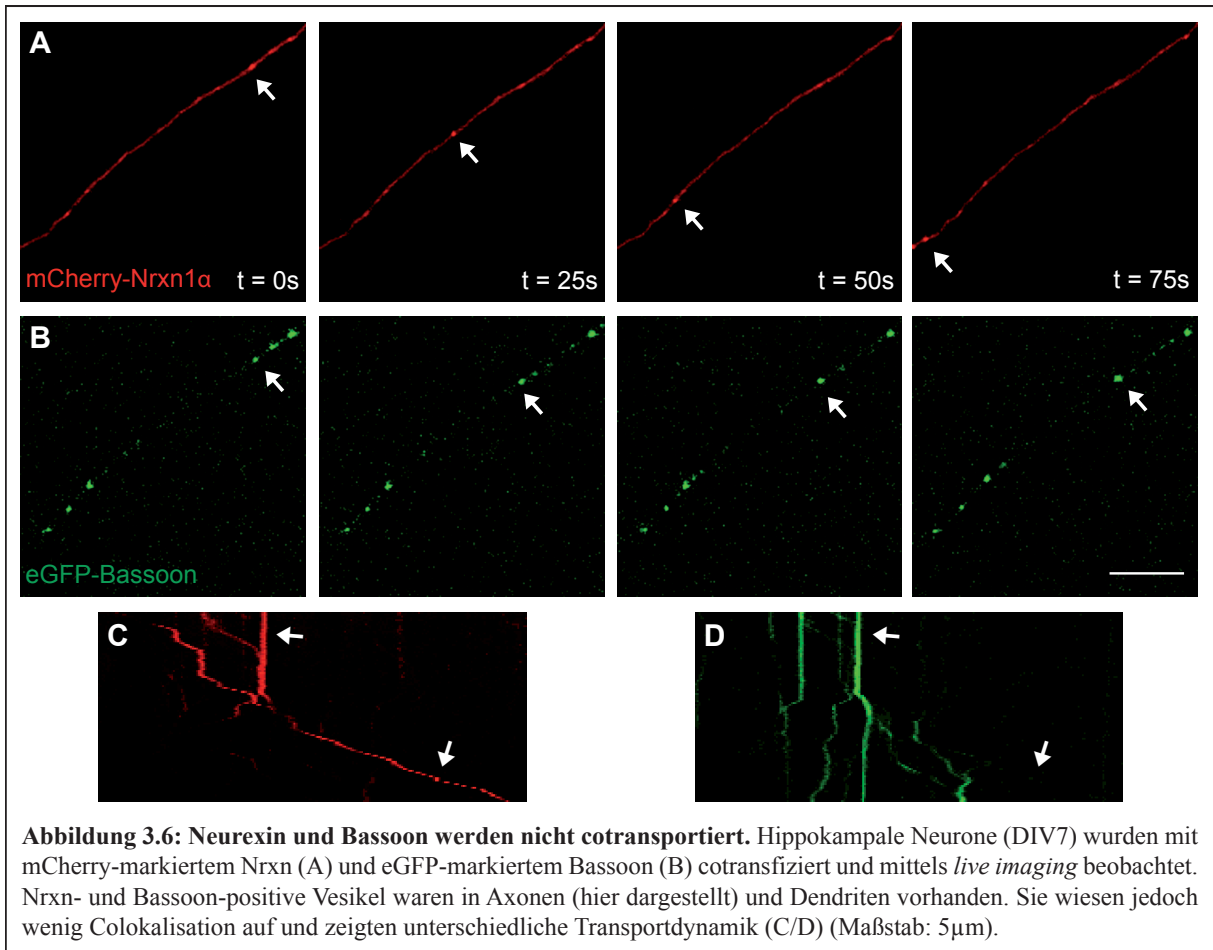
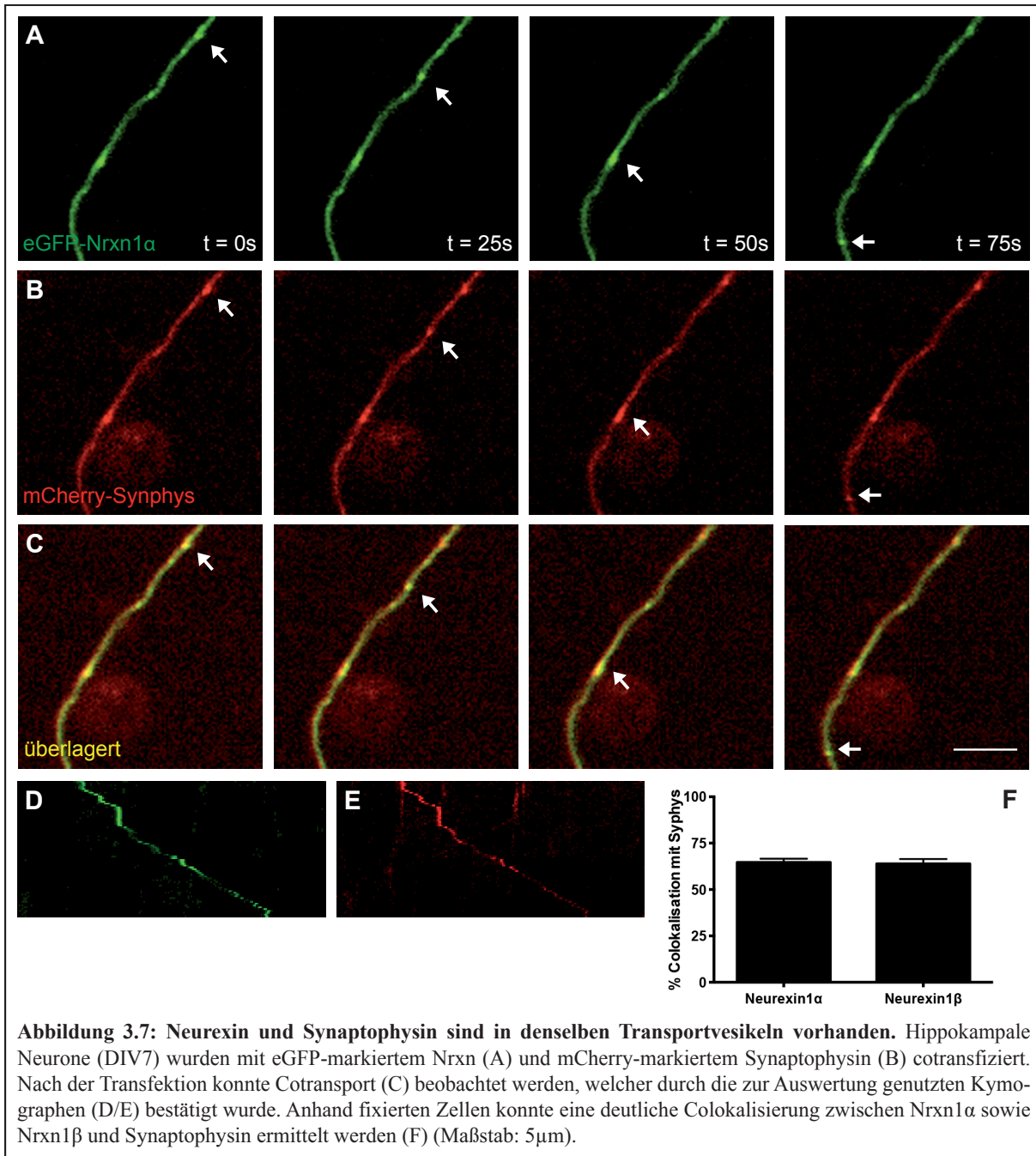
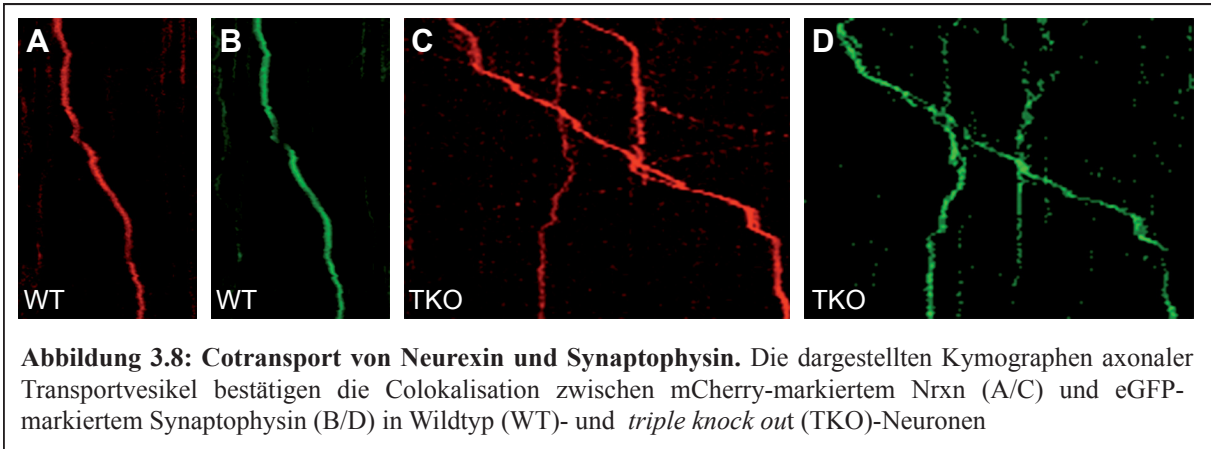


Abbildung 3.6: Neurexin und Bassoon werden nicht cotransportiert. Hippokampale Neurone (DIV7) wurden mit mCherry-markiertem Nrnx (A) und eGFP-markiertem Bassoon (B) cotransfiziert und mittels *live imaging* beobachtet. Nrnx- und Bassoon-positive Vesikel waren in Axonen (hier dargestellt) und Dendriten vorhanden. Sie wiesen jedoch wenig Colokalisation auf und zeigten unterschiedliche Transportdynamik (C/D) (Maßstab: 5µm).

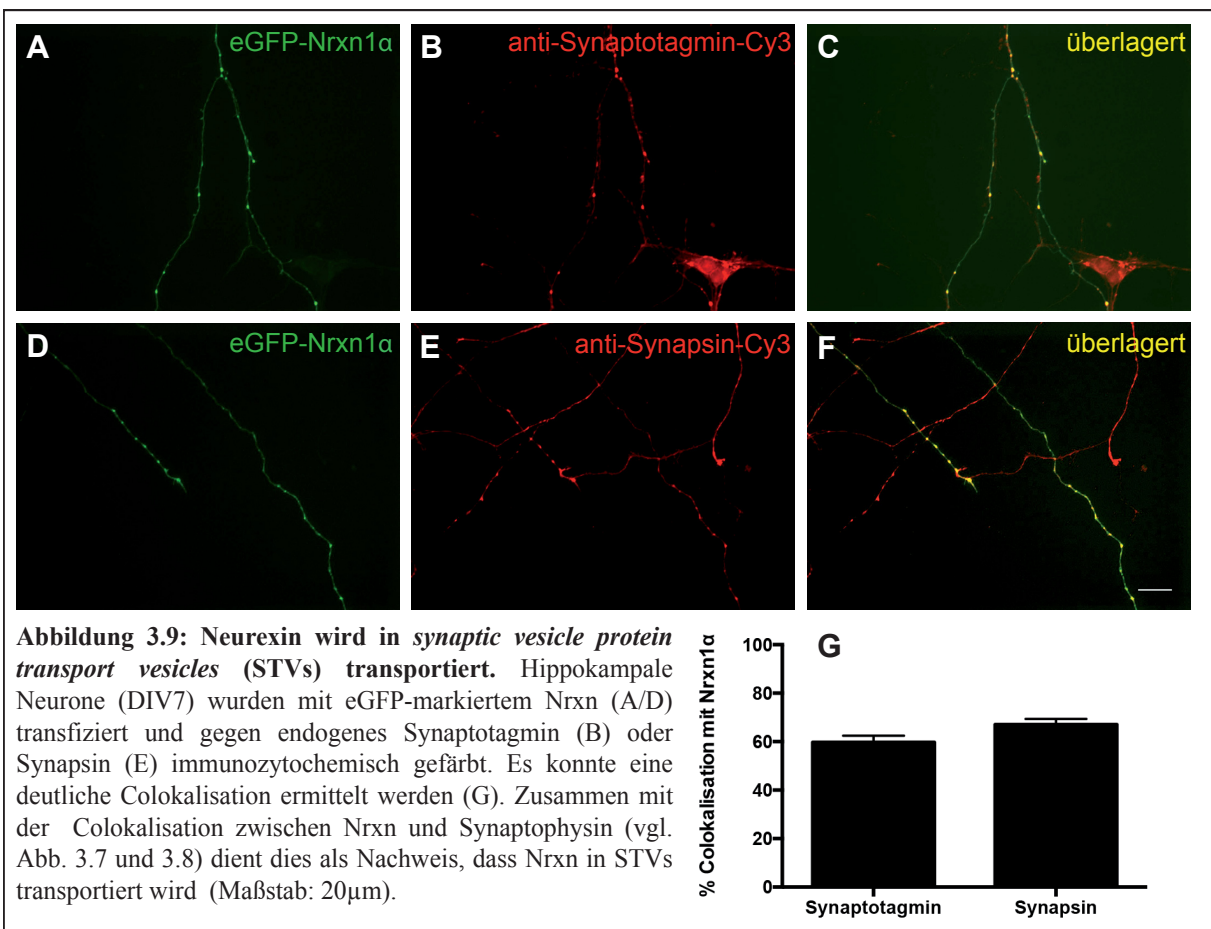
Die dritte analysierte Vesikelklasse waren die sogenannten *synaptic vesicle protein transport vesicles* (STVs). Sie enthalten Vesikel-assoziierte Proteine wie Synaptophysin, Synaptotagmin und Synapsin (Ahmari *et al.*, 2000; Sabo *et al.*, 2006). Der Standardmarker für diese Vesikelklasse ist Synaptophysin (Bury & Sabo, 2011). Überraschenderweise zeigte sich in diesen Experimenten eine Colokalisation zwischen Nrnx und Synaptophysin (vgl. Abb. 3.7), sowohl in stationären als auch in mobilen Phasen des Transports. Damit übereinstimmend bestätigen die Kymographen für eGFP-Nrxn1α und mCherry-Synaptophysin, dass sich beide Proteine synchron bewegten (vgl. Abb. 3.7, D/E). Dies dient als erster Beweis für den Cotransport beider Proteine.



Um sicherzustellen, dass es sich bei diesen Ergebnissen nicht um Effekte der Überexpression handelt, wurde das Experiment mit zwei anderen Plasmiden (mCherry-Nrxn1 α und eGFP-Synaptophysin) sowie in hippocampalen Neuronen mit α -Nrxn-triple knock out (TKO)-Hintergrund wiederholt (vgl. Abb. 3.8). In beiden Fällen konnte die Colokalisation zwischen Nrnx und Synaptophysin in stationären und mobilen Phasen bestätigt werden.



Um diese Resultate weiter zu verifizieren, wurden hippocampale Neurone mit eGFP-markiertem Nrnx transfiziert und anschließend gegen endogene Proteine, die ebenfalls Bestandteil von STVs sind, immunocytochemisch gefärbt. Es wurde insbesondere in Axonen eine Colokalisation zwischen Nrnx1 α und Synaptotagmin sowie Synapsin gefunden (vgl. Abb. 3.9). Aufgrund der in diesem Kapitel vorgestellten Experimente kann man davon ausgehen, dass Nrnx als Teil der *synaptic vesicle protein transport vesicles* (STVs) intrazellulär zur präsynaptischen Membran gelangt.



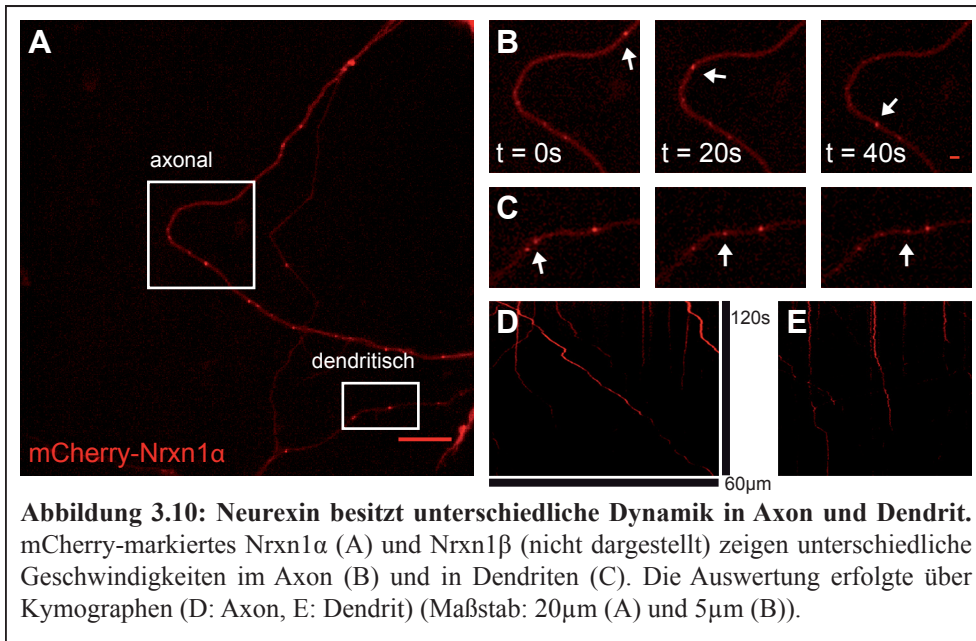
3.2 Dynamik von Nrnxn-positiven Transportvesikeln

Durch Experimente an fixierten Zellen können keine Informationen über die Dynamik des intrazellulären Nrnxn-Transports gewonnen werden. Derartige Fragestellungen erfordern *live imaging*-Experimente (vgl. Abb. 3.6 bis 3.8). Um die Dynamik zu verstehen, wurden Transfektionen von Nrnxn1 α bzw. Nrnxn1 β an hippokampalen Neuronen durchgeführt. Ich habe zunächst mehrere Versuchsreihen durchgeführt, um mikroskopische Parameter zu kalibrieren. Es sollten möglichst geringe *photobleaching*-Effekte auftreten, eine hohe Bildrate in mehreren Fluoreszenzkanäle erreicht werden und eine durchgehende Beobachtung der vesikulären Bewegung möglich sein (für die etablierten Parameter vgl. Kap. 2.2.3.4).

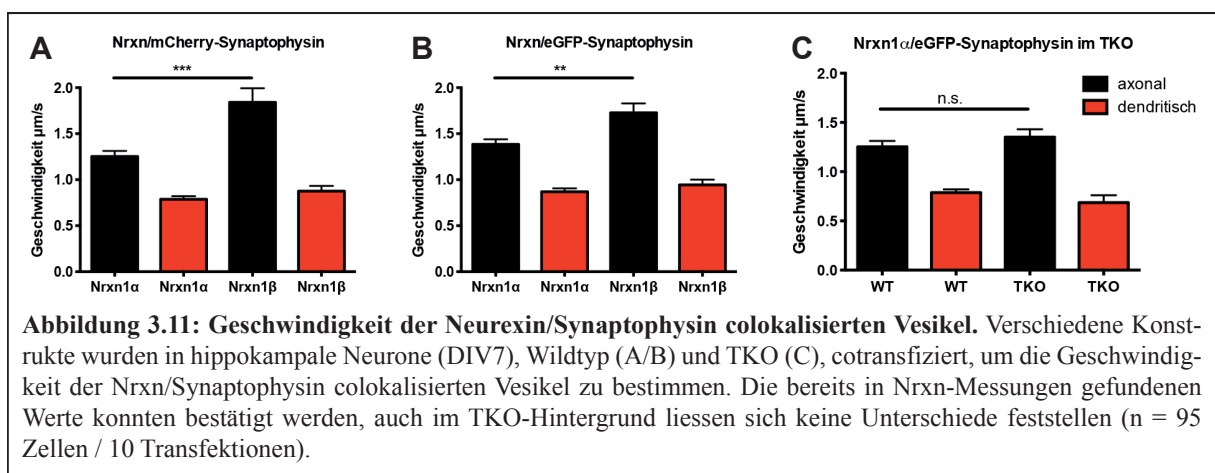
Die Auswertung der *live imaging*-Experimente erfolgte wie bereits beschrieben durch Kymographen (vgl. Kap. 2.2.3.5 und 3.1), welche die synchrone Mobilität von Proteinen demonstrieren können. Darüber hinaus kann anhand der Steigung der Graphen direkt die Geschwindigkeit der Vesikel berechnet werden (Durchführung mittels MetaMorph, vgl. Kap. 2.2.3.5). Diese *live imaging*-Experimente (vgl. Tab. 3.2 und Abb. 3.10) zeigten grundlegende Eigenschaften des Nrnxn-Transports. Nrnxn-positive Vesikel sind sowohl in Axonen als auch in Dendriten mobil. In Axonen verläuft der Transport jedoch schneller als in Dendriten. Des Weiteren bewegen sich Nrnxn-positive Vesikel in Axonen meist unidirektional (primär anterograd) und kontinuierlich, wohingegen Nrnxn-positive Vesikel in Dendriten ein mehr bidirektionales (anterograd und retrograd) sowie diskontinuierliches Bewegungsmuster aufweisen. Diese Beobachtung konnte durch eine quantitative Auswertung des Pausenverhaltens (Bury & Sabo, 2011; Sabo *et al.*, 2006) bestätigt werden. Axonal liegt eine Pausenfrequenz von 0,013 Pausen/s vor, dendritisch von 0,017 Pausen/s. Die Dauer der Pausen weist zwischen den Kompartimenten keine signifikanten Unterschiede auf, jedoch zwischen den Isoformen (Mittelwert: Nrnxn1 α : 27,6s; Nrnxn1 β : 11,7s). Es konnte beobachtet werden, dass Nrnxn1 α -positive Vesikel während mobiler Phasen langsamer sind als Nrnxn1 β -positive Vesikel.

	Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]		P-Wert
	axonal	dendritisch	
Nrnxn1α	1,2 \pm 0,53	0,8 \pm 0,26	0,0091
Nrnxn1β	1,7 \pm 0,51	1,0 \pm 0,23	<0,0001

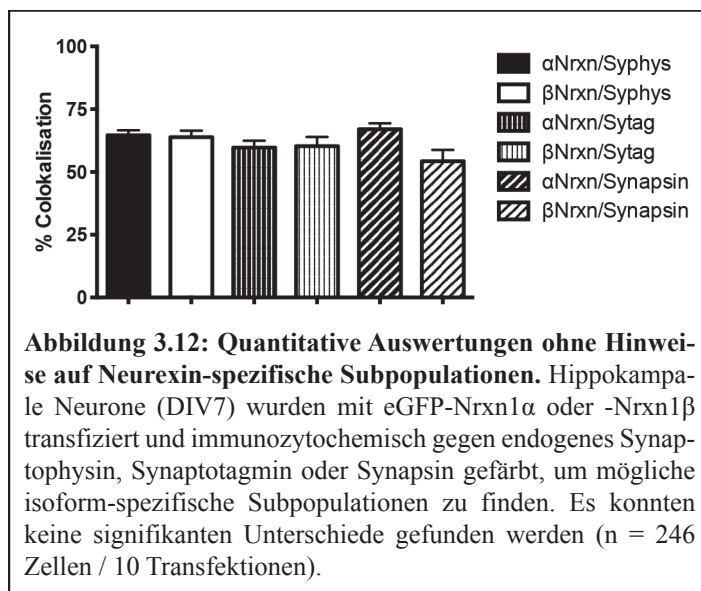
Tabelle 3.2: Transportcharakteristika (n = 47 Zellen / 4 Transfektionen, Werte \pm SD)



Die beschriebenen Erkenntnisse zur Dynamik von Nrxn führten zu einer umfangreichen Auswertung der in Kapitel 3.1 beschriebenen Experimente, insbesondere in Hinblick auf die Geschwindigkeit der verschiedenen Vesikel. Bassoon-positive PTVs weisen eine deutlich geringere Geschwindigkeit ($<0,5\mu\text{m/s}$) als Nrxn-positive Vesikel auf. Die ermittelte Geschwindigkeit für Nrxn/Synaptophysin colokalisierte Vesikel hingegen entspricht der in Tabelle 3.2 aufgeführten Unterscheidung axonaler und dendritischer Geschwindigkeit sowie der Unterschiede zwischen α - und β -Nrxn (vgl. Abb. 3.11, A/B). Es wurde ebenso keine signifikante Abweichung bei den Messungen an Zellen mit α -Nrxn-TKO-Hintergrund (vgl. Abb. 3.11, C) gefunden. Dies bestätigt weiterhin den Cotransport von Nrxn und Synaptophysin in STVs.

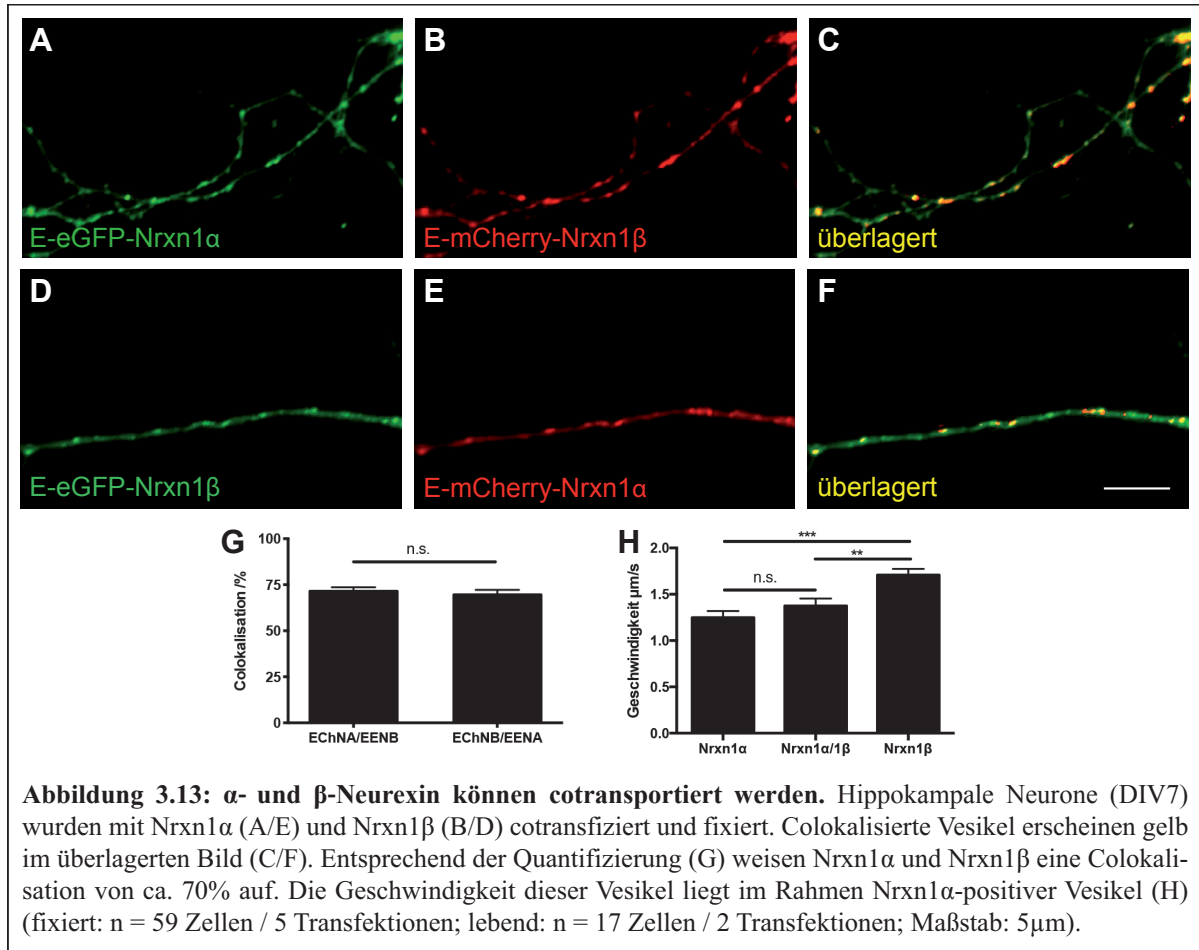


Die unterschiedlichen Geschwindigkeiten von Nrnx1 α und Nrnx1 β konnte mit Nrnx/Synaptophysin colokalisierten Vesikeln reproduziert werden. Demnach hat die Klasse der STVs keine konstante Geschwindigkeit, viel mehr scheint diese abhängig von der Proteinzusammensetzung zu sein. Alternativ könnten diese α/β -spezifischen Unterschiede demnach über den Transport durch verschiedene STV-Subpopulationen zu erklären sein. Zur Überprüfungen dieser Theorie wurden die Colokalisierungsexperimente zwischen Nrnx und den endogenen STV-Markerproteinen Synaptophysin, Synaptotagmin und Synapsin (vgl. Abb. 3.7 und 3.9) quantitativ ausgewertet. Abbildung 3.12 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse. Es wurde deutlich, dass die Colokalisation aller drei in STVs transportierten Proteine sowohl mit Nrnx1 α als auch mit Nrnx1 β übereinstimmend bei ca. 60% liegt. Es konnten keine Unterschiede zwischen beiden Isoformen oder zwischen Fortsatztypen (axonal und dendritisch) festgestellt werden. Aufgrund dieser Homogenität ist die Möglichkeit verschiedener STV-Subpopulationen als Begründung für die unterschiedlichen Geschwindigkeiten unwahrscheinlich.

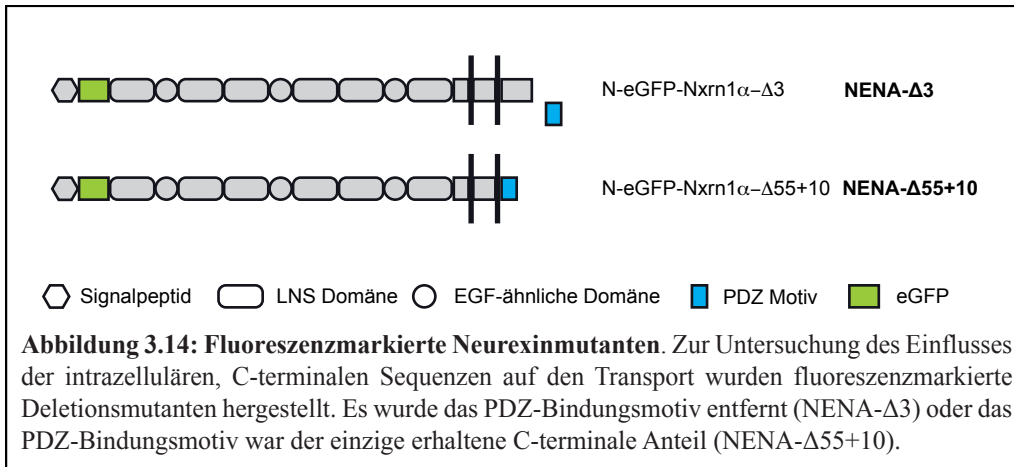


In diesem Zusammenhang habe ich auch untersucht, ob beide Neurexinvarianten nur einzeln transportiert werden. Hippokampale Neurone wurden mit eGFP- und mCherry-markiertem α - und β -Nrnx cotransfiziert und die Lokalisation in fixierten Zellen analysiert. Es konnte ermittelt werden, dass eine Colokalisation zwischen Nrnx1 α und Nrnx1 β vorliegt (ca. 70%, vgl. Abb. 3.13). Des Weiteren wurde auch die Geschwindigkeit von Nrnx1 α /Nrnx1 β colokalisierten Vesikeln in lebenden Neuronen bestimmt. Die Geschwindigkeit dieser Vesikel ist geringer als der für β -Nrnx ermittelte Wert und liegt im Bereich der langsameren α -Nrnx-positiven Vesikel. Demnach kann beim Transport von Nrnx sowohl Einzel- als auch

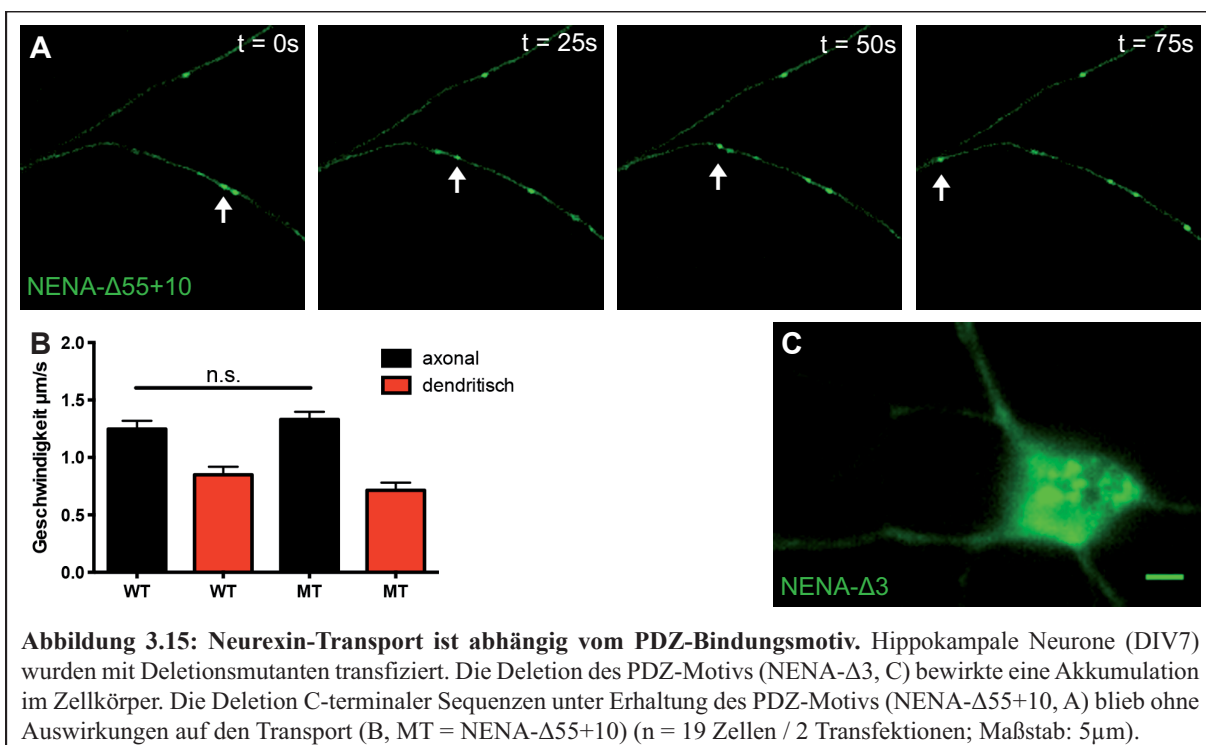
Cotransport vorkommen. Die experimentell unterscheidbaren Geschwindigkeiten der Vesikel scheinen auf variierenden Anteilen von α - und β -Nrnx an der Gesamtproteinzusammensetzung zu beruhen.



In nachfolgenden Experimenten wurde der in beiden Isoformen identische Anteil, die C-terminalen Strukturen, untersucht. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte mit Deletionsmutanten (vgl. Abb. 3.13) gezeigt werden, dass das C-terminale PDZ-Bindungsmotiv transportrelevant ist. Hierbei führte die Expression von eGFP-markierten Nrnx1 α , bei dem das PDZ-Bindungsmotiv entfernt wurde (NENA- Δ 3), zu einer Akkumulation von Nrnx im Zellkörper. NENA- Δ 55+10, bei dem die C-terminalen Sequenzen entfernt wurden, das PDZ-Bindungsmotiv jedoch erhalten blieb, zeigte keinen Lokalisationsphänotypen (Fairless *et al.*, 2008). Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurde nun der Transport von NENA- Δ 3 und NENA- Δ 55+10 in lebenden, hippokampalen Neuronen analysiert.



Nach Transfektion dieser Konstrukte erfolgte die Beobachtung der Nrxn-positiven Transportvesikel an DIV7. Wie in Abbildung 3.15 zu sehen ist, konnte die Akkumulation von Nrxn im Zellkörper nahe des endoplasmatischen Retikulums/Golgiapparates nach Deletion des PDZ-Bindungsmotivs bestätigt werden (vgl. Abb. 3.15, C). Unter Erhaltung des PDZ-Bindungsmotivs waren keine Unterschiede zum Wildtyp-Nrxn bei axonal/dendritischer Verteilung und der Geschwindigkeit zu beobachten. Die Experimente bestätigen, dass das C-terminale PDZ-Bindungsmotiv notwendig ist für den Transport von Nrxn. Die weiteren C-terminalen Strukturen spielen jedoch keine Rolle bei der Geschwindigkeit der Transportvesikel. Demnach ist der Geschwindigkeitsunterschied zwischen α - und β -Nrxn aufgrund der extrazellulären Strukturen gegeben.



3.3 Nrnx-Transport ist abhängig von Mikrotubuli und synaptischer Aktivität

Um den Mechanismus des Nrnx-Transports aufzuklären, wurde zunächst die Interaktion mit dem Cytoskelett untersucht. Wie in der Einleitung beschrieben (vgl. Kap. 1.4), bilden Aktinfilamente und Mikrotubuli die Grundlage für Transportprozesse und deren Regulation. Der intrazelluläre Langstreckentransport verläuft primär entlang dieser beiden Strukturen, wodurch die Auswahl der zur Verfügung stehenden Motorproteine bestimmt wird. Weitere Faktoren sind einerseits das *axon initial segment* (AIS), welches eine selektive Barriere bildet und an der Sortierung axon- und dendritenspezifischer Proteine beteiligt ist, sowie posttranslatorische Modifikationen von Mikrotubuli, die die Bindungsaffinitäten molekularer Motoren beeinflussen.

Vor Störung des Cytoskeletts wurde dessen Grundzustand durch immunozytochemische Färbungen mit Phalloidin, einem Aktin-bindendem Protein, sowie mit einem anti-Tubulin-Antikörper beobachtet (vgl. Abb. 3.16). Phalloidin markiert heterogene, filamentöse Strukturen, welche sich durch das komplette Neuron ziehen. Hierbei sind deutlich aktinreichere Strukturen zu erkennen. Der anti-Tubulin-Antikörper markiert ebenfalls Bereiche innerhalb der ganzen Zelle, allerdings homogener.

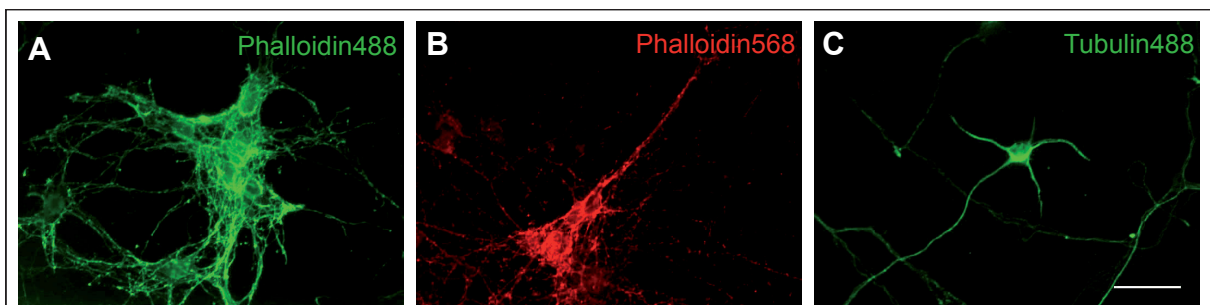
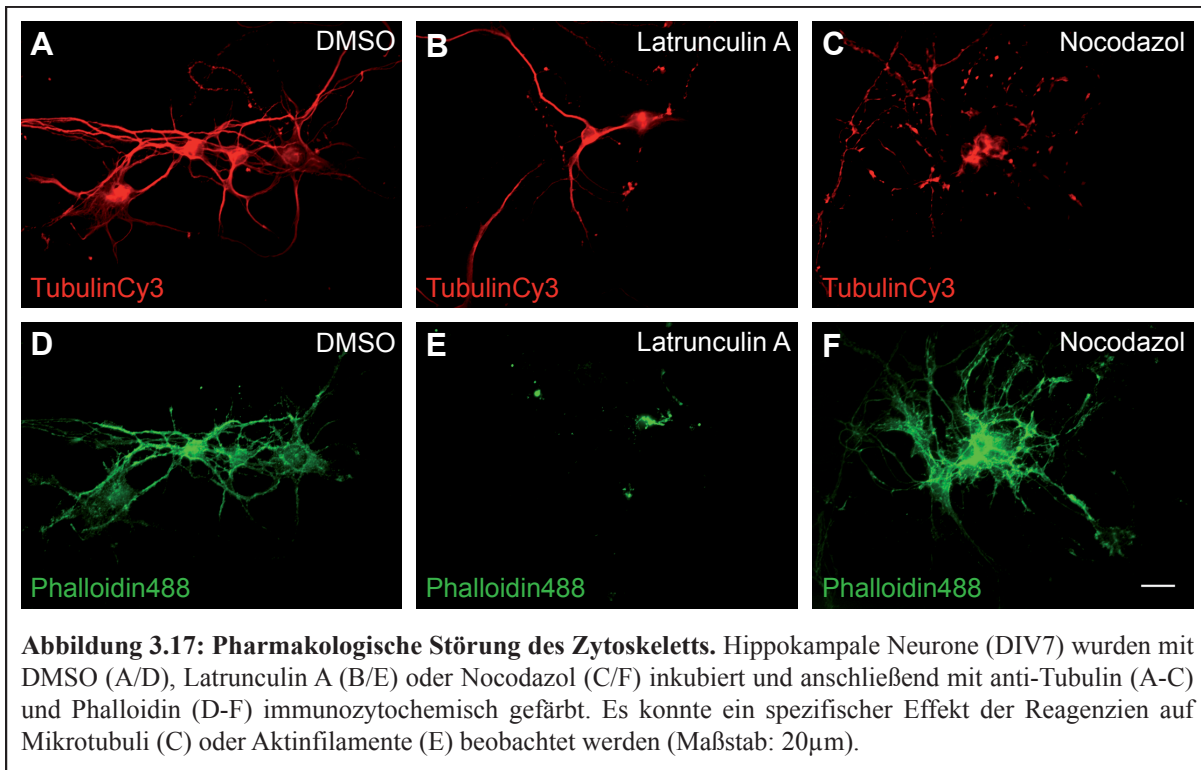


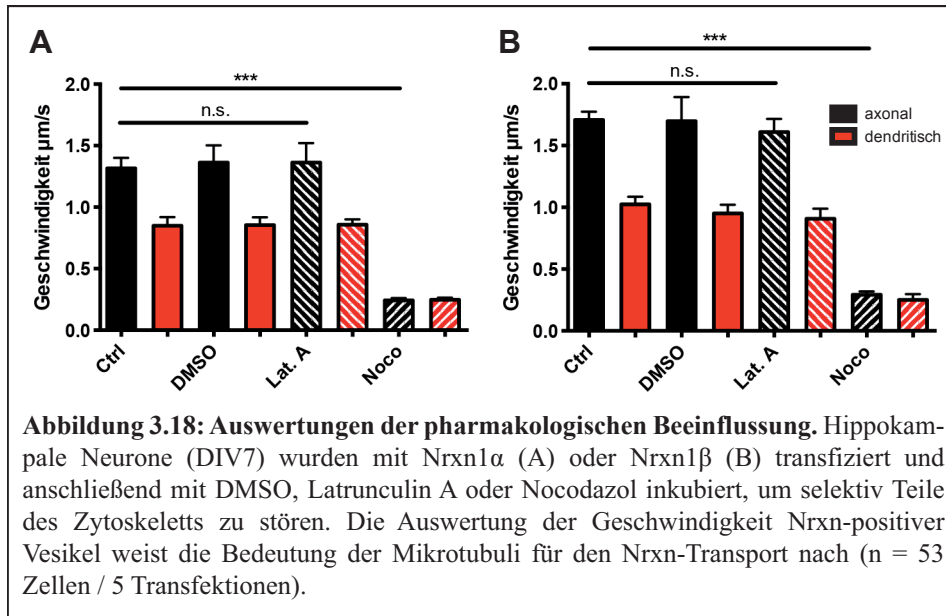
Abbildung 3.16: Grundzustand des Zytoskeletts. Aktinfilamente und Mikrotubuli sind maßgeblich am intrazellulären Transport beteiligt. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurde zunächst das Zytoskelett hippokampaler Neurone (DIV7) mittels Phalloidin (A/B) und anti-Tubulin (C) beobachtet (Maßstab: 20µm).

Nachfolgend wurde das Cytoskelett pharmakologisch beeinflusst. Als Kontrolle wurde DMSO (Dimethylsulfoxid) eingesetzt, da es als Lösungsmittel für weitere Substanzen in diesem Experiment diente. Die Zellen wurden mit 5-10µM Nocodazol inkubiert, welches an Mikrotubuli bindet und den Anbau weiterer Tubulinuntereinheiten verhindert, wodurch die Depolymerisierung überwiegt (De Brabander *et al.*, 1977). Höhere Konzentration haben unerwünschte Nebeneffekte auf das Aktinnetzwerk (Ligon & Steward, 2000). Latrunculin A wurde mit 2,5-5µM eingesetzt, es bindet an Aktinmonomere und verhindert deren Polymerisation (Spector *et al.*, 1989). Nach Inkubation mit dem jeweilige Reagenz erfolgte die immunozytochemische Färbung mit Phalloidin und anti-Tubulin. Abbildung 3.17 zeigt

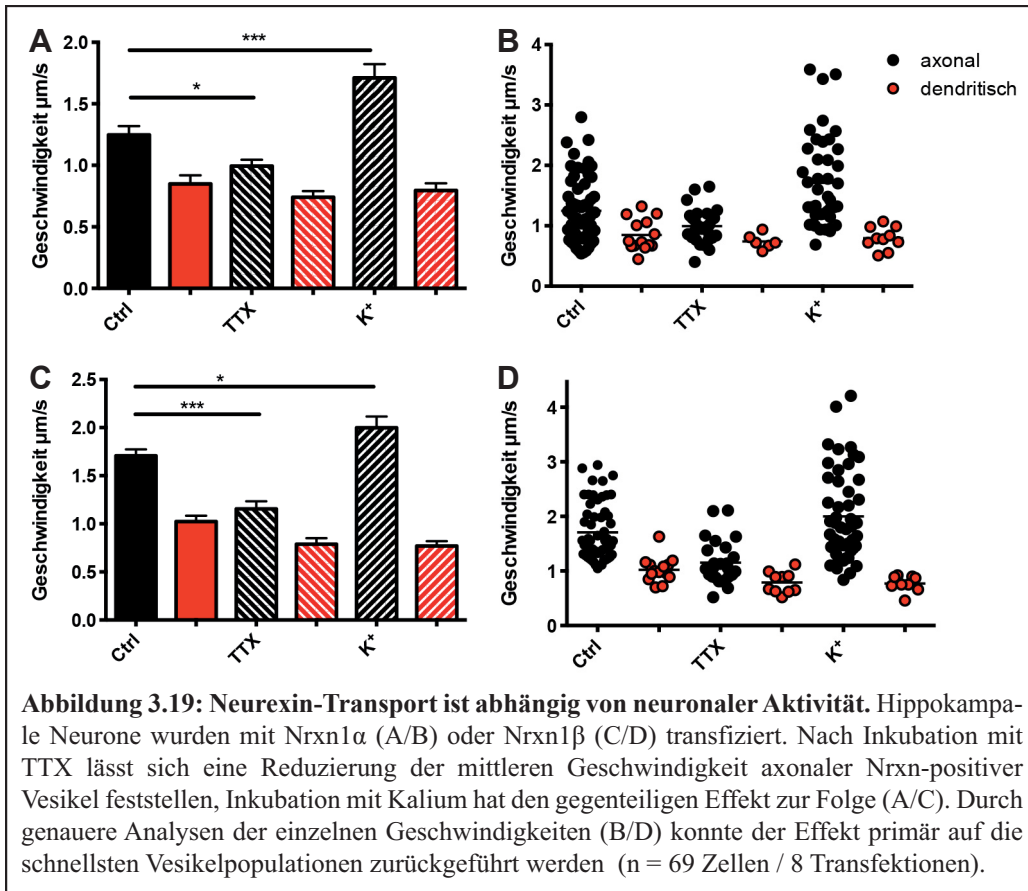
jeweils im oberen und unteren Bild die gleiche Zelle. Unter Einsatz von Latrunculin A sind nur noch Reste des Actinnetzwerks vorhanden (vgl. Abb. 3.17, E), Inkubation mit Nocodazol führt zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli (vgl. Abb. 3.17, C). Demnach konnte der erwartete Effekt der pharmakologischen Behandlung und deren Spezifität auf einzelne Bestandteile des Zytoskeletts nachgewiesen werden.



Im weiteren Verlauf der Versuchsreihe wurde die pharmakologische Beeinflussung des Zytoskeletts mit der Transfektion von Nrnx kombiniert, um direkt einen Zusammenhang zwischen dem Zytoskelett und dem Transport Nrnx-positiver Vesikel zu untersuchen. In Abbildung 3.18 ist die Auswertung der Geschwindigkeit dieser Vesikel dargestellt. Deutlich ist zu sehen, dass es zwischen unbehandelten („Ctrl“) sowie DMSO- und Latrunculin A-inkubierten Zellen keinen Unterschied in der Geschwindigkeit gibt. Die Inkubation mit Nocodazol zur Störung polymerisierter Mikrotubuli hingegen hat eine massive Reduktion der Geschwindigkeit zur Folge, es fand kein gerichteter Transport der Vesikel mehr statt. Dementsprechend kann man sagen, dass nur Mikrotubuli für den intrazellulären Langstreckentransport von Nrnx eine Rolle spielen.



Über die grundlegende Wechselwirkung mit dem neuronalen Zytoskelett hinaus wurde untersucht, ob der Transport von Nrnx als präsynaptisches Membranprotein von synaptischer Aktivität abhängt. Hierzu wurden hippocampale Neurone mit eGFP-Nrnx transfiziert und einerseits mit Tetrodotoxin (TTX) oder hohen Kaliumkonzentrationen inkubiert. TTX ist ein Neurotoxin, welches in Kugelfischen enthalten ist. Es inhibiert durch Blockade spannungabhängiger Natriumkanäle die synaptische Aktivität (Nieto *et al.*, 2012). Erhöhte Kaliumkonzentration hingegen führt zu schnellerer Depolarisation und ermöglicht so eine insgesamt höhere Aktivität. Es wurden 1 μ M TTX oder 60mM KCl für 15-60min vor dem *live imaging* inkubiert. Anhand der Auswertung dieser Experimente ist zu erkennen, dass sich die Geschwindigkeit Nrnx1 α -positiver (vgl. Abb. 3.19, A) und Nrnx1 β -positiver (vgl. Abb. 3.19, C) Vesikel unter Inhibierung der neuronalen Aktivität (TTX) reduziert. Nach Inkubation mit KCl im Messpuffer erhöhte sich die mittlere Geschwindigkeit der Vesikel. Bei einer genaueren Betrachtung der Geschwindigkeitsverteilung (vgl. Abb. 3.19, B/D) fällt auf, dass die Wirkung neuronaler Aktivität besonders in der schnellsten Population der Transportvesikel auftritt. Diese Population ist nach Behandlung mit TTX nicht mehr zu finden, nach Inkubation mit Kalium kommt sie hingegen häufiger vor als in der Kontrollsituation. Zusammenfassend kann man sagen, dass der intrazelluläre Transport von Nrnx, welches als präsynaptisches Membranprotein die Neurotransmission maßgeblich beeinflusst (Missler *et al.*, 2003), zu einem frühen Zeitpunkt (DIV7) selbst von neuronaler Aktivität abhängig ist.



3.4 KIF1A ist notwendig für den Transport von Nrnx

Eines der wichtigsten Themen bei der Untersuchung intrazellulären Transports ist die Frage nach den molekularen Motoren, da diese für den Großteil der zu überbrückenden Strecke innerhalb der Zelle verantwortlich sind. Nach dem erfolgreichen Nachweis, dass der intrazelluläre Transport von Nrnx mikrotubuli-abhängig ist (vgl. Kap. 3.3), verringerte sich die Anzahl möglicher Motorproteine deutlich. Wie in Kap. 1.4 beschrieben, beruht der intrazelluläre Transport auf den molekularen Motoren Myosin, Dynein und Kinesin. Aufgrund der präsynaptischen Lokalisierung von Nrnx, der Dynamik Nrnx-positiver Vesikel und ihrer Mikrotubuli-Abhängigkeit (vgl. Kap. 3.1 bis 3.3) liegt die Vermutung nahe, dass Kinesine an deren Transport beteiligt sind. Erste proteomische Experimente haben des Weiteren den Fokus auf das Kinesin3-Mitglied KIF1A gelenkt, welches aus Maushirn mit Nrnx copräzipitiert und durch Massenspektroskopie nachgewiesen wurde (Daten von Carsten Reissner). Für den weiteren Verlauf der Untersuchung mussten zunächst das KIF1A-eGFP-Konstrukt und der KIF1A-Antikörper (Sigma) in Zellkulturen etabliert werden. In Abbildung 3.20 ist die Expression von KIF1A zu sehen. Sowohl die Epifluoreszenz des Konstrukts als auch die immunocytochemische Färbung führten zu einer punktförmigen Markierung im Axon und in Dendriten, welche schon zuvor beschrieben wurde (Lee *et al.*, 2003).

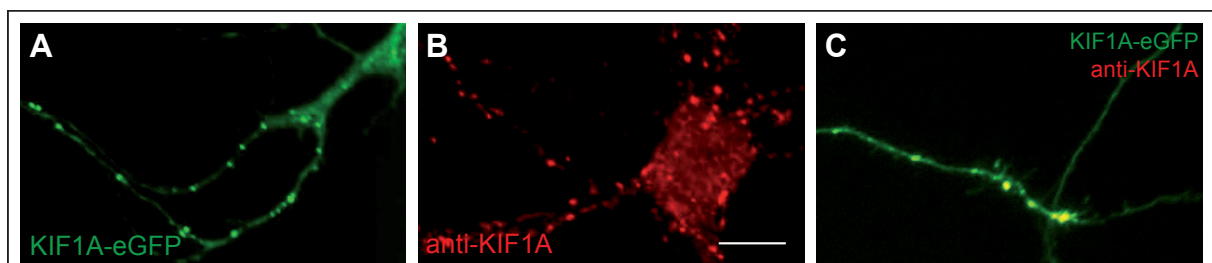


Abbildung 3.20: Lokalisation von KIF1A. Hippokampale Neurone (DIV7) wurden mit KIF1A-eGFP transfiziert (A) oder immunocytochemisch gegen endogenes KIF1A gefärbt (B). Sowohl die Überexpression als auch die immunocytochemische Färbung (B) brachten eine punktförmige Markierung im Axon und Dendriten hervor. Zudem war eine deutliche Colokalisierung beider Fluorophore (C) zu beobachten (Maßstab: 5µm).

Nach dieser statischen Betrachtung von KIF1A wurde dessen dynamisches Verhalten analysiert. Hippokampale Neurone wurden mit KIF1A-eGFP transfiziert und mittels *live imaging* beobachtet. KIF1A war in Axonen und Dendriten mobil, jedoch zeigte sich in Axonen eine kontinuierlichere Bewegung und eine höhere Geschwindigkeit als in Dendriten (vgl. Abb. 3.21). Die quantitative Auswertung anhand von Kymographen ergab, dass die Geschwindigkeit von KIF1A der bereits dargestellten Geschwindigkeitsverteilung von Nrnx1α im Axon und in Dendriten entspricht (vgl. Kap. 3.2).

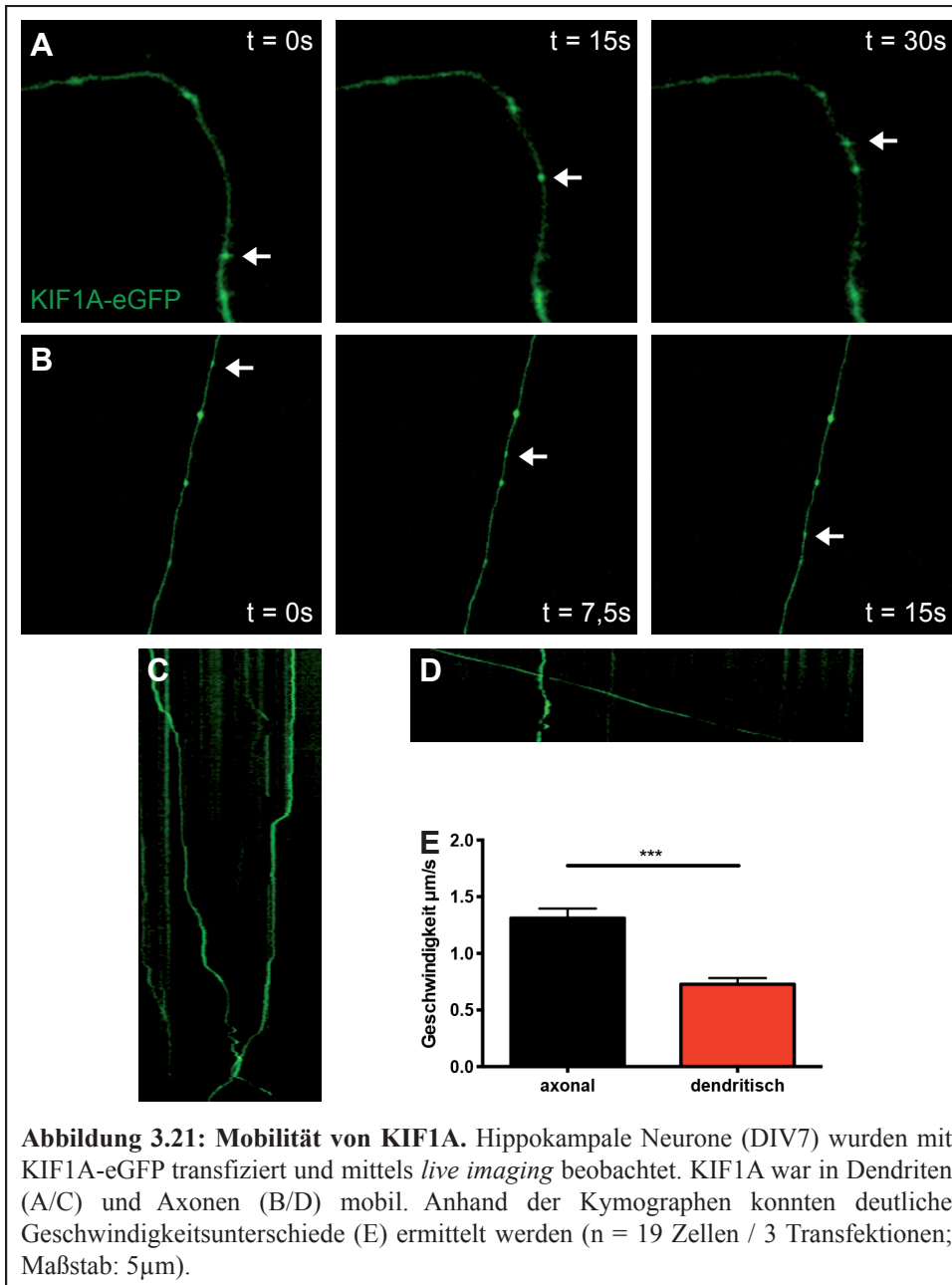
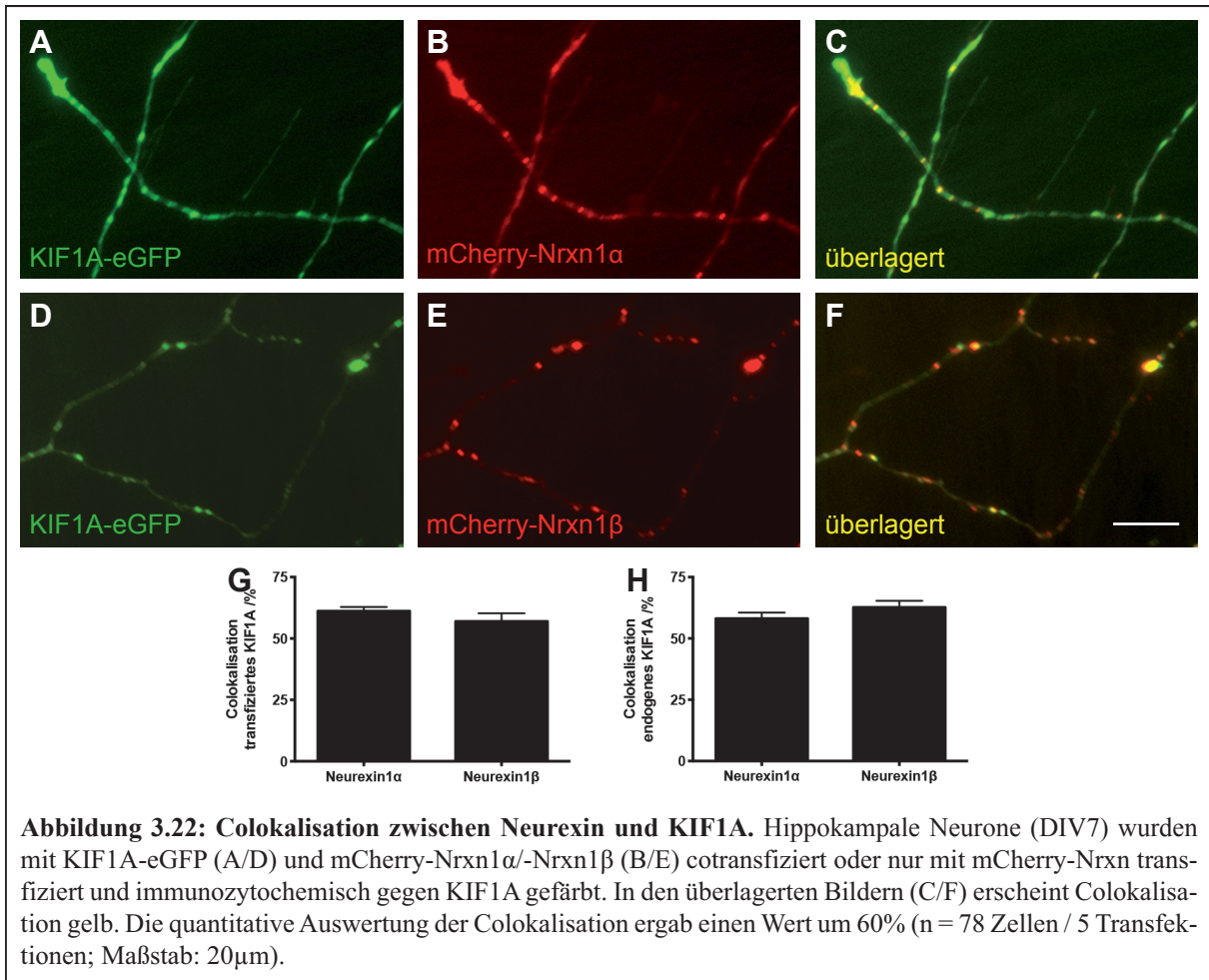


Abbildung 3.21: Mobilität von KIF1A. Hippokampale Neurone (DIV7) wurden mit KIF1A-eGFP transfiziert und mittels *live imaging* beobachtet. KIF1A war in Dendriten (A/C) und Axonen (B/D) mobil. Anhand der Kymographen konnten deutliche Geschwindigkeitsunterschiede (E) ermittelt werden (n = 19 Zellen / 3 Transfektionen; Maßstab: 5 μm).

Schließlich habe ich den möglichen Zusammenhang zwischen Nrnx und KIF1A direkt untersucht. Einerseits wurden hippocampale Neurone mit KIF1A-eGFP und mCherry-Nrxn1 α oder mCherry-Nrxn1 β cotransfiziert und fixiert. Andererseits wurde nur mCherry-Nrxn transfiziert und immunozytochemisch gegen endogenes KIF1A gefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.22 zu sehen. Für beide Isoformen von Nrnx war eine Colokalisation mit KIF1A zu finden. Des Weiteren wurde in den Auswertungen zwischen den Kompartimenten (Axon, Dendriten) unterschieden und verschiedene Zeitpunkte (DIV7 und DIV12) analysiert, in allen Untersuchungen lag die Colokalisation bei etwa 60%. Dieser Wert war identisch für transfiziertes und endogenes KIF1A.



Die bisherigen Resultate wurden daraufhin durch *live imaging*-Experimente ergänzt. Hippokampale Neurone wurden mit KIF1A-eGFP und mCherry-Nrxn1 α cotransfiziert und anschließend beobachtet. Abbildung 3.23 zeigt, dass die in fixierten Zellen gefundene Colokalisation bestätigt werden konnte. Darüber hinaus bewegten sich beide Proteine synchron, pausierten und nahmen die Bewegung erneut zusammen auf (vgl. Abb. 3.23, D/E). Wie schon für α -/ β -Nrxn und Synaptophysin gezeigt, dient dies als Beweis für den Cotransport. Die Geschwindigkeiten für KIF1A/Nrxn1 α entsprechen für axonalen und dendritischen Transport der Geschwindigkeitsverteilung, welche bereits in Messungen von KIF1A oder Nrxn1 α gefunden wurde (vgl. Abb. 3.21 und Kap. 3.2).

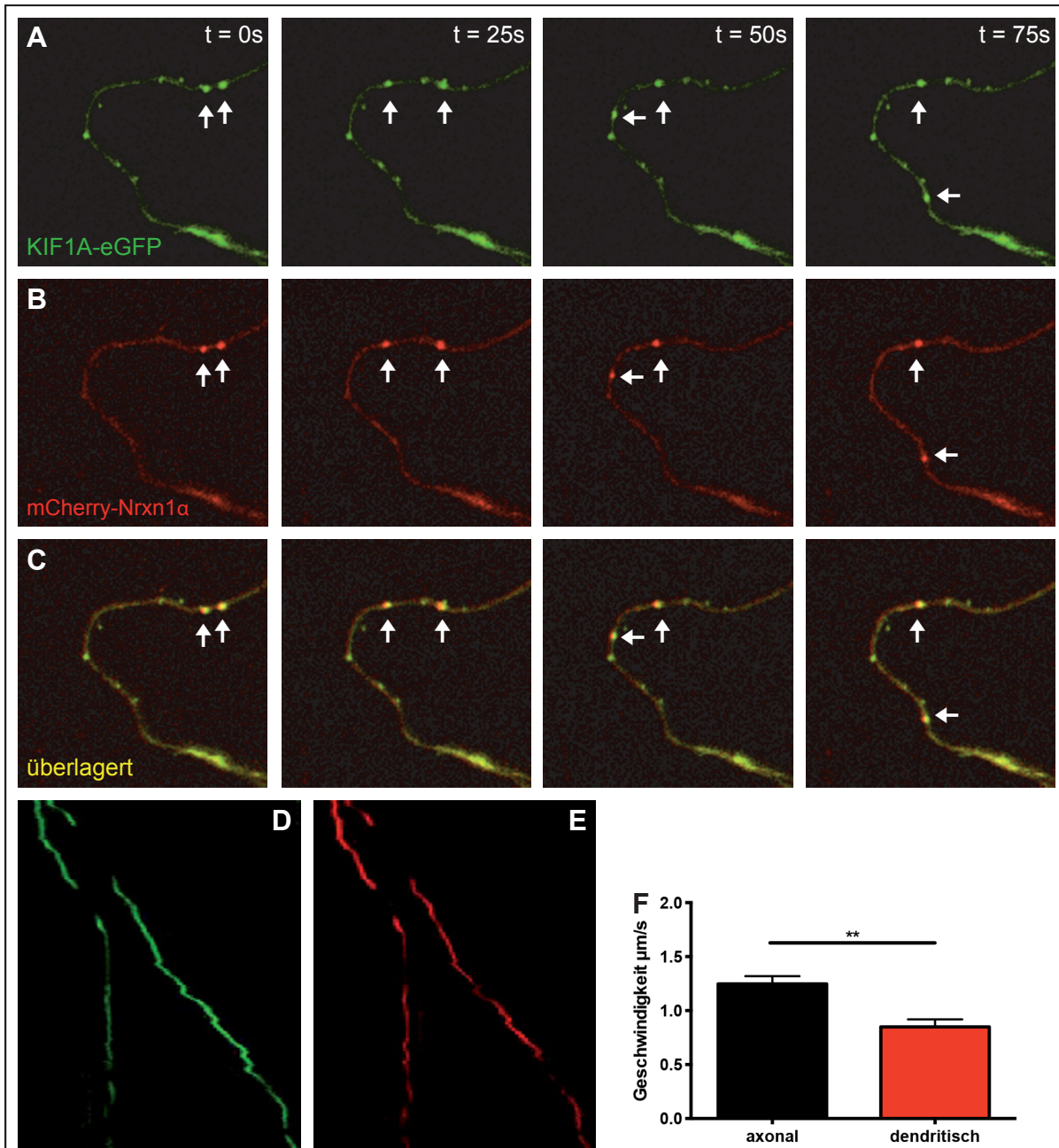
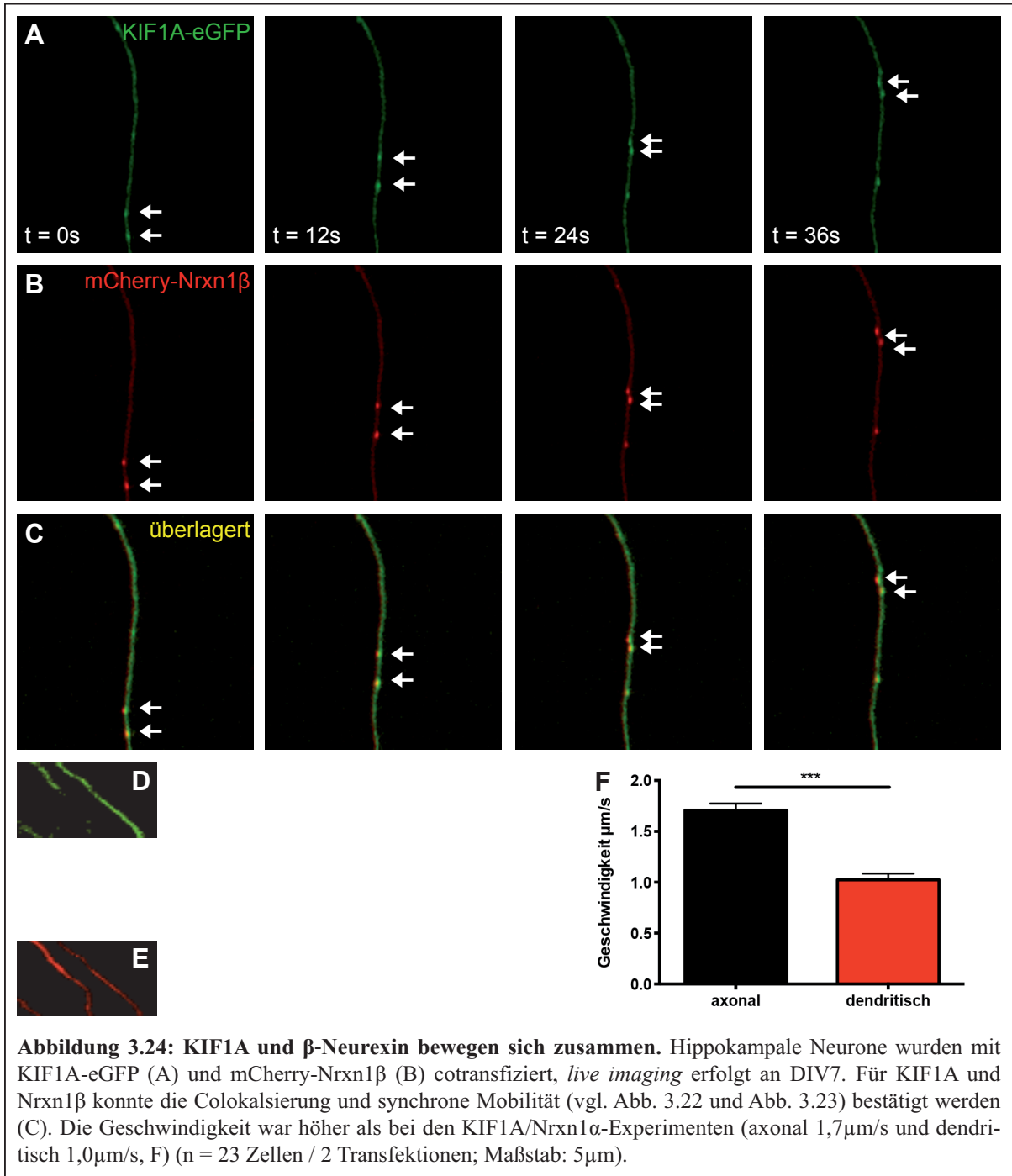


Abbildung 3.23: KIF1A und α -Neurexin bewegen sich zusammen. Hippokampale Neurone wurden mit KIF1A-eGFP (A) und mCherry-Nrxn1 α (B) cotransfiziert. *Live imaging* erfolgte an DIV7. Die Colokalisierungsexperimente an fixierten Zellen (vgl. Abb. 3.22) konnten hiermit auch an lebenden Zellen bestätigt werden (C). Beide Proteine weisen eine synchrone Mobilität auf, was aus den voneinander unabhängig erstellten Kymographen hervorgeht (D/E). Axonal erfolgte der Transport mit 1,3 $\mu\text{m/s}$ schneller als dendritisch mit 0,8 $\mu\text{m/s}$ (n = 24 Zellen / 2 Transfektionen; Maßstab: 5 μm).

Die Geschwindigkeitsunterschiede zwischen Nrxn1 α und Nrxn1 β erforderten die Durchführung der Cotransfektion von KIF1A-eGFP und mCherry-Nrxn1 β . Auch hier konnte eine Colokalisation und Synchronität der Bewegung beobachtet werden (vgl. Abb. 3.24). Erneut wurde für KIF1A/Nrxn1 β eine höhere Geschwindigkeit als für KIF1A/Nrxn1 α ermittelt. Diese Experimente zeigen, dass der molekulare Motor KIF1A am intrazellulären Transport beider Nrxn-Isoformen beteiligt ist. Interessant ist hierbei, dass beide Proteine

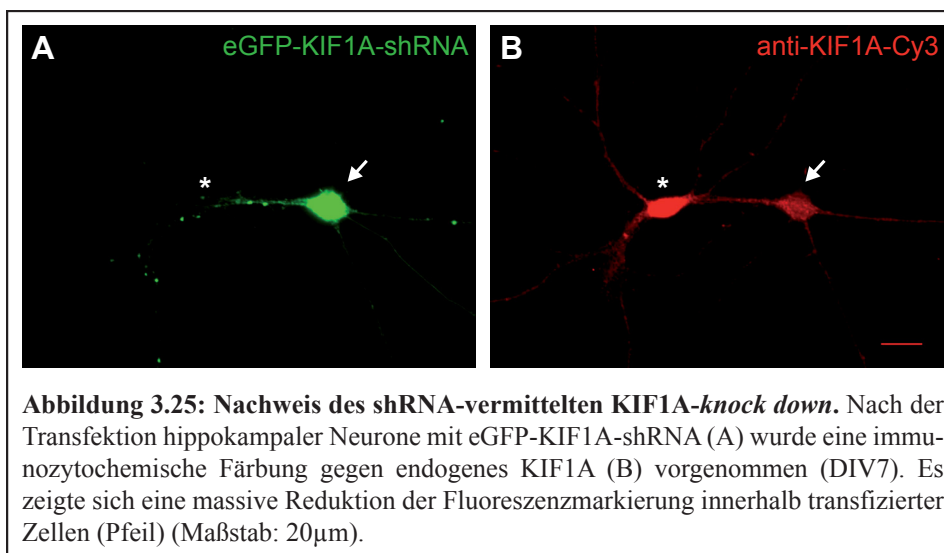
durch den gleichen Motor transportiert werden und dennoch verschiedene Geschwindigkeiten aufweisen und diese demnach tatsächlich von der jeweiligen Proteinzusammensetzung der Vesikel abhängig sein muss.



An Vesikeln können mehrere Motoren gebunden sein, wobei für die verschiedenen Wegabschnitte meistens nur ein spezifischer Motor aktiv ist (Gross, 2004; Schlager & Hoogenraad, 2009). Zur Regulation existieren verschiedene Modelle. Die Aktivitätsdauer der gebundenen Motoren kann unterschiedlich sein („*tug-of-war*“), die Bindungsdauer der

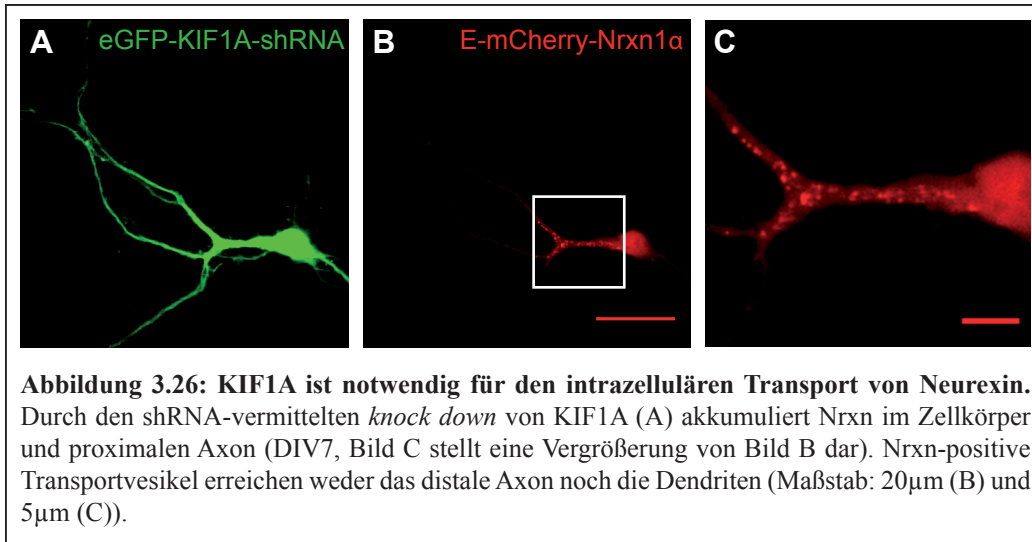
Motoren an den Cargo kann variieren („*exclusionary-presence*“) oder es können nicht alle Motoren simultan an den Cargo und den jeweiligen Bestandteil des Zytoskeletts gebunden sein („*coordination*“). Um zu überprüfen, ob KIF1A nicht nur mit Nrnx colokalisiert, sondern während dieser Colokalisation der aktive Motor ist, wurden shRNA (*small hairpin RNA*)-vermittelte *knock down*-Experimente durchgeführt.

Das für den *knock down* eingesetzte Konstrukt (Liu *et al.*, 2012) lässt transfizierte Zellen eGFP als Fluoreszenzmarker und die shRNA für den *knock down* von KIF1A exprimieren (vgl. Abb. 3.25, A). Um die Wirksamkeit dieser Methode zu verifizieren, wurden hippocampale Neurone mit eGFP-KIF1A-shRNA transfiziert und anschließend immunocytochemisch gegen endogenes KIF1A gefärbt (vgl. Abb. 3.25, B). Abbildung 3.25 zeigt in beiden Bildern den gleichen Ausschnitt. Die rechte Zelle ist transfiziert (eGFP-positiv, Pfeil), die linke Zelle ist nicht transfiziert (eGFP-negativ, *). Es ist zu erkennen, dass die nicht transfizierte Zelle eine deutliche Antikörperfärbung gegen endogenes KIF1A aufweist, welche in der eGFP-shRNA-positiven Zelle drastisch reduziert ist. Demnach kann man davon ausgehen, dass durch den *knock down* die Menge des endogenen KIF1A massiv eingeschränkt ist.



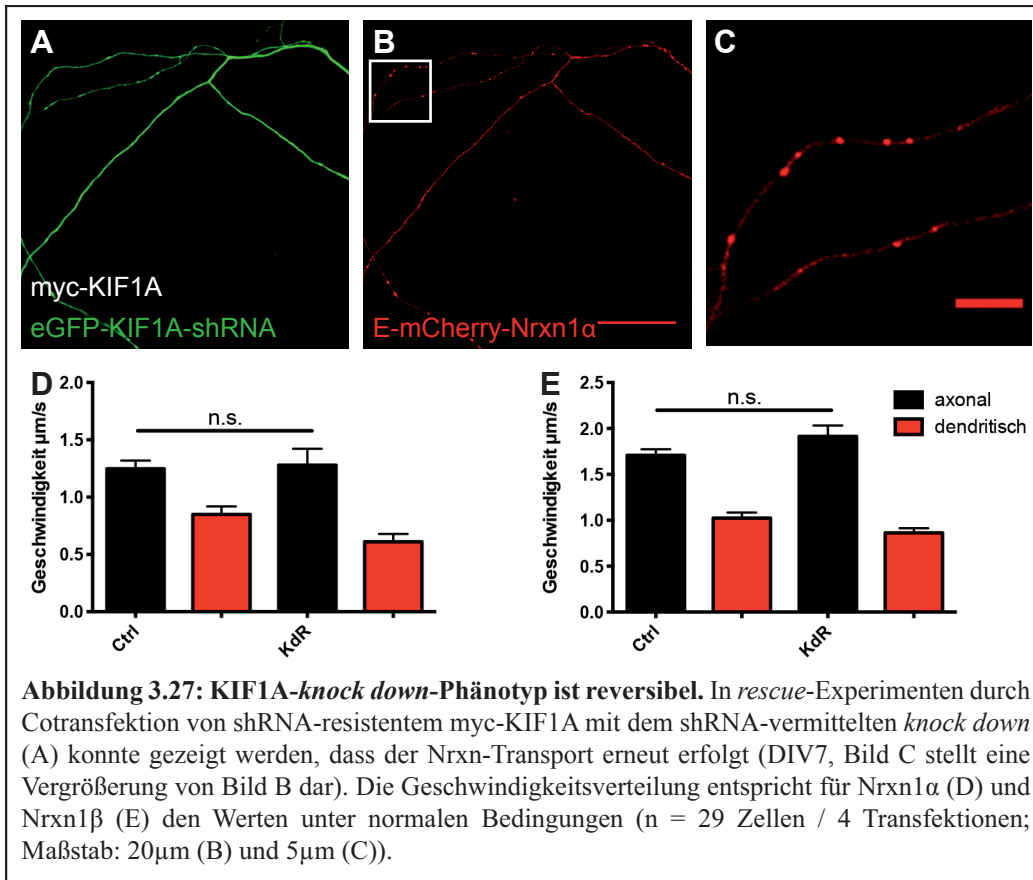
Nach diesem Nachweis der Wirksamkeit konnten hippocampale Neurone mit eGFP-KIF1A-shRNA und mCherry-Nrxn1 α cotransfiziert werden, um direkt die Auswirkungen des KIF1A-*knock down* auf den intrazellulären Transport von Nrnx zu beobachten. Transfizierte Zellen konnten durch die eGFP-Expression detektiert werden, zudem gibt diese Markierung Auskunft über die Zellmorphologie. Es konnte beobachtet werden, dass mCherry-Nrxn nach wie vor hergestellt und entsprechend in Transportvesikel verpackt wurde. Diese Vesikel sind weiterhin mobil, bewegen sich jedoch langsamer und sind interessanterweise nicht mehr in

der Lage, den Zellkörper und das proximale Axon zu verlassen (vgl. Abb. 3.26, B/C). Das distale Axon und die Dendriten enthielten nahezu keine Nrnx-positiven Transportvesikel. Dieses Experiment ist ein eindeutiger Nachweis, dass KIF1A und Nrnx nicht nur colokalisieren, sondern dass KIF1A der aktive Motor und für den intrazellulären Transport von Nrnx notwendig ist.



In weiteren Experimenten wurde der KIF1A-*knock down* mit der Beobachtung der Dynamik von Nrnx1β, Synaptophysin oder Bassoon kombiniert. Wie entsprechend der bisher dargestellten Ergebnisse zu erwarten war, verläuft der Transport von Bassoon (als Bestandteil von PTVs) wie unter normalen Bedingungen. Der Transport von Nrnx1β und Synaptophysin (als Bestandteil von STVs) ist massiv gestört, es kommt zur gleichen Akkumulation der Vesikel im Zellkörper und dem proximalen Axon wie bei Nrnx1α (nicht dargestellt).

Um die Rolle von KIF1A weiter zu verifizieren, wurde anschließend ein *rescue*-Experiment durchgeführt. Hierbei wurden hippocampale Neurone mit eGFP-KIF1A-shRNA und mCherry-Nrxn1α cotransfiziert, aber zusätzlich ein shRNA-resistentes KIF1A cotransfiziert (Xue *et al.*, 2010). In diesen Zellen wird Nrnx in Transportvesikel verpackt, die erneut die bekannte Mobilität erreichen (vgl. Abb. 3.27, B/C). Die Nrnx-positiven Vesikel sind sowohl im gesamten Axon als auch in den Dendriten zu finden. Die Geschwindigkeitsverteilung bei Wildtyp-Zellen und Zellen, die die shRNA für den KIF1A-*knock down* und das shRNA-resistente KIF1A enthalten, ist weitestgehend identisch (vgl. Abb. 3.27, D/E). Die hier vorgestellten Experimente zeigen, dass KIF1A notwendig und hinreichend für den Transport von Nrnx ist. Der *rescue*-Ansatz beweist, dass der *knock down* von KIF1A und die Einschränkungen des Transports reversibel sind und in den Experimenten keine anderen Faktoren als der *knock down* selbst eine Rolle spielen.



3.5 Vesikelfusion

Ein entscheidender Schritt innerhalb des Transportweges eines Zelloberflächenproteins ist die Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran der Zelle. In der vorliegenden Arbeit sollte in erster Linie der intrazelluläre Transport von Nrnx untersucht werden, dennoch wurde ein erster Ausblick auf die Fusion unternommen. Für diese Experimente wurden modifizierte, pH-abhängige Fluorophore verwendet (Miesenbock *et al.*, 1998). pHluorin ist strukturell so angepasst, dass die Fluoreszenz beim pH-Wert präsynaptischer Vesikel von etwa 5,5 gequencht wird. Nach Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran kommen die intralumenalen Proteine in Kontakt mit dem extrazellulären Medium (pH 7,4), wodurch es zu einem schnellen und deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität kommt. Anschließend erfolgt nach Endocytose eine erneute Ansäuerung des Vesikels, die die Fluoreszenz verringert (Burrone *et al.*, 2006; Sankaranarayanan *et al.*, 2000). Mutagenese-Experimente führten zu weiteren pH-abhängigen Fluorophoren mit abweichenden Spektren wie z.B. pHTomato (Li & Tsien, 2012), welche zusammen mit pHluorin eingesetzt werden können.

In den Experimenten mit Nrnx-pHluorin und Synaptophysin-pHTomato war eine geringe Häufigkeit der Fusionsereignisse zu beobachten. Innerhalb von mehreren hundert Messungen konnten nur in etwa 10% eine Zunahme der Fluoreszenzintensität in einzelnen Regionen detektiert werden. Im Rahmen dieser Experimente habe ich versucht, die Frequenz zu steigern. Die Dichte der Neurone wurde erhöht, das Alter der Zellen in Kultur variiert, der *live imaging*-Puffer (vgl. Kap. 2.1.9) durch einen Puffer mit erhöhter Kalium- (8mM statt 2,5mM) und/oder erhöhter Calciumkonzentration (4mM statt 2mM) ersetzt, um die Aktivität der Neurone und die Verfügbarkeit extrazellulären Calciums zu steigern. Darüber hinaus wurden Cokulturen genutzt, bei denen Neurone und Astrozyten im Gegensatz zur normalerweise eingesetzten Kulturform (vgl. Kap. 2.2.2.2) zusammen kultiviert wurden. Diese Ansätze ermöglichten jedoch keine deutlich höhere Frequenz der Fusionsereignisse von Nrnx oder Synaptophysin.

Um eine räumliche Eingrenzung der Suche nach Fusionsereignissen zu ermöglichen, wurden Cotransfektionen mit dem Calciumsensor GCaMP6f durchgeführt. GCaMP6f enthält zyklisch permutiertes eGFP (Baird *et al.*, 1999). An dessen C-Terminus ist Calmodulin (CaM) und an dessen N-Terminus das CaM-Zielpeptid M13 gekoppelt. Calciumabhängige Interaktionen zwischen CaM und M13 bewirken Konformationsänderungen und folgend eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Chen *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2014). Durch diese Methode sollte Calciumeinstrom ausfindig gemacht werden. Der Calciumeinstrom dient als Hinweis auf präsynaptische Terminale, daher habe ich in diesen Regionen gezielter nach

Fusionsereignissen suchen können. Innerhalb der meisten Messungen konnten Signale in verschiedenen Regionen gefunden werden (vgl. Abb. 3.28, A, 22 verschiedene Regionen mit Anstieg der Fluoreszenzintensität, Auswertung von drei Regionen dargestellt). Hierbei wurden einerseits Messungen vorgenommen, die auf der spontanen Aktivität der Neurone beruhten (vgl. Abb. 3.28, B-D), andererseits wurden über Stimulationselektroden Aktionspotentiale induziert (vgl. Kap. 2.2.3.4), welche verlässlich zum Calciumeinstrom führten (vgl. Abb. 3.28, F). Die Experimente mit GCaMP6f und Synaptophysin-pHTomato oder Nrnx-pHTomato führten nicht zu einer höheren Detektionsrate der Fusionsereignisse.

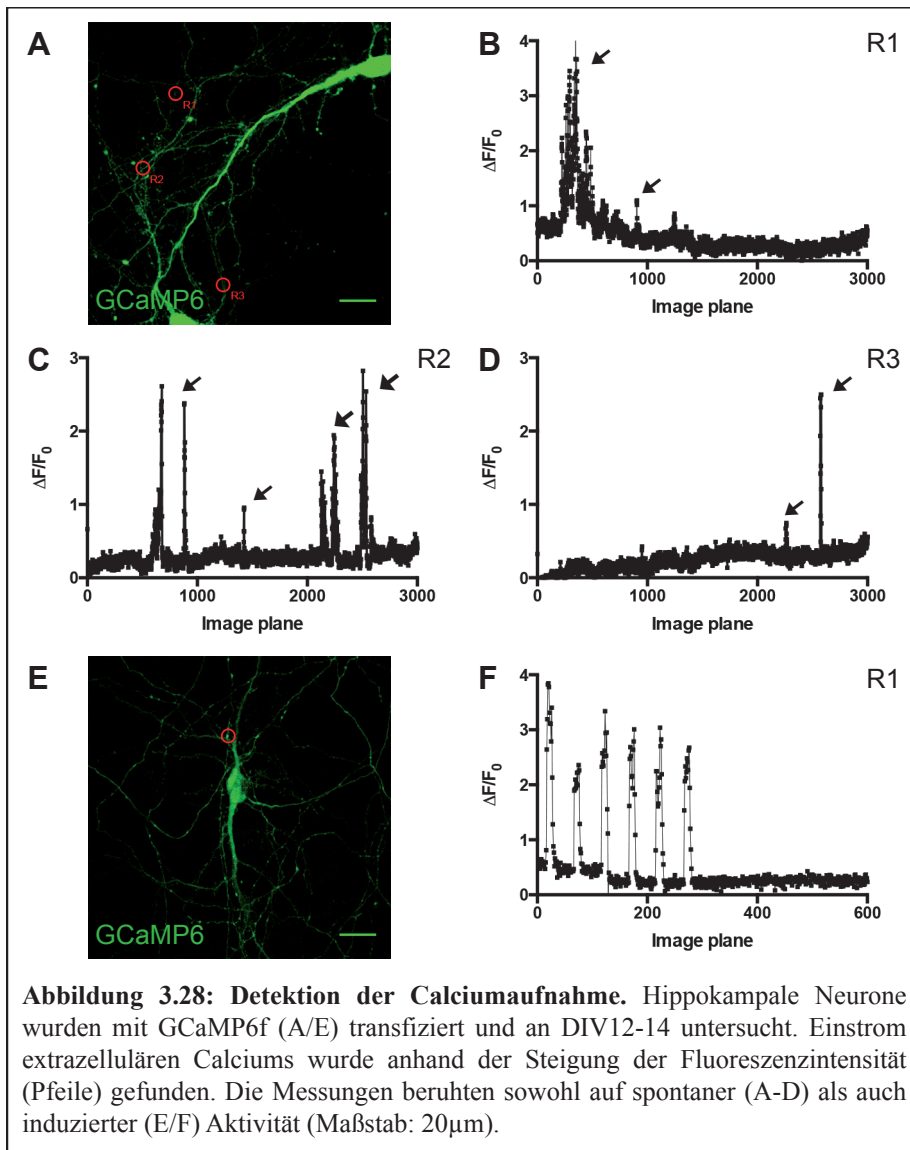
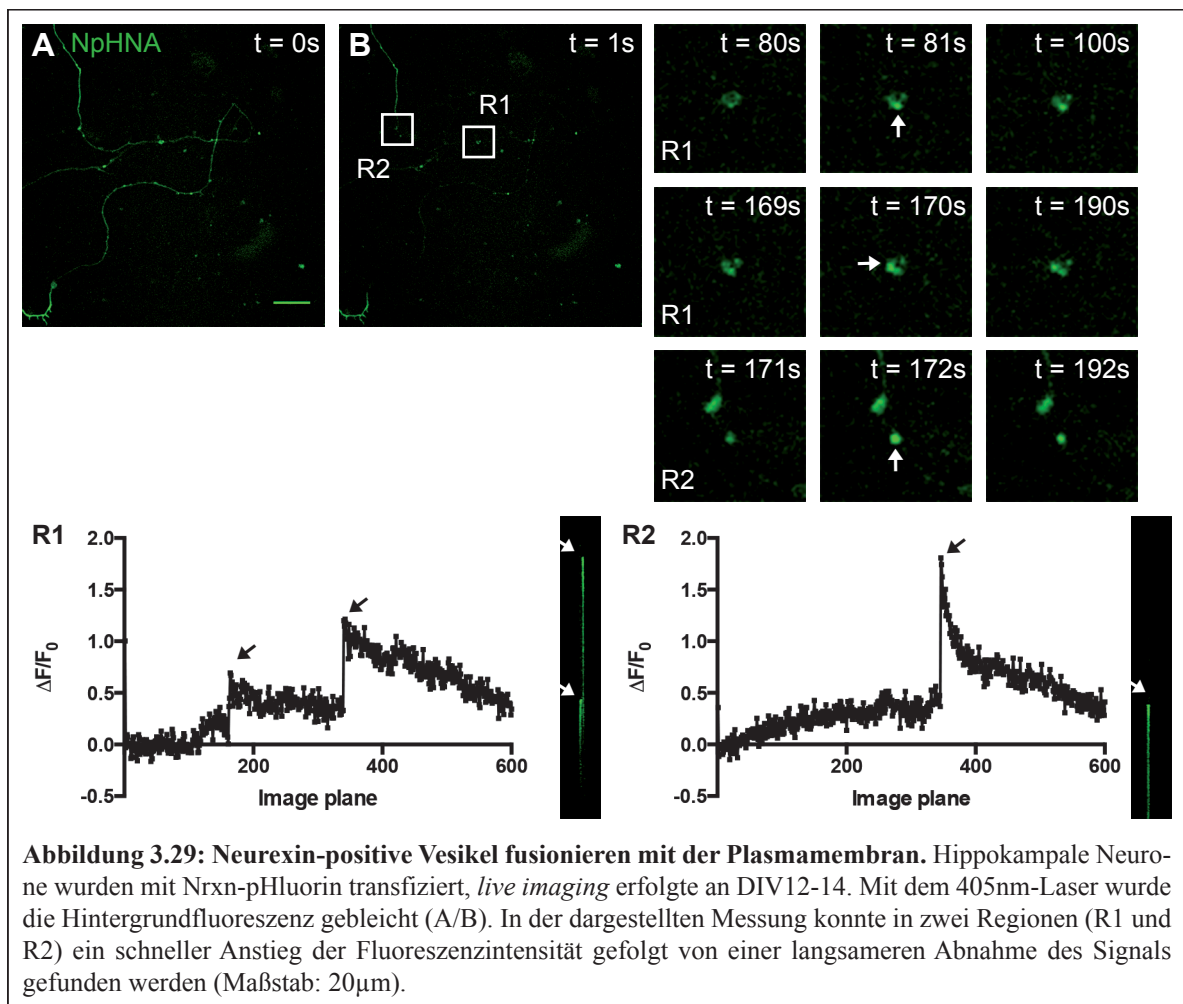


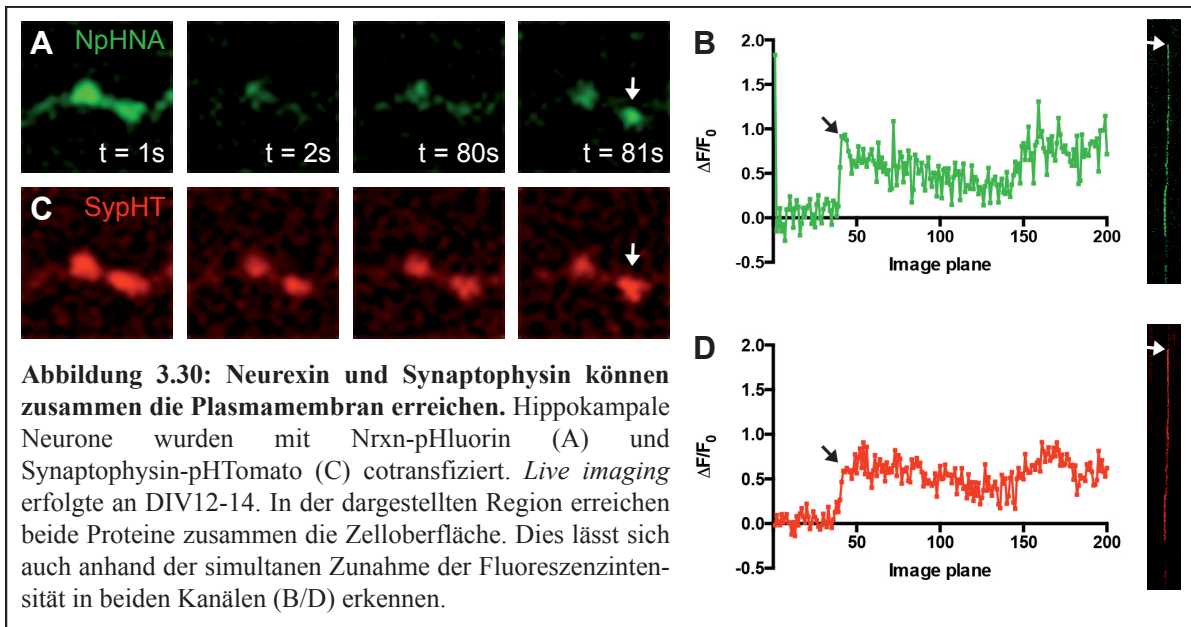
Abbildung 3.29 zeigt eine der Messung von pHluorin-markiertem Nrnx1 α . Zu sehen ist die Reduktion des Hintergrundsignals durch den 405nm-FRAP-Laser (vgl. Abb. 3.29, A/B). Während des dargestellten Messzeitraums erreichen Nrnx-positive Transportvesikel drei Mal ($t = 81s, 170s, 172s$) an zwei verschiedenen Stellen (R1, R2) die Zelloberfläche, was sich in

einem rapiden Anstieg der Fluoreszenzintensität und anschließender Reduktion durch Endozytose äußert. Die Fusionsevents lassen sich mittels Intensitätskurven ($\Delta F/F_0$, vgl. Kap. 2.2.3.5) sowie Kymographen finden. Die dargestellte Intensitätskurve entspricht prinzipiell dem erwarteten Verlauf für pHluorin (Royle *et al.*, 2008; Ryan, 2001). In den Kymographen ist ebenfalls der spontane Anstieg der Fluoreszenzintensität und deren nachfolgende Abnahme zu erkennen. Interessant ist, dass zwei der Fusionen in enger räumlicher Nähe stattfanden (Region 1) und zwei Ereignisse in kurzem zeitlichen Abstand (2s) erfolgten. Demnach erreicht das in diesen Experimenten eingesetzte Nrnx erwartungsgemäß die Zelloberfläche.



Nrnx wird mit STVs transportiert (vgl. Kap. 3.2). Durch Transfektion von verschiedenen pH-abhängig markierten Proteinen wurde überprüft, ob Nrnx und Synaptophysin nicht nur cotransportiert werden, sondern auch zusammen zur Zelloberfläche gelangen können. Denkbar wäre auch ein Mechanismus, bei dem beide Proteine intrazellulär cotransportiert werden, die Membran jedoch an unterschiedlichen Orten zu unterschiedlichen Zeiten erreichen. Abbildung 3.30 zeigt eine Messung von cotransfiziertem pHluorin-markiertem Nrnx und pHTomato-markiertem Synaptophysin. Sowohl die Intensitätskurven als auch die

Kymographen beider Kanäle (pHluorin und pHTomato) zeigen simultan ($t = 81\text{s}$) in der gleichen axonalen Region ein Anstieg der Fluoreszenzintensität. Zusammenfassend konnte mit den pH-abhängigen Experimenten nachgewiesen werden, dass die Nrnxn-positiven Transportvesikel mit der Plasmamembran fusionieren und dass Nrnxn und Synaptophysin zusammen die Zelloberfläche erreichen können.



4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der intrazelluläre Transport des präsynaptischen Transmembranproteins Nrnx charakterisiert. Zu Beginn dieser Arbeit war nur wenig über den Transport von Nrnx bekannt ((Fairless *et al.*, 2008), vgl. Kap. 1.4). Der Großteil der hier durchgeführten Experimente basiert auf direkter Beobachtung der Dynamik fluoreszenzmarkierter Proteine in lebenden Neuronen (*live imaging*). Durch diese Methodik konnte die Art der Nrnx-positiven Vesikel bestimmt werden. Des Weiteren konnte die Abhängigkeit des Transports von Mikrotubuli sowie die Notwendigkeit des Kinesins KIF1A nachgewiesen werden. In den nachfolgenden Kapiteln soll ein Bild des Mechanismus des Nrnx-Transports und dessen mögliche Bedeutung für die Synapsenfunktion gezeichnet werden.

4.1 Neurexin ist Bestandteil von *synaptic vesicle protein transport vesicles*

Die Methodik zur Untersuchung der intrazellulären Dynamik von Nrnx wurde von mir zunächst etabliert. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, wurden fluoreszenzmarkierte Konstrukte verwendet. Das jeweilige Fluorophor lag hierbei im extrazellulären Teil des Nrnx und demnach innerhalb des Transportvesikels. Durch dieses Verfahren war eine Unterscheidung zwischen den α - und β -Neurexinisofomen und eine direkte Beobachtung der dynamischen Prozesse möglich.

Die Entdeckung der Nrnx-positiven Transportvesikel und die Analyse des Verteilungsmusters von Nrnx in primären, hippocampalen Neuronen zeigten, dass die Fluoreszenzmarkierung keinen Einfluss auf die Dynamik des Proteins hat (vgl. Kap. 3.1). Danach wurde die Art dieser Transportvesikel näher charakterisiert. Bassoon, welches standardmäßig als Markerprotein für *piccolo-bassoon transport vesicles* (PTVs) eingesetzt wird (Zhai *et al.*, 2001), zeigte nur eine geringe Colokalisation zu Nrnx und eine deutlich abweichende Dynamik. Dies zeigt sich in den unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Bassoon-positive Vesikel bewegen sich oft mit etwa 0,35 μ m/s (Shapira *et al.*, 2003), wurden aber auch schon mit etwa 0,88 μ m/s dokumentiert (Fejtova *et al.*, 2009). Nrnx-positive Vesikel sind in jedem Fall schneller. Im Rahmen von Studien zur Synaptogenese wurde eine Sequenz der Akkumulation (prä)synaptischer Proteine definiert, welche Bassoon-positive PTVs als zuerst an der Präsynapse ankommende Vesikel sehen (Friedman *et al.*, 2000). Es ist nach wie vor in der Diskussion, ob Nrnx für die initiale Synaptogenese oder die Spezialisierung existierender Kontakte notwendig ist (Püschel & Betz, 1995; Reissner *et al.*, 2013). Bei Nrnx-*knock outs* kommt es nicht zu massiven anatomischen Veränderungen. Axonale Wegfindung, die Anzahl

synaptischer Kontakte, die Expression und Lokalisation der untersuchten synaptischen Proteine sowie die Anzahl und Größe synaptischer Vesikel ist unverändert (Dudanova *et al.*, 2007; Missler *et al.*, 2003). Dieser Phänotyp und die im Vergleich zu Bassoon naheliegend spätere Ankunft von Nrnx-positiven Vesikeln am präsynaptischen Terminal sprechen weiter gegen einen Einfluss von Nrnx auf den Beginn der Synaptogenese.

Es wurden Markerproteine verwendet, mit denen gezeigt werden konnte, dass Nrnx nicht durch endosomale Mechanismen transportiert wird (Lasiacka & Winckler, 2011). Eingesetzt wurden Antikörper gegen endogenes Rab5a, Rab7b, Rab11 und NEEP21. Darüber hinaus wurden Colokalisierungsexperimente mit transfiziertem Nrnx und endogenem Rab3a durchgeführt. Rab3a wird in fast allen Synapsen exprimiert (Fischer von Mollard *et al.*, 1994), dennoch sind *knock out*-Phänotypen relativ mild. In Mäusen und *C. elegans* mit KO-Hintergrund ist die Anzahl synaptischer Vesikel und die Morphologie synaptischer Kontakte unverändert (Geppert *et al.*, 1994; Nonet *et al.*, 1997). Rab3a ist mit *synaptic vesicle precursors* assoziiert, welche zusätzlich Synaptophysin und Synaptotagmin enthalten können und über die Adapterproteine DENN/MADD durch den molekularen Motor KIF1A transportiert werden (Okada *et al.*, 1995). Spätere Studien am *C. elegans* Rab3a-KO zeigten jedoch, dass Synaptotagmin in diesen Mutanten normal transportiert wird. Dies ist ein Hinweis auf weitere Synaptotagmin-positive und Rab3a-negative Transportvesikel (Niwa *et al.*, 2008; Schlager & Hoogenraad, 2009).

Nachfolgend wurde die Colokalisation von endogenem und transfiziertem Synaptophysin als Markerprotein für STVs (Ahmari *et al.*, 2000; Sabo *et al.*, 2006) mit Nrnx sowie die simultane Bewegung beider Proteine mit verschiedenen Konstrukten und unter verschiedenen Bedingungen (Wildtyp und α -Nrnx-TKO) nachgewiesen. Darüber hinaus wurde an fixierten Zellen die Colokalisation von Nrnx mit den weiteren Markerproteinen Synaptotagmin und Synapsin gezeigt. Dies sind Beweise, dass Nrnx in STVs transportiert wird. STVs sind notwendig für die Reifung primärer, synaptischer Kontakte. Ihre Akkumulation im Axon ist noch nicht vollständig aufgeklärt, insbesondere kann sie *in vitro* bereits vor axonal-dendritischem Kontakt stattfinden. Zweifelsfrei konnten Abhängigkeiten zwischen der Akkumulation von STVs und Synapsin sowie dem Einstrom extrazellulären Calciums gezeigt werden (Bury & Sabo, 2011; Friedman *et al.*, 2000; Sabo *et al.*, 2006). Kürzlich konnten Bury *et al.* zeigen, dass der Nrnx/Nlgn-Komplex nicht direkt zur Akkumulation von STVs beiträgt, sondern diese in Bereichen synaptogenetischer Aktivität erfolgt. Zudem wiesen sie die simultane Akkumulation von STVs und Nrnx nach (Bury & Sabo, 2014). Diese Experimente beruhen primär auf Veränderungen der Fluoreszenzintensität. Experimentell stimmen die

Ergebnisse mit den von mir durchgeführten Arbeiten überein. Aufgrund meiner kontinuierlichen Beobachtung von Nrnx und Synaptophysin während des intrazellulären Transports können die Ergebnisse von Bury *et al.* jedoch um den Cotransport beider Proteine ergänzt werden.

4.2 Cytoskelettabhängigkeit des Neurexin-Transports

Intrazelluläre Transportprozesse basieren für die meisten sekretorischen Proteine auf vesikulärem Transport entlang Aktinfilamenten und Mikrotubuli (Cai & Sheng, 2009; Hirokawa & Noda, 2008). Durch pharmakologische Störung mittels Latrunculin A und Nocodazol konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre Langstreckentransport von Nrnx von den Mikrotubuli abhängig ist (vgl. Kap. 3.2). Aktinfilamente erscheinen auf den ersten Blick nicht notwendig für den Transport von Nrnx, die pharmakologischen Experimente lassen es jedoch nicht ausschließen, dass Aktinfilamente für Prozesse nahe der Plasmamembran und die Fusion der Vesikel benötigt werden wie es bereits für andere Vesikel gezeigt wurde (Kneussel & Wagner, 2013; Wu *et al.*, 2002; Yano *et al.*, 2006). Interessant wird die Mikrotubuliabhängigkeit mit Hinblick auf die Verteilung der Nrnx-positiven Transportvesikel. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, befinden sich die Vesikel sowohl im Axon als auch in Dendriten und sind in beiden Kompartimenten mobil, wenn auch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und unterschiedlicher Richtungsspezifität. Die anterograde oder retrograde Nettobewegung beruht auf der Orientierung der Mikrotubuli (Kapitein *et al.*, 2010). Im Axon erfolgt eine meist unidirektionale, anterograde Bewegung der Nrnx-positiven Vesikel entsprechend der *plus-end-out* Ausrichtung der Mikrotubuli. Im Gegensatz dazu steht die bidirektionale Bewegung in Dendriten durch die gemischte Orientierung der Mikrotubuli.

Über die direkte, pharmakologische Beeinflussung des Cytoskeletts hinaus wurde der Einfluss neuronaler Aktivität auf den Transport untersucht. Tetrodotoxin (TTX) inhibiert synaptische Aktivität durch Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle. Hohe Konzentrationen von Kalium (KCl) fördern die Aktivität durch schnellere Depolarisation. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Geschwindigkeit der Transportvesikel in Abhängigkeit der synaptischen Aktivität verändert. Bei Inhibierung durch TTX verlangsamten sich die Vesikel, durch Inkubation mit KCl sind die Vesikel im Mittel schneller. Insbesondere beruht dieser Effekt auf der Anzahl der Vesikel mit den höchsten gemessenen Geschwindigkeiten ($>2\mu\text{m/s}$). Demnach kann man sagen, dass die schnellste Vesikelpopulation aktivitätsabhängig ist. Aktivitätsabhängige Effekte wurden schon für andere Vesikelklassen gefunden (de Wit *et al.*,

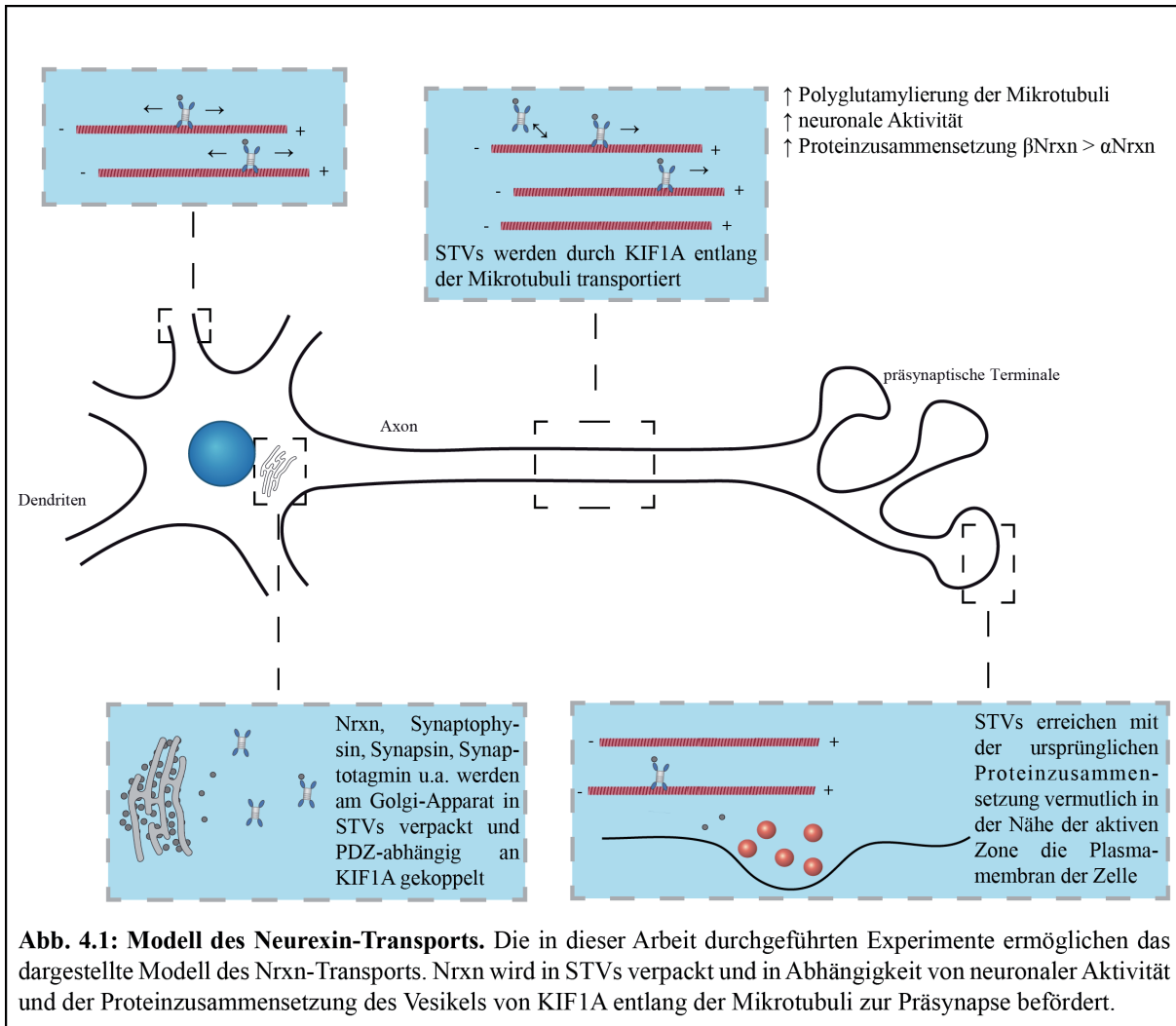
2006). In beiden Fällen handelt es sich um axonale Effekte, die Geschwindigkeit von Vesikeln innerhalb der Dendriten bleibt unbeeinflusst. In Studien wurden bereits aktivitätsabhängige Effekte des Zytoskeletts auf die Postsynapse nachgewiesen (Hu *et al.*, 2008; Jaworski *et al.*, 2009). Beides weist daraufhin, dass Zusammenhänge zwischen synaptischer Aktivität und intrazellulärem Transport durch Veränderungen der Dynamik des Zytoskeletts zu erklären sind (Hanus *et al.*, 2014; Hoogenraad & Bradke, 2009). Letztendlich wird dieses Experiment dadurch interessant, dass demnach Nrnx, welches funktionell als Modulator synaptischer Aktivität angesehen werden kann, zu einem frühen Zeitpunkt selbst von dieser Aktivität abhängig ist. Des Weiteren zeigt es, dass das Transportsystem in der Lage zu sein scheint, auf aktivitätsbedingte Erhöhungen der Neurexinnachfrage zu reagieren. Ähnliche Beispiele für aktivitätsabhängige Modulierung von synaptischem Transport liegen bereits für postsynaptische Rezeptoren und interessanterweise für postsynaptische Proteine wie Nlgn und Shank sowie für präsynaptische Proteine wie Munc18-1 und Syntaxin-1 vor (Cijssouw *et al.*, 2014; Ehlers *et al.*, 2007; Gill *et al.*, 2015; Gutierrez *et al.*, 2009; Turrigiano & Nelson, 2004).

4.3 Mechanismus des intrazellulären Transports von Neurexin

Es existiert eine Vielzahl molekularer Motoren, eingeteilt in Myosine, Dyneine und Kinesine. Myosine bewegen sich aktinabhängig und sind demnach nicht entscheidend am intrazellulären Transport von Nrnx beteiligt. Dyneine sind mikrotubuliabhängig, jedoch meistens an axonal retrogradem oder dendritischem Transport beteiligt. Kinesine bewegen sich ebenfalls entlang der Mikrotubuli und sind in vielen Fällen verantwortlich für axonal anterograden Transport (Hirokawa *et al.*, 2010). Nach dem Nachweis der Mikrotubuliabhängigkeit und Hinweisen aus proteomischen Experimenten habe ich verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen Nrnx und dem Kinesin KIF1A zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass Nrnx-positive Transportvesikel bezüglich Lokalisation und Geschwindigkeit vergleichbar mit KIF1A sind (Lee *et al.*, 2003; Okada *et al.*, 1995). Es wurde an fixierten Zellen eine Colokalisation zwischen Nrnx und KIF1A ermittelt, sowohl für α - als auch für β -Nrnx und ebenso für endogenes und transfiziertes KIF1A. In *live imaging*-Experimenten wurde eine synchrone Bewegung des Motors und des Proteins festgestellt. All diese Experimente weisen daraufhin, dass KIF1A am Transport von Nrnx beteiligt ist. Darüber hinaus wurden weitere *live imaging*-Experimente mit KIF1A und Synaptophysin sowie als Kontrolle Bassoon durchgeführt. Für Synaptophysin-enthaltende Vesikel ist bereits bekannt, dass sie durch

KIF1A transportiert werden (Bury & Sabo, 2011; Okada *et al.*, 1995; Sabo *et al.*, 2006), was hier als Bestätigung der Nrnx-transportierenden STVs angesehen werden kann. Zwischen Bassoon und KIF1A besteht kein Zusammenhang, Bassoon-positive PTVs werden durch KIF5B transportiert (Cai *et al.*, 2007).

Anhand dieser Kenntnis über den molekularen Motor KIF1A und der bisher diskutierten Ergebnisse lässt sich ein einheitliches Bild des Mechanismus des intrazellulären Nrnx-Transports erstellen (vgl. Abb. 4.1). Nrnx wird im Golgi-Apparat in *synaptic vesicle protein transport vesicles* verpackt. Der Transport erfolgt durch KIF1A entlang der Mikrotubuli. Die Bindungsfähigkeit zwischen Mikrotubuli und Kinesinen ist abhängig von posttranslationalen Modifikationen der Mikrotubuli. Polyglutamylierte Mikrotubuli weisen die höchste Affinität für KIF1A auf (Ikegami *et al.*, 2007; Konishi & Setou, 2009). Derart modifizierte Mikrotubuli sind sowohl im Axon als auch in Dendriten vorhanden. Dies erklärt, neben der Existenz postsynaptischer Subpopulationen von Nrnx (Kattenstroth *et al.*, 2004; Taniguchi *et al.*, 2007), warum sich trotz der primär präsynaptischen Lokalisation von Nrnx die Transportvesikel in beiden Kompartimenten bewegen. Die einheitliche Orientierung der Mikrotubuli im Axon ermöglicht einen schnelleren und kontinuierlicheren Transport als die gemischte Orientierung in Dendriten. Auch die Abhängigkeit von synaptischer Aktivität lässt sich in diesem Modell erklären. Erhöhte synaptische Aktivität führt zu häufigerer Polyglutamylierung der Mikrotubuli (Maas *et al.*, 2009) und damit ebenso zu besseren Transportbedingungen.



Die *live imaging*-Experimente an Nrxn-Deletionsmutanten (NENA- Δ 3, NENA Δ 55+10) bestätigten die zuvor in der Arbeitsgruppe durchgeführten Studien zur Bedeutung des C-terminalen PDZ-Bindungsmotivs für den Transport (Fairless *et al.*, 2008). Die Deletion des PDZ-Bindungsmotivs führt zur Akkumulation von Nrxn im Zellkörper. Sie spielt jedoch keine Rolle bei der Geschwindigkeit der Transportvesikel. Nrxn1 β -positive Vesikel sind schneller als Nrxn1 α -positive Vesikel, obwohl das PDZ-Bindungsmotiv identisch ist. Transportvesikel mit beiden Neurexinvarianten weisen eine Geschwindigkeit auf die im Rahmen der α -Nrxn-Messungen liegt. Die Ursache für die unterschiedlichen Geschwindigkeiten von α -Nrxn, β -Nrxn und α -/ β -Nrxn colokalisierten Vesikeln (vgl. Kap. 3.2) ließ sich experimentell nicht abschließend aufklären. Jedoch lassen die dargestellten Experimente zur Art der Transportvesikel, insbesondere in Hinblick auf die Colokalisation beider Neurexinvarianten, die Analyse der Deletionsmutanten sowie zur Notwendigkeit von KIF1A für beide Neurexinisoformentypen eine denkbare Erklärung zu. Die beobachteten Prozesse könnten auf den unterschiedlichen extrazellulären Strukturen von α - und β -Nrxn basieren. α -

Nrxn enthält extrazellulär drei EGF-ähnliche Domänen und sechs LNS-Domänen, wohingegen β -Nrxn ein LNS-Domäne und eine kurze, β -spezifische Sequenz enthält. Tanaka *et al.* haben gezeigt, dass sich die Architektur des Nrxn/Nlgn-Komplexes aufgrund dieser extrazellulären Strukturen stark unterscheidet. Durch Korrelation von Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM, *correlative light-electron microscopy*) wurde für β -Nrxn eine wesentlich höhere Packungsdichte an transsynaptischen Kontakten gefunden (Tanaka *et al.*, 2012). Eine vergleichbare strukturelle Verteilung könnte in Abhängigkeit von der Anzahl der Neurexinmoleküle auch innerhalb der Transportvesikel vorliegen, wodurch die hoch variablen Oberflächeneigenschaften der Vesikel (Takamori *et al.*, 2006) modifiziert würden. Möglich wären durch ein höheres β -Nrxn-Aufkommen eine höhere Anzahl an Bindungsstellen für KIF1A. Zur Konsequenz der simultanen Bindung mehrerer Motoren desselben Typs existieren verschiedene Aussagen. *In vivo*-Studien an *Drosophila*-Embryonen erbrachten keinen Nachweis des Einflusses mehrerer gleicher Motoren, *in vitro* konnte jedoch gezeigt werden, dass Cargo dadurch mit einer höheren Geschwindigkeit und einer höheren Schrittlänge transportiert wird (Mallik *et al.*, 2005; Shubeita *et al.*, 2008; Vershinin *et al.*, 2007).

Wie bereits in Kapitel 3.4 beschrieben existieren meistens mehrere gebundene Motoren an einem Vesikel, welche untereinander reguliert sein müssen. Diese Regulation bezieht sich auf die Aktivitätsdauer der Motoren, die Bindungsdauer der Motoren an den Cargo und die simultane Bindung des Motors an den Cargo und das Zytoskelett (Gross, 2004; Karcher *et al.*, 2002; Schlager & Hoogenraad, 2009; Vale, 2003). Für Myosine und Kinesine wurde beschrieben, dass sich die Cargo-bindende Domäne in Abwesenheit des Cargos autoinhibitorisch um die Motordomäne falten kann (Coy *et al.*, 1999; Thirumurugan *et al.*, 2006). Motorassoziierte Proteine, wie der mit Dynein interagierende Proteinkomplex Dynactin, unter anderem bestehend aus p150, Dynamitin und Arp1 (*actin related protein*), können die Aktivität und die Bindung zum Cargo beeinflussen (Karki & Holzbaur, 1999; Pfister *et al.*, 2006; Schroer, 2004). Zur Untersuchung der Aktivität spezifischer Motoren wurden innovative Methoden verwendet. Kapitein *et al.* nutzten weitestgehend immobile Peroxisomen als artifizielles Cargo, welches sie mit RFP (*red fluorescent protein*) als Fluoreszenzmarker und FKBP (FK506 *binding protein*) koppelten. FKBP bindet unter Zugabe von Rapamycin an FRB (FKBP-*rapamycin binding domain*, (Banaszynski *et al.*, 2005)), welches wiederum an Motor- oder Adapterprotein gebunden war. Dadurch konnte in Abhängigkeit der eingesetzten Konstrukte die jeweilige Aktivität der Motoren direkt untersucht werden (Kapitein *et al.*, 2010). Diese Vorgehensweise wurde des Weiteren genutzt,

um Motor-Cargo-Interaktionen von Kinesinen zu untersuchen (Jenkins *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde ein direkterer Ansatz gewählt, um die tatsächliche Aktivität von KIF1A während des Nrnx-Transports nachzuweisen. Es wurde ein shRNA-vermittelter *knock down* von KIF1A durchgeführt. Das eingesetzte Konstrukt enthielt eGFP als Fluoreszenzmarker und die KIF1A-shRNA (Liu *et al.*, 2012). *Live imaging* von Nrnx ergab eine massive Reduktion des Transports, woraus sich schließen lässt, dass KIF1A der aktive Motor für den Nrnx-Transport ist. Die *rescue*-Experimente mit shRNA-resistentem KIF1A (Xue *et al.*, 2010) weisen nach, dass unter Einsatz der shRNA keine anderen Faktoren als der *knock down* selbst eine Rolle spielen, sogenannte *off-target* Effekte also nicht vorliegen.

In der Ähnlichkeit der bekannten *knock out*-Phänotypen von KIF1A und Nrnx spiegelt sich der in dieser Arbeit beschriebene Zusammenhang wider. In beiden Fällen sterben KO-Mäuse innerhalb kurzer Zeit nach der Geburt. Der KIF1A-KO geht erwartungsgemäß einher mit einer massiven Einschränkung axonalen Transports, es kommt zu einer Verringerung der Dichte synaptischer Vesikel (Akkumulation im Zellkörper) und der Anzahl präsynaptischer Terminale (Yonekawa *et al.*, 1998). Die geringere Anzahl inhibitorischer Synapsen (Dudanova *et al.*, 2007) sowie eine dramatisch reduzierte Ausschüttung von Neurotransmittern an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen (Missler *et al.*, 2003) sind die entsprechenden Nrnx-KO-Phänotypen. Klar ist, dass zwischen Nrnx und KIF1A keine gegenseitige Abhängigkeit besteht, da in Nrnx-TKO keine Anzeichen für eine verminderte KIF1A-Funktion vorliegen, viel mehr ist Nrnx abhängig von KIF1A. Der molekulare Motor zeigt darüber hinaus noch stärkere Phänotypen, da eine Vielzahl synaptischer Proteine von seiner Funktion abhängig sind.

Meine Experimente bezogen sich auf primäre, hippocampale Neurone aus Mäusen. Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, existiert ein α -Nrnx in Invertebraten wie *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* und *Caenorhabditis elegans*, β -Nrnx konnte bisher nur in *C. elegans* nachgewiesen werden (Biswas *et al.*, 2008; Haklai-Topper *et al.*, 2011; Tabuchi & Südhof, 2002). Mit imac (*D. melanogaster*) und UNC-104 (*C. elegans*) konnten molekulare Motoren identifiziert werden, die homolog sind zu KIF1A. Diese Motoren besitzen alle eine C-terminale PH- (*pleckstrin homology*) Domäne, welche zumindest teilweise der Bindung möglicher Cargo dient (Klopfenstein *et al.*, 2002), und notwendig sind für den axonalen Transport (Hall & Hedgecock, 1991; Pack-Chung *et al.*, 2007). Interessant ist auch ein Vergleich der Mikrotubuliorientierung in diesen Spezies, da sie von der Orientierung in Vertebraten abweicht. Alle untersuchten Neurone in *Drosophila* teilen die axonale Orientierung mit Vertebraten, dendritisch findet sich jedoch generell das Minus-Ende der

Mikrotubuli zum Zellkörper ausgerichtet (statt gemischter Orientierung in proximalen Dendriten, (Stone *et al.*, 2008)). In *C. elegans* wurden ebenfalls mehrere Neuronentypen untersucht, in den meisten Fällen wurde eine *D. melanogaster* entsprechende Orientierung gefunden (Chisholm, 2013; Maniar *et al.*, 2012; Ou *et al.*, 2010). Dementsprechend könnte der axonale Nrnx-Transport wie in dieser Arbeit beschrieben stattfinden, dendritischer Transport müsste auf andere Weise reguliert sein.

Die durchgeführten Experimente zur Oberflächenfusion Nrnx-positiver Vesikel (vgl. Kap 3.5) bilden den letzten Schritt zur Untersuchung des intrazellulären Transports in meiner Arbeit. Generell wurde während den Messungen nur eine geringe Häufigkeit der Fusionsereignisse festgestellt. Dies entspricht jedoch möglicherweise den nativen Gegebenheiten, da z.B. für synaptische Vesikel bereits eine Frequenz von einem Vesikel in etwa vier Minuten publiziert wurde (Südhof, 2013). Variationen in Zelldichte, Alter der Kulturen und Zusammensetzung der Messpuffer führten nicht zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Vesikelfusion. Des Weiteren sind diese Messungen mit verschiedenen Schwierigkeiten verknüpft: das Hintergrundsignal kann durch Einsatz eines 405nm-Lasers gebleicht werden, da in Relation zu pH-abhängigen Molekülen pro Vesikel zum Teil nur eine geringe Signalstärke besteht. Dabei wird aber auch die Signalintensität gequenschter Fluorophore verringert. Darüber hinaus macht die Motilität der Zelle und laterale Diffusion der Proteine an der Zelloberfläche eine umfangreiche Analyse notwendig. Durch Kombination des Calciumsensors GCaMP6f mit pH-abhängigen Fluorophoren sollte eine räumlich restriktivere Suche nach Fusionsereignissen an präsynaptischen Terminalen ermöglicht werden (Chen *et al.*, 2013; Li & Tsien, 2012), jedoch konnte auch auf diesem Wege keine höhere Frequenz erreicht werden. Die Induktion von Aktionspotentialen durch Stimulationselektroden wurde zuvor bereits zur Steigerung von Fusionsereignissen verwendet (van de Bospoort *et al.*, 2012), diese Protokolle wurden jedoch überwiegend mit *dense core vesicles* durchgeführt, welche direkt auf die Stimulation reagieren. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass eine Vielzahl von Aktionspotentialen keine messbaren Fusionsereignisse hervorrufen (Gandhi & Stevens, 2003), was eine weitere Erklärung für die geringe Frequenz der Ereignisse in den pH-abhängigen Experimenten ist. Trotz dieser experimentellen Schwierigkeiten gelang durch Experimente mit pH-abhängigen Fluorophoren (Miesenbock *et al.*, 1998) der Nachweis, dass die eingesetzten Neurexinkonstrukte die Zelloberfläche erreichen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dies auch zusammen mit dem bereits intrazellulär cotransportierten Synaptophysin erfolgen kann.

Es existieren mehrere Modelle zur Fusion von Vesikeln, allen voran *kiss-and-run* (Ceccarelli *et al.*, 1973; Fesce *et al.*, 1994)), *full-collapse fusion* (FF, (Heuser & Reese, 1973)) und *ultrafast endocytosis* (Watanabe *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2013). Die Unterscheidung der verschiedenen Fusionsereignisse ist mit verschiedenen Methoden möglich, die Analyse der Kinetik pH-abhängiger Fluoreszenz scheint dabei eine der verlässlichsten Methoden zu sein (Keighron *et al.*, 2012). In den hier durchgeführten Experimenten wurde eine plötzliche Zunahme der Fluoreszenzintensität mit anschließend mehrere Sekunden andauernder Abnahme gezeigt. Die Kinetik der Nrnx-pHluorin Messungen entsprechen demnach dem *full-collapse fusion* Modell. Des Weiteren analysierten Cohen *et al.* turnover Raten synaptischer Proteine. Sie fanden, dass die meisten synaptischen Proteine eine Halbwertszeit von 2-5 Tagen aufweisen. Neurexine liegen mit 2,61 (Nrnx3 α) und 2,89 (Nrnx1) sehr dicht an der Halbwertszeit von Neuroligin mit 2,56 (Nlgn2) und 2,61 (Nlgn3) (Cohen *et al.*, 2013). Dies entspricht dem funktionellen Zusammenhang zwischen Nrnx und Nlgn und ergibt mit der in dieser Arbeit ermittelten Transportgeschwindigkeit ein erstes Bild zum metabolischen Umsatz von Neurexin. Dies unterstreicht die Bedeutung des intrazellulären Transports, durch den jederzeit eine ausreichende Menge synaptischer Proteine zur Verfügung steht.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der intrazelluläre Transport des präsynaptischen Transmembranproteins Nrnx intensiv untersucht und konnte weitgehend aufgeklärt werden. Die Experimente wurden mit Neurexin1 durchgeführt. Die Neurexine1/2/3 auf einem Genom sind unterschiedlicher als Neurexin1 in verschiedenen Spezies (Reissner *et al.*, 2013). Dennoch sind die C-terminalen Sequenzen und insbesondere das PDZ-Bindungsmotiv soweit identisch, dass die Vermutung nahe liegt, dass der Transport aller Neurexine ähnlich verläuft. Dies experimentell nachzuweisen wäre ein weiterer Schritt.

Darüber hinaus interessant wären Fragen nach den Regulationsmechanismen zur Fusion Nrnx-positiver Vesikel in die Plasmamembran (Calcium, intrazelluläre Signalkaskaden (Sabo *et al.*, 2006)) sowie fluoreszenzmikroskopische und biochemische Studien zur Bindung zwischen dem Transportvesikel und KIF1A. Eine direkte Bindung zwischen KIF1A und dem PDZ-Motiv von Nrnx ist strukturell nicht möglich. Denkbar wären Bindungen mit Rim1 α , welches auch in hier vorgestellten Experimenten mit Nrnx colokalisiert, oder Liprin α als Adapterprotein. Für Liprin α wurde in mehreren Studien Bindungen an KIF1A sowie dessen Bedeutung für den axonalen Transport beschrieben (Chia *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2011). Insbesondere wurde ein Komplex, bestehend aus Nrnx,

Syd1 und Liprin α an der aktiven Zone in *D. melanogaster* nachgewiesen, welcher in ähnlicher Form transportrelevant sein könnte (Owald *et al.*, 2012).

5. Zusammenfassung

Neurone sind polarisierte Zellen, deren interzelluläre Kontakte der Signalweiterleitung dienen. Diese strukturelle Grundlage spiegelt sich in prä- und postsynaptischem Transport wider. Zelladhäsionsmoleküle sind an Synaptogenese, Aufrechterhaltung von synaptischen Kontakten und Signalweiterleitung beteiligt. Heterologe transsynaptische Komplexe stellen ein ideales Modell zur Untersuchung der spezifischen Transportmechanismen dar. Neurexin ist ein vorwiegend präsynaptisch lokalisiertes Transmembranprotein, dessen Bindungspartner Neuroligin an der Postsynapse lokalisiert ist. Im Gegensatz zum Transport von Neuroligin war über den Transport von Neurexin zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur wenig bekannt. Zunächst wurden *live imaging*-Verfahren zur direkten Beobachtung der Dynamik fluoreszenzmarkierter Neurexinkonstrukte in lebenden Neuronen im Labor etabliert. Mit dieser Methodik wurde die Art und Dynamik Neurexin-positiver Transportvesikel, ihre Abhängigkeit vom neuronalen Zytoskelett sowie von molekularen Motoren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Neurexin u.a. mit Synaptophysin und Synaptotagmin in *synaptic vesicle protein transport vesicles* zur Präsynapse befördert wird. Axonal ist der Transport schneller und kontinuierlicher als in Dendriten, Nrnx1 β -positive Vesikel sind schneller Nrnx1 α -positive Vesikel. Dies beruht einerseits auf der Orientierung der Mikrotubuli, von denen der Neurexin-Transport abhängig ist wie in pharmakologischen Experimenten gezeigt werden konnte, sowie andererseits vermutlich auf der Packungsdichte der verschiedenen Neurexinisoformen innerhalb der Vesikel. Der Transport von Neurexin ist darüber hinaus abhängig von neuronaler Aktivität. Durch Colokalisationsexperimente und shRNA-vermittelte *knock down* Experimente konnte nachgewiesen werden, dass das Kinesin KIF1A für den Transport notwendig ist. Mittels pH-abhängiger Fluorophore war es letztlich möglich, die Fusion Neurexin-positiver Vesikel mit der Plasmamembran nachzuweisen. Demnach stellt die vorliegende Arbeit die erste umfangreiche Untersuchung über den intrazellulären Transportmechanismus des synaptischen Zelloberflächenmoleküls Neurexin an lebenden Neuronen dar.

6. Abstract

Neurons are highly polarized cells and their synapses are intercellular contacts that are responsible for signal transduction. This structural specialization is reflected in pre- and postsynaptic transport. Cell adhesion molecules are involved in synaptic function, transmission and signal transduction. Heterologous transsynaptic complexes represent an ideal model to study the specific transport mechanisms. Neurexin is a predominantly presynaptic localized transmembrane protein, its binding partner neuroligin is localized to the postsynaptic membrane. In contrast to the transport of neuroligin, little was known about the transport of neurexin at the beginning of this project.

First, live imaging methods for the direct observation of the dynamics of fluorescently labeled neurexin constructs were established in the laboratory. With this methodology, the nature and dynamics of neurexin-positive transport vesicles, their dependence on the neuronal cytoskeleton and molecular motors were studied. It was shown that neurexin is transported together with Synaptophysin and Synaptotagmin in synaptic vesicle protein transport vesicles to the presynaptic terminal. Axonal transport is faster and more continuous than in dendrites, Nrnx1 β -positive vesicles are faster than Nrnx1 α -positive vesicles. This is partly due to the orientation of the microtubules, of which the transport is dependent as discovered in pharmacological experiments, as well as probably due to the packing density of the various neurexin isoforms within the vesicles. Furthermore, the transport of neurexin is dependent on neuronal activity. Using colocalization studies and shRNA-mediated knockdown experiments it was demonstrated that the kinesin KIF1A is necessary for transport of neurexin. Via pH-dependent fluorophores it was ultimately possible to prove the fusion of neurexin-positive vesicles with the plasma membrane. Thus, the current work represents the first extensive study on the intracellular transport mechanism of the synaptic cell surface molecule neurexin on living neurons.

7. Literaturverzeichnis

- Ahmari, S. E., Buchanan, J., und Smith, S. J. (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nature neuroscience* **3**, 445-451
- Aizawa, H., Sekine, Y., Takemura, R., Zhang, Z., Nangaku, M., und Hirokawa, N. (1992) Kinesin family in murine central nervous system. *The Journal of cell biology* **119**, 1287-1296
- Akhmanova, A., und Steinmetz, M. O. (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 309-322
- Akins, M. R., und Biederer, T. (2006) Cell-cell interactions in synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 83-89
- Alabi, A. A., und Tsien, R. W. (2013) Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission. *Annual review of physiology* **75**, 393-422
- Arac, D., Boucard, A. A., Ozkan, E., Strop, P., Newell, E., Sudhof, T. C., und Brunger, A. T. (2007) Structures of neuroligin-1 and the neuroligin-1/neurexin-1 beta complex reveal specific protein-protein and protein-Ca²⁺ interactions. *Neuron* **56**, 992-1003
- Arons, M. H., Thynne, C. J., Grabrucker, A. M., Li, D., Schoen, M., Cheyne, J. E., Boeckers, T. M., Montgomery, J. M., und Garner, C. C. (2012) Autism-associated mutations in ProSAP2/Shank3 impair synaptic transmission and neurexin-neuroligin-mediated transsynaptic signaling. *Journal of Neuroscience* **32**, 14966-14978
- Association, A. P. (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th edition ed., American Psychiatric Publishing
- Atasoy, D., Schoch, S., Ho, A., Nadasy, K. A., Liu, X., Zhang, W., Mukherjee, K., Nosyreva, E. D., Fernandez-Chacon, R., Missler, M., Kavalali, E. T., und Südhof, T. C. (2007) Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2525-2530
- Autism Genome Project, C., Szatmari, P., Paterson, A. D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., Liu, X. Q., Vincent, J. B., Skaug, J. L., Thompson, A. P., Senman, L., Feuk, L., Qian, C., Bryson, S. E., Jones, M. B., Marshall, C. R., Scherer, S. W., Vieland, V. J., Bartlett, C., Mangin, L. V., Goedken, R., Segre, A., Pericak-Vance, M. A., Cuccaro, M. L., Gilbert, J. R., Wright, H. H., Abramson, R. K., Betancur, C., Bourgeron, T., Gillberg, C., Leboyer, M., Buxbaum, J. D., Davis, K. L., Hollander, E., Silverman, J. M., Hallmayer, J., Lotspeich, L., Sutcliffe, J. S., Haines, J. L., Folstein, S. E., Piven, J., Wassink, T. H., Sheffield, V., Geschwind, D. H., Bucan, M., Brown, W. T., Cantor, R. M., Constantino, J. N., Gilliam, T. C., Herbert, M., Lajonchere, C., Ledbetter, D. H., Lese-Martin, C., Miller, J., Nelson, S., Samango-Sprouse, C. A., Spence, S., State, M., Tanzi, R. E., Coon, H., Dawson, G., Devlin, B., Estes, A., Flodman, P., Klei, L., McMahon, W. M., Minshew, N., Munson, J., Korvatska, E., Rodier, P. M., Schellenberg, G. D., Smith, M., Spence, M. A., Stodgell, C., Tepper, P. G., Wijsman, E. M., Yu, C. E., Roge, B., Mantoulan, C., Wittmeyer, K., Poustka, A., Felder, B., Klauck, S. M., Schuster, C., Poustka, F., Bolte, S., Feineis-Matthews, S., Herbrecht, E., Schmotzer, G., Tsiantis, J., Papanikolaou, K., Maestrini, E., Bacchelli, E., Blasi, F., Carone, S., Toma, C., Van Engeland, H., de Jonge, M., Kemner, C., Koop, F., Langemeijer, M., Hijmans, C., Staal, W. G., Baird, G., Bolton, P. F., Rutter, M. L., Weisblatt, E., Green, J., Aldred, C., Wilkinson, J. A., Pickles, A., Le Couteur, A., Berney, T., McConachie, H., Bailey, A. J., Francis, K., Honeyman, G., Hutchinson, A., Parr, J. R., Wallace, S., Monaco, A. P., Barnby, G., Kobayashi, K., Lamb, J. A., Sousa, I., Sykes, N., Cook, E. H., Guter, S. J., Leventhal, B. L., Salt, J., Lord, C., Corsello, C., Hus, V., Weeks, D. E., Volkmar, F., Tauber, M., Fombonne, E., Shih, A., und Meyer,

- K. J. (2007) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature genetics* **39**, 319-328
- Baas, P. W., Deitch, J. S., Black, M. M., und Banker, G. A. (1988) Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 8335-8339
- Bailey, A., Phillips, W., und Rutter, M. (1996) Autism: towards an integration of clinical, genetic, neuropsychological, and neurobiological perspectives. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* **37**, 89-126
- Baird, G. S., Zacharias, D. A., und Tsien, R. Y. (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 11241-11246
- Balaji, J., und Ryan, T. A. (2007) Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 20576-20581
- Banaszynski, L. A., Liu, C. W., und Wandless, T. J. (2005) Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 4715-4721
- Bearer, E. L., und Reese, T. S. (1999) Association of actin filaments with axonal microtubule tracts. *Journal of neurocytology* **28**, 85-98
- Bel, C., Oguievetskaia, K., Pitaval, C., Goutebroze, L., und Faivre-Sarrailh, C. (2009) Axonal targeting of Caspr2 in hippocampal neurons via selective somatodendritic endocytosis. *Journal of cell science* **122**, 3403-3413
- Berkel, S., Marshall, C. R., Weiss, B., Howe, J., Roeth, R., Moog, U., Endris, V., Roberts, W., Szatmari, P., Pinto, D., Bonin, M., Riess, A., Engels, H., Sprengel, R., Scherer, S. W., und Rappold, G. A. (2010) Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nature genetics* **42**, 489-491
- Biederer, T., und Südhof, T. C. (2000) Mints as adaptors. Direct binding to neurexins and recruitment of munc18. *The Journal of biological chemistry* **275**, 39803-39806
- Biswas, S., Russell, R. J., Jackson, C. J., Vidovic, M., Ganeshina, O., Oakeshott, J. G., und Claudianos, C. (2008) Bridging the synaptic gap: neuroligins and neurexin I in *Apis mellifera*. *PloS one* **3**, e3542
- Bolliger, M. F., Frei, K., Winterhalter, K. H., und Gloor, S. M. (2001) Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression. *The Biochemical journal* **356**, 581-588
- Boucard, A. A., Chubykin, A. A., Comoletti, D., Taylor, P., und Südhof, T. C. (2005) A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron* **48**, 229-236
- Bourgeron, T. (2009) A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol* **19**, 231-234
- Bridgman, P. C. (2004) Myosin-dependent transport in neurons. *J Neurobiol* **58**, 164-174
- Budreck, E. C., und Scheiffele, P. (2007) Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *The European journal of neuroscience* **26**, 1738-1748
- Burrone, J., Li, Z., und Murthy, V. N. (2006) Studying vesicle cycling in presynaptic terminals using the genetically encoded probe synaptopHluorin. *Nat Protoc* **1**, 2970-2978
- Bury, L. A., und Sabo, S. L. (2011) Coordinated trafficking of synaptic vesicle and active zone proteins prior to synapse formation. *Neural Dev* **6**, 24
- Bury, L. A., und Sabo, S. L. (2014) Dynamic mechanisms of neuroligin-dependent presynaptic terminal assembly in living cortical neurons. *Neural Dev* **9**, 13

- Buss, F., Luzio, J. P., und Kendrick-Jones, J. (2002) Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic* **3**, 851-858
- Cai, Q., Pan, P. Y., und Sheng, Z. H. (2007) Syntabulin-kinesin-1 family member 5B-mediated axonal transport contributes to activity-dependent presynaptic assembly. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 7284-7296
- Cai, Q., und Sheng, Z. H. (2009) Molecular motors and synaptic assembly. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **15**, 78-89
- Ceccarelli, B., Hurlbut, W. P., und Mauro, A. (1973) Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *The Journal of cell biology* **57**, 499-524
- Chen, J., Yu, S., Fu, Y., und Li, X. (2014) Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**, 276
- Chen, T. W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K., und Kim, D. S. (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **499**, 295-300
- Cheney, R. E., O'Shea, M. K., Heuser, J. E., Coelho, M. V., Wolenski, J. S., Espreafico, E. M., Forscher, P., Larson, R. E., und Mooseker, M. S. (1993) Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* **75**, 13-23
- Chia, P. H., Patel, M. R., Wagner, O. I., Klopfenstein, D. R., und Shen, K. (2013) Intramolecular regulation of presynaptic scaffold protein SYD-2/liprin-alpha. *Mol Cell Neurosci* **56C**, 76-84
- Chih, B., Afridi, S. K., Clark, L., und Scheiffele, P. (2004) Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Human molecular genetics* **13**, 1471-1477
- Chih, B., Engelman, H., und Scheiffele, P. (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* **307**, 1324-1328
- Chih, B., Gollan, L., und Scheiffele, P. (2006) Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. *Neuron* **51**, 171-178
- Ching, M. S., Shen, Y., Tan, W. H., Jeste, S. S., Morrow, E. M., Chen, X., Mukaddes, N. M., Yoo, S. Y., Hanson, E., Hundley, R., Austin, C., Becker, R. E., Berry, G. T., Driscoll, K., Engle, E. C., Friedman, S., Gusella, J. F., Hisama, F. M., Irons, M. B., Lafiosca, T., LeClair, E., Miller, D. T., Neessen, M., Picker, J. D., Rappaport, L., Rooney, C. M., Sarco, D. P., Stoler, J. M., Walsh, C. A., Wolff, R. R., Zhang, T., Nasir, R. H., und Wu, B. L. (2010) Deletions of NRXN1 (neurexin-1) predispose to a wide spectrum of developmental disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **153B**, 937-947
- Chisholm, A. D. (2013) Cytoskeletal dynamics in *Caenorhabditis elegans* axon regeneration. *Annual review of cell and developmental biology* **29**, 271-297
- Chubykin, A. A., Atasoy, D., Etherton, M. R., Brose, N., Kavalali, E. T., Gibson, J. R., und Südhof, T. C. (2007) Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron* **54**, 919-931
- Cijsouw, T., Weber, J. P., Broeke, J. H., Broek, J. A., Schut, D., Kroon, T., Saarloos, I., Verhage, M., und Toonen, R. F. (2014) Munc18-1 redistributes in nerve terminals in an activity- and PKC-dependent manner. *The Journal of cell biology* **204**, 759-775
- Cohen, L. D., Zuchman, R., Sorokina, O., Muller, A., Dieterich, D. C., Armstrong, J. D., Ziv, T., und Ziv, N. E. (2013) Metabolic turnover of synaptic proteins: kinetics, interdependencies and implications for synaptic maintenance. *PLoS one* **8**, e63191
- Collins, M. O., Husi, H., Yu, L., Brandon, J. M., Anderson, C. N., Blackstock, W. P., Choudhary, J. S., und Grant, S. G. (2006) Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *Journal of neurochemistry* **97 Suppl 1**, 16-23

- Comoletti, D., De Jaco, A., Jennings, L. L., Flynn, R. E., Gaietta, G., Tsigelny, I., Ellisman, M. H., and Taylor, P. (2004) The Arg451Cys-neuroigin-3 mutation associated with autism reveals a defect in protein processing. *Journal of Neuroscience* **24**, 4889-4893
- Conde, C., and Caceres, A. (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature reviews. Neuroscience* **10**, 319-332
- Coppola, T., Magnin-Luthi, S., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Schiavo, G., and Regazzi, R. (2001) Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca²⁺ channels, SNAP-25, and synaptotagmin. *The Journal of biological chemistry* **276**, 32756-32762
- Coy, D. L., Hancock, W. O., Wagenbach, M., and Howard, J. (1999) Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nature cell biology* **1**, 288-292
- Craig, A. M., and Banker, G. (1994) Neuronal polarity. *Annual review of neuroscience* **17**, 267-310
- Craig, A. M., Blackstone, C. D., Haganir, R. L., and Banker, G. (1993) The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron* **10**, 1055-1068
- Davydova, D., Marini, C., King, C., Klueva, J., Bischof, F., Romorini, S., Montenegro-Venegas, C., Heine, M., Schneider, R., Schroder, M. S., Altmann, W. D., Henneberger, C., Rusakov, D. A., Gundelfinger, E. D., and Fejtova, A. (2014) Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca(2+) channels via RIM-binding protein. *Neuron* **82**, 181-194
- De Brabander, M., De May, J., Joniau, M., and Geuens, G. (1977) Ultrastructural immunocytochemical distribution of tubulin in cultured cells treated with microtubule inhibitors. *Cell biology international reports* **1**, 177-183
- De Jaco, A., Lin, M. Z., Dubi, N., Comoletti, D., Miller, M. T., Camp, S., Ellisman, M., Butko, M. T., Tsien, R. Y., and Taylor, P. (2010) Neuroigin trafficking deficiencies arising from mutations in the alpha/beta-hydrolase fold protein family. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 28674-28682
- de Wit, J., Toonen, R. F., Verhaagen, J., and Verhage, M. (2006) Vesicular trafficking of semaphorin 3A is activity-dependent and differs between axons and dendrites. *Traffic* **7**, 1060-1077
- Dean, C., Scholl, F. G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., and Scheiffele, P. (2003) Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nature neuroscience* **6**, 708-716
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome biology* **6**, 204
- Desai, A., and Mitchison, T. J. (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* **13**, 83-117
- Ding, J., Luo, A. F., Hu, L., Wang, D., and Shao, F. (2014) Structural basis of the ultrasensitive calcium indicator GCaMP6. *Science China. Life sciences* **57**, 269-274
- Doherty, J. L., O'Donovan, M. C., and Owen, M. J. (2012) Recent genomic advances in schizophrenia. *Clinical genetics* **81**, 103-109
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A., and Banker, G. A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **8**, 1454-1468
- Dresbach, T., Hempelmann, A., Spilker, C., tom Dieck, S., Altmann, W. D., Zuschratter, W., Garner, C. C., and Gundelfinger, E. D. (2003) Functional regions of the presynaptic cytomatrix protein bassoon: significance for synaptic targeting and cytomatrix anchoring. *Mol Cell Neurosci* **23**, 279-291
- Dudanova, I., Tabuchi, K., Rohlmann, A., Südhof, T. C., and Missler, M. (2007) Deletion of alpha-neurexins does not cause a major impairment of axonal pathfinding or synapse formation. *J Comp Neurol* **502**, 261-274

- Durand, C. M., Betancur, C., Boeckers, T. M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., Nygren, G., Rastam, M., Gillberg, I. C., Anckarsater, H., Sponheim, E., Goubran-Botros, H., Delorme, R., Chabane, N., Mouren-Simeoni, M. C., de Mas, P., Bieth, E., Roge, B., Heron, D., Burglen, L., Gillberg, C., Leboyer, M., and Bourgeron, T. (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature genetics* **39**, 25-27
- Ehlers, M. D., Heine, M., Groc, L., Lee, M. C., and Choquet, D. (2007) Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity. *Neuron* **54**, 447-460
- Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A. D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., Salin, P. A., Job, D., and Wehland, J. (2005) A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 7853-7858
- Etherton, M. R., Blaiss, C. A., Powell, C. M., and Südhof, T. C. (2009) Mouse neurexin-1alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 17998-18003
- Evans, R. M., and Zamponi, G. W. (2006) Presynaptic Ca²⁺ channels--integration centers for neuronal signaling pathways. *Trends in neurosciences* **29**, 617-624
- Ey, E., Leblond, C. S., and Bourgeron, T. (2011) Behavioral profiles of mouse models for autism spectrum disorders. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* **4**, 5-16
- Fabrichny, I. P., Leone, P., Sulzenbacher, G., Comoletti, D., Miller, M. T., Taylor, P., Bourne, Y., and Marchot, P. (2007) Structural analysis of the synaptic protein neuroligin and its beta-neurexin complex: determinants for folding and cell adhesion. *Neuron* **56**, 979-991
- Fairless, R., Masius, H., Rohlmann, A., Heupel, K., Ahmad, M., Reissner, C., Dresbach, T., and Missler, M. (2008) Polarized targeting of neurexins to synapses is regulated by their C-terminal sequences. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 12969-12981
- Fawcett, J. P., Aloyz, R., McLean, J. H., Pareek, S., Miller, F. D., McPherson, P. S., and Murphy, R. A. (1997) Detection of brain-derived neurotrophic factor in a vesicular fraction of brain synaptosomes. *The Journal of biological chemistry* **272**, 8837-8840
- Fejtova, A., Davydova, D., Bischof, F., Lazarevic, V., Altmann, W. D., Romorini, S., Schone, C., Zuschratter, W., Kreutz, M. R., Garner, C. C., Ziv, N. E., and Gundelfinger, E. D. (2009) Dynein light chain regulates axonal trafficking and synaptic levels of Bassoon. *The Journal of cell biology* **185**, 341-355
- Feng, J., Schroer, R., Yan, J., Song, W., Yang, C., Bockholt, A., Cook, E. H., Jr., Skinner, C., Schwartz, C. E., and Sommer, S. S. (2006) High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism. *Neuroscience letters* **409**, 10-13
- Fenster, S. D., Chung, W. J., Zhai, R., Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, A. M., Kaempf, U., Kindler, S., Gundelfinger, E. D., and Garner, C. C. (2000) Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* **25**, 203-214
- Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F., and Meldolesi, J. (1994) Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends in cell biology* **4**, 1-4
- Fischer von Mollard, G., Stahl, B., Li, C., Südhof, T. C., and Jahn, R. (1994) Rab proteins in regulated exocytosis. *Trends in biochemical sciences* **19**, 164-168
- Fletcher, T. L., and Banker, G. A. (1989) The establishment of polarity by hippocampal neurons: the relationship between the stage of a cell's development in situ and its subsequent development in culture. *Developmental biology* **136**, 446-454

- Fogel, A. I., Akins, M. R., Krupp, A. J., Stagi, M., Stein, V., und Biederer, T. (2007) SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 12516-12530
- Folstein, S. E., und Rosen-Sheidley, B. (2001) Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nature reviews. Genetics* **2**, 943-955
- Foth, B. J., Goedecke, M. C., und Soldati, D. (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 3681-3686
- Friedman, H. V., Bresler, T., Garner, C. C., und Ziv, N. E. (2000) Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* **27**, 57-69
- Fukushima, N., Furuta, D., Hidaka, Y., Moriyama, R., und Tsujiuchi, T. (2009) Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *Journal of neurochemistry* **109**, 683-693
- Gandhi, S. P., und Stevens, C. F. (2003) Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature* **423**, 607-613
- Garrido, J. J., Fernandes, F., Moussif, A., Fache, M. P., Giraud, P., und Dargent, B. (2003) Dynamic compartmentalization of the voltage-gated sodium channels in axons. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **95**, 437-445
- Gauthier, J., Spiegelman, D., Piton, A., Lafreniere, R. G., Laurent, S., St-Onge, J., Lapointe, L., Hamdan, F. F., Cossette, P., Mottron, L., Fombonne, E., Joober, R., Marineau, C., Drapeau, P., und Rouleau, G. A. (2009) Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **150B**, 421-424
- Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelieres, F. P., De Mey, J., MacDonald, M. E., Lessmann, V., Humbert, S., und Saudou, F. (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* **118**, 127-138
- Gennerich, A., und Vale, R. D. (2009) Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Current opinion in cell biology* **21**, 59-67
- Geppert, M., Bolshakov, V. Y., Siegelbaum, S. A., Takei, K., De Camilli, P., Hammer, R. E., und Sudhof, T. C. (1994) The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* **369**, 493-497
- Giannone, G., Mondin, M., Grillo-Bosch, D., Tessier, B., Saint-Michel, E., Czondor, K., Sainlos, M., Choquet, D., und Thoumine, O. (2013) Neurexin-1beta binding to neuroligin-1 triggers the preferential recruitment of PSD-95 versus gephyrin through tyrosine phosphorylation of neuroligin-1. *Cell Rep* **3**, 1996-2007
- Gill, I., Droubi, S., Giovedi, S., Fedder, K. N., Bury, L. A., Bosco, F., Sceniak, M. P., Benfenati, F., und Sabo, S. L. (2015) Presynaptic NMDA receptors - dynamics and distribution in developing axons in vitro and in vivo. *Journal of cell science* **128**, 768-780
- Gillberg, C. (1998) Asperger syndrome and high-functioning autism. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* **172**, 200-209
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182
- Gokce, O., und Südhof, T. C. (2013) Membrane-Tethered Monomeric Neurexin LNS-Domain Triggers Synapse Formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**, 14617-14628
- Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S. X., Linhoff, M. W., und Craig, A. M. (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* **119**, 1013-1026

- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., und Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J., und Lagnado, L. (2006) Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron* **51**, 773-786
- Gray, E. G. (1963) Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *Journal of anatomy* **97**, 101-106
- Gross, S. P. (2004) Hither and yon: a review of bi-directional microtubule-based transport. *Phys Biol* **1**, R1-11
- Gundelfinger, E. D., und Fejtova, A. (2012) Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone. *Current opinion in neurobiology* **22**, 423-430
- Gutierrez, R. C., Flynn, R., Hung, J., Kertesz, A. C., Sullivan, A., Zamponi, G. W., El-Husseini, A., und Colicos, M. A. (2009) Activity-driven mobilization of post-synaptic proteins. *The European journal of neuroscience* **30**, 2042-2052
- Ha, J., Lo, K. W., Myers, K. R., Carr, T. M., Humsi, M. K., Rasoul, B. A., Segal, R. A., und Pfister, K. K. (2008) A neuron-specific cytoplasmic dynein isoform preferentially transports TrkB signaling endosomes. *The Journal of cell biology* **181**, 1027-1039
- Hagberg, B., Goutieres, F., Hanefeld, F., Rett, A., und Wilson, J. (1985) Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. *Brain & development* **7**, 372-373
- Haklai-Topper, L., Soutschek, J., Sabanay, H., Scheel, J., Hobert, O., und Peles, E. (2011) The neurexin superfamily of *Caenorhabditis elegans*. *Gene expression patterns : GEP* **11**, 144-150
- Hall, D. H., und Hedgecock, E. M. (1991) Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell* **65**, 837-847
- Hammond, J. W., Huang, C. F., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G., und Verhey, K. J. (2010) Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Molecular biology of the cell* **21**, 572-583
- Hanlon, D. W., Yang, Z., und Goldstein, L. S. (1997) Characterization of KIFC2, a neuronal kinesin superfamily member in mouse. *Neuron* **18**, 439-451
- Hanus, C., Kochen, L., Tom Dieck, S., Racine, V., Sibarita, J. B., Schuman, E. M., und Ehlers, M. D. (2014) Synaptic control of secretory trafficking in dendrites. *Cell Rep* **7**, 1771-1778
- Hata, Y., Butz, S., und Südhof, T. C. (1996) CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 2488-2494
- Heuser, J. E., und Reese, T. S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of cell biology* **57**, 315-344
- Hida, Y., und Ohtsuka, T. (2010) CAST and ELKS proteins: structural and functional determinants of the presynaptic active zone. *Journal of biochemistry* **148**, 131-137
- Higuchi, R., Krummel, B., und Saiki, R. K. (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **16**, 7351-7367
- Hirokawa, N., Niwa, S., und Tanaka, Y. (2010) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* **68**, 610-638
- Hirokawa, N., und Noda, Y. (2008) Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* **88**, 1089-1118

- Ho, A., Liu, X., und Sudhof, T. C. (2008) Deletion of Mint proteins decreases amyloid production in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 14392-14400
- Hollmann, M., und Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annual review of neuroscience* **17**, 31-108
- Holmes, D. S., und Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical biochemistry* **114**, 193-197
- Hoogenraad, C. C., und Bradke, F. (2009) Control of neuronal polarity and plasticity--a renaissance for microtubules? *Trends in cell biology* **19**, 669-676
- Hoon, M., Soykan, T., Falkenburger, B., Hammer, M., Patrizi, A., Schmidt, K. F., Sassoe-Pognetto, M., Lowel, S., Moser, T., Taschenberger, H., Brose, N., und Varoqueaux, F. (2011) Neuroligin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 3053-3058
- Hotulainen, P., und Hoogenraad, C. C. (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of cell biology* **189**, 619-629
- Hu, X., Viesselmann, C., Nam, S., Merriam, E., und Dent, E. W. (2008) Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 13094-13105
- Hung, A. Y., und Sheng, M. (2002) PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *The Journal of biological chemistry* **277**, 5699-5702
- Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., und Sudhof, T. C. (1995) Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* **81**, 435-443
- Ichtchenko, K., Nguyen, T., und Sudhof, T. C. (1996) Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *The Journal of biological chemistry* **271**, 2676-2682
- Ikegami, K., Heier, R. L., Taruishi, M., Takagi, H., Mukai, M., Shimma, S., Taira, S., Hatanaka, K., Morone, N., Yao, I., Campbell, P. K., Yuasa, S., Janke, C., Macgregor, G. R., und Setou, M. (2007) Loss of alpha-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 3213-3218
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T. W., und Südhof, T. C. (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* **277**, 1511-1515
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Rastam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., und Bourgeron, T. (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature genetics* **34**, 27-29
- Jaworski, J., Kapitein, L. C., Gouveia, S. M., Dortland, B. R., Wulf, P. S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S. A., Di Stefano, P., Demmers, J., Krugers, H., Defilippi, P., Akhmanova, A., und Hoogenraad, C. C. (2009) Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* **61**, 85-100
- Jenkins, B., Decker, H., Bentley, M., Luisi, J., und Banker, G. (2012) A novel split kinesin assay identifies motor proteins that interact with distinct vesicle populations. *The Journal of cell biology* **198**, 749-761
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V. M., und Neefjes, J. (2007) Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betalll spectrin. *The Journal of cell biology* **176**, 459-471

- Kaech, S., und Banker, G. (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* **1**, 2406-2415
- Kaech, S., Huang, C. F., und Banker, G. (2012) General considerations for live imaging of developing hippocampal neurons in culture. *Cold Spring Harb Protoc* **2012**
- Kaesler, P. S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J., und Sudhof, T. C. (2011) RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* **144**, 282-295
- Kaether, C., Skehel, P., und Dotti, C. G. (2000) Axonal membrane proteins are transported in distinct carriers: a two-color video microscopy study in cultured hippocampal neurons. *Molecular biology of the cell* **11**, 1213-1224
- Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A., und Goldstein, L. S. (2001) Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* **414**, 643-648
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H., und Goldstein, L. S. (2000) Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* **28**, 449-459
- Kang, Y., Zhang, X., Dobie, F., Wu, H., und Craig, A. M. (2008) Induction of GABAergic postsynaptic differentiation by alpha-neurexins. *The Journal of biological chemistry* **283**, 2323-2334
- Kapitein, L. C., und Hoogenraad, C. C. (2010) Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Mol Cell Neurosci* **46**, 9-20
- Kapitein, L. C., Schlager, M. A., Kuijpers, M., Wulf, P. S., van Spronsen, M., MacKintosh, F. C., und Hoogenraad, C. C. (2010) Mixed microtubules steer dynein-driven cargo transport into dendrites. *Current biology : CB* **20**, 290-299
- Kapitein, L. C., Schlager, M. A., van der Zwan, W. A., Wulf, P. S., Keijzer, N., und Hoogenraad, C. C. (2010) Probing intracellular motor protein activity using an inducible cargo trafficking assay. *Biophysical journal* **99**, 2143-2152
- Karcher, R. L., Deacon, S. W., und Gelfand, V. I. (2002) Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends in cell biology* **12**, 21-27
- Karki, S., und Holzbaur, E. L. (1999) Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Current opinion in cell biology* **11**, 45-53
- Kattenstroth, G., Tantalaki, E., Südhof, T. C., Gottmann, K., und Missler, M. (2004) Postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function requires alpha-neurexins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2607-2612
- Kayser, M. S., McClelland, A. C., Hughes, E. G., und Dalva, M. B. (2006) Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 12152-12164
- Keighron, J. D., Ewing, A. G., und Cans, A. S. (2012) Analytical tools to monitor exocytosis: a focus on new fluorescent probes and methods. *The Analyst* **137**, 1755-1763
- Kennedy, M. J., und Ehlers, M. D. (2006) Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annual review of neuroscience* **29**, 325-362
- Kim, H. G., Kishikawa, S., Higgins, A. W., Seong, I. S., Donovan, D. J., Shen, Y., Lally, E., Weiss, L. A., Najm, J., Kutsche, K., Descartes, M., Holt, L., Braddock, S., Troxell, R., Kaplan, L., Volkmar, F., Klin, A., Tsatsanis, K., Harris, D. J., Noens, I., Pauls, D. L., Daly, M. J., MacDonald, M. E., Morton, C. C., Quade, B. J., und Gusella, J. F. (2008) Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. *American journal of human genetics* **82**, 199-207
- Kirov, G., Rujescu, D., Ingason, A., Collier, D. A., O'Donovan, M. C., und Owen, M. J. (2009) Neurexin 1 (NRXN1) deletions in schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* **35**, 851-854

- Klopfenstein, D. R., Tomishige, M., Stuurman, N., und Vale, R. D. (2002) Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell* **109**, 347-358
- Kneussel, M., und Wagner, W. (2013) Myosin motors at neuronal synapses: drivers of membrane transport and actin dynamics. *Nature reviews. Neuroscience* **14**, 233-247
- Koch, A. W., Bozic, D., Pertz, O., und Engel, J. (1999) Homophilic adhesion by cadherins. *Current opinion in structural biology* **9**, 275-281
- Koch, S. M., und Ullian, E. M. (2010) Neuronal pentraxins mediate silent synapse conversion in the developing visual system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 5404-5414
- Koehnke, J., Katsamba, P. S., Ahlsen, G., Bahna, F., Vendome, J., Honig, B., Shapiro, L., und Jin, X. (2010) Splice form dependence of beta-neurexin/neurologin binding interactions. *Neuron* **67**, 61-74
- Konishi, Y., und Setou, M. (2009) Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nature neuroscience* **12**, 559-567
- Kreutzberg, G. W. (1969) Neuronal dynamics and axonal flow. IV. Blockage of intra-axonal enzyme transport by colchicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **62**, 722-728
- Langford, G. M. (2002) Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* **3**, 859-865
- Lasiecka, Z. M., und Winckler, B. (2011) Mechanisms of polarized membrane trafficking in neurons -- focusing in on endosomes. *Mol Cell Neurosci* **48**, 278-287
- Laumonier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M. P., Raynaud, M., Ronce, N., Lemonnier, E., Calvas, P., Laudier, B., Chelly, J., Fryns, J. P., Ropers, H. H., Hamel, B. C., Andres, C., Barthelemy, C., Moraine, C., und Briault, S. (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neurologin family. *American journal of human genetics* **74**, 552-557
- Lawrence, C. J., Dawe, R. K., Christie, K. R., Cleveland, D. W., Dawson, S. C., Endow, S. A., Goldstein, L. S., Goodson, H. V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R. L., McIntosh, J. R., Miki, H., Mitchison, T. J., Okada, Y., Reddy, A. S., Saxton, W. M., Schliwa, M., Scholey, J. M., Vale, R. D., Walczak, C. E., und Wordeman, L. (2004) A standardized kinesin nomenclature. *The Journal of cell biology* **167**, 19-22
- Lee, J. R., Shin, H., Ko, J., Choi, J., Lee, H., und Kim, E. (2003) Characterization of the movement of the kinesin motor KIF1A in living cultured neurons. *The Journal of biological chemistry* **278**, 2624-2629
- Leone, P., Comoletti, D., Ferracci, G., Conrod, S., Garcia, S. U., Taylor, P., Bourne, Y., und Marchot, P. (2010) Structural insights into the exquisite selectivity of neurexin/neurologin synaptic interactions. *The EMBO journal* **29**, 2461-2471
- Leterrier, C., Laine, J., Darmon, M., Boudin, H., Rossier, J., und Lenkei, Z. (2006) Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 3141-3153
- Levinson, D. F., Shi, J., Wang, K., Oh, S., Riley, B., Pulver, A. E., Wildenauer, D. B., Laurent, C., Mowry, B. J., Gejman, P. V., Owen, M. J., Kendler, K. S., Nestadt, G., Schwab, S. G., Mallet, J., Nertney, D., Sanders, A. R., Williams, N. M., Wormley, B., Lasseter, V. K., Albus, M., Godard-Bauche, S., Alexander, M., Duan, J., O'Donovan, M. C., Walsh, D., O'Neill, A., Papadimitriou, G. N., Dikeos, D., Maier, W., Lerer, B., Champion, D., Cohen, D., Jay, M., Fanous, A., Eichhammer, P., Silverman, J. M., Norton, N., Zhang, N., Hakonarson, H., Gao, C., Citri, A., Hansen, M., Ripke, S.,

- Dudbridge, F., und Holmans, P. A. (2012) Genome-wide association study of multiplex schizophrenia pedigrees. *The American journal of psychiatry* **169**, 963-973
- Lewis, T. L., Jr., Mao, T., Svoboda, K., und Arnold, D. B. (2009) Myosin-dependent targeting of transmembrane proteins to neuronal dendrites. *Nature neuroscience* **12**, 568-576
- Li, J., Ashley, J., Budnik, V., und Bhat, M. A. (2007) Crucial role of Drosophila neurexin in proper active zone apposition to postsynaptic densities, synaptic growth, and synaptic transmission. *Neuron* **55**, 741-755
- Li, Y., und Tsien, R. W. (2012) pHTomato, a red, genetically encoded indicator that enables multiplex interrogation of synaptic activity. *Nature neuroscience* **15**, 1047-1053
- Ligon, L. A., und Steward, O. (2000) Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol* **427**, 351-361
- Lise, M. F., Wong, T. P., Trinh, A., Hines, R. M., Liu, L., Kang, R., Hines, D. J., Lu, J., Goldenring, J. R., Wang, Y. T., und El-Husseini, A. (2006) Involvement of myosin Vb in glutamate receptor trafficking. *The Journal of biological chemistry* **281**, 3669-3678
- Liu, J. S., Schubert, C. R., Fu, X., Fourniol, F. J., Jaiswal, J. K., Houdusse, A., Stultz, C. M., Moores, C. A., und Walsh, C. A. (2012) Molecular Basis for Specific Regulation of Neuronal Kinesin-3 Motors by Doublecortin Family Proteins. *Mol Cell*
- Lo, K. Y., Kuzmin, A., Unger, S. M., Petersen, J. D., und Silverman, M. A. (2011) KIF1A is the primary anterograde motor protein required for the axonal transport of dense-core vesicles in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* **491**, 168-173
- Lowe, J., Li, H., Downing, K. H., und Nogales, E. (2001) Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *Journal of molecular biology* **313**, 1045-1057
- Maas, C., Belgardt, D., Lee, H. K., Heisler, F. F., Lappe-Siefke, C., Magiera, M. M., van Dijk, J., Hausrat, T. J., Janke, C., und Kneussel, M. (2009) Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 8731-8736
- Mallik, R., Petrov, D., Lex, S. A., King, S. J., und Gross, S. P. (2005) Building complexity: an in vitro study of cytoplasmic dynein with in vivo implications. *Current biology : CB* **15**, 2075-2085
- Maniar, T. A., Kaplan, M., Wang, G. J., Shen, K., Wei, L., Shaw, J. E., Koushika, S. P., und Bargmann, C. I. (2012) UNC-33 (CRMP) and ankyrin organize microtubules and localize kinesin to polarize axon-dendrite sorting. *Nature neuroscience* **15**, 48-56
- Manneville, J. B., Jehanno, M., und Etienne-Manneville, S. (2010) Dlg1 binds GKAP to control dynein association with microtubules, centrosome positioning, and cell polarity. *The Journal of cell biology* **191**, 585-598
- Matus, A. (2000) Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* **290**, 754-758
- Maximov, A., Südhof, T. C., und Bezprozvanny, I. (1999) Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins. *The Journal of biological chemistry* **274**, 24453-24456
- McAllister, A. K. (2007) Dynamic aspects of CNS synapse formation. *Annual review of neuroscience* **30**, 425-450
- Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., und Cheney, R. E. (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* **400**, 590-593
- Miesenbock, G., De Angelis, D. A., und Rothman, J. E. (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**, 192-195
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., und Hirokawa, N. (2001) All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7004-7011

- Miller, K. E., DeProto, J., Kaufmann, N., Patel, B. N., Duckworth, A., und Van Vactor, D. (2005) Direct observation demonstrates that Liprin-alpha is required for trafficking of synaptic vesicles. *Current biology : CB* **15**, 684-689
- Missler, M., Fernandez-Chacon, R., und Südhof, T. C. (1998) The making of neuroligins. *Journal of neurochemistry* **71**, 1339-1347
- Missler, M., Hammer, R. E., und Südhof, T. C. (1998) Neuroligin binding to alpha-neuroligins. A single LNS domain functions as an independently folding ligand-binding unit. *The Journal of biological chemistry* **273**, 34716-34723
- Missler, M., Südhof, T. C., und Biederer, T. (2012) Synaptic Cell Adhesion. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*
- Missler, M., Zhang, W., Rohlmann, A., Kattenstroth, G., Hammer, R. E., Gottmann, K., und Südhof, T. C. (2003) Alpha-neuroligins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* **423**, 939-948
- Moessner, R., Marshall, C. R., Sutcliffe, J. S., Skaug, J., Pinto, D., Vincent, J., Zwaigenbaum, L., Fernandez, B., Roberts, W., Szatmari, P., und Scherer, S. W. (2007) Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *American journal of human genetics* **81**, 1289-1297
- Montgomery, J. M., Pavlidis, P., und Madison, D. V. (2001) Pair recordings reveal all-silent synaptic connections and the postsynaptic expression of long-term potentiation. *Neuron* **29**, 691-701
- Nakata, T., und Hirokawa, N. (2003) Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *The Journal of cell biology* **162**, 1045-1055
- Nakata, T., Terada, S., und Hirokawa, N. (1998) Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *The Journal of cell biology* **140**, 659-674
- Nalepa, I., und Vetulani, J. (1990) Second messengers: rate of formation as an index of receptor reactivity. *Acta neurobiologiae experimentalis* **50**, 635-656
- Neher, E., und Sakaba, T. (2008) Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* **59**, 861-872
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A., und Zerial, M. (1999) Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature cell biology* **1**, 376-382
- Nieto, F. R., Cobos, E. J., Tejada, M. A., Sanchez-Fernandez, C., Gonzalez-Cano, R., und Cendan, C. M. (2012) Tetrodotoxin (TTX) as a therapeutic agent for pain. *Mar Drugs* **10**, 281-305
- Nikonenko, I., Toni, N., Moosmayer, M., Shigeri, Y., Muller, D., und Sargent Jones, L. (2003) Integrins are involved in synaptogenesis, cell spreading, and adhesion in the postnatal brain. *Brain research. Developmental brain research* **140**, 185-194
- Niwa, S., Tanaka, Y., und Hirokawa, N. (2008) KIF1Bbeta- and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. *Nature cell biology* **10**, 1269-1279
- Nogales, E. (2001) Structural insight into microtubule function. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **30**, 397-420
- Nonet, M. L., Staunton, J. E., Kilgard, M. P., Fergestad, T., Hartwig, E., Horvitz, H. R., Jorgensen, E. M., und Meyer, B. J. (1997) *Caenorhabditis elegans* rab-3 mutant synapses exhibit impaired function and are partially depleted of vesicles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 8061-8073
- O'Brien, R., Xu, D., Mi, R., Tang, X., Hopf, C., und Worley, P. (2002) Synaptically targeted narp plays an essential role in the aggregation of AMPA receptors at excitatory synapses in cultured spinal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 4487-4498

- Ogawa, Y., und Rasband, M. N. (2008) The functional organization and assembly of the axon initial segment. *Curr Opin Neurobiol* **18**, 307-313
- Ohtsuka, T., Takao-Rikitsu, E., Inoue, E., Inoue, M., Takeuchi, M., Matsubara, K., Deguchi-Tawarada, M., Satoh, K., Morimoto, K., Nakanishi, H., und Takai, Y. (2002) Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *The Journal of cell biology* **158**, 577-590
- Ohyama, A., Komiya, Y., und Igarashi, M. (2001) Globular tail of myosin-V is bound to vamp/synaptobrevin. *Biochemical and biophysical research communications* **280**, 988-991
- Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine-Aizawa, Y., und Hirokawa, N. (1995) The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* **81**, 769-780
- Ou, C. Y., Poon, V. Y., Maeder, C. I., Watanabe, S., Lehrman, E. K., Fu, A. K., Park, M., Fu, W. Y., Jorgensen, E. M., Ip, N. Y., und Shen, K. (2010) Two cyclin-dependent kinase pathways are essential for polarized trafficking of presynaptic components. *Cell* **141**, 846-858
- Owald, D., Khorramshahi, O., Gupta, V. K., Banovic, D., Depner, H., Fouquet, W., Wichmann, C., Mertel, S., Eimer, S., Reynolds, E., Holt, M., Aberle, H., und Sigrist, S. J. (2012) Cooperation of Syd-1 with Neurexin synchronizes pre- with postsynaptic assembly. *Nature neuroscience*
- Pack-Chung, E., Kurshan, P. T., Dickman, D. K., und Schwarz, T. L. (2007) A Drosophila kinesin required for synaptic bouton formation and synaptic vesicle transport. *Nature neuroscience* **10**, 980-989
- Pak, C. W., Flynn, K. C., und Bamberg, J. R. (2008) Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nature reviews. Neuroscience* **9**, 136-147
- Pardo, C. A., und Eberhart, C. G. (2007) The neurobiology of autism. *Brain Pathol* **17**, 434-447
- Pennuto, M., Bonanomi, D., Benfenati, F., und Valtorta, F. (2003) Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2/synaptobrevin II to synaptic vesicles. *Molecular biology of the cell* **14**, 4909-4919
- Pfeffer, S., und Aivazian, D. (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 886-896
- Pfister, K. K., Fisher, E. M., Gibbons, I. R., Hays, T. S., Holzbaur, E. L., McIntosh, J. R., Porter, M. E., Schroer, T. A., Vaughan, K. T., Witman, G. B., King, S. M., und Vallee, R. B. (2005) Cytoplasmic dynein nomenclature. *The Journal of cell biology* **171**, 411-413
- Pfister, K. K., Shah, P. R., Hummerich, H., Russ, A., Cotton, J., Annuar, A. A., King, S. M., und Fisher, E. M. (2006) Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS genetics* **2**, e1
- Piechotta, K., Dudanova, I., und Missler, M. (2006) The resilient synapse: insights from genetic interference of synaptic cell adhesion molecules. *Cell Tissue Res* **326**, 617-642
- Prekeris, R., und Terrian, D. M. (1997) Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *The Journal of cell biology* **137**, 1589-1601
- Progida, C., Cogli, L., Piro, F., De Luca, A., Bakke, O., und Bucci, C. (2010) Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN. *Journal of cell science* **123**, 1480-1491
- Püschel, A. W., und Betz, H. (1995) Neurexins are differentially expressed in the embryonic nervous system of mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**, 2849-2856
- Reichelt, A. C., Rodgers, R. J., und Clapcote, S. J. (2011) The role of neurexins in schizophrenia and autistic spectrum disorder. *Neuropharmacology* **62**, 1519-1526

- Reissner, C., Klose, M., Fairless, R., und Missler, M. (2008) Mutational analysis of the neurexin/neurologin complex reveals essential and regulatory components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15124-15129
- Reissner, C., Runkel, F., und Missler, M. (2013) Neurexins. *Genome biology* **14**, 213
- Risch, N., Spiker, D., Lotspeich, L., Nouri, N., Hinds, D., Hallmayer, J., Kalaydjieva, L., McCague, P., Dimiceli, S., Pitts, T., Nguyen, L., Yang, J., Harper, C., Thorpe, D., Vermeer, S., Young, H., Hebert, J., Lin, A., Ferguson, J., Chiotti, C., Wiese-Slater, S., Rogers, T., Salmon, B., Nicholas, P., Petersen, P. B., Pingree, C., McMahon, W., Wong, D. L., Cavalli-Sforza, L. L., Kraemer, H. C., und Myers, R. M. (1999) A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *American journal of human genetics* **65**, 493-507
- Rissone, A., Monopoli, M., Beltrame, M., Bussolino, F., Cotelli, F., und Arese, M. (2007) Comparative genome analysis of the neurexin gene family in *Danio rerio*: insights into their functions and evolution. *Molecular biology and evolution* **24**, 236-252
- Rizzoli, S. O., und Jahn, R. (2007) Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles. *Traffic* **8**, 1137-1144
- Rosales, C. R., Osborne, K. D., Zuccarino, G. V., Scheiffele, P., und Silverman, M. A. (2005) A cytoplasmic motif targets neuroligin-1 exclusively to dendrites of cultured hippocampal neurons. *The European journal of neuroscience* **22**, 2381-2386
- Roy, S. (2014) Seeing the unseen: the hidden world of slow axonal transport. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **20**, 71-81
- Roy, S., Winton, M. J., Black, M. M., Trojanowski, J. Q., und Lee, V. M. (2008) Cytoskeletal requirements in axonal transport of slow component-b. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 5248-5256
- Royle, S. J., Granseth, B., Odermatt, B., Derevier, A., und Lagnado, L. (2008) Imaging phluorin-based probes at hippocampal synapses. *Methods in molecular biology* **457**, 293-303
- Ruberti, F., und Dotti, C. G. (2000) Involvement of the proximal C terminus of the AMPA receptor subunit GluR1 in dendritic sorting. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, RC78
- Ryan, T. A. (2001) Presynaptic imaging techniques. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 544-549
- Sabo, S. L., Gomes, R. A., und McAllister, A. K. (2006) Formation of presynaptic terminals at predefined sites along axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 10813-10825
- Saito, N., Okada, Y., Noda, Y., Kinoshita, Y., Kondo, S., und Hirokawa, N. (1997) KIFC2 is a novel neuron-specific C-terminal type kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles. *Neuron* **18**, 425-438
- Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J. E., und Ryan, T. A. (2000) The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophysical journal* **79**, 2199-2208
- Satoh, D., Sato, D., Tsuyama, T., Saito, M., Ohkura, H., Rolls, M. M., Ishikawa, F., und Uemura, T. (2008) Spatial control of branching within dendritic arbors by dynein-dependent transport of Rab5-endosomes. *Nature cell biology* **10**, 1164-1171
- Saxena, S., Howe, C. L., Cosgaya, J. M., Steiner, P., Hirling, H., Chan, J. R., Weis, J., und Kruttgen, A. (2005) Differential endocytic sorting of p75NTR and TrkA in response to NGF: a role for late endosomes in TrkA trafficking. *Mol Cell Neurosci* **28**, 571-587
- Schapitz, I. U., Behrend, B., Pechmann, Y., Lappe-Siefke, C., Kneussel, S. J., Wallace, K. E., Stempel, A. V., Buck, F., Grant, S. G., Schweizer, M., Schmitz, D., Schwarz, J. R., Holzbaur, E. L., und Kneussel, M. (2010) Neuroligin 1 is dynamically exchanged at

- postsynaptic sites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 12733-12744
- Scheiffele, P. (2003) Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annual review of neuroscience* **26**, 485-508
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., und Serafini, T. (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* **101**, 657-669
- Schlager, M. A., und Hoogenraad, C. C. (2009) Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Mol Brain* **2**, 25
- Schliwa, M., und Woehlke, G. (2003) Molecular motors. *Nature* **422**, 759-765
- Schroer, T. A. (2004) Dynactin. *Annual review of cell and developmental biology* **20**, 759-779
- Schubert, D., Humphreys, S., Baroni, C., und Cohn, M. (1969) In vitro differentiation of a mouse neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **64**, 316-323
- Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D. H., und Hirokawa, N. (2000) Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* **288**, 1796-1802
- Setou, M., Seog, D. H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M., und Hirokawa, N. (2002) Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* **417**, 83-87
- Shapira, M., Zhai, R. G., Dresbach, T., Bresler, T., Torres, V. I., Gundelfinger, E. D., Ziv, N. E., und Garner, C. C. (2003) Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles. *Neuron* **38**, 237-252
- Shin, H., Wyszynski, M., Huh, K. H., Valtschanoff, J. G., Lee, J. R., Ko, J., Streuli, M., Weinberg, R. J., Sheng, M., und Kim, E. (2003) Association of the kinesin motor KIF1A with the multimodular protein liprin-alpha. *The Journal of biological chemistry* **278**, 11393-11401
- Shubeita, G. T., Tran, S. L., Xu, J., Vershinin, M., Cermelli, S., Cotton, S. L., Welte, M. A., und Gross, S. P. (2008) Consequences of motor copy number on the intracellular transport of kinesin-1-driven lipid droplets. *Cell* **135**, 1098-1107
- Siddiqui, T. J., Pancaroglu, R., Kang, Y., Rooyakkers, A., und Craig, A. M. (2010) LRRTMs and neuroligins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 7495-7506
- Song, A. H., Wang, D., Chen, G., Li, Y., Luo, J., Duan, S., und Poo, M. M. (2009) A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell* **136**, 1148-1160
- Spector, I., Shochet, N. R., Blasberger, D., und Kashman, Y. (1989) Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell motility and the cytoskeleton* **13**, 127-144
- Steiner, P., Sarria, J. C., Glauser, L., Magnin, S., Catsicas, S., und Hirling, H. (2002) Modulation of receptor cycling by neuron-enriched endosomal protein of 21 kD. *The Journal of cell biology* **157**, 1197-1209
- Stone, M. C., Roegiers, F., und Rolls, M. M. (2008) Microtubules have opposite orientation in axons and dendrites of Drosophila neurons. *Molecular biology of the cell* **19**, 4122-4129
- Stowell, J. N., und Craig, A. M. (1999) Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains. *Neuron* **22**, 525-536
- Su, Q., Cai, Q., Gerwin, C., Smith, C. L., und Sheng, Z. H. (2004) Syntabulin is a microtubule-associated protein implicated in syntaxin transport in neurons. *Nature cell biology* **6**, 941-953
- Südhof, T. C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annual review of neuroscience* **27**, 509-547

- Südhof, T. C. (2008) Neuroligins and neuexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* **455**, 903-911
- Südhof, T. C. (2013) Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* **80**, 675-690
- Sugita, S., Saito, F., Tang, J., Satz, J., Campbell, K., and Südhof, T. C. (2001) A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain. *The Journal of cell biology* **154**, 435-445
- Sugiyama, H., Ito, I., and Watanabe, M. (1989) Glutamate receptor subtypes may be classified into two major categories: a study on *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. *Neuron* **3**, 129-132
- Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., Dityatev, A., and Schachner, M. (2004) Trans-Golgi network delivery of synaptic proteins in synaptogenesis. *Journal of cell science* **117**, 381-388
- Tabuchi, K., and Südhof, T. C. (2002) Structure and evolution of neuexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics* **79**, 849-859
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., Muller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., and Jahn, R. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831-846
- Tanaka, H., Miyazaki, N., Matoba, K., Nogi, T., Iwasaki, K., and Takagi, J. (2012) Higher-order architecture of cell adhesion mediated by polymorphic synaptic adhesion molecules neuexin and neuroligin. *Cell Rep* **2**, 101-110
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A., and Hirokawa, N. (1998) Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* **93**, 1147-1158
- Taniguchi, H., Gollan, L., Scholl, F. G., Mahadomrongkul, V., Dobler, E., Limthong, N., Peck, M., Aoki, C., and Scheiffele, P. (2007) Silencing of neuroligin function by postsynaptic neuexins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 2815-2824
- Thirumurugan, K., Sakamoto, T., Hammer, J. A., 3rd, Sellers, J. R., and Knight, P. J. (2006) The cargo-binding domain regulates structure and activity of myosin 5. *Nature* **442**, 212-215
- tom Dieck, S., Sanmarti-Vila, L., Langnaese, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K. H., Kampf, U., Franzer, J. T., Stumm, M., Garner, C. C., and Gundelfinger, E. D. (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *The Journal of cell biology* **142**, 499-509
- Treutlein, B., Gokce, O., Quake, S. R., and Südhof, T. C. (2014) Cartography of neuexin alternative splicing mapped by single-molecule long-read mRNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E1291-1299
- Tseng, C. N., Zhang, L., Cascio, M., and Wang, Z. Z. (2003) Calcium plays a critical role in determining the acetylcholine receptor-clustering activities of alternatively spliced isoforms of Agrin. *The Journal of biological chemistry* **278**, 17236-17245
- Turrigiano, G. G., and Nelson, S. B. (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature reviews. Neuroscience* **5**, 97-107
- Twelvetrees, A. E., Yuen, E. Y., Arancibia-Carcamo, I. L., MacAskill, A. F., Rostaing, P., Lumb, M. J., Humbert, S., Triller, A., Saudou, F., Yan, Z., and Kittler, J. T. (2010) Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron* **65**, 53-65

- Uemura, T., Lee, S. J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K., and Mishina, M. (2010) Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell* **141**, 1068-1079
- Ushkaryov, Y. A., Hata, Y., Ichtchenko, K., Moomaw, C., Afendis, S., Slaughter, C. A., and Sudhof, T. C. (1994) Conserved domain structure of beta-neurexins. Unusual cleaved signal sequences in receptor-like neuronal cell-surface proteins. *The Journal of biological chemistry* **269**, 11987-11992
- Ushkaryov, Y. A., Petrenko, A. G., Geppert, M., and Südhof, T. C. (1992) Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science* **257**, 50-56
- Ushkaryov, Y. A., Rohou, A., and Sugita, S. (2008) alpha-Latrotoxin and its receptors. *Handbook of experimental pharmacology*, 171-206
- Vaags, A. K., Lionel, A. C., Sato, D., Goodenberger, M., Stein, Q. P., Curran, S., Ogilvie, C., Ahn, J. W., Drmic, I., Senman, L., Chrysler, C., Thompson, A., Russell, C., Prasad, A., Walker, S., Pinto, D., Marshall, C. R., Stavropoulos, D. J., Zwaigenbaum, L., Fernandez, B. A., Fombonne, E., Bolton, P. F., Collier, D. A., Hodge, J. C., Roberts, W., Szatmari, P., and Scherer, S. W. (2012) Rare deletions at the neurexin 3 locus in autism spectrum disorder. *American journal of human genetics* **90**, 133-141
- Vale, R. D. (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467-480
- van de Bospoort, R., Farina, M., Schmitz, S. K., de Jong, A., de Wit, H., Verhage, M., and Toonen, R. F. (2012) Munc13 controls the location and efficiency of dense-core vesicle release in neurons. *The Journal of cell biology* **199**, 883-891
- Varoqueaux, F., Jamain, S., and Brose, N. (2004) Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *European journal of cell biology* **83**, 449-456
- Veenstra-VanderWeele, J., and Cook, E. H., Jr. (2004) Molecular genetics of autism spectrum disorder. *Molecular psychiatry* **9**, 819-832
- Verhey, K. J., and Hammond, J. W. (2009) Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 765-777
- Vershinin, M., Carter, B. C., Razafsky, D. S., King, S. J., and Gross, S. P. (2007) Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 87-92
- Vlachos, A., Korkotian, E., Schonfeld, E., Copanaki, E., Deller, T., and Segal, M. (2009) Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 1017-1033
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K., and Sudhof, T. C. (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* **388**, 593-598
- Wang, Z., Edwards, J. G., Riley, N., Provance, D. W., Jr., Karcher, R., Li, X. D., Davison, I. G., Ikebe, M., Mercer, J. A., Kauer, J. A., and Ehlers, M. D. (2008) Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* **135**, 535-548
- Washbourne, P., Bennett, J. E., and McAllister, A. K. (2002) Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nature neuroscience* **5**, 751-759
- Washbourne, P., Liu, X. B., Jones, E. G., and McAllister, A. K. (2004) Cycling of NMDA receptors during trafficking in neurons before synapse formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 8253-8264
- Watanabe, S., Liu, Q., Davis, M. W., Hollopeter, G., Thomas, N., Jorgensen, N. B., and Jorgensen, E. M. (2013) Ultrafast endocytosis at Caenorhabditis elegans neuromuscular junctions. *eLife* **2**, e00723

- Watanabe, S., Rost, B. R., Camacho-Perez, M., Davis, M. W., Sohl-Kielczynski, B., Rosenmund, C., und Jorgensen, E. M. (2013) Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* **504**, 242-247
- Wei, Z., Zheng, S., Spangler, S. A., Yu, C., Hoogenraad, C. C., und Zhang, M. (2011) Liprin-mediated large signaling complex organization revealed by the liprin-alpha/CASK and liprin-alpha/liprin-beta complex structures. *Mol Cell* **43**, 586-598
- Welte, M. A. (2004) Bidirectional transport along microtubules. *Current biology : CB* **14**, R525-537
- Westermann, S., und Weber, K. (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 938-947
- Winckler, B., und Mellman, I. (1999) Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components. *Neuron* **23**, 637-640
- Winckler, B., und Mellman, I. (2010) Trafficking Guidance Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*
- Wisco, D., Anderson, E. D., Chang, M. C., Norden, C., Boiko, T., Folsch, H., und Winckler, B. (2003) Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons. *The Journal of cell biology* **162**, 1317-1328
- Witte, H., Neukirchen, D., und Bradke, F. (2008) Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *The Journal of cell biology* **180**, 619-632
- Wu, H., Nash, J. E., Zamorano, P., und Garner, C. C. (2002) Interaction of SAP97 with minus-end-directed actin motor myosin VI. Implications for AMPA receptor trafficking. *The Journal of biological chemistry* **277**, 30928-30934
- Xia, C. H., Roberts, E. A., Her, L. S., Liu, X., Williams, D. S., Cleveland, D. W., und Goldstein, L. S. (2003) Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *The Journal of cell biology* **161**, 55-66
- Xue, X., Jaulin, F., Espenel, C., und Kreitzer, G. (2010) PH-domain-dependent selective transport of p75 by kinesin-3 family motors in non-polarized MDCK cells. *Journal of cell science* **123**, 1732-1741
- Yamada, M., Toba, S., Takitoh, T., Yoshida, Y., Mori, D., Nakamura, T., Iwane, A. H., Yanagida, T., Imai, H., Yu-Lee, L. Y., Schroer, T., Wynshaw-Boris, A., und Hirotsune, S. (2010) mNUDC is required for plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1. *The EMBO journal* **29**, 517-531
- Yamada, M., Toba, S., Yoshida, Y., Haratani, K., Mori, D., Yano, Y., Mimori-Kiyosue, Y., Nakamura, T., Itoh, K., Fushiki, S., Setou, M., Wynshaw-Boris, A., Torisawa, T., Toyoshima, Y. Y., und Hirotsune, S. (2008) LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. *The EMBO journal* **27**, 2471-2483
- Yan, J., Oliveira, G., Coutinho, A., Yang, C., Feng, J., Katz, C., Sram, J., Bockholt, A., Jones, I. R., Craddock, N., Cook, E. H., Jr., Vicente, A., und Sommer, S. S. (2005) Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients. *Molecular psychiatry* **10**, 329-332
- Yano, H., Ninan, I., Zhang, H., Milner, T. A., Arancio, O., und Chao, M. V. (2006) BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex. *Nature neuroscience* **9**, 1009-1018
- Yizhar, O., Fenno, L. E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T. J., O'Shea, D. J., Sohal, V. S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J. T., Stehfest, K., Fudim, R., Ramakrishnan, C., Huguenard, J. R., Hegemann, P., und Deisseroth, K. (2011) Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* **477**, 171-178
- Yonekawa, Y., Harada, A., Okada, Y., Funakoshi, T., Kanai, Y., Takei, Y., Terada, S., Noda, T., und Hirokawa, N. (1998) Defect in synaptic vesicle precursor transport and

- neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *The Journal of cell biology* **141**, 431-441
- Zala, D., Hinckelmann, M. V., Yu, H., Lyra da Cunha, M. M., Liot, G., Cordelieres, F. P., Marco, S., und Saudou, F. (2013) Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell* **152**, 479-491
- Zhai, R. G., Vardinon-Friedman, H., Cases-Langhoff, C., Becker, B., Gundelfinger, E. D., Ziv, N. E., und Garner, C. C. (2001) Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron* **29**, 131-143
- Zhang, C., Milunsky, J. M., Newton, S., Ko, J., Zhao, G., Maher, T. A., Tager-Flusberg, H., Bolliger, M. F., Carter, A. S., Boucard, A. A., Powell, C. M., und Sudhof, T. C. (2009) A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export. *Journal of Neuroscience* **29**, 10843-10854
- Zhang, W., Rohlmann, A., Sargsyan, V., Aramuni, G., Hammer, R. E., Südhof, T. C., und Missler, M. (2005) Extracellular domains of alpha-neurexins participate in regulating synaptic transmission by selectively affecting N- and P/Q-type Ca²⁺ channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 4330-4342
- Zhen, M., und Jin, Y. (1999) The liprin protein SYD-2 regulates the differentiation of presynaptic termini in *C. elegans*. *Nature* **401**, 371-375

8. Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abb. 1.1	Neurexin-Struktur.....	13
Abb. 1.2	Transsynaptischer Komplex.....	15
Abb. 1.3	Polarität von Neuronen.....	19
Abb. 1.4	Schematische Darstellung des zytoskelett-abhängigen Transports.....	20
Abb. 1.5	PDZ-Abhängigkeit des Neurexin-Transports.....	25

Material & Methoden

Abb. 2.1	Schematischer Verlauf der <i>live imaging</i> -Experimente.....	46
Abb. 2.2	Entwicklung hippokampaler Neurone <i>in vitro</i>	49

Ergebnisse

Abb. 3.1	Fluoreszenzmarkierte Neurexinonstrukte.....	56
Abb. 3.2	Neurexin ist in Transportvesikeln vorhanden.....	57
Abb. 3.3	Das Fluorophor hat keinen Einfluss auf die Lokalisation.....	57
Abb. 3.4	Neurexin colokalisiert mit Calciumkanälen, CASK und Rim1 α	59
Abb. 3.5	Neurexin wird nicht mit <i>dense core vesicles</i> transportiert.....	59
Abb. 3.6	Neurexin und Bassoon werden nicht cotransportiert.....	61
Abb. 3.7	Neurexin und Synaptophysin sind in denselben Transportvesikeln vorhanden.....	62
Abb. 3.8	Cotransport von Neurexin und Synaptophysin.....	63
Abb. 3.9	Neurexin wird in <i>synaptic vesicle protein transport vesicles</i> (STVs) transportiert.....	63
Abb. 3.10	Neurexin besitzt unterschiedliche Dynamik in Axon und Dendrit.....	65
Abb. 3.11	Geschwindigkeit der Neurexin/Synaptophysin colokalisierten Vesikel.....	65
Abb. 3.12	Quantitative Auswertungen ergaben keine Hinweise auf Neurexinisoform-spezifische Subpopulation.....	66
Abb. 3.13	α - und β -Neurexin können cotransportiert werden.....	67
Abb. 3.14	Fluoreszenzmarkierte Neurexinmutanten.....	68
Abb. 3.15	Neurexin-Transport ist abhängig vom PDZ-Bindungsmotiv.....	68
Abb. 3.16	Grundzustand des Zytoskeletts.....	69
Abb. 3.17	Pharmakologische Störung des Zytoskeletts.....	70
Abb. 3.18	Auswertungen der pharmakologischen Beeinflussung.....	71

Abb. 3.19	Neurexin-Transport ist abhängig von neuronaler Aktivität.....	72
Abb. 3.20	Lokalisation von KIF1A.....	73
Abb. 3.21	Mobilität von KIF1A.....	74
Abb. 3.22	Colokalisation zwischen Neurexin und KIF1A.....	75
Abb. 3.23	KIF1A und α -Neurexin bewegen sich zusammen.....	76
Abb. 3.24	KIF1A und β -Neurexin bewegen sich zusammen.....	77
Abb. 3.25	Nachweis des shRNA-vermittelten KIF1A- <i>knock down</i>	78
Abb. 3.26	KIF1A ist notwendig für den intrazell. Transport von Neurexin.....	79
Abb. 3.27	KIF1A- <i>knock down</i> -Phänotyp ist reversibel.....	80
Abb. 3.28	Detektion der Calciumaufnahme.....	82
Abb. 3.29	Neurexin-positive Vesikel fusionieren mit der Plasmamembran.....	83
Abb. 3.30	Neurexin und Synaptophysin können zusammen die Plasmamembran erreichen.....	84
 Diskussion		
Abb. 4.1	Modell des Neurexin-Transports.....	90

9. Tabellenverzeichnis

Ergebnisse

Tab. 3.1	Colokalisation von Markerproteinen mit Neurexin.....	58
Tab. 3.2	Transportcharakteristika.....	64

10. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb	Abbildung
AIS	<i>Axon initial segment</i>
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
AraC	Cytosin Arabinosid
AS	Aminosäure
ASD	<i>Autism spectrum disorders</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CaCh	Calciumkanal
CASK	<i>Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase</i>
CAST	<i>Cytomatrix at the active zone-associated structural protein</i>
CAZ	<i>Cytomatrix active zone</i>
DIV	<i>Day in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FF	<i>Full-collapse fusion</i>
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
h	Stunde(n)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HS	<i>Horse serum</i>
Kap	Kapitel
KD	<i>Knock down</i>
KO	<i>Knock out</i>
KR	<i>Kiss-and-run</i>
L	Liter
LB	Laura Bertani
LNS	<i>Laminin-Neurexin-Sex hormone binding globulin</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
min	Minute(n)
NCAM	<i>Neuronal cell adhesion molecule</i>
NEEP21	<i>Neuron-enriched endosomal protein21</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
Nlgn	Neuroigin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nrxn	Neurexin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDZ	PSD95, Dlg1, Zonula occludens-1
PFA	Paraformaldehyd
PSD	Postsynaptische Dichte
PTM	Posttranslatorische Modifikation
PTV	<i>Piccolo-bassoon transport vesicle</i>
QC	QuikChange
RIM1 α	<i>Regulating synaptic membrane exocytosis 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of interest</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SALM	<i>Synaptic adhesion-like molecule</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
shRNA	<i>Small hairpin-Ribonukleinsäure</i>
SNAP25	<i>Soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleinimide-sensitive factor attachment receptor</i>
SS	Spleißstelle
STV	<i>Synaptic vesicle protein transport vesicle</i>
TKO	<i>Triple knock out</i>
TTX	Tetrodotoxin
vgl	vergleich
WT	Wildtyp

Veröffentlichungen

Poster

Neupert, C., Niesmann, K., Reissner, C., Missler, M. (2012). *Polarized trafficking of α - and β -neurexins is KIF1A-dependent*. Society for Neuroscience, 42nd Annual Meeting, New Orleans, USA

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Markus Missler bedanken, der mir dieses interessante Projekt übertragen hat. Ich danke dafür, dass er jederzeit am Fortgang meiner Arbeit interessiert war und für sein in mich gesetztes Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. Püschel und Herrn Prof. Dr. Jürgen Klingauf danke ich für die Bereitschaft, mein Promotionskomitee zu bilden und für Diskussionen während meiner Arbeit.

Ich danke Dr. Katharina Niesmann für die Betreuung in meiner Anfangszeit und die lehrreiche wie unterhaltsame Einführung in die Mikroskopie.

Bei Dr. Carsten Reissner, Dr. Johanna Stahn, Dr. Martin Klose, Dr. Gesche Born, Dr. Daniele Repetto, Dr. Fabian Runkel, Dr. Shaopeng Wang, Dr. Wenjia Guo, Dr. Dorothee Breuer Dr. Johannes Brockhaus, Dr. Astrid Rohlmann, Miriam Schreitmüller, Anja Blanqué, Enno Löffler, Ilka Wolff, Kai Kerkhoff und Daniela Aschhoff bedanke ich für die schöne Zeit im Labor, die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich für ihre jederzeit finanzielle und moralische Unterstützung.

Jana danke ich für ihre Liebe und für ihren Glauben an mich.