

# Charakterisierung postsynaptischer Funktionen des F-BAR-Domänenproteins Syndapin I

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium”(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena



von Diplom-Humanbiologin Katharina Schneider

geboren am 26.11.1985 in Karl-Marx-Stadt jetzt Chemnitz

Gutachter:

1. Prof. Dr. Britta Qualmann, Universitätsklinikum Jena, Institut für Biochemie I
2. Prof. Dr. Christian Hübner, Universitätsklinikum Jena, Institut für Humangenetik
3. PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Humangenetik

Datum der Einreichung:

27. Juni 2014

Datum der Verteidigung:

21. November 2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Struktur & Funktion dendritischer Dornfortsätze .....	1
1.1.1	Der Dornfortsatz als postsynaptisches Kompartiment .....	1
1.1.2	Die PSD-Proteine der ProSAP/Shank-Familie .....	4
1.2	Synapsenbildung & synaptische Plastizität .....	6
1.3	Das F-BAR-Domänenprotein Syndapin I .....	8
1.4	Fragestellung .....	11
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1	Material .....	12
2.1.1	Chemikalien & Biochemikalien .....	12
2.1.2	Bakterien-, Zellkulturmedien & Zellkulturreagenzien .....	13
2.1.3	Puffer & Lösungen .....	14
2.1.4	Zelllinien, Tier- & Bakterienstämme .....	15
2.1.4.1	Zelllinien .....	15
2.1.4.2	Tierstämme .....	15
2.1.4.3	Bakterienstämme .....	15
2.1.5	Vektorplasmide & Expressionskonstrukte .....	16
2.1.6	<i>Primer</i> .....	18
2.1.7	Antikörper .....	19
2.1.8	Verbrauchsmaterialien .....	20
2.1.9	Geräte & <i>Software</i> .....	20
2.2	Methoden .....	22
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	22
2.2.1.1	Herstellung hitzeschockkompetenter <i>E. coli</i> .....	22
2.2.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock .....	23
2.2.1.3	Minipräparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse .....	23
2.2.1.4	Mini-, Midi- & Maxipräparation von Plasmid-DNA mittels Kit-Systemen .....	23
2.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	24
2.2.1.6	PCR .....	24
2.2.1.7	Genotypisierung von Syndapin I-Mäusen .....	24

2.2.1.8	Restriktionsverdau & Dephosphorylierung von DNA.....	24
2.2.1.9	Agarosegelelektrophorese von DNA.....	25
2.2.1.10	DNA-Isolation aus Agarosegelen.....	25
2.2.1.11	Oligonukleotidhybridisierung.....	26
2.2.1.12	Ligation von DNA-Fragmenten.....	26
2.2.1.13	Sequenzierung von DNA.....	26
2.2.2	Zellkultur-Methoden.....	26
2.2.2.1	Kultivierung nicht-neuronaler Zelllinien.....	26
2.2.2.2	Herstellung & Kultivierung primärer Neuronenkulturen.....	27
2.2.2.3	Transiente Transfektion nicht-neuronaler Zelllinien.....	27
2.2.2.4	Transiente Transfektion neuronaler Kulturen.....	27
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	28
2.2.3.1	Überexpression & Aufreinigung von GST- & His-Trx-Fusionsproteinen.....	28
2.2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	29
2.2.3.3	Präparation von HEK293-Zellextrakten.....	29
2.2.3.4	Präparation von Rattengehirnextrakten.....	29
2.2.3.5	Kopräzipitationsanalyse mit GST- & His-Trx-Fusionsproteinen.....	30
2.2.3.6	Protein-Quervernetzungsanalyse.....	31
2.2.3.7	Liposomenbindungsanalyse.....	31
2.2.3.8	SDS-PAGE.....	32
2.2.3.9	Westernblotanalyse mittels Fluoreszenzdetektion.....	32
2.2.3.10	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen.....	33
2.2.4	Zyto- & Histochemie.....	33
2.2.4.1	Immunzytochemie.....	33
2.2.4.2	Präparation von Mausgehirnen für die Immunhistochemie.....	34
2.2.4.3	Immunhistochemie.....	34
2.2.4.4	Anfertigung & Golgi-Färbung von Mausgehirnschnitten.....	34
2.2.5	Elektrophysiologische Methoden.....	35
2.2.6	Mikroskopie & bildanalytische Verfahren.....	36
2.2.6.1	Mikroskope.....	36
2.2.6.2	Morphologische Untersuchung von dendritischen Dornfortsätzen & synaptischen Punkten in Zellkulturen.....	36
2.2.6.3	Morphologische Untersuchung von dendritischen Dornfortsätzen in Mausgehirnschnitten.....	37
2.2.6.4	Oberflächenrekonstruktion & quantitative Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Flächen.....	38
2.2.6.5	Statistik.....	38

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1	Syndapin I beeinflusst die Postsynapsenbildung .....	39
3.1.1	<i>Syndapin I</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse zeigen eine gestörte Bildung dendritischer Dornfortsätze .....	39
3.1.2	Die Postsynapsenbildung ist von der postsynaptischen Syndapin I-Expression abhängig .....	40
3.1.2.1	Die Depletion von Syndapin I führt zu einer gestörten Postsynapsenbildung .....	40
3.1.2.2	Die Überexpression von Syndapin I führt zu einer gesteigerten Postsynapsenbildung.....	45
3.1.3	Syndapin I ist auch im postsynaptischen Kompartiment lokalisiert .....	46
3.1.3.1	Endogenes Syndapin I ist auch im postsynaptischen Kompartiment lokalisiert .....	46
3.1.3.2	Rekombinantes Syndapin I ist auch im postsynaptischen Kompartiment lokalisiert .....	48
3.2	Syndapin I interagiert mit ProSAP/Shank-Proteinen .....	49
3.2.1	Syndapin I interagiert mit Proteinen der ProSAP/Shank-Familie <i>in vitro</i> .....	49
3.2.2	Syndapin I interagiert mit ProSAP1 in Zellen.....	52
3.2.2.1	Syndapin I bildet mit ProSAP1 Komplexe in Zellen .....	52
3.2.2.2	Syndapin I kolokalisiert mit ProSAP1 in Neuronen.....	55
3.3	Syndapin I kooperiert mit ProSAP1 in der Postsynapsenbildung.....	57
3.3.1	Die Bildung & Morphologie von Postsynapsen ist von der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion abhängig.....	58
3.3.1.1	Die Funktionen von ProSAP1 sind von der Anwesenheit & Komplexbildung mit Syndapin I abhängig.....	58
3.3.1.2	Die Postsynapsenbildung ist von der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung abhängig.....	62
3.3.2	Membranassoziierte Syndapin I/ProSAP1-Komplexe sind wichtig für die Postsynapsenbildung.....	67
3.3.2.1	Die I122E/M123E-Mutation der F-BAR-Domäne beeinträchtigt die Lipidbindungseigenschaft von Syndapin I .....	67
3.3.2.2	Die Postsynapsenbildung ist von der Syndapin I-vermittelten Membranbindung abhängig .....	69
3.3.2.3	Syndapin I/ProSAP1-Komplexe binden an Membranlipide.....	71
3.3.2.4	Postsynaptische Syndapin I-Defizienz führt zu einer gestörten synaptischen Transmission.....	71
3.3.2.5	<i>Syndapin I</i> <sup>-/-</sup> -Neurone zeigen eine gestörte räumliche Organisation von ProSAP1 in Dornfortsatzköpfen .....	74

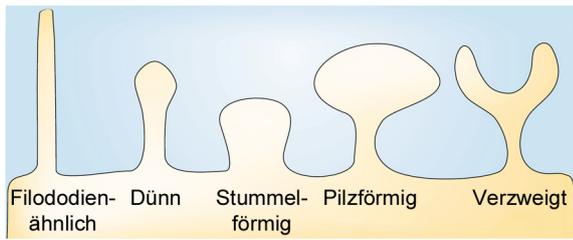
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>76</b>
4.1 Syndapin I beeinflusst die Bildung & Funktion von Postsynapsen.....	76
4.2 Syndapin I interagiert mit ProSAP/Shank-Proteinen .....	81
4.3 Syndapin I & ProSAP1 kooperieren in der Postsynapsenbildung .....	83
4.4 Syndapin I beeinflusst die räumliche Organisation von ProSAP1 .....	85
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>90</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>91</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>A Anhang.....</b>	<b>I</b>
<b>B Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>C Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Wissenschaftliche Veröffentlichungen .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>XVII</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Struktur & Funktion dendritischer Dornfortsätze

### 1.1.1 Der Dornfortsatz als postsynaptisches Kompartiment

Die Formierung neuronaler Netzwerke und die Bildung und Plastizität von Synapsen gilt als Grundlage von Denk-, Lern- und Gedächtnisbildungsprozessen (BLISS und LØMO, 1973; HEBB, 2002; KANDEL und SCHWARTZ, 1982). Eine Synapse besteht aus der präsynaptischen Endigung, die über den synaptischen Spalt von der postsynaptischen Spezialisierung getrennt wird (DE ROBERTIS und BENNETT, 1955; PALAY, 1956). Über die Ausschüttung von Neurotransmittern aus präsynaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt und die Bindung der Neurotransmitter an postsynaptische Neurotransmitterrezeptoren findet die synaptische Transmission statt. In höher entwickelten Organismen befinden sich die Postsynapsen von 90% aller exzitatorischen glutamatergen und einiger inhibitorischer  $\gamma$ -aminobutyric acid ( $\gamma$ -Aminobuttersäure, GABA)-erger Synapsen auf dendritischen Dornfortsätzen, welche sich als spezialisierte Mikrokompartimente vom dendritischen Schaft ausstülpfen (GRAY, 1959a; 1959b; HARRIS und KATER, 1994; HERING und SHENG, 2001). Durch die Abgrenzung des Dornfortsatzkopfes vom dendritischen Schaft über einen schmalen Hals wird die Dynamik von Calcium-Ionen und sekundären Botenstoffen reguliert, wodurch chemische Antworten einzelner Synapsen isoliert werden (KOCH und ZADOR, 1993; KORKOTIAN und SEGAL, 2000; MAJEWSKA et al., 2000a; 2000b; SABATINI und SVOBODA, 2000; SVOBODA et al., 1996; VOLFOVSKY et al., 1999). Die Größe und Gestalt der Dornfortsätze ebenso wie die Dichte der Dornfortsätze entlang der Dendriten variiert stark und ihre Morphologie ist vom Entwicklungsstadium, Gehirnarealen, synaptischer Aktivität sowie pathologischen Faktoren abhängig (BOYER et al., 1998; CHICUREL und HARRIS, 1992; FIALA et al., 1998; HARRIS und STEVENS, 1989; HARRIS und KATER, 1994). Ausgehend von den unterschiedlichen Formen und Größen wurden Dornfortsätze in verschiedene Morphologiegruppen klassifiziert: Filopodienähnliche, dünne, stummelförmige, pilzförmige sowie verzweigte Dornen (CHANG und GREENOUGH, 1984; HARRIS et al., 1992; PETERS und KAISERMAN-ABRAMOF, 1970) (Abb. 1). Dornfortsätze sind hoch dynamisch (CRICK, 1982; DUNAEVSKY et al., 1999; FISCHER et al., 1998; PARNASS et al., 2000), wobei die Änderung der Dornfortsatzmorphologie von bestimmten Stimuli abhängig ist und in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und der synaptischen Aktivität reguliert wird (DUNAEVSKY et al., 1999; LENDVAI et al., 2000; MATUS et al., 2000). Grundlegend für die Bildung und Eliminierung von filopodienähnlichen und reifen Dornfortsätzen sowie morphologischen Veränderungen des Dornfortsatzkopfes sind Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts (DUNAEVSKY et al., 1999; FISCHER et al., 1998; HALPAIN et al., 1998; WONG et al., 2000; ZITO et al., 2004), welches ein verzweigtes Netzwerk im gesamten Dornfortsatz ausbildet (FIFKOVÁ und DELAY, 1982; MATUS et al., 1982; KOROBOVA und SVITKINA, 2010). Das Aktinzytoskelett des Dornfortsatzes wird durch



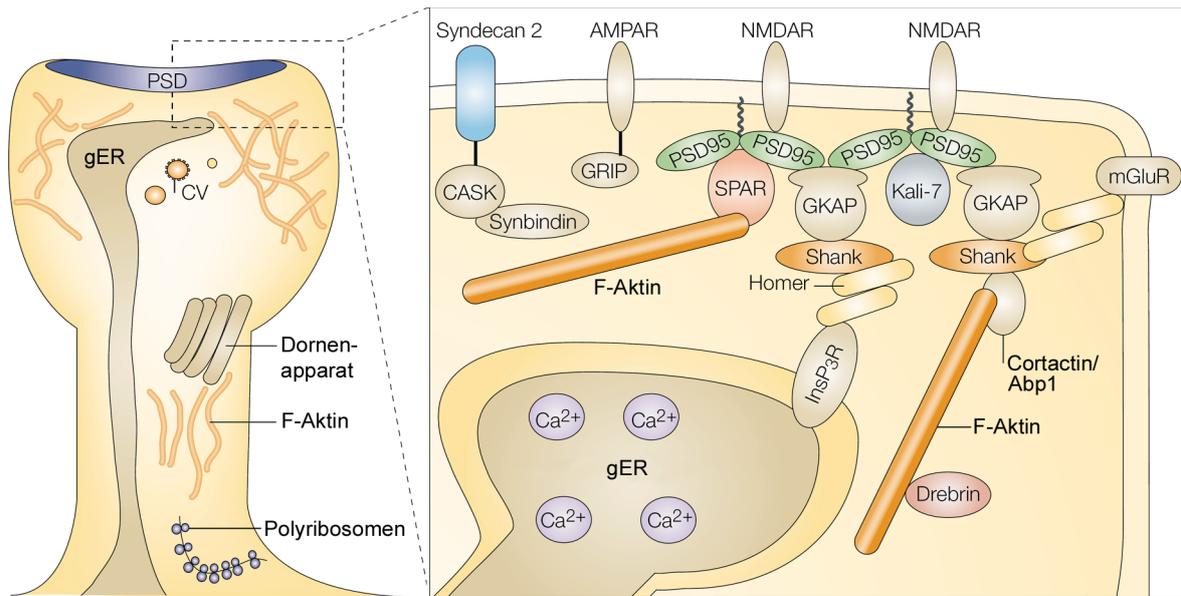
**Abbildung 1: Die Morphologieklassen dendritischer Dornfortsätze.** Morphologische Klassifizierung von dendritischen Dornfortsätzen in filododienähnliche, dünne, stummelförmige, pilzförmige und verzweigte Dornfortsätze (modifiziert nach HERING und SHENG, 2001).

verschiedene Signalwege reguliert (LUO et al., 1996; TASHIRO et al., 2000; WONG et al., 2000; IRIE und YAMAGUCHI, 2002; PENZES et al., 2003), die u.a. auf die Aktivierung von Nukleationspromotionsfaktoren wie beispielsweise dem neuronalen Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP) zusammenlaufen (HIGGS und POLLARD, 2000; MIKI et al., 1996; 1998; PREHODA et al., 2000; ROHATGI et al., 1999). Die Nukleationspromotionsfaktoren sind in der Lage, Aktinmonomere zu binden und mit dem *actin related protein 2 and 3* (Arp2/3)-Komplex zu assoziieren und so die Aktinnukleation von verzweigten Aktinfilamenten zu fördern (HIGGS und POLLARD, 2000; MACHESKY et al., 1994; MULLINS et al., 1998; ROHATGI et al., 1999; SVITKINA und BORISY, 1999).

Die Veränderungen der Gestalt und Größe der Dornfortsätze können Änderungen in der Funktion als elektrisches und biochemisches Kompartiment (KOCH und ZADOR, 1993; SVOBODA et al., 1996), Änderungen in der Stärke der synaptischen Transmission (SCHIKORSKI und STEVENS, 1999) und/oder die Bildung neuer Synapsen bedeuten (DUNAEVSKY et al., 1999; LENDVAI et al., 2000; WONG et al., 2000).

Ein reifer Dornfortsatz trägt typischerweise genau eine exzitatorische Postsynapse, die sich im Dornfortsatzkopf befindet. Die Postsynapse ist durch die Postsynaptische Dichte (PSD), eine elektronendichte Spezialisierung an der postsynaptischen Plasmamembran, erkennbar (Abb. 2) (DE ROBERTIS und BENNETT, 1955; GRAY, 1959a; 1959b; PALAY, 1956). Die Größe des Dornfortsatzkopfes ist proportional zu der PSD-Fläche, zur Anzahl der  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure, AMPA)-Rezeptoren sowie zu der Anzahl gedockter Neurotransmittervesikel der aktiven Zone (HARRIS und STEVENS, 1989; MATSUZAKI et al., 2001; NUSSER et al., 1998; SCHIKORSKI und STEVENS, 1999). Die PSD nimmt ca. 10% der Dornfortsatzoberfläche ein (HARRIS und STEVENS, 1989) und besteht aus einer komplexen Matrix aus Proteinen, durch die die ionotropen Glutamatrezeptoren des AMPA und des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Typen sowie die metabotropen Glutamat (mGlu)-Rezeptoren (BAUDE et al., 1993; BEKKERS und STEVENS, 1989; COLLINGRIDGE et al., 1983; MARTIN et al., 1993) gegenüber der aktiven Zone zusammengelagert sind (ZIFF, 1997).

*PSD-95*, *Discs large*, *Zona occludens 1* (PDZ)-Domänen-beinhaltende Gerüstproteine (KENNEDY, 1995) bilden einen Hauptbestandteil der PSD und verknüpfen die Signalwege der AMPA-, NMDA- und mGlu-Rezeptoren untereinander sowie mit dem Aktinzytoskelett des Dornfortsatzkopfes (Abb. 2) (COLLINS et al., 2006; FARR et al., 2004; HUSI et al., 2000; KIM und SHENG, 2004), wodurch die synaptische Aktivität über die Aktindynamik vermittelt an die Dornfortsatzmorphologie geknüpft wird (PAK et al., 2001; SALA et al., 2001). Beispiele für PDZ-Domänen beinhaltende Gerüstproteine sind die membranassoziierten Guanylatkinasen



**Abbildung 2: Aussehen und Aufbau dendritischer Dornfortsätze.** Darstellung eines reifen Dornfortsatzes einer exzitatorischen Synapse (links) mit einem ausgedehnten Kopf und einem schmalen Hals. Im Dornfortsatzkopf befindet sich der aktiven Zone gegenüber die PSD sowie ein verzweigtes Aktinzytoskelett und ein Netzwerk aus glattem ER (gER). Im Halsbereich befinden sich Aktinfilamente (F-Aktin) und Polyribosomen sowie der Dornenapparat, ein stark ausgeprägtes Netzwerk aus glattem ER. Ein Ausschnitt aus dem Dornfortsatzkopf (rechts) zeigt die Proteine der PSD sowie die Verknüpfung mit dem Aktinzytoskelett des Dornfortsatzkopfes und mit dem glatten ER. In der PSD befinden sich Glutamaterezeptoren des AMPA- (AMPA), NMDA- (NMDAR) sowie des metabotropen Typen (mGluR), die über verschiedene Adaptorproteine indirekt oder direkt mit PSD-Gerüstproteinen wie PSD-95 (PSD95) und ProSAP/Shank (Shank) verknüpft sind. Die PSD-Gerüstproteine verknüpfen die Neurotransmitterrezeptorkomplexe untereinander sowie über verschiedene regulatorische Proteine wie Homer bzw. Cortactin und Abp1 mit dem glatten ER bzw. dem Aktinzytoskelett des Dornfortsatzkopfes (modifiziert nach HERING und SHENG, 2001).

(MAGUKs) wie PSD-95 und die prolinreichen synapsenassoziierten Proteine/Src-Homologie 3 (SH3)-Domänen und Ankyrin-Wiederholung-beinhaltenen Proteine (ProSAPs/Shanks) (KIM und SHENG, 2004). Die MAGUKs sind u.a. durch direkte Interaktionen mit NMDA-Rezeptoruntereinheiten (KORNAU et al., 1995; NIETHAMMER et al., 1996), Ionenkanälen (GEE et al., 1998; KIM et al., 1995) und Zelladhäsionsmolekülen (INAGAKI et al., 2001; SCHULTZE et al., 2001) an der Zusammenlagerung und an der Signaltransduktion der NMDA-Rezeptorkomplexe beteiligt. AMPA-Rezeptorkomplexe werden durch Interaktion mit PDZ-Domänenproteinen wie dem Glutamaterezeptor-interagierenden Protein (GRIP) in die PSD integriert (DONG et al., 1997). Die mGlu-Rezeptorkomplexe werden durch die Interaktion mit dem PDZ-Domänenprotein Homer in die PSD integriert und funktionell mit den Inositoltrisphosphat-Rezeptoren verknüpft, was eine Freisetzung des intrazellulären Calciums nach Rezeptorstimulation ermöglicht (BRAKEMAN et al., 1997; KAMMERMEIER et al., 2000; TU et al., 1998; XIAO et al., 1998; 2000). Die ProSAP/Shank-Proteine sind über direkte oder indirekte Interaktionen mit den verschiedenen Glutamaterezeptorkomplexen verbunden und nehmen in der PSD-Organisation und -Signalintegration eine zentrale Rolle ein (HUSI et al., 2000; SHENG und KIM, 2000; TU et al., 1999). Die PSD bildet somit den molekularen Apparat, der für den Empfang und die Verarbeitung synaptischer Signale in der postsynaptischen Zelle notwendig ist und gewährleistet die räumliche Organisation sowie

entwicklungs- und aktivitätsabhängige Änderungen der postsynaptischen Strukturen (ZIFF, 1997).

### 1.1.2 Die PSD-Proteine der ProSAP/Shank-Familie

Die Familie der ProSAP/Shank-Proteine besteht aus drei Mitgliedern: Shank1, ProSAP1 (auch Shank2 genannt) und ProSAP2 (auch Shank genannt3) (BÖCKERS et al., 1999a; 1999b; DU et al., 1998; LIM et al., 1999; NAISBITT et al., 1999; TOBABEN et al., 2000, TU et al., 1999; YAO et al., 1999; ZITZER et al., 1999a; 1999b). ProSAP/Shank-Proteine sind mit einer molekularen Masse von über 200 kD große Multidomänenproteine und besitzen eine in Mammalia konservierte Domänenstruktur mit einer N-terminalen Domäne von 5-6 Ankyrin-Wiederholungen, einer SH3-Domäne, einer PDZ-Domäne, einer langen Region mit prolinreichen Motiven sowie einem C-terminalen sterilen Alphanmotiv (SAM-Domäne). Die drei ProSAP/Shank-Proteine treten jeweils in verschiedenen langen, entwicklungsabhängig regulierten Spleißvarianten auf, wobei für ProSAP1 bislang nur kürzere Spleißvarianten charakterisiert wurden, denen die N-terminalen Ankyrin-Wiederholungen bzw. die Ankyrin-Wiederholungen und die sich daran anschließende SH3-Domäne fehlten (BÖCKERS et al., 1999a; 2002; DU et al., 1998; LIM et al., 1999; SHENG und KIM, 2000).

Die SH3-Domäne vermittelt die Interaktion zu GRIP (SHENG und KIM, 2000), wodurch ProSAP/Shank-Proteine mit den Signalwegen der AMPA-Rezeptoren verbunden sind (DONG et al., 1997; SRIVASTAVA et al., 1998; WYSZYNSKI et al., 1999). Die PDZ-Domäne ist unter den ProSAP/Shank-Proteinen hochkonserviert (BÖCKERS et al., 1999a; LIM et al., 1999) und vermittelt die Interaktion mit den Guanylatkinase-assoziierten Proteinen (GKAP) (BÖCKERS et al., 1999b; NAISBITT et al., 1999; TU et al., 1999; YAO et al., 1999), wodurch die ProSAP/Shank-Proteine über die MAGUK-Proteine mit dem NMDA-Rezeptorkomplex verknüpft sind (HUSI et al., 2000) (Abb. 2). Der sich an die PDZ-Domäne anschließende, ungefähr 1000 umfassende Aminosäuresequenzbereich ist reich an Prolin- und Serinresten und vermittelt eine Vielzahl von Proteininteraktionen, u.a. mit dem PDZ-Domänen-Gerüstprotein Homer, welches die Interaktion mit den mGlu-Rezeptoren vermittelt (TU et al., 1999), mit der SH3-Domäne des Aktin-bindenden Proteins Cortactin mittels des spezifischen ppI-Motivs (DU et al., 1998; LIM et al., 1999; NAISBITT et al., 1999), der SH3-Domäne des Aktin-bindenden Proteins Abp1, dessen Bindung über mehrere prolinreiche Motive vermittelt wird (HÄCKEL et al., 2008; QUALMANN et al., 2004), sowie über serinreiche Bereiche mit Dynamin-2 (OKAMOTO et al., 2001). Durch Bindung an den Arp2/3-Komplex bzw. den Arp2/3-Komplexaktivator N-WASP fördert Cortactin die Aktinnukleation (URUNO et al., 2001; WEAVER et al., 2001) und spielt durch die direkte Assoziation mit ProSAP/Shank eine wichtige Rolle für die Dornfortsatzmorphologie (HERING und SHENG, 2003). Auch der ProSAP/Shank-Bindungspartner Abp1 bindet Aktinfilamente, reguliert Aktindynamik und nimmt eine wichtige Funktion in der Stabilisierung des Aktinzytoskeletts des Dornfortsatzkopfes ein (HÄCKEL et al., 2008; KESSELS et al., 2000; QUALMANN et al., 2004).

ProSAP/Shank-Proteine sind neuronal angereichert (DU et al., 1998; LIM et al., 1999; YAO

et al., 1999; ZITZER et al., 1999b) und werden in vielen Großhirnarealen wie dem Cortex und Hippocampus deckungsgleich exprimiert (BÖCKERS et al., 1999a; 1999b; ZITZER et al., 1999b). Jedoch unterscheidet sich die Expression der einzelnen Isoformen in den verschiedenen Zellschichten des Kleinhirns sowie in einigen Großhirnarealen (BÖCKERS et al., 1999a; 1999b; ZITZER et al., 1999b) und auch die jeweiligen Spleißvarianten der ProSAP/Shank-Proteine werden unterschiedlich exprimiert (BÖCKERS et al., 1999a; DU et al., 1998; LIM et al., 1999; NAISBITT et al., 1999; TU et al., 1999). ProSAP/Shank-Proteine sind Bestandteil der PSD exzitatorischer Synapsen und kommen nicht in inhibitorischen Synapsen vor (BÖCKERS et al., 1999a; LIM et al., 1999; NAISBITT et al., 1999; TU et al., 1999; YAO et al., 1999; ZITZER et al., 1999b). Die ProSAP/Shank-Proteine sind mit einem Abstand von 30 nm zur postsynaptischen Membran in den tieferen Regionen der insgesamt 40-50 nm umfassenden PSD lokalisiert, wohingegen sich im Vergleich dazu PSD-95 in einem Abstand von 5-10 nm zur postsynaptischen Membran befindet (HARRIS und STEVENS, 1989; NAISBITT et al., 1999; VALTSCHANOFF und WEINBERG, 2001). Die Lokalisation der einzelnen ProSAP/Shank-Proteine wird unterschiedlich und entwicklungsabhängig reguliert, wobei ProSAP1 bereits während der Synapsenbildung ungefähr im postnatalen Stadium P6-P10 und noch vor der Bildung von PSD-95-NMDA-Rezeptorkomplexen in der PSD lokalisiert ist (BÖCKERS et al., 1999a; 2002; DU et al., 1998; LIM et al., 1999; NAISBITT et al., 1999). Während ProSAP1 und ProSAP2 SAM-Domänen vermittelt und Zink-Ionen-abhängig in die PSD rekrutiert werden, wird Shank1 zeitlich deutlich später, in primären hippocampalen Neuronen nach ungefähr 14 Tagen in Kultur, SAM-Domänen- und Zink-Ionen-unabhängig in die PSD rekrutiert (BÖCKERS et al., 2005; GRABRUCKER et al., 2011; SHENG und KIM, 2000; SALA et al., 2001). SAM-Domänen sind in der Lage, über End-zu-End-Bindung sowohl homomer als auch heteromer zu multimerisieren, was die ProSAP/Shank-Proteine zur Ausbildungen großer zweidimensionaler, plattformähnlicher Schichten befähigt, bei deren Zusammenlagerung Zink-Ionen eine stabilisierende Rolle spielen (BARON et al., 2006; GUNDELFINGER et al., 2006; NAISBITT et al., 1999).

Durch die ProSAP/Shank-vermittelte Verknüpfung der PSD-Gerüstproteine GRIP, GKAP und Homer werden die AMPA-, NMDA- und mGlu-Rezeptorkomplexe räumlich und funktionell in der PSD verknüpft und deren Signalwege mit der Regulation des Aktinzytoskelett im Dornfortsatzkopfes verbunden (Abb. 2). ProSAP/Shank-Proteine nehmen dadurch eine entscheidende Rolle in der Zusammenlagerung der PSD während der Postsynapsenbildung und in der Regulation morphologischer und funktioneller Veränderungen während der synaptischen Plastizität ein (BÖCKERS et al., 2002; 2006; SHENG und KIM, 2000). Überexpressionsstudien bestätigten die Rolle der ProSAP/Shank-Proteine in der Dornfortsatzreifung, Synapsenbildung und -funktion, wobei eine ProSAP/Shank-Überexpression zu vergrößerten Dornfortsatzköpfen, erhöhten synaptischen Dichten und einer gesteigerten synaptischen Transmission führte (GRABRUCKER et al., 2011; HÄCKEL et al., 2008; ROUSSIGNOL et al., 2005; SALA et al., 2001). Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA)-Interferenz (RNAi)-Studien zeigten desweiteren, dass ein Verlust der einzelnen ProSAP/Shank-Proteine zu einer verringerten synaptischen

Dichte (BERKEL et al., 2012; GRABRUCKER et al., 2011) sowie ProSAP2 RNAi-vermittelt zu einer verringerten Dornfortsatzdichte (ROUSSIGNOL et al., 2005) und ProSAP1 RNAi-vermittelt zu einem Volumenverlust der Dornfortsätze führte (BERKEL et al., 2012). Studien an *ProSAP/Shank*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten Defekte in der Dornfortsatzbildung, Störungen in der synaptischen Transmission sowie autismusähnliche Verhaltensstörungen (HUNG et al., 2008; PEÇA et al., 2011; SCHMEISSER et al., 2012; WANG et al., 2011). Genetische Studien an humanen *ProSAP/Shank*-Genen identifizierten Mutationen in diesen Genen als eine Ursache für Autismus-Spektrum-Störungen (*autism spectrum disorders*, ASD) (BERKEL et al., 2010; DURAND et al., 2007; GAUTHIER et al., 2010; MARSHALL et al., 2008; SATO et al., 2012) und Studien an Mausmodellen von einigen dieser Mutationen zeigten Defekte in der Dornfortsatzbildung, Störungen in der synaptischen Transmission und autismusähnliche Verhaltensstörungen vergleichbar mit den Phänotypen der *ProSAP/Shank*<sup>-/-</sup>-Mäuse (BERKEL et al., 2012).

## 1.2 Synapsenbildung & synaptische Plastizität

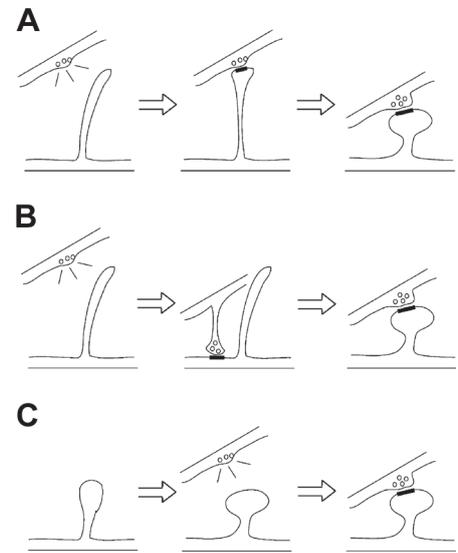
Die Ausbildung dendritischer Dornfortsätze korreliert in den meisten Großhirnregionen zeitlich mit der Hauptperiode der Synapsenbildung, die in Mammalia in den ersten postnatalen Wochen stattfindet (YUSTE und BONHÖFFER, 2004). Der zeitliche Zusammenhang zwischen der Bildung von Synapsen und Dornfortsätzen während der Ausbildung neuronaler Netzwerke ist bislang noch nicht hinreichend aufgeklärt und wird in verschiedenen Modellen diskutiert (Abb. 3). Junge pyramidale Neurone sind reich an filopodienähnlichen Ausläufern des dendritischen Schafts, die sich schnell ausbilden und wieder zurückziehen (DAILEY und SMITH, 1996; DUNAEVSKY et al., 1999; LENDVAI et al., 2000; ZIV und SMITH, 1996). Diese werden im Laufe der Entwicklung von reifen Dornfortsätzen mit einem ausgebildeten Kopf ersetzt (DAILEY und SMITH, 1996; FIALA et al., 1998; HARRIS, 1999; ZIV und SMITH, 1996). Dabei kommt es entwicklungsabhängig zu einer Zunahme reifer Dornfortsätze entlang des Dendriten (ETHELL und PASQUALE, 2005). Diese Beobachtungen führten zu der Vorstellung, dass dendritische Filopodien instabile Vorläufer der Dornfortsätze darstellen, die durch Abnahme ihrer Motilität, Verkürzung und Vergrößerung des distalen Endes in Dornfortsätze umgewandelt werden (MARRS et al., 2001; VAUGHN, 1989; ZIV und SMITH, 1996) (Abb. 3A). Die dendritischen Filopodien suchen aktiv den präsynaptischen Kontakt (ZIV und SMITH, 1996), dessen Ausbildung die Umwandlung in einen stabilen Dornfortsatz auslöst (DAILEY und SMITH, 1996; MARRS et al., 2001; OKABE et al., 2001; TRACHTENBERG et al., 2002). Studien, in denen die Mehrheit der Synapsen in jungen Neuronen auf dem dendritischen Schaft lokalisiert war, führten alternativ zu der Vorstellung, dass sich Synapsen auf Dornfortsätzen aus Schaftsynapsen bilden (DAILEY und SMITH, 1996; HARRIS et al., 1992; 1999; MARRS et al., 2001; MILLER und PETERS, 1981) (Abb. 3B). Während der Ausreifung des neuronalen Netzwerkes steigt die Anzahl der Synapsen auf den Dornfortsätzen, wohingegen die Anzahl der Schaftsynapsen abnimmt (BOYER et al., 1998; FIALA et al., 1998). Eine mögliche Kombination beider Modelle schlägt zunächst die Ausbildung eines primären synaptischen Kontakts auf

dendritischen Filopodien vor, welche sich daraufhin zurückbilden und Schaftsynapsen entstehen lassen, die sich dann in Dornfortsätze umwandeln (FIALA et al., 1998; MARRS et al., 2001).

In einer dritten Vorstellung, die sich auf Studien von Purkinjezellen des Kleinhirns stützt, findet die Dornfortsatzbildung unabhängig von und zeitlich vor der Synapsenbildung statt (LARRAMENDI, 1969; SOTELO, 1978; 1990; TAKÁCS et al., 1997) (Abb. 3C). Die Unterschiede zwischen den Synapsen der pyramidalen Neurone des Großhirns und der Purkinjezellen des Kleinhirns in ihrer synaptischen Aktivität und in ihrer molekularen Zusammensetzung werden als mögliche Ursachen für die verschiedenen Beobachtungen der Dornfortsatzentwicklung betrachtet (ETHELL und PASQUALE, 2005).

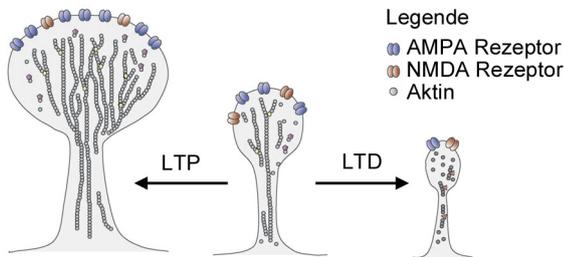
Im adulten Gehirn können Dornfortsätze abhängig von ihrer Morphologie sehr stabil sein, wobei Dornfortsätze mit ausgebildetem Kopf stabiler sind als filopodienähnliche Dornfortsätze (GRUTZENDLER et al., 2002; TRACHTENBERG et al., 2002). Abhängig von der synaptischen Aktivität kommt es auch im adulten Gehirn zur Neubildung bzw. Eliminierung von Dornfortsätzen, obwohl ein Großteil der Dornfortsätze adulter Neurone eher

morphologischen Veränderungen unter Erhalt des Dornfortsatzes unterliegt (GRUTZENDLER et al., 2002). Aufgrund der Korrelation der Dornfortsatzkopfgröße mit der Stärke der synaptischen Transmission (HARRIS und STEVENS, 1989; MATSUZAKI et al., 2001; NUSSER et al., 1998; SCHIKORSKI und STEVENS, 1999) werden morphologische Veränderungen der Dornfortsätze eng mit langanhaltenden Änderungen in der synaptischen Übertragungsstärke, der synaptischen Langzeitplastizität, assoziiert (ENGERT und BONHÖFFER, 1999; YUSTE und BONHÖFFER, 2001). Eine langanhaltende starke synaptische Aktivität führt zu einem erhöhten postsynaptischen Calciumgehalt, der zu einem NMDA-Rezeptor-abhängigen Einbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran führt (COLLINGRIDGE et al., 1983; LYNCH et al., 1983; LLEDO et al., 1998; MALETIC-SAVATIC et al., 1999; MALINOW und MILLER, 1986; NICOLL et al., 1988). Diese Langzeitpotenzierung (LTP) führt auch zur Vergrößerung der Köpfe bestehender Dornfortsätze sowie zur Neubildung von Dornfortsätzen (MATSUZAKI et al., 2004; NÄGERL et al., 2004; OKAMOTO et al., 2004) (Abb. 4). Eine langanhaltende schwache synaptische Aktivität bewirkt gegenteilig einen verminderten Calciumgehalt, der NMDA-Rezeptor-abhängig zur Endozytose von AMPA-Rezeptoren von der postsynaptischen Membran führen kann (DUDEK und BEAR, 1992; ITO et al., 1982; LIAO et al., 1999; LISSIN et al., 1998; O'BRIEN et al., 1998; TURRIGIANO et al., 1998). Diese Langzeitdepression (LTD) bewirkt das Schrumpfen von Dornfortsatzköpfen sowie das Verkürzen bis hin zur Eliminierung von Dornfortsätzen (ZHOU et al., 2004) (Abb. 4). Die



**Abbildung 3: Modelle der Synapsen- und Dornfortsatzbildung.** A, Filopodien als Dornfortsatzvorläufer. B, Dornfortsatzbildung aus Schaftsynapsen. C, Dornfortsatzbildung ohne synaptischen Kontakt (modifiziert nach ETHELL und PASQUALE, 2005).

morphologischen Veränderungen werden durch verschiedene Rezeptor-vermittelte Signalwege ausgelöst, die auf die Regulation des Aktinzytoskeletts zusammenlaufen (DUNAEVSKY et al., 1999; FISCHER et al., 1998; LENDVAI et al., 2000; WONG et al., 2000).



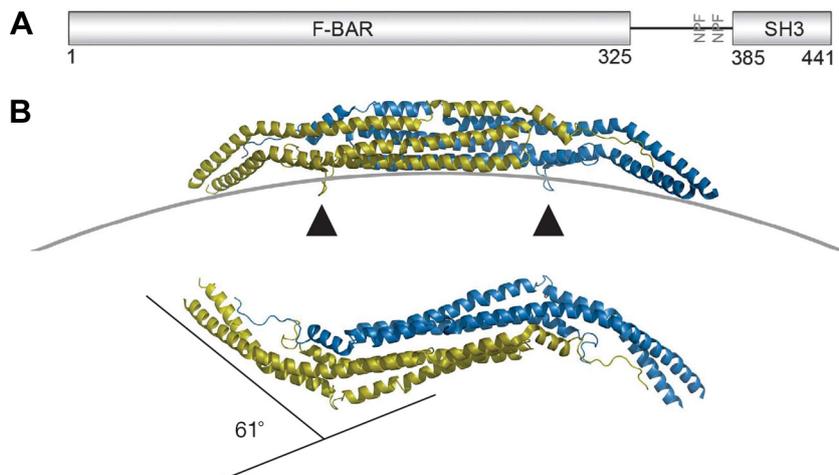
**Abbildung 4: Morphologische Veränderungen dendritischer Dornfortsätze während der synaptischen Plastizität.** LTP-Induktion führt zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts, zum Wachstum der Dornfortsätze mit vergrößertem Kopfbereich und zum Einbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran (links). LTD führt Aktindynamik-vermittelt zu einem Schrumpfen des Kopfbereichs der Dornfortsätze und zur Endozytose von AMPA-Rezeptoren von der postsynaptischen Membran (rechts) (modifiziert nach TADA und SHENG, 2006).

### 1.3 Das F-BAR-Domänenprotein Syndapin I

Die Familie der synaptischen Dynamin-assoziierten Proteine (Syndapin, auch genannt *protein kinase C $\alpha$  and casein kinase 2 substrate in neurons*, PACSIN) umfasst in Mammalia drei ca. 50-65 kD große Proteine, das neuronal angereicherte Syndapin I, das ubiquitär exprimierte und in mehreren Spleißvarianten vorkommende Syndapin II sowie das vorrangig in Herz- und Skelettmuskelgewebe exprimierte Syndapin III (MODREGGER et al., 2000; PLOMANN et al., 1998; QUALMANN et al., 1999; QUALMANN und KELLY, 2000; RITTER et al., 1999; SUMOY et al., 2001). Die Syndapin I-Expression wird entwicklungsabhängig reguliert und ist im adulten Gewebe maximal, wobei Syndapin I ubiquitär im Gehirn mit einer besonderen Stärke im Hippocampus und Kleinhirn exprimiert wird (PLOMANN et al., 1998). Studien zeigten für Syndapin I eine dendritische, präsynaptische und postsynaptische Lokalisation in Neuronen (BRAUN et al., 2005; QUALMANN et al., 1999; PÉREZ-OTAÑO et al., 2006).

Die Domänenstruktur von Syndapin I, ähnlich zu der der anderen Syndapine, zeichnet sich durch eine N-terminale Fes/Cdc42-interagierendes Protein 4-Homologie-Bin/Amphiphysin/Rvs (F-BAR)-Domäne, einen sich anschließenden flexiblen *Linker*-Bereich und eine C-terminale SH3-Domäne aus (MODREGGER et al., 2000; PLOMANN et al., 1998; QUALMANN et al., 1999; RITTER et al., 1999; RAO et al., 2010) (Abb. 5A). F-BAR-Domänen zeigen Strukturähnlichkeiten zu Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR)-Domänen und binden dimerisiert an Membranen und induzieren positive Membrankrümmung (FROST et al., 2008; HENNE et al., 2007; ITOH et al., 2005; SHIMADA et al., 2007). Die Dimere der Syndapin I-F-BAR-Domäne sind zu einem seitlich betrachtet konkav gekrümmten Sechs-Helix-Bündel mit im 61°-Winkel stark abgeknickten Enden geformt, wodurch von der Oberseite betrachtet eine stark geknickte S-Form entsteht (WANG et al., 2009). An beiden Enden des Sechs-Helix-Bündels befindet sich im Syndapin-F-BAR-Dimer eine Keilschleife (*wedge loop*) mit hydrophoben Aminosäureresten, wodurch Syndapin-F-BAR-Dimere in der Lage sind, in Membranen zu inserieren und somit die Bindung und Induktion positiv gekrümmter Membran zu fördern (RAO et al., 2010; WANG et al., 2009) (Abb. 5B). F-BAR-Domänen können sich lateral und End-zu-End zu größeren Aggregaten zusammenlagern, wodurch sie sich ringförmig um Einstülpungen anordnen und so

die Bildung von tubulären oder vesikulären Strukturen fördern können (FROST et al., 2008; SHIMADA et al., 2007). Durch die stark abgeknickte S-Form der Syndapin I-F-BAR-Domäne spielt Syndapin I eine Rolle in der Induktion von stärker gekrümmten Membranen (RAO et al., 2010; WANG et al., 2009), wie sie in der Vesikelbildung benötigt werden. Syndapin I zeigt darüber hinaus eine besondere Bindungsaffinität für phosphatidylserinreiche Membranen, was eine funktionelle Rolle in Membranmodulationsvorgängen der Plasmamembran impliziert (ITO et al., 2005; DHARMALINGAM et al., 2009). Ausgehend von den unterschiedlichen Krümmungseigenschaften der verschiedenen BAR- und F-BAR-Domänen wird ein Zusammenspiel mehrerer (F-)BAR-Domänenproteine während Membranmodulationsprozessen vorgeschlagen (FROST et al., 2008; SHIMADA et al., 2007; QUALMANN et al., 2011).



**Abbildung 5: Domänenorganisation und F-BAR-Dimerstruktur von Syndapin I.**

**A**, Syndapin I besitzt eine N-terminale F-BAR-Domäne, einen flexiblen *Linker*-Bereich mit zwei NPF-Motiven sowie eine C-terminale SH3-Domäne (modifiziert nach KOCH et al., 2011). **B**, Die dimerisierte F-BAR-Domäne von Syndapin ist seitlich betrachtet (oberer Abschnitt) zu einem gekrümmten Sechshelix-Bündel geformt, dessen distale Enden von der Oberseite betrachtet (unterer Abschnitt) stark abgeknickt sind.

Die Keilschleifen (markiert durch Pfeilspitzen) tragen hydrophobe Aminosäurereste, die durch Membraninsertion zur Bindung und Krümmung von Membranen beitragen (modifiziert nach QUALMANN et al., 2011).

Syndapin I besitzt zwei Asparagin-Prolin-Phenylalanin (NPF)-Motive, über die Syndapin I mit Eps15-Homologie-Domänen (EHD)-beinhaltenden Proteinen interagiert und über die eine Syndapin I-Rolle in endosomalen Recyclingprozessen vermittelt wird (BRAUN et al., 2005). Die SH3-Domäne vermittelt Interaktionen mit PxxP-Motiven verschiedener Proteine, u.a. mit dem endozytotisch relevanten Protein Dynamin, dem Nukleationspromotionsfaktor N-WASP, dem Aktinnukleator Cordon-bleu (Cobl) und den präsynaptischen Proteinen Synapsin und Synaptojanin (AHUJA et al., 2007; MODREGGER et al., 2000; QUALMANN et al., 1999, 2000). Durch die Selbstassoziationseigenschaft von Syndapin I können mehrere Interaktionspartner, die in verschiedene zellbiologische Prozesse involviert sind, miteinander und darüber hinaus mit Membranmodulationsvorgängen verknüpft werden (DHARMALINGAM et al., 2009; KESSELS und QUALMANN, 2006; SCHWINTZER et al., 2011). Syndapin I nimmt durch die räumliche Verknüpfung des Aktinzytoskeletts mit Membranmodulationsvorgängen während der Neuromorphogenese eine essentielle Rolle ein (QUALMANN et al., 1999). Syndapin I verknüpft N-WASP mit Membranen und setzt es aus der Autoinhibition frei, wodurch Arp2/3-Komplex-abhängig Aktinnukleation vermittelt wird und ist so entscheidend für die korrekte Ausbildung von Axonen (DHARMALINGAM et al., 2009). Durch die räumliche Regulation des Aktinnukleators Cobl nimmt Syndapin I eine Rolle während der Entwicklung des Dendritenbaumes ein (SCHWINTZER et al., 2011). Die Relevanz der räumlichen Regulation von Cobl

während Membranmodulationsvorgängen wurde desweiteren mit dem Syndapin I-Ortholog im Zebrafisch-Modellorganismus bewiesen. Die Syndapin I/Cobl-Interaktion erwies sich für die Ausbildung von aktinreichen Stereozilien sowie Mikrotubuli-basierenden Kinozilien als essentiell (SCHÜLER et al., 2013).

Über die Interaktion mit Dynamin und den EHD-Proteinen ist Syndapin I an verschiedenen Prozessen der Vesikelbildung beteiligt (ANDERSSON et al., 2008; ANGGONO et al., 2006; BRAUN et al., 2005; KOCH et al., 2011; SIMPSON et al., 1999; QUALMANN et al., 2000). Syndapin I ist zudem in der Lage, Dynamin und N-WASP während der Clathrin-vermittelten Endozytose zu verknüpfen (KESSELS und QUALMANN, 2002; 2006).

In der Studie von PÉREZ-OTÁÑO et al. (2006) wurde zudem eine Interaktion mit der Rezeptoruntereinheit NR3A der unreifen NMDA-Rezeptoren beschrieben und eine mögliche Rolle in der Entwicklung reifer NMDA-Rezeptoren durch NR3A-Internalisierung vorgeschlagen.

In *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte eine verstärkte Löslichkeit von Dynaminen sowie Defekte im Recycling und eine Vergrößerung präsynaptischer Vesikel in hippocampalen Synapsen festgestellt werden (KOCH et al., 2011). Desweiteren zeigten *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Synapsen der Stäbchen-Fotorezeptoren in der Retina schwere Defekte in Membrantransportvorgängen mit einer verringerten Adaptionfähigkeit, einer Akkumulation von endosomenähnlichen Membranstrukturen an der synaptischen Plasmamembran sowie vergrößerten synaptischen Vesikeln (KOCH et al., 2011). Dies führte zu dem Modell, dass Syndapin I während des Vesikelabschnürungsprozesses an der Rekrutierung von Dynamin an die Membran beteiligt ist und dass es unter Syndapin I-Defizienz vermutlich zu einer ineffizienten bzw. verspäteten Dynamin-vermittelten Vesikelabschnürung kommt (KOCH et al., 2011).

Syndapin I wurde sowohl in exzitatorischen als auch inhibitorischen Synapsen nachgewiesen und elektrophysiologische Messungen zeigten reduzierte spontane bzw. evozierte exzitatorische und inhibitorische postsynaptische Ströme an *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Hippocampuschnitten (KOCH et al., 2011). Mit dem wiederholten Auftreten von Krampfanfällen, einer veränderten hippocampalen Netzwerkaktivität, einem verringerten Schwellenwert für den GABA-Rezeptorantagonisten Bicucullin sowie einem vergrößerten Hippocampus entsprechen *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäuse dem Phänotyp epileptischer Mäuse (KOCH et al., 2011).

## 1.4 Fragestellung

Während der Bildung und Reifung von Dornfortsätzen erforderliche Veränderungen der Plasmamembran benötigen eine genaue Regulation der PSD-Komponenten und werden durch Kräfte des Aktinzytoskeletts vermittelt. Das F-BAR-Domänenprotein Syndapin I ist in der Lage direkt und mittels N-WASP/Arp2/3-Komplex-vermittelter Aktinfilamentneubildung die Topologie der Plasmamembran zu modulieren. Eine Funktion von Syndapin I als räumlicher Regulator in der Bildung und morphologischen Veränderung dendritischer Dornfortsätze schien somit denkbar. Mithilfe von Analysen der Dornfortsatzmorphologie und Synapsendichte sollte diese Hypothese kritisch hinterfragt werden. Die Untersuchung von *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Neuronen im Vergleich zu Syndapin I *small interfering* RNA (siRNA)-exprimierenden Neuronen sollte dabei der Abgrenzung speziell postsynaptischer Syndapin I-Funktionen dienen, die bei der alleinigen Untersuchung von *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen aufgrund des kompletten Syndapin I-Verlusts nicht möglich wäre. Syndapin I-Überexpressionsstudien sollten mögliche postsynaptische Syndapin I-Funktion durch einen positiven Effekt auf die Dornfortsatzmorphologie bzw. Synapsendichte verdeutlichen. Mittels Verwendung von verschiedenen Syndapin I-Mutanten sollte zudem in RNAi-Rettungsexperimenten adressiert werden, welche Domänen für Funktionen von Syndapin I in dendritischen Dornfortsätzen kritisch sind. Im Mittelpunkt sollten hierbei putative Abhängigkeiten von der Membranassoziationseigenschaft sowie von SH3-Domänen-vermittelten Interaktionen von Syndapin I stehen. Die vermutete postsynaptische Relevanz von Syndapin I sollte mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Lokalisationsanalysen in Neuronenkulturen auf subzellulärer Ebene bestätigt werden.

Die neu identifizierte Interaktion mit dem postsynaptischen Gerüstprotein ProSAP1 stellt einen attraktiven Ansatzpunkt für eine postsynaptische Rolle von Syndapin I dar, da ProSAP1 entscheidend an der PSD-Organisation während der Bildung und morphologischen Veränderung von Dornfortsätzen beteiligt ist. Die Charakterisierung der Bindungsmotive der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion sollte dabei einen wesentlich Beitrag zur Abgrenzung von anderen ProSAP1-Interaktionen leisten. In Lokalisationsanalysen sollte die Relevanz der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion auf zellulärer und subzellulärer Ebene überprüft werden. Studien der Dornfortsatzmorphologie und der Synapsendichte unter Beeinträchtigung der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion sollten den funktionellen Mechanismus der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion aufklären.

Die Membranassoziationsfähigkeit von Syndapin I macht eine räumliche Regulation von ProSAP1 während der Membranmodulationsvorgänge in der Ausbildung und Plastizität dendritischer Dornfortsätze vorstellbar. Mittels proteinbiochemischer und zellbiologischer Studien sowie mittels elektrophysiologischer Messungen sollte die Relevanz der Membranassoziationsfähigkeit von Syndapin I und die Relevanz einer Interaktion mit ProSAP1 in lebenden Zellen untersucht werden. Insbesondere eine Untersuchung der räumlichen Lokalisation von ProSAP1 in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Neuronen könnte näheren Einblick in die Relevanz der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion geben und zur kausalen Analyse des epileptischen Phänotypen von *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen beitragen.

# 2 Material & Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Chemikalien & Biochemikalien

Sofern nicht weiter angegeben wurden alle Lösungen in doppelt-distilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt. Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in höchstem Reinheitsgrad von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG, Merck KGaA, Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Co. LLC und SERVA *Electrophoresis* GmbH bezogen.

#### Chemikalien für die Molekularbiologie

Agarose LE	Biozym <i>Scientific</i> GmbH
Alkalische Phosphatase <i>FastAP Thermosensitive Aqua ad iniectionabilia</i> (Aqua a.i.)	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
Bovines Serumalbumin (BSA) (10×)	B. Braun Melsungen AG
Deoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) 100 mM	<i>New England Biolabs</i> (NEB) <sup>®</sup> Inc.
FastRuler™ <i>Low Range DNA (deoxyribonucleic acid) Ladder</i>	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
GeneRuler™1kb (Kilobase) <i>DNA Ladder</i>	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
<i>HotStarTaq (Thermus aquaticus)</i> -DNA-Polymerase	Qiagen <sup>®</sup> N.V.
Phusion <sup>®</sup> <i>High Fidelity</i> Reaktionspuffer	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
Phusion <sup>®</sup> -DNA-Polymerase	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
Proteinase K	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> Co. LLC
Qiagen-PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> )-Puffer	Qiagen <sup>®</sup> N.V.
Restriktionsendonuklease-Reaktionspuffer	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.; NEB <sup>®</sup> Inc.
Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.; NEB <sup>®</sup> Inc.
Ribonuklease (RNase) A	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
T4-Polynukleotidkinase	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.

#### Chemikalien für die Proteinbiochemie

Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG
<i>Brain Extract from bovine brain, Type I: Folch Fraction I</i> Lipide	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> Co. LLC
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> Co. LLC
<i>Complete™ Protease Inhibitor Cocktail</i> Tabletten (ohne Ethylendiamintetraacetat, EDTA)	Roche <i>Diagnostics</i> AG
Coomassie-Brillantblau G-250	Carl Roth GmbH & Co. KG
Deoxyribonuklease (DNase) I	Roche <i>Diagnostics</i> AG
<i>High-Affinity</i> Glutathion-S-Transferase (GST)-Resin	Genscript Corp.
Lysozym aus Hühnereiweiss	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> Co. LLC
Magermilchpulver	J. M. Gabler Saliter GmbH
PageRuler™ <i>Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
<i>Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder</i>	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
Talon™ <i>Superflow™ Metal Affinity</i> Resin	Clontech <i>Laboratories</i> Inc.
Xylolecyanol	MP <i>Biomedicals</i> , LLC

#### Chemikalien für die Zyto- & Histochemie

Chrom(III)-kaliumsulfat-Dodecahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
4',6-Diamidin-2'-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Roche <i>Diagnostics</i> AG
Fluoromont-G™	<i>Southern Biotech</i>
Gelatine	SERVA <i>Electrophoresis</i> GmbH

Ketamin 100 mg Ampullen	DeltaSelect GmbH
MitoTracker <sup>®</sup> <i>Deep Red FM</i>	<i>Molecular Probes</i> <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
Mowiol <sup>®</sup> 4-88	Calbiochem
Ziegenserum ( <i>Normal Goat Serum</i> )	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
Phalloidin Alexa Fluor <sup>®</sup> 633	<i>Molecular Probes</i> <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
Rompun 2% Injektionslösung	Bayer AG
Roti <sup>®</sup> -Histokitt Einschlussmittel	Carl Roth GmbH & Co. KG

### Kitsysteme

<i>FD Rapid GolgiStain</i> <sup>™</sup> -Kit	FD NeuroTechnologies, Inc.
NucleoBond <sup>®</sup> Xtra Midi-Kit	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG
NucleoSpin <sup>®</sup> <i>Gel and PCR Clean-up</i> -Kit	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid-Kit	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG
Qiagen <sup>®</sup> Plasmid Maxi-Kit	Qiagen <sup>®</sup> N.V.
Qiagen <sup>®</sup> Plasmid Midi-Kit	Qiagen <sup>®</sup> N.V.

## 2.1.2 Bakterien-, Zellkulturmedien & Zellkulturreagenzien

Alle Nährmedien wurden in ddH<sub>2</sub>O nach den Herstellerangaben angesetzt und autoklaviert. Die Zugabe hitzesensitiver Antibiotika erfolgte direkt vor Verwendung.

### Bakterienkultur

Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG
<i>Lysogeny Broth</i> (LB)-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG
2× <i>Yeast extract tryptone</i> (YT)-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG

### Zellkulturmedien

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM), <i>High Glucose</i>	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
<i>Minimum Essential Medium</i> (MEM)	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
Neurobasal <sup>™</sup> Medium	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
Neurobasal <sup>™</sup> -A Medium	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
Opti-MEM <sup>™</sup> <i>I Reduced Serum Medium</i>	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH

### Zellkulturreagenzien

B-27 <sup>®</sup> <i>Serum-Free Supplement</i> (50×)	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH/GE Healthcare
GlutaMAX <sup>™</sup> <i>Supplement</i>	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS), <i>no Calcium, no Magnesium, no Phenolred</i>	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
L-Glutamin (100×)	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
Pferdeserum, hitzeinaktiviert	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> Co. LLC
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> Co. LLC
0,5% Trypsin-EDTA (10×), <i>no Phenolred</i>	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
TurboFect <sup>™</sup> <i>Transfection Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.

### Antibiotika

Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG
100× Penicillin (100 Einheiten/ml)-Streptomycin (100µg/ml)	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen GmbH
Tetracyclin-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG

## 2.1.3 Puffer &amp; Lösungen

Ampicillin	100 µg/ml Medium
Anästhetikum	1,2% (w/v) Ketamin; 0,17% ( <i>volume/volume</i> , v/v) Rompun in 0,9% ( <i>weight/volume</i> , w/v) NaCl
Blocklösung	2% (w/v) BSA; 10% (v/v) Pferdeserum in PBS (pH 7,4)
Blotto-PBS(T)	5% (w/v) Magermilchpulver in PBS bzw. PBST
Bradford-Reagenz	100 mg/l Coomassie-Brillantblau G-250; 5% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Phosphorsäure (filtriert)
CaCl <sub>2</sub> -Puffer	60 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% (v/v) Glycerol; 10 mM Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES) (pH 7,0)
Chloramphenicol	30 µg/ml LB-Agar
Coomassie-Färbelösung	0,15% (w/v) Coomassie-Brillantblau G-250; 40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
DMEM <sup>++</sup>	2 mM L-Glutamin; 10% (v/v) FKS; Penicillin/ Streptomycin in DMEM
6× DNA-Probenpuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylocyanol; 30% (v/v) Glycerol; 50 mM EDTA (pH 8,0)
EDC-Lösung	100 mM EDC in 1× [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer (pH 7,4)
Entfärbelösung	30% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure
<i>Folch fraction</i> I-Lipide	25 mg/ml in Chloroform-Methanol-Gemisch (1:2)
Gelatine-Beschichtungslösung	0,3% (w/v) Gelatine; 0,05% (w/v) Chromkaliumsulfat (CrK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> × 12H <sub>2</sub> O)
Golgi-Färbelösung	1 Teil Lösung D; 1 Teil Lösung E; 2 Teile ddH <sub>2</sub> O ( <i>FD Rapid Golgi-Stain</i> <sup>TM</sup> Kit)
GST-Elutionspuffer	20 mM Glutathion; 50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-HCl; 120 mM NaCl (pH 8,0)
2× HEPES- <i>buffered saline</i> (HBS)-Puffer	274 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 15 mM Glucose; 42 mM HEPES (pH 7,12)
1× HEPES-Puffer	10 mM HEPES; 1 mM Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraacetat (EGTA); 0,1 mM MgCl <sub>2</sub> (pH 7,4)
Histidin (His)-Elutionspuffer	50 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 150 mM Imidazol (pH 7,0)
His-Extraktionspuffer	50 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl (pH 7,0)
Histologie- (Histo-)blocklösung	5% (v/v) Ziegenserum (in PBS); 0,25% (v/v) Triton <sup>®</sup> X-100 in 0,1 M PB
1× Hybridisierungspuffer	100 mM NaCl; 50 mM HEPES (pH 7,4)
Imprägnierlösung	1 Teil Lösung A; 1 Teil Lösung B ( <i>FD Rapid GolgiStain</i> <sup>TM</sup> Kit)
Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer) 100	1× HEPES-Puffer; 100 mM NaCl; 1% (v/v) Triton <sup>®</sup> X-100, 1× PIC (pH 7,4)
Kanamycin	25 µg/ml Medium
Kompetenzpuffer	10 mM PIPES; 15 mM CaCl <sub>2</sub> ; 55 mM MnCl <sub>2</sub> ; 250 mM KCl; Zugabe des MnCl <sub>2</sub> nach Einstellen von pH 6,7 (KOH); sterilfiltriert
Lysepuffer	1× HEPES-Puffer; 150 mM NaCl, 1× PIC (pH 7,4)
Mowiol	10% (w/v) Mowiol 4-88; 25% (w/v) Glycerol; 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)
0,1 M <i>Phosphate buffer</i> (PB)	77,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 22,6 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	2,68 mM KCl; 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 136,9 mM NaCl; 7,98 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O (pH 7,4)
PBS-Calcium/Magnesium (PBS-CM)	0,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 mM CaCl <sub>2</sub> in PBS
PBS-Tween (PBST)	0,05% (v/v) Tween <sup>®</sup> 20 in PBS (pH 7,4)
25× Proteinaseinhibitoren-cocktail (PIC)	1 <i>Complete</i> <sup>TM</sup> <i>Protease Inhibitor Cocktail</i> Tablette ohne EDTA in 2 ml PBS

Poly-D-Lysin	0,01% (w/v) Poly-D-Lysin; 150 mM Borsäure (pH 8,5; sterilfiltriert)
Puffer P1	50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A (pH 8,0)
Puffer P2	200 mM NaOH; 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> , SDS)
Puffer P3	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
Quenchpuffer	25 mM Glycin in PBS (pH 7,4)
<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> (RIPA)-Puffer	0,1% (w/v) SDS; 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat; 1% (v/v) Nonidet™P-40; 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
4× SDS-Probenpuffer	4% (v/v) SDS; 40% (v/v) Glycerin; 20% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,004% (w/v) Bromphenolblau; 250 mM Tris-HCl (pH 6,8)
<i>Super optimal broth</i> (SOB)-Medium	2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 2,5 mM KCl
SOB-Glucose (SOC)-Medium	20 mM Glucose in SOB-Medium
50× Tris-Acetat-EDTA (TAE)	2 M Tris-HCl; 5,71% (v/v) Eisessig; 0,05 M EDTA (pH 8,5)
<i>Terrific broth</i> (TB)-Medium	1,2% (w/v) Trypton/Pepton; 2,4% (w/v) Hefeextrakt; 0,4% (v/v) Glycerol; 1,7 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 7,2 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Tetracyclin	10 µg/ml
Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,02% (w/v) SDS; 18% (v/v) Methanol
10× Tris-Glycin-Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
1× Trypsin-EDTA	0,05% Trypsin-EDTA in HBSS
Waschpuffer (WP) 150	1× HEPES-Puffer; 150 mM NaCl; 1% (v/v) Triton® X-100 (pH 7,4)
WP300	1× HEPES-Puffer; 300 mM NaCl; 1% (v/v) Triton® X-100 (pH 7,4)
1× Zytosolpuffer	25 mM HEPES; 25 mM KCl; 2,5 mM Magnesiumacetat; 100 mM Kaliumglutamat (pH 7,2)

## 2.1.4 Zelllinien, Tier- & Bakterienstämme

### 2.1.4.1 Zelllinien

Die Überexpression rekombinanter Fusionsproteine erfolgte in *Human embryonic kidney* (HEK)293-Epithelzellen (GRAHAM et al., 1977) aus der Niere bzw. *Cercopithecus aethiops, origin-defective* SV-40 (COS)7-Fibroblastenzellen (GLUZMAN, 1981) aus der Niere der Grünen Meerkatze. Beide Zelllinien wurden von ATCC®/LGC *Standards* GmbH bezogen.

### 2.1.4.2 Tierstämme

<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar-Stamm
<i>Mus musculus</i>	C57/BL6J-Stamm (Charles River <i>Laboratories</i> , Inc.)

### 2.1.4.3 Bakterienstämme

Die verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme (Agilent *Technologies*, Inc.) (Tabelle 1) XL10Gold® bzw. SCS 110 für unmethylierte Plasmid-DNA dienten zur Expression von Plasmid-DNA in Mammaliazellen. Die *E. coli*-Stämme BL21-CodonPlus®(DE3)-RIPL und Rosetta™(DE3)pLysS dienten zur Expression von GST und Polyhistidin-Thioredoxin (His-Trx)-Fusionsproteinen in Bakterien.

**Tabelle 1:** Verwendete *E. coli*-Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp
XL10Gold <sup>®</sup>	Tet <sup>r</sup> Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]
BL21-CodonPlus <sup>®</sup> (DE3)-RIPL	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i> [ <i>argU proL</i> Cam <sup>r</sup> ] [ <i>argU ileY leuW</i> Strep/Spec <sup>r</sup> ]
Rosetta <sup>™</sup> (DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm λ</i> (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) pLysSRARE (Cam <sup>r</sup> )
SCS 110	<i>rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)</i> [F' <i>traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15</i> ]

## 2.1.5 Vektorplasmide & Expressionskonstrukte

**Tabelle 2:** Verwendete Vektorplasmide.

Vektor	Verwendung	Firma/Referenz
pBluescript II SK (+)	Mev (Kloniervektor)	Agilent <i>Technologies</i> , Inc.
pcDNA <sup>™</sup> 3.1/His C	Mev (Xpress <sup>™</sup> - <i>Tag</i> )	Invitrogen GmbH
pCMV- <i>Tag2</i>	Mev (FLAG- <i>Tag</i> )	Agilent <i>Technologies</i> , Inc.
pCMV- <i>Tag2</i> -mCherry	Mev (FLAG-mCherry- <i>Tag</i> )	SCHNEIDER et al. (2014)
pCMV- <i>Tag2</i> -Mito-mCherry	Mev (Mito-FLAG-mCherry- <i>Tag</i> )	SCHNEIDER et al. (2014)
pEGFP-C/-N	Mev (GFP- <i>Tag</i> )	Clontech <i>Laboratories</i> Inc.
pEGFP-cw	Mev (GFP- <i>Tag</i> )	Wilko Altrock, LIN Magdeburg
pET32	Bev (His-Trx- <i>Tag</i> )	Novagen <sup>®</sup> Merck KGaA
pGAT2	Bev (GST- <i>Tag</i> )	KESSELS et al. (2000)
pGEX	Bev (GST- <i>Tag</i> )	GE <i>Healthcare</i>
pMCherry-F	Mev (PM-mCherry)	Martin Korte, Technische Universität Braunschweig
pRNAT-H1.1/GFP	siRNA Expressionsvektor	GenScript USA Inc.
pRNAT-H1.1/PM-mCherry	siRNA Expressionsvektor	Institut für Biochemie I, UKJ
pRNAT-U6.1/GFP	siRNA Expressionsvektor	GenScript USA Inc.
pRNAT-U6.1/PM-mCherry	siRNA Expressionsvektor	Institut für Biochemie I, UKJ

Bev, Bakterienexpressionsvektor; GFP, Grünfluoreszierendes Protein; LIN, Leibniz-Institut für Neurobiologie; Mev, Mammaliaexpressionsvektor; Mito, Mitochondrienmembran; PM, Plasmamembran; UKJ, Universitätsklinikum Jena.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DNA-Expressionskonstrukte sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 und die verwendeten siRNA-Expressionskonstrukte sind in Tabelle 5 aufgelistet. Angaben für verwendete ProSAP1- (GI:51921383), ProSAP2- (GI:11067399), Shank1- (GI:77627981) und Syndapin I-Konstrukte (GI:4324452) beziehen sich auf Sequenzen kodierend für Proteine der Ratte (*Rattus norvegicus*), verwendete Cobl- (GI:162135965) und Abp1-Konstrukte (GI:7304993) beziehen sich auf Sequenzen kodierend für Proteine der Maus (*Mus musculus*). Die DNA-Expressionskonstrukte GFP-ProSAP1 und GFP-ProSAP2 sind von Tobias Böckers (Universität Ulm), GFP-Shank1 von Carlo Sala (*Institute of Neuroscience*, Mailand) bezogen worden. Eine RNAi-insensitive Syndapin I-Mutante (Syndapin I<sup>res</sup>) enthält mehrere stille Mutationen in den Nukleotiden 297-317 (ab Startkodon) von

GAACAGCCTACTGAACGAGGA zu GAATTCATTGTAAATGAAGA. Die ProSAP1-Mutante (ProSAP1<sup>\*</sup>) enthält Mutationen der Aminosäuren 141-151 von RKKAPPPPKRA zu GAGAAAAAAGA. Kurze Peptid-kodierende Plus- und Minus-DNA-Einzelstränge wurden mittels Oligonukleotidhybridisierung über entsprechend gewählte Restriktionsschnittstellen inkloniert. Selbsterstellte Konstrukte sind entsprechend gekennzeichnet (\*\*\*) und dazu für Polymerasekettenreaktionen (PCR) bzw. Oligonukleotidhybridisierungen verwendete Primer in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 3:** Verwendete DNA-Konstrukte zur Transfektion von Mammalia-Zellen.

Konstrukt	AS	Schnittstellen	Vektor	Laborcode
<b>ProSAP-Konstrukte</b>				
FLAG-ProSAP1	1-1252	BamHI/BamHI	pCMV2b	FTM3 <sup>***</sup>
FLAG-ProSAP1 <sup>*</sup>	1-1252	BamHI/BamHI	pCMV2c	FZX4 <sup>***</sup>
GFP-ProSAP1	1-1252	BamHI/KpnI	pEGFP-C1	e340
GFP-ProSAP1 <sup>*</sup>	1-1252	AflII/EcoRV	pEGFP-cw	CDW5
GFP-ProSAP1 1-235	1-235	SacI/HindIII	pEGFP-cw	BUQ2
GFP-ProSAP1 <sup>*</sup> 1-235	1-235	SacI/HindIII	pEGFP-cw	BXL5
GFP-ProSAP2	1-1740	EcoRI/EcoRI	pEGFP-C2	e206
GFP-Shank1	1-2167	PauI/EcoRI	pEGFP-C1	e419
<b>Syndapin I-Konstrukte</b>				
FLAG-mCherry-Sdp I SH3	376-441	BamHI/EcoRI	pCMV2b-mCherry	EYU3
FLAG-Sdp I	1-441	BamHI/EcoRI	pCMV2b	JM1
FLAG-Sdp I <sup>res</sup>	1-441	BamHI/HindIII	pCMV2b	CLB1
FLAG-mCherry-Sdp I <sup>res</sup>	1-441	BamHI/HindIII	pCMV2b-mCherry	FZW1 <sup>***</sup>
FLAG-Sdp I <sup>res</sup> ΔSH3	1-382	BamHI/BmgBI	pCMV2b	FWI2 <sup>***</sup>
FLAG-mCherry-Sdp I <sup>res</sup> ΔSH3	1-382	BamHI/XhoI	pCMV2b-mCherry	HLI1 <sup>***</sup>
FLAG-Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	1-441	BamHI/EcoRI	pCMV2b	EAV1
GFP-Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	1-441	BamHI-BglII/ EcoRI	pEGFP-C1	DZW1
FLAG-Sdp I <sup>res</sup> I122E/M123E	1-441	BamHI/EcoRI/ XhoI	pCMV2b	FWJ1 <sup>***</sup>
FLAG-mCherry-Sdp I <sup>res</sup> I122E/M123E	1-441	BamHI/XhoI	pCMV2b-mCherry	HLH1 <sup>***</sup>
GFP-Sdp I	1-441	BamHI/XbaI	pEGFP-C1	EI1
Mito-mCherry-Sdp I	1-441	BamHI/EcoRI	pCMV2b-Mito- mCherry	EJQ2
Mito-mCherry-Sdp I <sup>ΔSH3</sup>	1-382	BamHI/EcoRI	pCMV2c-Mito- mCherry	EJO1
Mito-mCherry-Sdp I <sup>P434L</sup>	1-441	BamHI/EcoRI	pCMV2b-Mito- mCherry	EJR1
Xpress-Sdp I	1-441	BamHI/EcoRI	pcDNA <sup>TM</sup> 3.1/HisC	DH1
Xpress-Sdp I <sup>ΔSH3</sup>	1-382	BamHI/EcoRI	pcDNA <sup>TM</sup> 3.1/HisC	DG3
<b>Kurze +++APPPP-Motiv-Konstrukte</b>				
FLAG-mCherry-Cobl 318-332	318-332	EcoRI/XhoI	pCMV2b-mCherry	FWK2 <sup>***</sup>
GFP-Cobl 318-332	318-332	EcoRI/BamHI	pEGFP-C2	FCH1
GFP-ProSAP1 139-152	139-153	EcoRI/SalI	pEGFP-C2	GNZ1 <sup>***</sup>
GFP-ProSAP2 671-685	671-685	EcoRI/SalI	pEGFP-C2	GOA1 <sup>***</sup>

AS, Aminosäure; Sdp, Syndapin.

**Tabelle 4:** Verwendete DNA-Konstrukte zur Überexpression in *E. coli*.

Konstrukt	AS	Schnittstellen	Vektor	Laborcode
GST-Abp1 SH3	371-433	BamHI/HindIII	pGAT2	CPH1
GST-Cobl 318-332	318-332	EcoRI/NheI-XhoI	pGEX-5X-1	FIV1
GST-ProSAP1 1-235	1-235	BamHI/XhoI-SalI	pGEX-4T-2	GHI1**
GST-ProSAP1* 1-235	1-235	BamHI/XhoI-SalI	pGEX-4T-2	GHJ1**
GST-ProSAP1 133-282	133-282	EcoRI/PstI	pGEX-5X-1	GQC1**
GST-ProSAP1 139-153	139-153	EcoRI/PstI	pGEX-5X-1	GQA1**
GST-ProSAP2 671-685	671-685	EcoRI/PstI	pGEX-5X-1	GQB1**
GST-Syndapin I	1-441	BamHI/EcoRI	pGEX-2T	BG2
GST-Syndapin I <sup>H122E/M123E</sup>	1-441	BamHI/EcoRI	pGEX-2T	DYM1
GST-Syndapin I SH3	378-441	EcoRI/SalI	pGEX-5X-1	ABG1
His-Trx-ProSAP1 1-235	1-235	SacI/HindIII	pET32a(+)	GHG2**
His-Trx-ProSAP1* 1-235	1-235	SacI/HindIII	pET32a(+)	GHH1**
His-Trx-Syndapin I	1-441	BamHI/EcoRI	pET32a(+)	ASU1
His-Trx-Syndapin I SH3	376-441	EcoRI/HindIII	pET32a(+)	ASZ1

Alle RNAi-Konstrukte wurden mittels Oligonukleotidhybridisierung über BamHI/HindIII-Schnittstellen in den pRNAT-H1.1 bzw. pRNAT-U6.1/GFP einkloniert, mit nachfolgendem Austausch des GFP durch plasmamembranständiges m*Cherry* (PM-mCherry) über Nhe/SmaI-Schnittstellen.

**Tabelle 5:** Verwendete RNAi-Konstrukte zur Transfektion von Mammalia-Zellen. pRNAT-Vektor in Klammern angegeben; Angaben der Nukleotide ab Startkodon.

Konstrukt	Nukleotide	Referenz	Laborcode
Arp3 RNAi (U6.1)	271-291	STEFFEN et al. (2006)	FGS2
N-WASP RNAi (U6.1)	432-453	YAMAGUCHI et al. (2005)	FGR1
ProSAP1 RNAi (H1.1)	3354-3372	BERKEL et al. (2012)	GHM4**
<i>scrambled</i> RNAi (H1.1)	-	NOLZE et al. (2013)	FRA1; FRR6
<i>scrambled</i> RNAi (U6.1)	-	PINYOL et al. (2007)	FGY3
Syndapin I RNAi (H1.1)	297-317	DHARMALINGAM et al. (2009)	BLO6; FGQ3

### 2.1.6 Primer

Für PCR und Oligonukleotidhybridisierung verwendete Oligonukleotide wurden von bio-mers.net GmbH bezogen und auf 100  $\mu$ M mit Aqua a.i. verdünnt.

**Tabelle 6:** Verwendete *Primer*. Schnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

<i>Primer</i>	Sequenz 5' → 3'	Schnittstellen	Verwendung
<b>Sequenzierprimer</b>			
Cas	gtttcaggttcaggggaggtg	-(rw)	pEGFP-C
Cs	catggtcctgctggagttcgtg	-	pEGFP-C
pGEX5'	gggctggcaagccacgtttggtg	-	pGEX
T3	gcaattaaccctcactaaagg	-	pCMV2
T7	taatacgaactcactataggg	-	pCMV2, pET32(+)
<b>Genotypisierungs-PCR-Primer</b>			
BQ497	aagggagtctggatgcaagg	-(rw)	<i>Syndapin I</i> <sup>+/+</sup>
BQ498	atctgaggagaccattcag	-	<i>Syndapin I</i> <sup>-/-</sup>
BQ502	agagatgttgagatgtgtac	-	<i>Syndapin I</i> <sup>+/+</sup>
BQ536	cggtagaattgacgaagttcc	-(rw)	<i>Syndapin I</i> <sup>-/-</sup>

rw, rückwärts.

**Tabelle 6:** (Fortsetzung) Verwendete *Primer*.

<i>Primer</i>	Sequenz 5'→3'	Schnittstellen	Verwendung
<b>PCR-Primer</b>			
BQ740	gcgaattcattgttaaatgaagacctggagaaaagtc	EcoRI	Syndapin I <sup>res</sup> 1-441
BQ741	cggaattcttcacctcctgtgag	EcoRI(rw)	Syndapin I <sup>res</sup> 1-441
BQ783	gtcctcagagtctatatagcctcaac	XhoI(rw)	Syndapin I 1-441
BQ1899	ccggaattcaatctagaccctgatgatacagcc	EcoRI	ProSAP1 133-282
BQ1900	acgcgtcgaccaagcttcgggtgaacttcagcat	SalI(rw)	ProSAP1 133-282
<b>Oligonukleotidhybridisierungspaare</b>			
BQ1518	aattcatgaagtcagacatgaagaagcgcagagcccc tcctcctccaagtctagctagc	EcoRI	Cobl 318-332
BQ1519	tcgagctagctagcacttgaggaggaggctctgc gcttcttcatgtctgacttcat	NheI,XhoI	Cobl 318-332
BQ1829	gatccccggaattgagcaaaagagattttcaagagaaa tctctttgctcaattcctttttgaaa	BamHI	ProSAP1 RNAi
BQ1830	agcttttcaaaaaggaattgagcaaaagagatttctctt gaaaatctctttgctcaattccggg	HindIII	ProSAP1 RNAi
BQ1895	aattcacagccagaaaagaaagctccccacctccaaa gcgggctccgaccg	EcoRI	ProSAP1 139-153
BQ1896	tgcacggtcggagcccgctttggaggtgggggagctt tctttctggctgtg	SalI	ProSAP1 139-153
BQ1897	aattcagtgctcggcgcagagccccaccacctccaaa gaggccccagcg	EcoRI	ProSAP2 671-685
BQ1898	tgcagctgggggcctcttgggaggtggtggggctc tgcccgagcactg	SalI	ProSAP2 671-685

### 2.1.7 Antikörper

Verwendete sekundäre Antikörper sind in Tabelle 7 aufgelistet und wurden in einer Verdünnung von 1:1.000 in der Immunfluoreszenzfärbung (IF) oder 1:700 (IF, neuronale Zellkulturen) bzw. 1:10.000 in der Westernblotdetektion (WB) eingesetzt. Verwendete primäre Antikörper sind in Tabelle 8 jeweils mit entsprechend in IF oder WB eingesetzter Verdünnung aufgelistet.

**Tabelle 7:** Verwendete sekundäre Antikörper.

Spezifität	Spezies	Verwendung	Firma
Kaninchen-AF488	Esel	IF	MP Invitrogen GmbH
Maus-AF488	Esel	IF	MP Invitrogen GmbH
Meerschweinchen-AF488	Ziege	IF	MP Invitrogen GmbH
Kaninchen-AF568	Ziege	IF	MP Invitrogen GmbH
Maus-AF568	Esel	IF	MP Invitrogen GmbH
Meerschweinchen-AF568	Ziege	IF	MP Invitrogen GmbH
Kaninchen-AF647	Ziege	IF	MP Invitrogen GmbH
Maus-AF647	Ziege	IF	MP Invitrogen GmbH
Meerschweinchen-AF647	Ziege	IF	MP Invitrogen GmbH
Kaninchen-AF680	Ziege	WB	MP Invitrogen GmbH
Maus-AF680	Ziege	WB	MP Invitrogen GmbH
Kaninchen-Dylight800	Ziege	WB	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
Maus-Dylight800	Ziege	WB	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
Meerschweinchen-IRDye680	Esel	WB	LI-COR <i>Bioscience</i> GmbH
Meerschweinchen-IRDye800CW	Esel	WB	LI-COR <i>Bioscience</i> GmbH

AF, Alexa Fluor<sup>®</sup>; MP, *Molecular Probes*<sup>®</sup>.

Tabelle 8: Verwendete primäre Antikörper.

Spezifität	Spezies	Verdünnung IF	Verdünnung WB	Firma/Referenz
Bassoon	Kaninchen	1:200	-	W. Altmann, LIN Magdeburg
FLAG	Maus Klon M2	1:500	1:500	Sigma-Aldrich® Co. LLC
FLAG	Kaninchen	1:100	1:500	Sigma-Aldrich® Co. LLC
GFP	Maus Klon B34	-	1:4.000	Covance Inc.
GFP	Maus Klon JL-8	-	1:8.000	Clontech <i>Laboratories</i> , Inc.
GFP	Kaninchen	-	1:2.000	Abcam® plc
GST	Kaninchen 2704 TB	-	1:1.000	QUALMANN et al. (1999)
GST	Meerschweinchen BE6	-	1:1.000	BRAUN et al. (2005)
His-Trx	Meerschweinchen	-	1:1.000	HAAG et al. (2012)
MAP2	Maus Klon HM-2	1:500	-	Sigma-Aldrich® Co. LLC
MAP2	Kaninchen	1:500	-	Abcam® plc
c-myc	Maus Klon 9E10	1:500	-	Covance Inc.
ProSAP1	Kaninchen	-	1:500	Sigma-Aldrich® Co. LLC
ProSAP1	Kaninchen	1:250	-	T. Böckers, Universität Ulm
ProSAP1	Maus Klon N23B/6	1:250	1:1.000	Neuromab <i>Antibodies</i> Inc.
ProSAP1	Meerschweinchen	1:200	-	T. Böckers, Universität Ulm
ProSAP2	Kaninchen	1:250	-	T. Böckers, Universität Ulm
ProSAP2	Maus Klon N69/46	1:250	1:1.000	Neuromab <i>Antibodies</i> Inc.
ProSAP2	Meerschweinchen	1:200	-	T. Böckers, Universität Ulm
PSD-95	Maus Klon 6G6-1C9	1.250	-	Abcam® plc
Synapsin 1	Maus Klon 46.1	1:500	-	<i>Synaptic Systems</i> mbH
Syndapin I	Kaninchen 2704 TB	1:250	1:1.000	QUALMANN et al. (1999)
Syndapin I	Meerschweinchen BE6	1:100	1:2.500	BRAUN et al. (2005)
Xpress™	Maus	1:500	-	Novex® Invitrogen GmbH

MAP, Mikrotubuli-assoziiertes Protein.

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Assistent Pasteurpipetten, lange Form 230 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
Cellstar® Gewebekulturflasche (75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Polypropylenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Zellkultuplatten (6-well; 12-well; 24-well)	Greiner Bio-One GmbH
Deckgläser Stärke No.1 rechteckig (24×32 mm; 24×50 mm)	Gerhard Menzel GmbH
Deckgläser Stärke No.1 rund (12 mm-; 15 mm-; 18 mm-Durchmesser)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG; Gerhard Menzel GmbH
Einweg-Pasteurpipetten, graduiert	Carl Roth GmbH & Co. KG
Eppendorf Gefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	SARSTEDT AG & Co.
Eppendorf <i>Safe-Lock</i> ™ Gefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG
HistoBond® adhäsive Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Immobilon®-FL Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Merck KGaA Millipore
Multi® PCR-Tubes 0,2 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH
Pierce® <i>Disposable 10 ml Polypropylene Columns</i>	Thermo Fisher <i>Scientific</i> Inc.
Pipettenspitzen (2-200 µl; 50-1.000 µl)	Brand, GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen (0,1-10 µl)	STARLAB GmbH
ZelluTrans/Roth Dialysiermembranen T2 (Flachbreite 25 mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG

### 2.1.9 Geräte & Software

BioPhotometer	Eppendorf AG
Geldryer 583	Bio-Rad <i>Laboratories</i> GmbH

Magnetrührer MR Hei-Mix L  
 Mastercycler<sup>®</sup> ep *gradient* S  
 Milli-Q<sup>®</sup> *Gradient*-Reinstwasser System  
*See-saw rocker* SSL4  
 Thermomixer *compact*  
 Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD 70  
 Ultra-Turrax<sup>®</sup> T8-S8N5G  
 Vortex-Genie<sup>®</sup> 2

### Gelelektrophorese & Westernblot

Agarose-Gelelektrophoresekammern  
 Consort EV265 *Power Supply*  
 Criterion<sup>™</sup> Blotter  
 Intas<sup>®</sup> Gel-Imager  
 Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra *Cell*  
 Odyssey<sup>®</sup> Gel-Imager  
 PowerPac<sup>™</sup> HC *Power Supply*

### Inkubatoren & Brutschränke

C150  
 GFL *Orbital Shaking* Inkubator 3032  
 HeraCell 240(i)CO<sub>2</sub> Inkubator  
 Incu-line Inkubator<sup>®</sup>

### Mikroskope

Leica TCS SP5  
 Objektive 63×/1,4 Öl; 40×/0,75 Luft  
 Zeiss AxioObserver.Z1 (mit ApoTome)  
 Objektive 63×/1,4 Öl; 40×/1,3 Öl  
 Kamera AxioCam MRm *Charge-coupled device*  
 Quecksilberdampflampe HXP 120

### Mikrotome

Kryostat Leica CM3050S  
 Schlittenmikrotom Leica SM2010R

### Sicherheitswerkbänke

Biowizard *Golden Line*  
 Cleanwizard KH-170  
 HeraSafe HS  
 LaminAir<sup>®</sup> HB2472  
 LaminAir<sup>®</sup> HVR 2448

### Software

Adobe Photoshop CS3  
 AxioVision Rel. 4.8.2  
 GraphPad Prism 5.03  
 ImageJ 1.46r  
 Imaris 7.6  
 LAS AF 3

### Zentrifugen

Heraeus<sup>®</sup> Multifuge<sup>®</sup> 3SR+  
 Rotor F13-14×50C  
 Tischzentrifuge 5417R  
 Rotor F45-30-11  
 Optima<sup>®</sup> L-70 Ultrazentrifuge  
 Rotor SW 28  
 Optima<sup>®</sup> Max-XP Ultrazentrifuge  
 Rotor TLA110; TLS55

Heidolph *Instruments* GmbH  
 Eppendorf AG  
 Merck KGaA Millipore  
 Stuart<sup>®</sup> Bibby *Scientific*  
 Eppendorf AG  
 Bandelin *electronic* GmbH & Co. KG  
 Ika<sup>®</sup> GmbH & Co. KG  
 Carl Roth GmbH & Co. KG

Werkstatt, UKJ  
 Consort bvba  
 Bio-Rad *Laboratories* GmbH  
 INTAS *Science Imaging Instruments* GmbH  
 Bio-Rad *Laboratories* GmbH  
 LI-COR *Biosciences* GmbH  
 Bio-Rad *Laboratories* GmbH

Binder GmbH  
 GFL mbH  
 Thermo Fisher *Scientific* Inc.  
 VWR *International* GmbH

Leica *Microsystems*  
 Leica *Microsystems*  
 Carl Zeiss *Microscopy* GmbH  
 Carl Zeiss *Microscopy* GmbH  
 Carl Zeiss *Microscopy* GmbH  
 Leistungselektronik JENA GmbH

Leica *Biosystems*  
 Leica *Biosystems*

KOJAIR Tech OY  
 KOJAIR Tech OY  
 Thermo Fisher *Scientific* Inc.  
 Thermo Fisher *Scientific* Inc.  
 Thermo Fisher *Scientific* Inc.

Adobe *Systems*, Inc.  
 Carl Zeiss *Microscopy* GmbH  
 GraphPad *Software*, Inc  
*National Institutes of Health*  
 BITPLANE AG  
 Leica *Microsystems*

Thermo Fisher *Scientific* Inc.

Eppendorf AG

Beckman Coulter GmbH

Beckman Coulter GmbH

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die hier beschriebenen molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach *Molecular cloning* (SAMBROOK et al., 1989) durchgeführt.

#### 2.2.1.1 Herstellung hitzeschockkompetenter *E. coli*

***E. coli* XL10Gold<sup>®</sup>** Zur Herstellung wurden 100 µl hitzeschockkompetente *E. coli* XL10Gold<sup>®</sup> auf Tetracyclin- und Chloramphenicol-enthaltenden LB-Agar-Platten ausgestrichen, über Nacht (ÜN) im Brutschrank inkubiert und anschließend 25 ml Tetracyclin- und Chloramphenicol-enthaltendes 2×YT-Medium mit Einzelkolonien angeimpft. Diese Vorkultur inkubierte bei 37°C und 200 min<sup>-1</sup> im Brutschrank ÜN und anschließend wurden 5 ml Vorkultur zum Animpfen einer 500 ml 2×YT-Medium Kultur genutzt, welche Chloramphenicol, 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2% (w/v) Glucose enthielt. Die Kultur wurde für 20-24 h bei 18°C und 200 min<sup>-1</sup> inkubiert, bis sie eine Optische Dichte (OD) gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,5-0,6 erreichte. Nachfolgend wurde die Kultur für 10 min auf Eis unter leichtem Schwenken abgekühlt, für 15 min bei 1.000 ×g und 4°C zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstands wurde das Sediment in 60 ml eiskaltem Kompetenzpuffer resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 10 min bei 1.000 ×g und 4°C sedimentiert und anschließend nach Verwerfen des Überstands in 40 ml eiskaltem Kompetenzpuffer resuspendiert. Die entstandene Bakteriensuspension wurde mit Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer finalen Konzentration von 7% (v/v) unter leichtem Schwenken versetzt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Abschließend erfolgte die Portionierung der Bakteriensuspension in 100 µl-Aliquots, welche in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert wurden.

***E. coli* SCS 110, Rosetta<sup>™</sup>(DE3)pLysS & BL21-CodonPlus<sup>®</sup>(DE3)-RIPL** Zur Herstellung wurde ein Bakterien-Aliquot auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, ÜN im Brutschrank inkubiert und eine Einzelkolonie zum Animpfen von einer 50 ml LB-Medium Vorkultur benutzt. Nach ÜN-Inkubation der Vorkultur bei 37°C und 250 min<sup>-1</sup> wurden 10 ml Vorkultur in 500 ml LB-Medium Kultur inokuliert und diese weitere 2-3 h bei 37°C und 250 min<sup>-1</sup> bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 inkubiert. Anschließend kühlte die Kultur für 10 min auf Eis ab und es folgte eine Zentrifugation für 7 min bei 2.000 ×g und 4°C. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Bakteriensediment in 80 ml CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert und erneut für 5 min bei 1.000 ×g und 4°C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt. Abschließend erfolgte die Resuspension des Bakteriensediments in 16 ml CaCl<sub>2</sub>-Puffer und die Portionierung auf Trockeneis in 100 µl- bzw. 250 µl-Aliquots, welche bis zur Verwendung bei -80°C gelagert wurden.

### 2.2.1.2 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Die Transformation verschiedener *E. coli*-Stämme erfolgte mittels 45 s 42°C-Hitzeschock von 100 µl kompetenten Bakterien, welche mit 2 µl Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz für 1 min bei 4°C vorinkubiert wurden. Anschließend kühlte der Ansatz für 1 min auf Eis ab und inkubierte nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium für 1 h bei 37°C und 850 min<sup>-1</sup>. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 3 min bei 4.000 × *g* und Raumtemperatur (RT) sedimentiert und nachfolgend in 100 µl des Überstands resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.1.3 Minipräparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

Die Präparation von Plasmid-DNA für molekularbiologische Methoden erfolgte mittels alkalischer Lyse im kleinen Maßstab (Minipräparation) unter Verwendung von 2 ml einer *E. coli* XL10Gold™ oder *E. coli* SCS 110 ÜN-Kultur in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum. Nach Zentrifugation der Kultur für 5 min bei 3.800 × *g* und RT wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Nachfolgend erfolgte die alkalische Lyse durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 und mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes. Danach schloss sich die Neutralisation durch Zugabe von 250 µl Puffer P3, erneut mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes und eine zehnmünütige Inkubation bei 4°C an. Anschließend folgte die Abzentrifugation des gefällten Proteins und genomischer DNA für 10 min bei 20.800 × *g* und 4°C, woraufhin 550 µl des die Plasmid-DNA enthaltenden Überstands in ein neues Reaktionsgefäß übertragen wurde. Durch Zugabe von 375 µl 100% (v/v) Isopropanol erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA, welche durch Zentrifugation für 10 min bei 20.800 × *g* und 4°C sedimentiert wurde. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Sediment mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 20.800 × *g* und 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das DNA-Sediment luftgetrocknet und anschließend in 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) gelöst.

### 2.2.1.4 Mini-, Midi- & Maxipräparation von Plasmid-DNA mittels Kit-Systemen

Zur transienten Zelltransfektion benötigte Plasmid-DNA höheren Reinheitsgrades wurde im kleinen Maßstab (Minipräparation) mittels NucleoSpin® Plasmid-Kit, im größeren Maßstab (Midipräparation) mittels NucleoBond® Xtra Midi- bzw. Qiagen® Plasmid Midi-Kit und im großen Maßstab (Maxipräparation) mittels Qiagen® Plasmid Maxi-Kit nach Anleitung des jeweiligen Herstellers hergestellt. Es erfolgte die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus *E. coli* XL10Gold®-ÜN-Kulturen. Diese wurden je nach Größenmaßstab in 2 ml, 100 ml oder 500 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angesetzt. Gebundene Plasmid-DNA wurde von den Säulen mit 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) für Minipräparationen bzw. mit 100 µl Aqua a.i. für Midi- und 250 µl Aqua a.i. für Maxipräparationen eluiert.

### 2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit doppelsträngiger DNA erfolgte photospektrometrisch durch Messen der Extinktionen bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Plasmid-DNA-Lösungen wurden dazu im Verhältnis 1:50 mit Aqua a.i. verdünnt und gegen eine Aqua a.i.-Referenz gemessen. Die Reinheit der DNA-Lösung errechnete sich aus dem Quotienten der Absorption<sub>260 nm</sub>/Absorption<sub>280 nm</sub>. Dabei zeichnet eine sehr reine Probe ein Quotient zwischen 1,75 bis 1,95 aus, wohingegen ein Quotient unter 1,75 auf Protein- und Phenolrestverunreinigungen hindeutet.

### 2.2.1.6 PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels PCR unter Verwendung spezifischer Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Tabelle 6) und entsprechend gewählter Matrizen-DNA. Ein 25 µl PCR-Ansatz enthielt 250-500 ng Matrizen-DNA, jeweils 0,5 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, jeweils 200 µM Desoxynucleosidtriphosphate, 3% (v/v) DMSO, 1× Phusion<sup>®</sup> *High Fidelity* Reaktionspuffer und 0,5 Einheiten Phusion<sup>®</sup>-DNA-Polymerase. PCR-Reaktionen liefen im Thermozykler nach dem Schema in Tabelle 9 ab. Die Hybridisierungstemperatur (\*) wurde nach Abhängigkeit der gewählten Primerkombination variiert. Die Variation der Elongationszeit (\*\*) erfolgte nach Abhängigkeit der entsprechenden PCR-Produktlänge. Zur Überprüfung der korrekten Länge und Qualität des PCR-Produkts schloss sich die Auftrennung des PCR-Ansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese an.

**Tabelle 9:** PCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Dauer
1) Initiale Denaturierung	98°C	2 min
2) Denaturierung	98°C	15 s
3) Hybridisierung	65°C*	30 s
4) Elongation	72°C	1 min**
5) Finale Elongation	72°C	2 min

29× Wiederholung der Schritte 2-4

### 2.2.1.7 Genotypisierung von Syndapin I-Mäusen

Syndapin I-Mäuse wurden vor Verwendung von Michaela Vogel, Institut für Biochemie I, UKJ, auf den Genotyp hin überprüft. Diese Methode wird genauer im Anhang A beschrieben.

### 2.2.1.8 Restriktionsverdau & Dephosphorylierung von DNA

Für präparative oder analytische Zwecke erfolgte die gezielte Spaltung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten mithilfe von sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen. Ein 20 µl Reaktionsansatz enthielt 5-10 µg DNA, 5 Einheiten Restriktionsendonuklease, 1-2× Reaktionspuffer (je nach Restriktionsenzym) und optional 1 µg/µl BSA. Zum Restriktionsverdau von PCR-Produkten wurden diese vorher über Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und der gesamte

Gelextrakt von 50  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Der eingesetzte Reaktionspuffer und die Inkubationstemperatur als auch -dauer (meist 2-4 h) variierte nach eingesetzten Restriktionsendonukleasen und den entsprechenden Herstellerempfehlungen. Zur Überprüfung der korrekten Länge und Qualität der erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte die Auftrennung des Reaktionsansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese mit gegebenenfalls anschließender Gelextraktion geeigneter DNA-Fragmente.

Zur Dephosphorylierung linearisierter Vektorplasmide inkubierten entsprechende Reaktionsansätze im Anschluss an den Restriktionsverdau mit 1 Einheit alkalischer Phosphatase FastAP™ für 30 min bis 1 h bei 37°C.

Zum sequentiellen Restriktionverdau von DNA in verschiedenen Reaktionspuffer wurde die DNA nach dem ersten Restriktionsverdau gefällt. Dazu erfolgte die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  100% (v/v) Isopropanol zu einem 20  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatzes und eine Zentrifugation für 10 min bei 20.8000  $\times g$  und RT. Nach Verwerfen des Überstands wurde das DNA-Sediment durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  70% (v/v) Ethanol und Zentrifugation für 10 min bei 20.800  $\times g$  und RT gewaschen. Anschließend wurde der Überstand vollständig abgenommen und das DNA-Sediment luftgetrocknet. Die Resuspension des DNA-Sediments erfolgte in 20  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl (pH 8,0).

#### 2.2.1.9 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Agarosegelelektrophorese erfolgte zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten einer Größe von 250-2000 Basenpaaren (bp) auf horizontalen 1% (w/v) Agarosegelen in 1 $\times$  TAE. Für kleinere DNA-Fragmente unter 250 bp wurden 2% (w/v) und für größere DNA-Fragmente über 2000 bp horizontale 0,8% (w/v) Agarosegele in 1 $\times$  TAE verwendet. Gelelektrophorese von DNA-Proben in final 1 $\times$  DNA-Probenpuffer erfolgte bei einer Spannung von 100 V in 1 $\times$  TAE als Laufpuffer. Der Nachweis der DNA-Fragmente unter Ultraviolett-Licht erfolgte über den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, welcher den Agarosegelen vor Erhärten in einer finalen Konzentration von 0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zugegeben wurde. Zum Größenvergleich der DNA-Fragmente wurde bei jeder Gelelektrophorese entsprechend den erwarteten Fragmentgrößen ein 1 kb bzw. 100 bp DNA-Größenstandard mitgeführt.

#### 2.2.1.10 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach Ausschneiden entsprechender Banden aus dem Gel erfolgte mittels NucleoSpin® *Gel and PCR Clean-up*-Kit nach Angaben des Herstellers. Zum Lösen der Gelstücke erfolgte die Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  NTI-Puffer (vom Kit bereitgestellt) und Inkubation für 30 min bei 50°C und 850  $\text{min}^{-1}$ . Gebundene und gewaschene DNA wurde mit 50  $\mu\text{l}$  70°C warmem 5 mM Tris-HCl (pH 8,5) für 10 min inkubiert und anschließend durch Zentrifugation für 1 min bei 11.000  $\times g$  eluiert.

### 2.2.1.11 Oligonukleotidhybridisierung

Die Generierung sehr kurzer doppelsträngiger DNA-Fragmente (40-50 bp) erfolgte mittels Hybridisierung zweier komplementärer Oligonukleotid-Stränge, welche mit bestimmten Restriktionsschnittstellen an ihren 5'- bzw. 3'-Enden synthetisiert worden waren. Zur Hybridisierung wurden final je 1  $\mu\text{M}$  Oligonukleotid in 1 $\times$  Hybridisierungspuffer in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem Thermozykler durchgeführt, wobei zunächst eine Denaturierung bei 90°C für 4 min erfolgte, dann die Hybridisierung für 10 min bei 70°C und anschließend ein schrittweises Abkühlen um 0,3°C/s auf 4°C. Die hybridisierte DNA wurde durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Isopropanol, kurzes Vortexen und Inkubation für 10-15 min bei RT gefällt und anschließend für 3 min bei 20.800  $\times g$  sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Sediment mit 400  $\mu\text{l}$  70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 3 min bei 20.800  $\times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Sediment luftgetrocknet und im Anschluß in 20  $\mu\text{l}$  Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. Vor Ligation der hybridisierten Oligonukleotide mit linearisiertem Vektorplasmid war eine Phosphorylierung der 5'- und 3'- Oligonukleotidenden notwendig. Diese erfolgte durch Zugabe von 5 Einheiten T4-Polynukleotid-Kinase in 1 $\times$  T4-DNA-Ligasepuffer in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  und anschließende Inkubation für 30 min bei 37°C. Nach Inaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65°C wurde der Reaktionsansatz erneut schrittweise um 0,3°C/s auf 4°C abgekühlt.

### 2.2.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen von linearisiertem Vektor mit einem oder mehreren DNA-Fragmenten erfolgte im Verhältnis 1:6-1:7 unter Verwendung von 500 Einheiten T4-DNA-Ligase und optional 2  $\mu\text{l}$  50% (w/v) Polyethylenglykol 4000 in 1 $\times$  T4-DNA-Ligationspuffer in einem 20  $\mu\text{l}$  Ansatz, welcher für 2 h bei RT oder 16 h bei 16°C inkubiert wurde. Anschließend folgte die Transformation von *E. coli* mit 10  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes mittels Hitzeschock.

### 2.2.1.13 Sequenzierung von DNA

Die Überprüfung der korrekten Basensequenz mittels PCR- oder Oligonukleotidhybridisierung-generierter DNA-Konstrukte erfolgte durch DNA-Sequenzierung. Dazu wurden zu 5  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA 2  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  Primerverdünnung zugegeben und der Ansatz an die Firma SEQLAB *Sequence Laboratories* Göttingen GmbH versendet, welche die Sequenzierreaktionen durchgeführt hatten.

## 2.2.2 Zellkultur-Methoden

### 2.2.2.1 Kultivierung nicht-neuronaler Zelllinien

Die Kultivierung nicht-neuronaler Zellen erfolgte in 75  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen in 10 ml DMEM<sup>++</sup> bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> im Zellinkubator. Die Zellpassage wurde alle drei bis vier Tage durchgeführt, wobei die Zellen nach dem Waschen mit 5 ml HBSS durch Zugabe von 1 ml 1 $\times$  Trypsin-EDTA vereinzelt und im Verhältnis 1:10 mit

10 ml frischem DMEM<sup>++</sup> verdünnt ausgesät wurden. Für die transiente Transfektion von HEK293-Zellen wurden die Zellen am Vortag der Transfektion in 6-*well*-Platten in einem Verdünnungsverhältnis von 1:3 mit 1,5 ml Zellsuspension je Vertiefung ausgesät. Im Falle der transienten Transfektion von COS7-Zellen erfolgte die Passage in einem Verdünnungsverhältnis von 1:6 - 1:10 je nach Zellkulturdichte auf Poly-D-Lysin-beschichtete Deckgläschen mit 0,5 ml bzw. 1 ml Zellsuspension je Vertiefung einer 12- oder 24-*well*-Platte. Poly-D-Lysin-Beschichtung von 15 mm bzw. 12 mm-Durchmesser Deckgläschen erfolgte im Vorfeld durch Zugabe von 1 ml bzw. 0,5 ml Poly-D-Lysin je Vertiefung einer 12- bzw. 24-*well*-Platte, 30 min Inkubation bei RT und nachfolgend dreimaligem Waschen mit 0,5 ml bzw. 1 ml HBSS.

#### 2.2.2.2 Herstellung & Kultivierung primärer Neuronenkulturen

**Rattenneuronenkulturen** Primäre hippocampale Rattenneurone wurden von Annett Kreuzsch and Christin Scharf (Institut für Biochemie I, UKJ) nach BANKER und COWAN (1977) und BREWER et al. (1993) präpariert und kultiviert. Eine ausführliche Beschreibung der Methode befindet sich im Anhang A.

**Mausneuronenkulturen** Primäre hippocampale Mausneurone wurden von Dr. Nicole Koch und Michaela Öhler (Institut für Biochemie I, UKJ) präpariert und kultiviert. Die ausführliche Beschreibung dieser Methode befindet sich im Anhang A.

#### 2.2.2.3 Transiente Transfektion nicht-neuronaler Zelllinien

Nicht-neuronale Zellen wurden einen Tag nach der Passage mittels TurboFect Transfektionsreagenz transient transfiziert. Dazu wurde entsprechend verwendeter 6-, 12-, oder 24-*well*-Platte 3 µg, 2 µg bzw. 1 µg Plasmid-DNA je Vertiefung eingesetzt, diese mit 2 µl/µg DNA Transfektionsreagenz und 100 µl Opti-MEM<sup>TM</sup> versetzt und der Ansatz für 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe zum Zellmedium erfolgte eine Inkubation der Zellen für 4 h bei 37°C im Brutschrank. Im Anschluß wurde das Medium durch frisches DMEM<sup>++</sup> ersetzt und die Zellen entsprechend des Expressionsniveaus weitere 24 h bzw. 48 h im Brutschrank inkubiert, bevor sie in proteinbiochemischen oder immunzytochemischen Methoden verwendet wurden.

#### 2.2.2.4 Transiente Transfektion neuronaler Kulturen

Die transiente Transfektion neuronaler Kulturen erfolgte am 12. Tag der Zellkultivierung mittels Calciumphosphat. Dazu wurde vor Transfektionsbeginn das Zellkulturmedium abgenommen, für die spätere Inkubation aufbewahrt und durch 670 µl Neurobasal ohne Zusätze ersetzt. Für einen Transfektionsansatz wurden 1,3 µg DNA mit 2,5 µl 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und 20 µl Aqua a.i. je Vertiefung vermischt und durch Vortexen auf geringster Stufe mit 20 µl 2× HBS-Puffer versetzt. Nach zwanzigminütiger, lichtgeschützter Inkubation bei RT wurden je Vertiefung 40 µl des Transfektionsansatzes tropfenweise dem Zellmedium hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Zellmedium durch 1,4 ml frisches Neurobasal ohne Zusätze ersetzt, zweimal 1 ml davon abgenommen und wieder durch frisches

Neurobasal ersetzt. Anschließend wurde das Zellmedium abgenommen und 500 µl des aufbewahrten Ausgangsmediums versetzt mit 1× Penicillin/Streptomycin zugegeben. Die Zellen wurden nach zweitägiger Kultivierung fixiert und für die Immunzytochemie vorbereitet.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 Überexpression & Aufreinigung von GST- & His-Trx-Fusionsproteinen

**Überexpression** Zur Präparation von GST- und His-Trx-Fusionsproteinen erfolgte die Hitzeschocktransformation entsprechender Plasmid-DNA in *E. coli*-Bakterien der Stämme Rosetta™(DE3)pLysS bzw. BL21-CodonPlus®(DE3)-RIPL, um eine 100 ml Vorkultur aus LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum anzupflanzen. Diese inkubierte anschließend ÜN bei 37°C und 200 min<sup>-1</sup> und wurde zum Animpfen einer Kultur aus 1 l 2×YT-Medium (für GST-Fusionsproteine) bzw. TB-Medium (für His-Trx-Fusionsproteine) jeweils mit entsprechendem Antibiotikum genutzt. Die Kultur inkubierte bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bei 37°C und 200 min<sup>-1</sup>, woraufhin die Überexpression des Fusionsproteins durch Zugabe des unphysiologischen Induktors Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid in einer finalen Konzentration von 0,5 mM induziert wurde. Nach weiteren 4 h Inkubation bei 37°C und 200 min<sup>-1</sup> erfolgte die Sedimentation der Bakterien für 10 min bei 2.000 ×g und 4°C.

**Aufreinigung** Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt, soweit nicht anders vermerkt. Das Bakteriensediment wurde in 25 ml PBS (immer für GST-Fusionsproteine) bzw. His-Extraktionspuffer (immer für His-Trx-Fusionsproteine) versetzt mit 1× PIC resuspendiert und ÜN bei -80°C durchgefroren. Vor dem Bakterienaufschluss wurde die aufgetaute Bakteriensuspension mit etwa 100 mg Lysozym und im Falle von GST-Fusionsprotein mit final 1 mM Dithiothreitol versetzt. Der Bakterienaufschluss erfolgte mittels zweimaliger fünfminütiger Ultraschallhomogenisierung und anschließender Inkubation für 30 min rotierend in 50 ml PBS bzw. His-Extraktionspuffer mit final 1× PIC, 1% (v/v) Triton® X-100, 0,04 mg/ml DNase I und 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Nach Zentrifugation für 10 min bei 12.000 ×g wurde das Zellysats von sedimentierten, unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt und zu 1,5 ml Matrix (*High-Affinity* GST-Resin für GST-Fusionsproteine bzw. Talon™*Superflow*™*Metal Affinity* Resin für His-Trx-Fusionsproteine) zugegeben, welche vorher zweimal durch Zugabe von 40 ml PBS bzw. His-Extraktionspuffer, 2 min rotierender Inkubation und 2 min Zentrifugation bei 200 ×g gewaschen wurde. Nach 45 min Inkubation des Zellysats mit der Affinitätsmatrix auf dem Drehrad wurde gebundenes Fusionsprotein durch 5 min Zentrifugation bei 200 ×g vom ungebundenen Material abgetrennt. Anschließend wurde die Affinitätsmatrix dreimal durch Zugabe von 40 ml PBS bzw. His-Extraktionspuffer, 10 min rotierender Inkubation und 5 min Zentrifugation bei 200 ×g gewaschen. Die Matrix wurde in eine Durchflusssäule, welche vorher mit PBS bzw. His-Extraktionspuffer equilibriert wurde, eingebracht. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins von der Matrix erfolgte über 4-6-malige Zugabe von 500 µl GST-Elutionspuffer für GST-Fusionsproteine bzw. His-Elutionspuffer für His-Trx-Fusionsproteine, jeweils 10 min

Inkubation und Auffangen der Elutionsfraktionen. Nach einer Bradford-Proteinbestimmung der Elutionsfraktionen wurden ausreichend Protein-beihaltende Fraktionen vereinigt und ÜN gegen 2 l PBS (für GST- und His-Trx-Fusionsproteine) dialysiert. Im Anschluss erfolgte eine Bradford-Proteinbestimmung des Dialysats und eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit anschließender Coomassie-Färbung des Gels zur Überprüfung der Qualität des aufgereinigten Fusionsproteins.

### 2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts einer Probe erfolgte nach 1:100 Verdünnung in 150 mM NaCl in einem Volumen von 100 µl und Zugabe von 1 ml Bradford-Reagenz photospektrometrisch durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 595 nm. Dabei wird die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie-Brillantblau G-250 der Verschiebung der Extinktion von 495 nm nach 595 nm bei Proteinbindung genutzt (BRADFORD, 1976). Zur Eichung wurden Doppelbestimmungen einer 150 mM NaCl-Leerprobe und einer BSA-Standardreihe aus 1 µg, 2 µg, 4 µg und 6 µg (jeweils pro 100 µl 150 mM NaCl) mitgeführt.

### 2.2.3.3 Präparation von HEK293-Zellextrakten

Ein bzw. zwei Tage nach transientscher Zelltransfektion entsprechend des Expressionsniveaus erfolgte die Zellernte. Dazu wurden die Zellen je Vertiefung einer 6-well-Platte mit 1 ml PBS-CM gewaschen und nach Abnehmen des PBS-CM in einem Volumen von 0,5 ml PBS je 6-well-Platten-Vertiefung mit einem Zellschaber abgelöst. Pro Vertiefungen einer 6-well-Platte wurde mit 0,25-0,5 ml PBS nachgespült und diese Lösung mit der Zellsuspension vereinigt. Danach wurde für 5 min bei  $1.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und das Zellsediment in 265 µl Lysepuffer je 6-well-Platten-Vertiefung resuspendiert. Mit 10 s Ultraschallhomogenisation und anschließender Inkubation für 60 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  in Anwesenheit von 1% (v/v) Triton<sup>®</sup> X-100 auf dem Drehrad erfolgte der Zellaufschluss. Abschließend wurden unlösliche Zellbestandteile durch 20 min Zentrifugation bei  $20.800 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  vom Zelllysats abgetrennt, welches danach für Kopräzipitations- oder Proteinquervernetzungsanalysen eingesetzt wurde.

### 2.2.3.4 Präparation von Rattengehirnextrakten

Frisch präparierte oder in flüssigem Stickstoff schockgefrostete und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte Rattengehirne wurden gewogen, auf Eis mit dem Skalpell zerkleinert und mit dem dreifachen Volumen an eiskaltem Lysepuffer versetzt. Die mit einem Ultraturrax zweimal für 15 s bei Stufe 3 homogenisierte Suspension wurde mit final 1% (v/v) Triton<sup>®</sup> X-100 versetzt und für 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einem Drehrad inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei  $1.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  wurde die obere flüssige Phase „S1“ abgenommen und nach Zentrifugation der unteren beiden dichteren Phasen für 10 min bei  $3341 \times g$  mit dem gewonnenen Überstand „S2“ vereint und einer 45 min Ultrazentrifugation bei  $150.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  unterzogen. Der Proteingehalt des gewonnenen Überstands „S3“ wurde nach der Bradford-Methode ermittelt, S3-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das nach

der Ultrazentrifugation verbliebende Sediment „P3“ beinhaltete unlösliche Bestandteile der Zelle dar, welche mittels RIPA-Puffer, wie im folgenden beschrieben, extrahiert wurden. Rattengehirnextrakte wurden in Kopräzipitationsanalysen entweder als reiner S3 oder im 1:1,35 (w/w) Gemisch von S3 und P3-Extrakt eingesetzt.

**P3-Extraktion mittels RIPA-Puffer** Das P3-Sediment wurde in 1,5 ml RIPA-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C rotierend inkubiert, wobei nach 10 min Inkubation erneut resuspendiert wurde. Nach 45 min Ultrazentrifugation bei  $150.000 \times g$  und 4°C wurde der Überstand „P3-Extrakt“ abgenommen und nach Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.3.5 Kopräzipitationsanalyse mit GST- & His-Trx-Fusionsproteinen

Kopräzipitationsanalysen wurden entweder mit HEK293-Zellextrakten (heterolog), mit aufgereinigten His-Trx-Fusionsproteinen (direkt) oder mit Rattengehirnextrakten (endogen) und GST-Fusionsprotein, immobilisiert an GST-Matrix, durchgeführt. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Versuchsschritte auf 4°C durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz 50 µl einer 1:1 Suspension der Matrix in PBS zunächst dreimal durch Zugabe von 500 µl PBS, 5 min rotierender Inkubation und 1 min Zentrifugation bei  $11.000 \times g$  gewaschen. Pro Ansatz erfolgte die Immobilisation von 30 µg GST-Fusionsprotein an die Matrix in Gegenwart von 500 µl 5% (w/v) BSA in PBS durch Inkubation für 3 h auf einem Drehrad. Nach Abzentrifugation des ungebundenen Materials für 1 min bei  $11.000 \times g$  wurde zweimal mit 500 µl PBS und einmal mit 500 µl WP150 (für heterologe und endogene Kopräzipitationen) bzw. WP300 (für direkte Kopräzipitationen) durch jeweils 5 min rotierende Inkubation und 1 min Zentrifugation bei  $11.000 \times g$  gewaschen. Anschließend wurde zur gewaschenen Matrix entweder 220 µl Zellextrakt im Falle einer heterologen Kopräzipitation, 1-4 mg Rattengehirnextrakt in 250 µl WP150 mit  $1 \times$  PIC im Falle einer endogenen Kopräzipitation oder eine äquimolare Menge an His-Trx-Fusionsprotein in 250 µl WP300 mit  $1 \times$  PIC im Falle einer direkten Kopräzipitation zugegeben und für 3 h auf einem Drehrad inkubiert. Dabei wurde jeweils ein 90 µl Aliquot des eingesetzten Materials als analytische Probe „Startmaterial“/ „Lysat“ genommen. Nach Zentrifugation der Matrix für 1 min bei  $11.000 \times g$  wurde vom nicht sedimentierten Material ein 90 µl Aliquot „Überstand“ genommen. Nach dreimaligem Waschen durch die Zugabe von jeweils 500 µl WP150 bzw. WP300 (jeweils mit  $1 \times$  PIC), 5 min rotierender Inkubation und 1 min Zentrifugation bei  $11.000 \times g$  erfolgte die Elution der gebundenen Proteinkomplexe von der Matrix durch Zugabe von 30 µl GST-Elutionspuffer, 30 min Inkubation bei  $850 \text{ min}^{-1}$  und 5 min Zentrifugation bei  $16.000 \times g$  und RT. Eluierte Proteinkomplexe „Präzipitat“ wurden von der sedimentierten Matrix getrennt. Die Startmaterial-, Überstand- und Präzipitat-Proben wurden für 5 min bei 95°C in  $1 \times$  SDS-Probenpuffer inkubiert und bei -20°C gelagert. Anschließend erfolgte der Nachweis der eingesetzten Proteine und gebildeten Proteinkomplexe durch Analyse der Proben mittels SDS-PAGE mit 9,5% (v/v) Polyacrylamidgelen und Westernblotanalyse mit den entsprechenden Antikörpern.

**Kopräzipitationen für Liposomenbindungsanalysen** Die Gewinnung von Proteinkomplexen für Liposomenbindungsanalysen erfolgte über Kopräzipitation von GFP-Fusionsproteinen mit immobilisiertem GST-Fusionsprotein. Für die Herstellung der HEK293-Zellextrakte wurden dazu die Zellen einer 6-*well*-Platten-Vertiefung in 125  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert. Ein Kopräzipitationsansatz wurde mit 1,5 ml Zellextrakt und 100  $\mu$ g GST-Fusionsprotein, immobilisiert an 150  $\mu$ g Matrix in Gegenwart von 3 ml 5% (w/v) BSA in PBS, unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt und die Kopräzipitate in 100  $\mu$ l GST-Elutionspuffer eluiert.

#### 2.2.3.6 Protein-Quervernetzungsanalyse

Dazu wurden HEK293-Zellextrakte aus FLAG-Fusionsprotein-überexprimierenden bzw. FLAG-GFP-überexprimierenden Zellen hergestellt. Sedimentierte Zellen wurden in einem Volumen von 150  $\mu$ l Lysepuffer je 6-*well*-Platten-Vertiefung resuspendiert. Die Analyse der chemischen Vernetzung von Proteinen erfolgte durch Zugabe von 30  $\mu$ l EDC-Lösung in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe (0 mM, 2 mM, 5 mM, 15 mM, 20 mM, 50 mM in IP-Puffer100) zu je 20  $\mu$ l HEK293-Zellextrakt und anschließender Inkubation für 20 min bei RT. Nach Inkubation in 1 $\times$  SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C erfolgte die Analyse der Quervernetzung überexprimierter Fusionsproteine mittels SDS-PAGE auf 5-10% (v/v) Polyacrylamidgradientengelen und anschließender Westernblotanalyse mit anti-FLAG-Antikörpern.

#### 2.2.3.7 Liposomenbindungsanalyse

**Präparation von Liposomen** Zur Herstellung von Liposomen nach REEVES und DOWBEN (1969) wurden *Folch fraction* I-Lipide verwendet. Dazu wurden 160  $\mu$ l Lipide mit 530  $\mu$ l Chloroform und 10  $\mu$ l Methanol vermischt und auf dem Boden eines 2 l Erlenmeyerkolben verteilt. Durch Bedampfung mit Stickstoff (4°C) für 30 min wurde das Lösungsmittel verdunstet. Die anschließende Bedampfung mit Wasser-gesättigtem Stickstoff für 30 min fördert die Liposomenbildung. Die ÜN bei 37°C in 30 ml 1 $\times$  Zytosolpuffer abgelösten Phospholipide wurden für 1 h bei 33.734  $\times g$  und 28°C sedimentiert und in 500  $\mu$ l des Überstands resuspendiert. Bis zur Verwendung wurden die Lipide bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

**Liposomenflotation** Liposomenflotationsexperimente erfolgten durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation von Gemischen aus Liposomen und aufgereinigten GST-Fusionsproteinen bzw. eluierten GST-/GFP-Fusionsproteinkomplexen aus Kopräzipitationsanalysen. Zunächst wurde ein Ansatz aus 30  $\mu$ l Liposomen, 5  $\mu$ g Fusionsprotein bzw. 30  $\mu$ l Proteinkomplexe, 40  $\mu$ l 15,4% (w/v) Saccharoselösung (Lösung in 2 $\times$  Zytosolpuffer) hergestellt und auf 100  $\mu$ l mit 1 $\times$  Zytosolpuffer aufgefüllt (finale Saccharosekonzentration 6,16% (w/v)). Dieser wurde für 15 min bei 37°C und 800  $\text{min}^{-1}$  inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz mit 150  $\mu$ l 75% (w/v) Saccharoselösung (Lösung in 1 $\times$  Zytosolpuffer) gemischt, sodass eine 47,5% (w/v) Saccharoselösung entsteht, nachfolgend mit 200  $\mu$ l 35% (w/v) Saccharoselösung (Lösung in 1 $\times$  Zytosolpuffer) überschichtet und nochmals mit 200  $\mu$ l 1 $\times$  Zytosolpuffer überschichtet. Nach 30 min Ultrazentrifugation bei 200.000  $\times g$  und 28°C erfolgte die Entnahme von 100  $\mu$ l

Fraktionen, welche für 5 min bei 95°C in 1× SDS-Probenpuffer bzw. in 2× SDS-Probenpuffer und 4 M Harnstoff für Ethanol-präzipitierte Proben inkubierten. Eine Ethanolpräzipitation der Fraktionen fand im Falle der Analyse von GST-/GFP-Fusionsproteinkomplexen statt und wird im folgenden beschrieben. Im Anschluß wurden die Proben auf die Anwesenheit der GST- bzw- GFP-Fusionsproteine mittels SDS-PAGE mit 9,5% (v/v) Polyacrylamidgelen und Westernblotanalyse mit anti-GFP- und anti-GST-Antikörpern hin analysiert.

**Ethanolpräzipitation von Proteinproben** Die Fraktionen wurden jeweils im Verhältnis 1:1 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und mit 800 µl 99% (v/v) Ethanol (-20°C) versetzt und kurz durch Vortexen vermischt. Nach ÜN-Inkubation bei -20°C wurden die Proben bei 20.000 × g und 4°C für 30 min zentrifugiert und anschließend mit 1 ml 80% (v/v) Ethanol (-20°C) versetzt, erneut 5 min bei 20.000 × g zentrifugiert und das Sediment nach Verwerfen des Überstands luftgetrocknet.

### 2.2.3.8 SDS-PAGE

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels vertikaler Gelelektrophorese in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen nach LÄMMLI et al. (1970). Es wurden 9,5% (v/v) Polyacrylamid-Trenngele oder 5-10% (v/v) Polyacrylamid-Gradiententrenngele mit einem 5% (v/v) Polyacrylamid-Sammelgel in einer Dicke von 0,75 mm verwendet, deren Zusammensetzungen in Tabelle 14 (Anhang A) dargestellt sind. Aufzutrennende Proben wurden vor der SDS-PAGE in 1× SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Als Größenreferenz wurden je nach zu detektierenden Proteingrößen die *PageRuler*<sup>™</sup> Proteinleiter (10-170 kD) bzw. die *Spectra Multicolor High Range* Proteinleiter (40-300 kD) mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1× Tris-Glycin-Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 8 mA pro Gel und einer Grenzspannung von 300 V, bis die Bromphenolblau-Lauffront die untere Abgrenzung des Gels erreicht hatte. Nach Abschluß der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels Coomassie-Färbung oder immunspezifisch über Westernblotdetektion analysiert.

### 2.2.3.9 Westernblotanalyse mittels Fluoreszenzdetektion

**Westernblottransfer** Um Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen immunspezifisch zu detektieren, erfolgte ihr Transfer (RENART et al., 1979; TOWBIN et al., 1979) auf eine PVDF-Membran im *Tankblot*-Verfahren. Die PVDF-Membran wurde vor Gebrauch in Methanol kurz aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 4°C und einer angelegten Spannung von 100 V in Transferpuffer. Im Anschluß wurde die Membran dreimal in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bevor sie zur Westernblotanalyse mittels Fluoreszenzdetektion verwendet wurde.

**Westernblotdetektion** Um freie, unspezifische Bindungen zu blockieren wurden die PVDF-Membranen zunächst für 1 h bei RT in Blotto-PBS auf dem Wippschüttler inkubiert und im Anschluß dreimal für 10 min bei RT mit PBST auf dem Wippschüttler gewaschen. Verwendete Primärantikörper wurden entsprechend der Tabelle 8 in 5% (w/v) BSA und

0,025% (v/v) Natriumazid in PBST verdünnt und mit den Membranen ÜN bei 4°C rotierend inkubiert. Nach Abnahme der Primärantikörperverdünnung erfolgte dreimaliges Waschen für 10 min bei RT mit Blotto-PBST und anschließende lichtgeschützte Inkubation für 1 h bei RT mit Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern entsprechend der in Tabelle 7 aufgeführten Verdünnungen in Blotto-PBST mit 0,001% (w/v) SDS. Abschließend wurde lichtgeschützt jeweils für 10 min bei RT zweimal mit PBST und zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Membranen mit Hilfe des LI-COR ODYSSEY™ Systems analysiert wurden.

#### 2.2.3.10 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Der Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte über Anfärbung mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau G-250 in Coomassie-Färbelösung für 30 min bei RT auf einem Wippschüttler. Im Anschluß wurden die Gele für 1-2 h in Entfärbelösung bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert, bis die angefärbten Proteinbanden deutlich erkennbar waren. Nach Detektion der Gelbanden mittels eines Weißlicht-Transilluminators wurden die Gele zwischen gequollenem Cellophan gelegt und mittels Vakuumpumpe für 30 min getrocknet.

### 2.2.4 Zyto- & Histochemie

#### 2.2.4.1 Immunzytochemie

Für die Immunfärbung von Zellen wurden diese auf beschichteten Deckgläschen kultiviert und vor der Immunfärbung das Zellmedium verworfen. Alle weiteren Schritte erfolgten in einem Volumen von 500 µl für Vertiefungen einer 24-well-Platte bzw. 1 ml je Vertiefung einer 12-well-Platte lichtgeschützt bei RT soweit nicht anders vermerkt. Nicht-neuronale Zellen wurden für 10 min und primäre hippocampale Neurone für 7 min bzw. für 4 min vor Immunfärbungen synaptischer Marker mit 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Nach Entfernen der PFA-Lösung wurde die Protein-quervernetzende Wirkung des PFAs durch eine dreißigminütige Inkubation mit Quenchpuffer abgestoppt. Anschließend erfolgte nach Entfernung des Quenchpuffers die Permeabilisierung der Zellen durch eine einstündige Inkubation in Blocklösung versetzt mit final 0,2% (v/v) Triton® X-100. Die Deckgläschen wurden mit der mit Zellen bewachsenen Seite nach oben in eine feuchte Kammer überführt und mit je 40 µl bzw. 60 µl (für 12 mm- bzw. 15 mm-Durchmesser Deckgläschen) der Primärantikörperverdünnung in Blocklösung (Tabelle 8) für 1 h inkubiert. Danach erfolgte dreimal eine Inkubation mit 100 µl frischer Blocklösung für je 10 min. Die Inkubation mit je 40 µl bzw. 60 µl Fluorophor-gekoppeltem Sekundärantikörper in Blocklösung (Tabelle 7) erfolgte für 1 h. Nach Sekundärantikörper-Inkubation wurden die Deckgläschen einmal mit je 100 µl Blocklösung und zweimal mit je 100 µl PBS für je 10 min gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen kurz in ddH<sub>2</sub>O getaucht, mit je 5 µl Mowiol auf Objektträger aufgebracht und zum Aushärten über Nacht bei RT lichtgeschützt gelagert.

**Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien & Aktin** Zur Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien wurden die Zellen vor der Fixierung mit *MitoTracker*® *Deep Red FM* in einer

finalen Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  in Zellmedium für 1 h im Brutschrank inkubiert. Das Aktinzytoskeletts wurde mit Fluorophor-gekoppeltem Phalloidin während der Sekundärantikörper-Inkubation fluoreszenzmarkiert.

### 2.2.4.2 Präparation von Mausgehirnen für die Immunhistochemie

Mausgehirnschnitte für die Immunhistochemie wurden von Gehirnen PFA-perfundierter, 7 Wochen alter, männlicher Mäuse angefertigt. Dazu wurden die Mäuse mittels intraperitonealer Injektion von 200-300  $\mu\text{l}$  Anästhetikum (100  $\mu\text{l}/10\text{ g}$  Mausgewicht) betäubt und nach 10 min auf Schmerzinsensitivität überprüft. Nach Entfernung des Rippenbogens und Abtrennung des Zwerchfells wurden die rechte Herzkammer und der linke Herzvorhof punktiert. Es erfolgte eine transkardiale Perfusion mit PBS mit anschließender Perfusion mit 4% (w/v) PFA in PBS mit einem Volumen von jeweils 50 ml Lösung. Präparierte Mausgehirne wurden ÜN in 4% (w/v) PFA in PBS bei 4°C nachfixiert, anschließend in PBS und Leitungswasser gespült und zur Kryoprotektion zunächst in 10% (w/v) Saccharose in PBS und dann in 30% (w/v) Saccharose in PBS jeweils ÜN bei 4°C inkubiert.

Die Anfertigung der sagittalen Gehirnschnitte in einer Dicke von 55  $\mu\text{m}$  erfolgte auf einem Schlittenmikrotom unter Verwendung von Trockeneis. Es wurden jeweils vier bis sechs Gehirnschnitte in 1,5 ml 0,1 M PB in einer Vertiefung einer 6-well Platte gesammelt und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.4.3 Immunhistochemie

Die Immunfärbung erfolgte mit jeweils zwei Gehirnschnitten je Vertiefung lichtgeschützt in einer 6-well-Platte. Die Schnitte wurden einmal mit 1 ml 0,1 M PB gespült und zur Permeabilisierung für 1 h bei RT mit 300  $\mu\text{l}$  Histoblocklösung inkubiert. Nach Entfernung der Histoblocklösung erfolgte die Primärantikörper-Inkubation ebenfalls in 250  $\mu\text{l}$  Histoblocklösung für 48 h bei 4°C. Waschschritte wurden dreimal für 10 min mit 500  $\mu\text{l}$  0,1 M PB bei RT durchgeführt. Anschließend inkubierten die Schnitte mit Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern in einer Verdünnung von 1:1.000 in 300  $\mu\text{l}$  0,1 M PB für 24 h bei 4°C. Erneut wurde zweimal für 10 min mit 500  $\mu\text{l}$  0,1 M PB bei RT gewaschen. Zellkerne wurden mit DAPI in einer Verdünnung von 1:1.000 in 0,1 M PB für 30 min bei RT fluoreszenzgefärbt. Die Gehirnschnitte wurden auf Adhäsionsobjektträger in PBS aufgebracht und anschließend mit Fluoromont-G<sup>TM</sup> und Deckgläschen eingedeckt. Nach Aushärten des Eindeckmediums ÜN bei RT wurden die Deckgläschen mit Nagellack versiegelt und der Lack für 1 h bei RT getrocknet.

### 2.2.4.4 Anfertigung & Golgi-Färbung von Mausgehirnschnitten

Golgi-Färbungen nach GLASER und VAN DER LOOS (1981) benötigten unfixierte Mausgehirnschnitte, welche aus Gehirnen von 25-27 Wochen alten, männlichen Mäusen angefertigt wurden. Die Entnahme der Gehirne erfolgte nach einer tiefen Anästhesierung mit Halothan und Dekapitation. Die Gehirne wurden kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült und mit dem *FD Rapid*

*GolgiStain*<sup>™</sup> Kit für die Golgi-Färbung aufbereitet. Zunächst inkubierten die Gehirne in 5 ml Imprägnierlösung für 21 Tage lichtgeschützt bei RT, wobei nach 24 h die Lösung einmal erneuert wurde. Anschließend wurden die Gehirne in 5 ml Lösung C überführt und für 6-7 Tage lichtgeschützt bei 4°C inkubiert, wobei die Lösung nach 24 h einmal erneuert wurde. Zum Anfertigen von Gehirnschnitten wurden die Gehirne in Plastikkammern ausgekleidet mit Klarsichtfolie eingebettet, alle Schritte erfolgten auf Trockeneis. Dafür wurden die Gehirne für 2 min in Isopentan eingetaucht, in einer Petrischale für 5 min durchgefroren, anschließend in 5 ml 2% (w/v) Agarose-Lösung eingebettet und bis zur vollständigen Agarose-Erhärtung erneut durchgefroren. Die Anfertigung der koronalen Gehirnschnitte in einer Dicke von 25 µm erfolgte mit einem Kryostat bei einer Kammertemperatur von -23°C und einer Objektischtemperatur von -22°C. Die Gehirnschnitte wurden mittels Lösung C auf Gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen, anschließend bei RT lichtgeschützt luftgetrocknet und bis zur Verwendung binnen 3 Tagen bei RT gelagert. Zur Gelatine-Beschichtung wurden Objektträger zunächst mit Seifenwasser gewaschen, gründlich mit Leitungswasser gespült, anschließend mit ddH<sub>2</sub>O gespült, in 70% (v/v) Ethanol getaucht und in staubfreier Umgebung ÜN luftgetrocknet. Anschließend wurden die Objektträger drei- bis fünfmal langsam in 40-50°C warme Gelatine-Beschichtungslösung getaucht, für 48 h bei RT luftgetrocknet und bis zur Verwendung in staubfreier Umgebung bei RT gelagert. Die Golgi-Färbung der aufgezogenen Gehirnschnitte erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, bei RT in Glasküvetten mit einer Füllhöhe von 300-400 ml. Zunächst wurden die Schnitte zweimal für 2 min in ddH<sub>2</sub>O gespült, anschließend für 30 s mit Golgi-Färbelösung gefärbt, erneut zweimal für 4 min in ddH<sub>2</sub>O gespült, dann in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (50%, 75%, 95%, viermal 99%, alle (v/v)) und abschließend dreimal für 4 min in Xylen zur Entfernung von Ethanol-Rückständen geklärt. Das Eindecken mit Deckgläschen erfolgte unter Verwendung von Roti<sup>™</sup> Histokit II als Eindeckmedium.

### 2.2.5 Elektrophysiologische Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten *Patch-Clamp*-Messungen von *miniature excitatory postsynaptic currents* (mEPSCs) wurden von Dr. Lutz, Liebmann, Institut für Humangenetik, UKJ, durchgeführt. Dazu wurden primäre hippocampale Rattenneuronenkulturen an DIV 12 einzel- bzw. an DIV13 kotransfiziert und zwei Tage später für die Messungen verwendet. Die Messungen wurden nach SINNING et al. (2011) durchgeführt. Für die quantitative Auswertung wurden 2-6 unabhängige Transfektionen von jeweils unabhängigen Neuronenpräparationen verwendet, von denen jeweils 3-4 Zellen gemessen wurden.

## 2.2.6 Mikroskopie & bildanalytische Verfahren

### 2.2.6.1 Mikroskope

Die Aufnahme von konfokalen Bildern erfolgte an einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop ausgestattet mit der LAS AF *Software* oder einem inversen Epifluoreszenzmikroskop ausgestattet mit einem ApoTome-Modul und der AxioVision *Software*. Hellfeldmikroskopie erfolgte an einem inversen Epifluoreszenz-Mikroskop ebenfalls mit der AxioVision *Software*. Für quantitative Bildanalysen wurden Bilder als z-Serien mit einer Intervalltiefe von 0,2-0,3  $\mu\text{m}$  aufgenommen und als maximale Intensitätsprojektionen verwendet. Bilder wurden mit der Adobe Photoshop *Software* bearbeitet. Quantitative Bildverarbeitung erfolgte unter Verwendung der ImageJ *Software* bzw. Imaris *Software*.

### 2.2.6.2 Morphologische Untersuchung von dendritischen Dornfortsätzen & synaptischen Punkten in Zellkulturen

Die Morphologieanalysen erfolgten unter Verwendung von primären hippocampalen Rattenneuronen auf je zwei bis sechs Deckgläschen aus mindestens drei unabhängigen Neuronenpräparationen mit Hilfe der ImageJ *Software*. Während der Experimente wurden zur Überprüfung und Normierung alle notwendigen Kontrollen mitgeführt. Die Auswahl der zu untersuchenden Neurone erfolgte zufällig. Zur Visualisierung der kompletten Neuronenmorphologie wurden die Zellen mit PM-mCherry kotransfiziert. Alle morphologischen Analysen dendritischer Dornfortsätze wurden mit Hilfe des PM-mCherry-Signals durchgeführt. Die Untersuchung synaptischer Punkte erfolgte auf dem Überlagerungsbild der Kanäle des PM-mCherry-Signals und des immunfluoreszenzgefärbten Synapsin 1 (präsynaptischer Marker) bzw. PSD-95 (postsynaptischer Marker)-Signals. Zur Erhebung der Dichten dendritischer Dornfortsätze sowie prä- und postsynaptischer Punkte wurden Dendritenabschnitte mit einer Mindestlänge von 50  $\mu\text{m}$  verwendet. In die Auswertung der Dornfortsatzmorphologie wurden hierbei alle sichtbaren dornfortsatzartigen Auswüchse einer Maximallänge von 5  $\mu\text{m}$  entlang des Dendritenabschnitts miteinbezogen. Für die Auswertung der Prä- und Postsynapsendichten wurden alle prä- bzw. postsynaptische Markierungen einer Mindestgröße von zwei (PSD-95-Markierung) bzw. drei (Synapsin 1-Markierung) farbgesättigten Bildpixeln miteinbezogen, die sich entlang des Dendritenabschnitts und in dessen dendritischen Dornfortsätzen befanden. Für Präsynapsendichten wurden zusätzlich Synapsin 1-Markierungen, die direkt an den Dendriten oder an Dornfortsätze angrenzen, in die Auswertung miteinbezogen. Für die morphologische Untersuchung individueller Dornfortsätze wurde die Dornfortsatzlänge jedes dornfortsatzartigen Auswuchses gemessen und entsprechend in Morphologiegruppen eingeteilt. Die Einteilung in Morphologiegruppen dendritischer Dornfortsätze erfolgte nach HERING und SHENG (2001) nach den in Tabelle 10 dargestellten Größenrichtwerten. Als Dornfortsatzlänge wurde die Entfernung von der Basis des Dornfortsatzhalses bis zum weitest entfernten Punkt des Dornfortsatzkopfes erhoben. Die Kopfbreite entsprach der maximalen Breite des Dornfortsatzkopfes im rechten Winkel zur Längsachse des Dornfortsatzhalses.

Als Definition eines Kopfes wurde eine minimale Kopfbreite von  $0,3 \mu\text{m}$  festgelegt. Zur Quantifizierung erfolgte dementsprechend die Analyse von jeweils 10-20 Dornfortsatzdichten sowie jeweils 500-1.000 individuellen Dornfortsätzen von 10-20 ausgewerteten Dendritenabschnitten von 10-16 Neuronen. Weiterhin wurden 50-200 Dichten synaptischer Punkte von 25-75 Neuronen analysiert, welche auf den Mittelwert der pRNAT-Kontrolle der jeweiligen Transfektion normiert wurden. Aus diesen Werten sowie aus den absoluten Werten wurden Mittelwerte erhoben.

**Tabelle 10:** Morphologische Klassifizierung dendritischer Dornfortsätze.

Morphologiegruppe	Dornfortsatzlänge	Dornfortsatzköpfe
Stummelförmig	$<0,75 \mu\text{m}$	Enden mit oder ohne Kopf
Dünn und filopodien-ähnlich	$0,75 - 5 \mu\text{m}$	kein abgrenzbarer Kopf erkennbar bzw. Endbreite $<0,3 \mu\text{m}$
Pilzförmig	$0,75 - 5 \mu\text{m}$	$>0,3 \mu\text{m}$
Verzweigt	$0,75 - 5 \mu\text{m}$	mehrere Köpfe bzw. kopflose Enden

### 2.2.6.3 Morphologische Untersuchung von dendritischen Dornfortsätzen in Mausgehirnschnitten

Die morphologische Analysen dendritischer Dornfortsätze wurden an Dendritenabschnitten im *Stratum radiatum* hippocampaler Neurone der Region CA1 (*Cornu ammonis*, Ammonshorn) von Golgi-gefärbten Mausgehirnschnitten mit Hilfe der *Imaris Software* durchgeführt. In invertierten hellfeldmikroskopischen z-Stapelaufnahmen wurden Dendritenabschnitte und deren dendritische Dornfortsätze mittels des *Imaris Filament Tracer*-Moduls unter jeweiliger Verwendung des *shortest distance*-Algorithmus dreidimensional rekonstruiert. Für die dendritischen Dornfortsätze wurde eine Mindestbreite des Dornfortsatzkopfes bzw. -endes (*seed point* in der *Imaris Software*) von  $0,2 \mu\text{m}$  und eine Maximallänge von  $5 \mu\text{m}$  gewählt. Die Klassifizierung in Morphologiegruppen erfolgte mittels des integrierten MATLAB-Klassifizierungsmoduls mit der in Tabelle 11 dargestellten Konfiguration. Zur Quantifizierung erfolgte die Analyse der Dichten dendritischer Dornfortsätze sowie der Dichten und prozentualen Verteilungen der einzelnen Morphologiegruppen von insgesamt ungefähr 100 Dendritenabschnitten von drei wildtypischen und drei *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen, aus denen Mittelwerte erhoben wurden.

**Tabelle 11:** Konfiguration des MATLAB-Klassifizierungsmoduls dendritischer Dornfortsätze.

Feld	Befehl
Stummelförmig	<code>length(spine) &lt; 0.75</code>
Pilzförmig	<code>length(spine) &lt; 5 and max_width(head) &gt; mean_width(neck) * 1.5</code>
Dünn	<code>max_width(head) &gt;= mean_width(neck)</code>
Filopodien	<code>true</code>
Kopflänge	<code>45 %</code>
Basislänge	<code>25 %</code>

#### 2.2.6.4 Oberflächenrekonstruktion & quantitative Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Flächen

Zur quantitativen Untersuchung der Flächen PSD-95- und ProSAP1-positiver Punkte sowie PSD-95- und ProSAP1-kolokalisierter Punkte erfolgte eine Oberflächenrekonstruktion mit Hilfe der *Imaris Software* unter Verwendung primärer hippocampaler Mausneurone, welche nach 7 bzw. 14 Tagen in Kultur anti-PSD-95- und anti-ProSAP1-immunfluoreszenzmarkiert wurden. Auf maximalen Intensitätsprojektionen wurden dazu zunächst unter Verwendung des *Imaris Coloc*-Moduls aus den Kanälen der PSD-95- und ProSAP1-Signale ein Kolokalisationskanal erstellt. Anschließend erfolgte für die Einzelkanäle und den Kolokalisationskanal unter Verwendung des *Imaris Surface*-Moduls die Oberflächenrekonstruktion aller positiven Punkte in einem definierten Bereich von Interesse (*region of interest*, ROI). Die Oberflächen wurden unter Verwendung einer Oberflächendetailgröße von 0,1  $\mu\text{m}$ , der Schwellenwertberechnung über die absolute Intensität sowie einer Mindestvoxelgröße von 1,0 Voxel rekonstruiert. Es wurden die Oberflächengrößen, die mittleren und maximalen (summierten) Signalintensitäten der einzelnen PSD-95- und ProSAP1-positiven Punkte sowie die Oberflächengrößen der kolokalisierten Punkte analysiert und daraus Mittelwerte jeder ROI (200-2.000 positive Punkte pro ROI) erhoben. Zur Quantifizierung wurden je Genotyp 40 Zellen auf 2 Deckgläschen aus unabhängigen Neuronenpräparationen analysiert und Mittelwerte erhoben.

#### 2.2.6.5 Statistik

Die Analysen auf statistische Signifikanzen erfolgten mit Hilfe der *GraphPad Prism Software*. Die elektrophysiologischen Analysen wurden mittels ungepaartem, zweiseitigem *Student's t*-Test bzw. mittels *one-way* ANOVA mit dem Newman-Keuls *post-hoc* Test statistisch getestet. Alle weiteren Statistiken wurden unter Verwendung des ungepaarten, zweiseitigen *Student's t*-Test bzw. des *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test durchgeführt. Statistische Signifikanzniveaus wurden mit \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  und \*\*\*,  $p < 0,001$  gekennzeichnet. Graphisch dargestellt wurden Mittelwerte und Standardfehler. Eine Auflistung aller abgebildeten Mittelwerte mit jeweiligen Standardabweichungen, Standardfehlern und  $n$ -Werten befindet sich in Tabelle 15 in Anhang A.

# 3 Ergebnisse

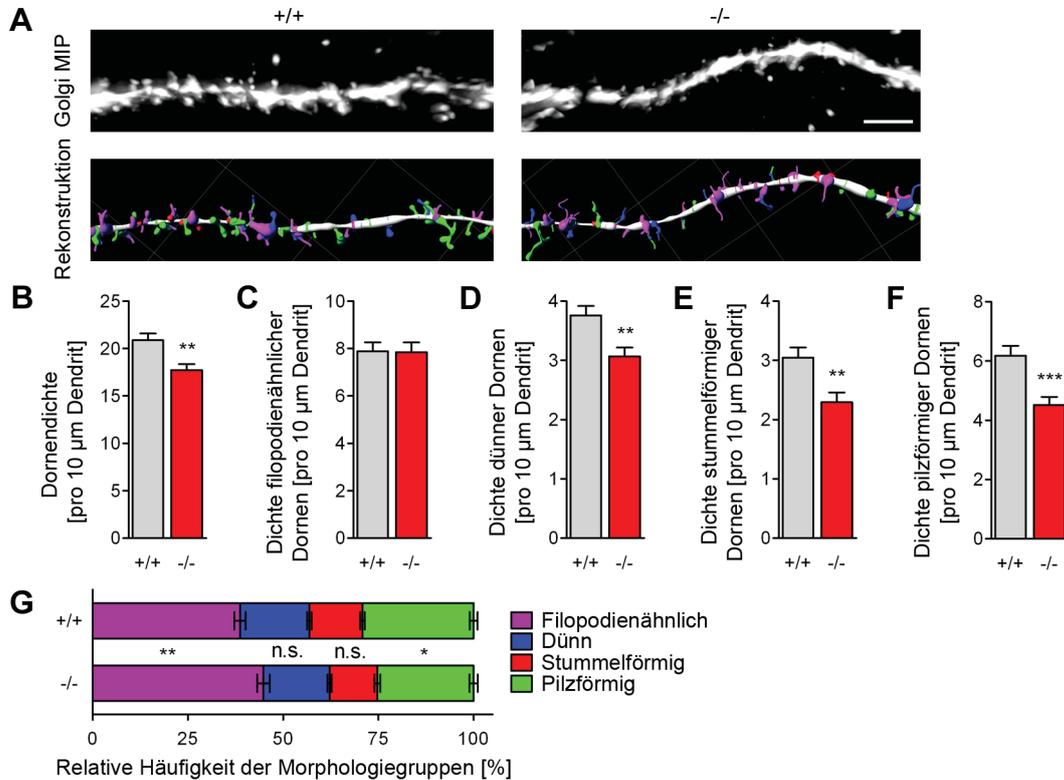
## 3.1 Syndapin I beeinflusst die Postsynapsenbildung

### 3.1.1 *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine gestörte Bildung dendritischer Dornfortsätze

Funktionelle Studien über Syndapin I schrieben der Syndapin I-vermittelten Verknüpfung von Aktinnukleations- und Endozytosemaschinerien mit Membranmodulationsvorgängen während der Axon- und Dendritenausbildung sowie während Abschnürungsprozessen präsynaptischer Vesikel in der kompensatorischen Endozytose von Neurotransmittern eine entscheidende Rolle zu (DHARMALINGAM et al., 2009; KOCH et al., 2011; SCHWINTZER et al., 2011). Die zur *in vivo*-Untersuchung der Syndapin I-Funktionen generierten *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäuse litten an generalisierten, klonischen Krampfanfällen (KOCH et al., 2011). Dieser Phänotyp stand im Einklang mit elektrophysiologischen und morphologischen Analysen, die eine veränderte neuronale Netzwerkaktivität und eine gestörte Bildung präsynaptischer Vesikel ergaben (KOCH et al., 2011). Jedoch blieb bislang ungeklärt, ob der makroskopische Phänotyp rein präsynaptischen Ursprungs ist, oder ob eine Störung der Postsynapsenorganisation eine weitere Ursache sein könnte.

Um dies zu untersuchen, wurden koronale Mausgehirnschnitte von adulten männlichen wildtypischen und *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen angefertigt und nach der Golgi-Methode gefärbt. Durch die dreidimensionale Rekonstruktion von Dendriten und dendritischen Dornfortsätzen pyramidalen CA1-Neurone wurde die Morphologie der Dornfortsätze auf Veränderungen unter Verlust von Syndapin I hin untersucht. Die quantitative Analyse zeigte um 15% signifikant verringerte Dornfortsatzdichten in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen (Abb. 6A, B). Die morphologische Klassifizierung der Dornfortsätze in filopodienähnliche, dünne, stummelförmige und pilzförmige Dornen und die Erhebung der Dornfortsatzdichten individueller Morphologiegruppen ergab für *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäuse keine signifikante Veränderung in der Dichte filopodienähnlicher Dornen. Dahingegen waren die Dichten der anderen drei Morphologiegruppen mit ausgebildetem Kopfbereich signifikant verringert: Die Dichte der Dornfortsätze mit schmalen Kopfbereich (dünne Dornen) war um 18% reduziert, die Dichte der Dornfortsätze mit stärker ausgebildetem Kopfbereich (pilzförmige Dornen) um 27% und die der kurzen Dornfortsätze mit oder ohne Kopfbereich (stummelförmige Dornen) um 25% (Abb. 6C-F). Die Erhebung der prozentualen Verteilung individueller Dornfortsatzgruppen in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen wies eine signifikante Unterrepräsentation reifer Dornfortsätze (pilzförmige Dornen) um 13% und eine signifikante Überrepräsentation unreifer Dornfortsätze bzw. Dornfortsatzvorstufen (filopodienähnliche Dornen) um 16% auf. Dahingegen waren andere Dornfortsatzentwicklungsstadien (stummelförmige und dünne Dornen) in der relativen Häufigkeit nicht signifikant verändert (Abb. 6G).

Diese Befunde ließen auf eine gestörte Bildung dendritischer Dornfortsätze mit einem ausgebildeten Kopfbereich durch den Verlust von Syndapin I schließen. Aus diesen Beobachtungen ging jedoch nicht hervor, ob die gestörte Dornfortsatzbildung auf das Fehlen von Syndapin I in der Prä- oder Postsynapse oder in beiden zurückzuführen war.



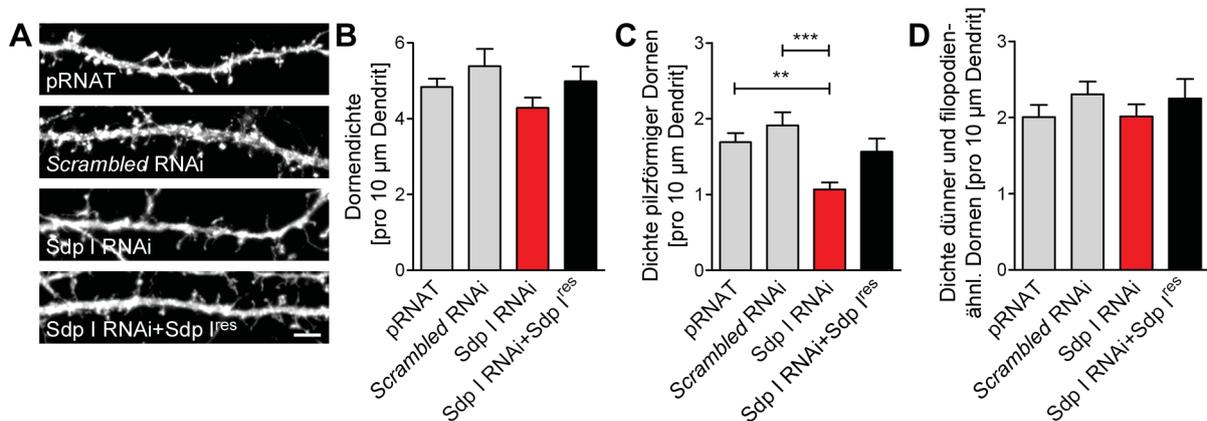
**Abbildung 6: Dendritische Dornfortsätze von hippocampalen CA1-Neuronen in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen erwiesen sich als signifikant reduziert.** **A**, Dargestellt sind Beispiele von Dendritenabschnitten aus maximalen Intensitätsprojektionen (MIP) von Golgi-gefärbten CA1-Neuronen aus adulten wildtypischen (+/+) und *Syndapin I*<sup>-/-</sup> (-/-)-Mausgehirnschnitten (oberer Abschnitt), sowie die korrespondierenden Dendriten- und Dornfortsatzrekonstruktionen (unterer Abschnitt) mit der Klassifizierung in filopodienähnliche (magenta), dünne (blau), stummelförmige (rot) und pilzförmige (grün) Dornen. Größenbalken: 4 µm. **B-G**, Quantitative Auswertungen der Dornfortsatzrekonstruktionen zeigten sowohl eine signifikant verringerte Gesamtdornendichte (**B**) als auch signifikant verringerte Dichten von Dornfortsätzen mit ausgebildetem Kopf (**D**, dünne; **E**, stummelförmige; **F**, pilzförmige Dornen) im Gegensatz zur filopodienähnlichen Dornendichte (**C**). **G**, Die prozentuale Verteilung der Morphologiegruppen zeigte einen signifikant kleineren Anteil pilzförmiger Dornen sowie einen signifikant größeren Anteil filopodienähnlicher Dornen in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen. n.s., nicht signifikant. Die Mittelwerte, Standardabweichungen, -fehler und *n*-Werte sind in Tabelle 15 in Anhang A angegeben.

### 3.1.2 Die Postsynapsenbildung ist von der postsynaptischen Syndapin I-Expression abhängig

#### 3.1.2.1 Die Depletion von Syndapin I führt zu einer gestörten Postsynapsenbildung

Syndapin I RNAi-Analysen in primären hippocampalen Rattenneuronen zum Zeitpunkt der Dornfortsatzentwicklung (14. *day in vitro* (Tag in Kultur), DIV14) dienten der Aufklärung der Frage, ob die in den *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachteten Dornfortsatzveränderungen

(Abb. 6) sekundäre Effekte präsynaptischer Störungen waren oder direkt auf das Fehlen von Syndapin I in der Postsynapse zurückzuführen waren. Die Vektor-basierte Expression von siRNA ermöglichte bei entsprechend niedrigen Transfektionsraten die gezielte Betrachtung postsynaptischer Effekte einer Syndapin I-Depletion in Syndapin I siRNA-exprimierenden Dendriten, die in Kontakt zu untransfizierten Präsynapsen standen, wodurch präsynaptische Syndapin I-Depletionseffekte ausgeschlossen werden konnten (Abb. 7). Die Koexpression von konstitutiv an die Plasmamembran-gebundenem mCherry (PM-mCherry) erlaubte die Detektion der siRNA-exprimierenden Zellen. Die morphologische Analyse und die Klassifizierung der Dornfortsätze anhand der durch PM-mCherry vollständig sichtbaren Dornfortsatzmorphologie zeigte eine um 11% verringerte Gesamtdornendichte, die jedoch statistisch nicht signifikant war (Abb. 7A, B). Es ergab sich, vergleichbar mit dem Phänotyp der *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mausneurone, unter Syndapin I RNAi eine um 35% bzw. 42% signifikant verringerte Dichte pilzförmiger Dornen (Abb. 7A, C) im Vergleich zu den pRNAT- bzw. den *scrambled* RNAi (Sequenz-unspezifische siRNA)-Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu waren die Dichten der sich entwickelnden Dornen (dünne und filopodienähnliche Dornen, Abb. 7A, D) und der stummelförmigen Dornen (Daten nicht gezeigt, Werte siehe Tabelle 15 in Anhang A) nicht signifikant verändert. Durch Koexpression einer RNAi-insensitiven FLAG-Syndapin I-Mutante (*Sdp I*<sup>res</sup>) wurde in Syndapin I RNAi-Neuronen der Phänotyp unterdrückt. Dies bewies, dass die beobachteten Veränderungen der Dornfortsatzmorphologie spezifisch auf die Syndapin I-Depletion in diesen Zellen zurückzuführen waren.

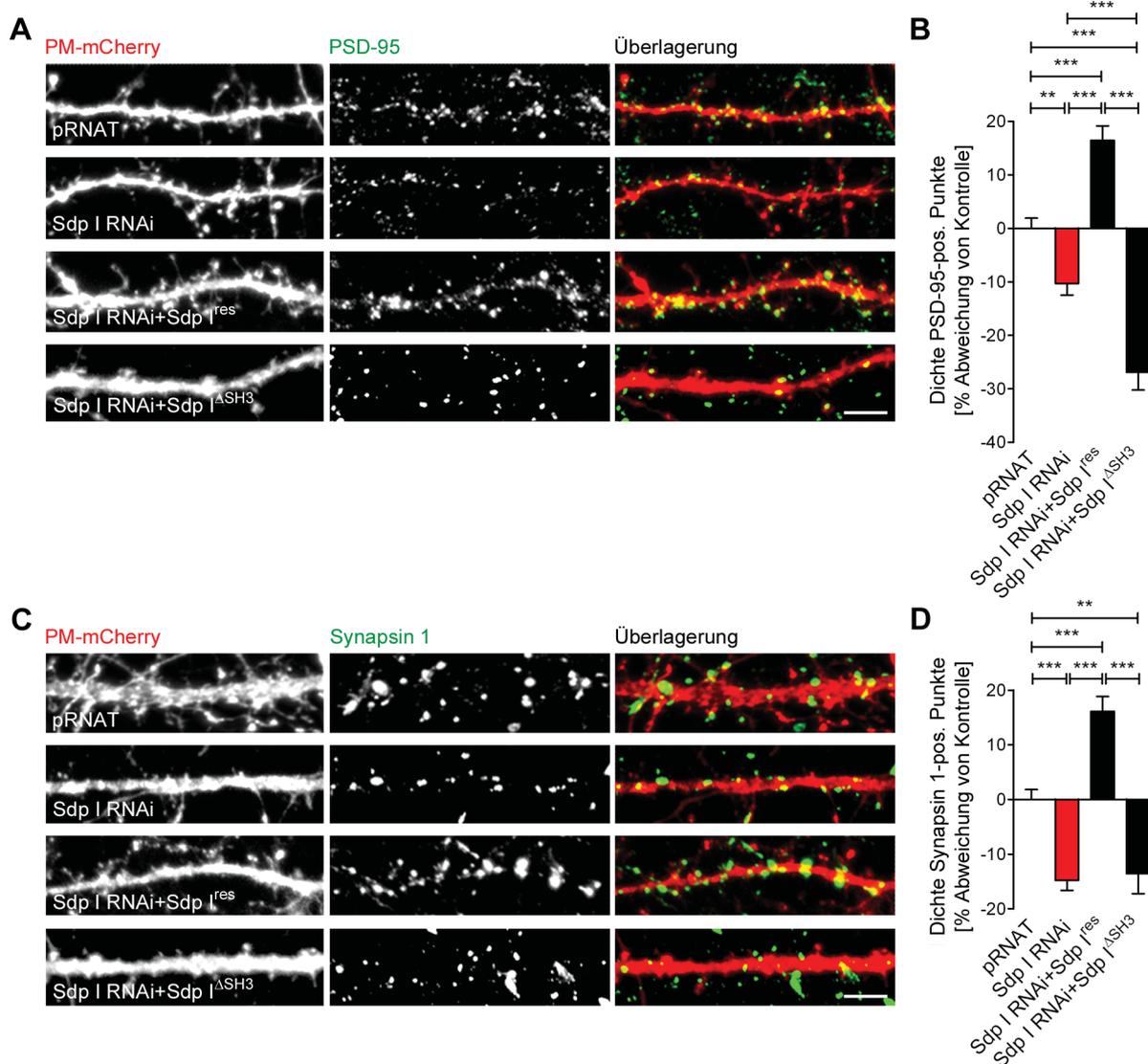


**Abbildung 7: Syndapin I-Depletion beeinträchtigte die Dornfortsatzbildung durch den Verlust von Syndapin I-Funktionen in der Postsynapse.** **A**, Dendriten von primären hippocampalen Rattenneuronen (DIV 14) zeigten einen Verlust an pilzförmigen Dornen nach RNAi-basierender Syndapin I-Depletion (*Sdp I* RNAi) im Vergleich zu den Kontrollen (pRNAT; *scrambled* RNAi). Dieser Phänotyp wurde durch die Überexpression eines RNAi-insensitiven FLAG-Syndapin I (*Sdp I*<sup>res</sup>) aufgehoben. Dargestellt sind die PM-mCherry-Signale, die für morphologische Analysen genutzt wurden. **B-D**, Gezeigt sind die quantitativen Analysen der Gesamtdornendichte (**B**) sowie der Dichte einzelner Morphologiegruppen (**C**, pilzförmige; **D**, dünne und filopodienähnliche (filopodienähnli.) Dornen). Größenbalken: 5 µm.

Da die Syndapin I-Depletion besonders die Bildung pilzförmiger, also reifer Dornfortsätze beeinträchtigte, wurde daraufhin die Postsynapsenbildung unter Syndapin I-Depletion untersucht. Dies erfolgte durch die Analyse der Dichte von anti-PSD-95-immunmarkierten postsynaptischen Punkten entlang von Dendriten siRNA- und PM-mCherry-koexprimierender

Neurone (Abb. 8A, B). Die anti-PSD-95-Immunmarkierungen waren unter Syndapin I-Depletion bezogen auf pRNAT-Kontrollzellen um 10% signifikant verringert (Abb. 8A, B). Ebenfalls zeigten die anti-Synapsin 1-Immunmarkierungen eine signifikante Reduktion (15% bezogen auf pRNAT) in den Präsynapsen, die Kontakte entlang von Dendriten transfizierter Neurone bildeten (Abb. 8C, D). Dies war konsistent mit den reduzierten Dornenfortsatz- und Postsynapsendichten Syndapin I-depletierter Neurone. Die Darstellungen der jeweiligen absoluten Werte befinden sich in Abb. 37A, B (Anhang A).

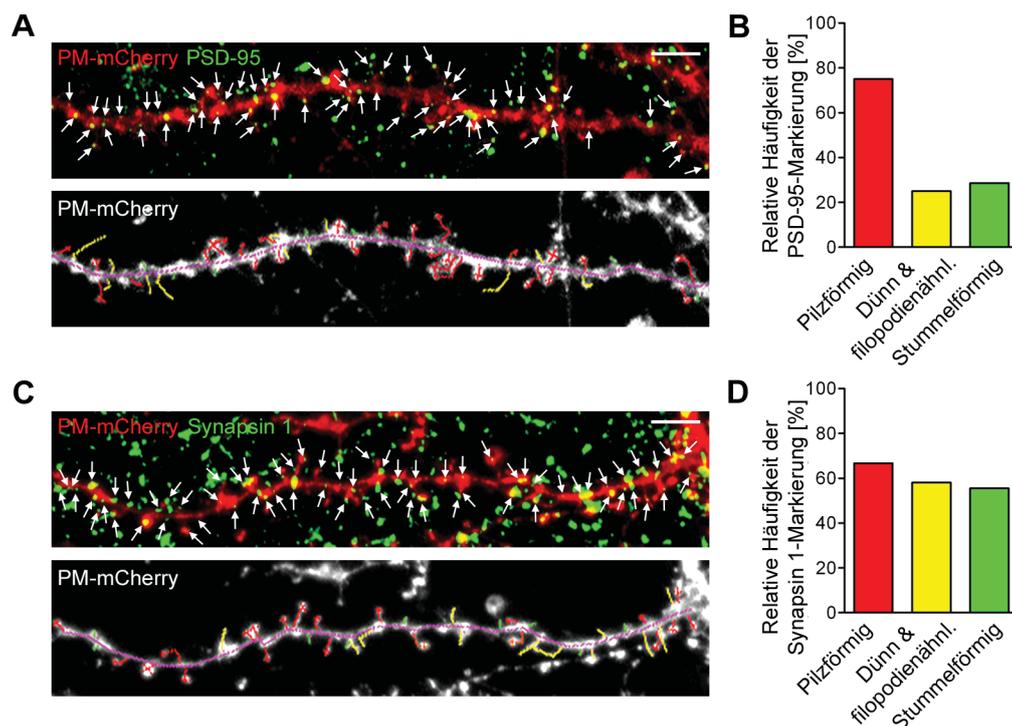
Aus den Annahmen, dass reife Dornfortsätze sowohl eine Postsynapse aufweisen, als auch von einer Präsynapse kontaktiert werden und diese durch transsynaptische Kommunikation



**Abbildung 8: Syndapin I-Depletion störte die Synapsenbildung durch den Verlust von SH3-Domänen-vermittelten Syndapin I-Funktionen in der Postsynapse.** Dargestellt sind die Analysen von post- (A, anti-PSD-95) bzw. präsynaptisch- (C, anti-Synapsin 1) immungefärbten Synapsen zur Quantifizierung von Synapsendichten entlang von Dendritenabschnitten von Syndapin I-depletierten primären hippocampalen Rattenneuronen (DIV14). Es zeigten sich reduzierte Synapsendichten im Vergleich zu pRNAT-Kontrollzellen. Dieser Phänotyp wurde durch die Überexpression des RNAi-insensitiven FLAG-Syndapin I im Gegensatz zu einer RNAi-insensitiven FLAG-Syndapin I-Mutante ohne SH3-Domäne (Sdp I<sup>ΔSH3</sup>) aufgehoben. B, D, Gezeigt ist die quantitative Auswertung der Anzahl PSD-95- (B) bzw. Synapsin 1- (D) positiver (pos.) Punkte entlang von Dendritenabschnitten transfizierter Neurone. PM-mCherry ist in rot, PSD-95 bzw. Synapsin 1 sind in grün in Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 5  $\mu$ m.

während der Ausbildung neuronaler Netzwerke gemeinsam reguliert werden, lässt sich schlussfolgern, dass sich die Dichte reifer Dornfortsätze in den Post- und Präsynapsendichten widerspiegeln sollte. Um diesen Sachverhalt in den hier angewandten Auswertungssystemen - Analyse der Dornfortsatzmorphologie und der Synapsendichten - zu überprüfen, wurden repräsentative Analysen der Post- bzw. Präsynapsendichte von Kontrolldendritenabschnitten mit den entsprechenden Dornfortsatzanalysen der jeweiligen Dendritenabschnitte verglichen (Abb. 9). Dabei zeigte sich, dass in der Tat 75% aller pilzförmiger, also reifer Dornen eine postsynaptische Markierung (PSD-95-positiv) aufwiesen. Im Gegensatz dazu wiesen die übrigen Dornfortsatzgruppen nur zu 25% (dünne und filopodienähnliche Dornen) bzw. zu 29% (stummelförmige Dornen) eine PSD-95-Markierung auf (Abb. 9A, B). Der Vergleich der präsynaptischen Dichten mit der Dornfortsatzanalyse ergab, dass alle Dornfortsatzgruppen zur Mehrheit von einer Synapsin 1-positiven Präsynapse kontaktiert wurden (67%, pilzförmige; 58%, dünne und filopodienähnliche; 56%, stummelförmige Dornen) (Abb. 9C, D).

Um darüber hinaus mögliche Unterschiede zwischen der Dornfortsatzdichte- und Synapsendichteanalyse aufzuklären, wurde der Anteil der Postsynapsen auf Dornfortsätzen im Vergleich zum Anteil der Postsynapsen auf dem Dendriten ohne erkennbaren

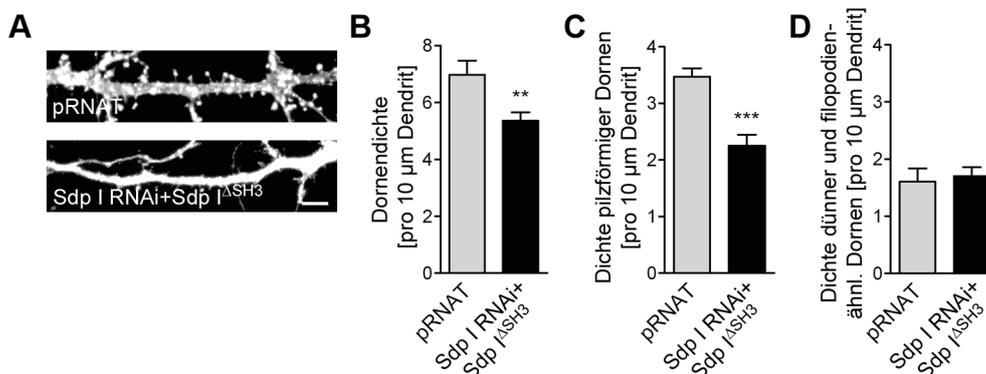


**Abbildung 9: Die Synapsendichte korrelierte mit der Dichte reifer Dornfortsätze.** **A, C**, Gezeigt ist der Vergleich einer repräsentativen Analyse der Postsynapsendichte (**A**, anti-PSD-95) bzw. Präsynapsendichte (**C**, anti-Synapsin 1) (jeweiliger oberer Abschnitt) mit der entsprechenden Dornfortsatzanalyse (jeweiliger unterer Abschnitt) des Dendritenabschnittes von einem PM-mCherry-exprimierenden primären hippocampalen Neuron (DIV14). Pfeile markieren alle Post- bzw. Präsynapsen, die in die Auswertung miteinbezogen wurden. In der Dornfortsatzauswertung sind pilzförmige Dornen in rot, dünne und filopodienähnliche Dornen in gelb und stummelförmige Dornen in grün markiert. Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$ . **B, D**, Dargestellt ist die relative Häufigkeit von PSD-95-markierten (**B**) bzw. Synapsin 1-markierten (**D**) dendritischen Dornfortsätzen entsprechend ihren Morphologiegruppen aufgliedert. Die Mehrheit der pilzförmigen Dornen wies eine PSD-95-Markierung auf, wohingegen dünne und filopodienähnliche Dornen sowie stummelförmige Dornen nur zu einem geringen Teil PSD-95-markiert waren (**B**). Alle Dornfortsatzgruppen wurden in der Mehrheit von einer Synapsin 1-positiven Präsynapse kontaktiert (**D**).

Dornfortsatz ermittelt. Die Auswertung von 101 mit Antikörper gegen den postsynaptischen Marker PSD-95 angefärbten Dendritenabschnitten aus 25 Zellen ergab einen Postsynapsenanteil von 34% sich auf dendritischen Dornfortsätzen befindenden Postsynapsen (Daten nicht gezeigt, Werte siehe Tabelle 15 in Anhang A)). Mit den hier verwendeten Auswertungsmethoden für Dornfortsatz- und Synapsendichten konnten also wesentlich mehr Postsynapsen als reife dendritische Dornfortsätze detektiert werden, was mögliche Unterschiede in den Effektstärken erklären würde. Es kann hier jedoch keine Aussage getroffen werden, wie groß der Anteil der Postsynapsen ist, die direkt den dendritischen Schaft kontaktieren, sowie wie groß der Anteil derer ist, die sich auf Dornfortsätzen in der z-Ebene befanden.

Auch in der Synapsenbildung unterdrückte die Koexpression einer RNAi-insensitiven FLAG-Syndapin I-Mutante die Syndapin I-vermittelten Störungen vollständig und erhöhte dabei sogar die Post- bzw. Präsynapsendichte signifikant um jeweils 16% jeweils bezogen auf pRNAT (Abb. 8A-D). Als weitere Kontrolle wurde *scrambled* RNAi eingesetzt (Daten nicht gezeigt, Werte siehe Tabelle 15 in Anhang A).

Der Einsatz einer RNAi-insensitiven FLAG-Syndapin I-Deletionsmutante ohne SH3-Domäne diente der näheren Charakterisierung des Depletionsphänotypen. Es wurde untersucht, inwieweit die Koexpression dieser Syndapin I-Mutante zur Rettung des Syndapin I RNAi-Effekts im Vergleich zum RNAi-insensitiven, intakten FLAG-Syndapin I führt. Dies gibt Aufschluß darüber, ob postsynaptische Syndapin I-Funktionen über SH3-Domänen-Interaktionen vermittelt werden. Auffälligerweise war die RNAi-insensitive FLAG-Syndapin I-Deletionsmutante ohne SH3-Domäne nicht zur Aufhebung des Syndapin I-Depletionsphänotypen sowohl für die Synapsenbildung (Abb. 8A-D) als auch Dornfortsatzbildung (Abb. 10A-D) befähigt. Die Post- bzw. Präsynapsendichten waren bezogen auf pRNAT um 27% bzw. 14% verringert (Abb. 8A-D; absolute Werte siehe Abb. 37C, D im Anhang A). Auch waren die Gesamtdornendichte mit -23% (Abb. 10A, B) und die Dichte pilzförmiger Dornen mit -34% im Vergleich zur



**Abbildung 10: Syndapin I-Depletion störte die Dornfortsatzbildung durch den Verlust von SH3-Domänen-vermittelten Syndapin I-Funktionen in der Postsynapse.** A, Dargestellt sind die PM-mCherry-Signale von primären hippocampalen Rattenneuronen (DIV14), die für morphologische Analysen genutzt wurden. B-D, Quantitative Dornfortsatzanalysen von Dendritenabschnitten zeigten unter Syndapin I-Depletion und Sdp I<sup>ΔSH3</sup>-Koexpression im Vergleich zu pRNAT-Kontrollzellen einen signifikanten Verlust an Dornfortsätzen (B), insbesondere an pilzförmigen Dornen (C), der durch die Koexpression der Sdp I<sup>ΔSH3</sup>-Mutante nicht gerettet wurde. Die Koexpression von Syndapin I siRNA und Sdp I<sup>ΔSH3</sup> führte zu keiner veränderten Dichte dünner und filopodienähnlicher Dornen (D). Größenbalken: 5 µm.

pRNAT-Kontrolle hochsignifikant verringert (Abb. 10A, C).

Diese Befunde zeigten eindrucksvoll, dass die beobachteten Effekte in der Dornfortsatz- und Postsynapsenbildung spezifisch auf die Syndapin I-Depletion zurückzuführen sind und darüber hinaus von Syndapin I SH3-Domäne-vermittelten Funktionen abhängig sind.

### **3.1.2.2 Die Überexpression von Syndapin I führt zu einer gesteigerten Postsynapsenbildung**

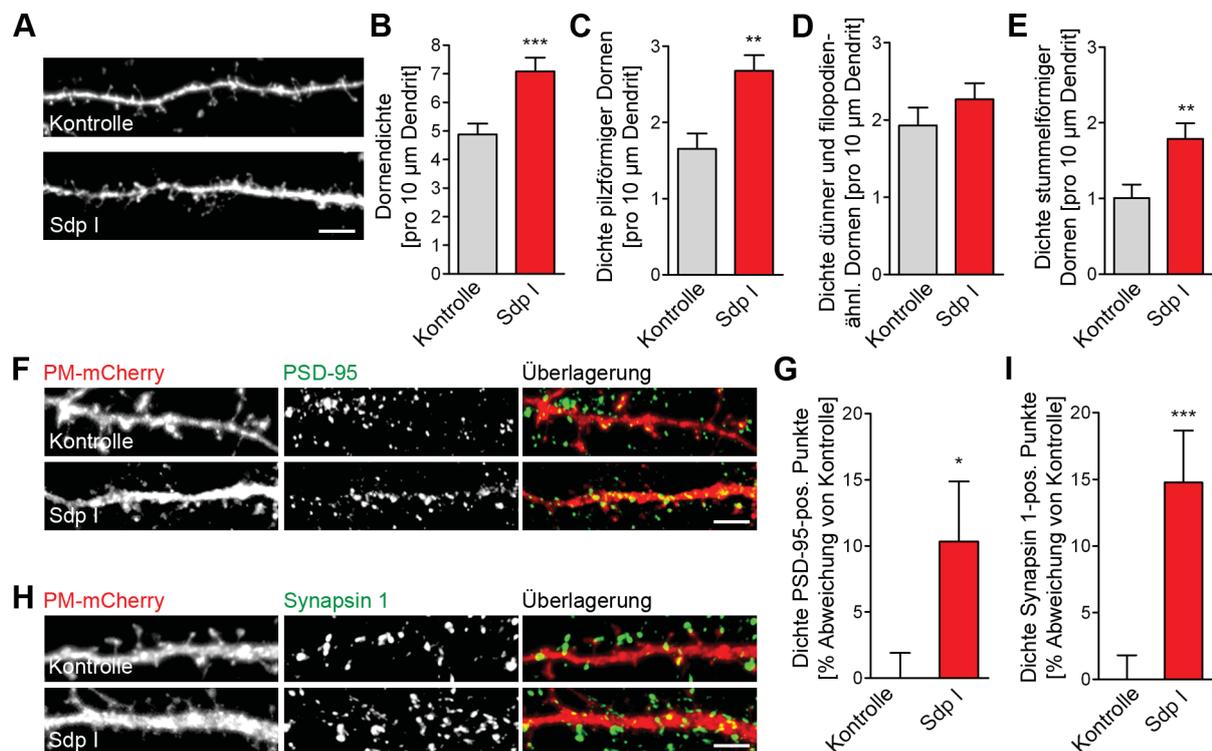
Neben der Syndapin I-Depletion bietet die Überexpression von rekombinantem Syndapin I in Neuronen eine Möglichkeit, postsynaptische Funktionen von Syndapin I anhand der Analyse von Dornfortsatzmorphologie und Syndapsendichte zu untersuchen. Dabei kann die gesteigerte Syndapin I-Expression eine mögliche postsynaptische Funktion von Syndapin I in den Prozessen der Postsynapsenbildung besonders hervorheben. Die Analyse von Postsynapsen Syndapin I-überexprimierender Neurone bei geringer Transfektionsrate ermöglichte die Untersuchung postsynaptischer Effekte in Neuronen, die nur von untransfizierten Neuronen mit unverändertem Syndapin I-Expressionsniveau kontaktiert wurden.

Die morphologische Analyse und Klassifizierung der Dornfortsätze zeigte unter der Überexpression von Xpress-Epitop-markiertem Syndapin I eine signifikante Erhöhung der Dornendichte um 45% verglichen mit PM-mCherry-exprimierenden Kontrollzellen. Es zeigte sich insbesondere eine Erhöhung der Dichte von pilzförmigen Dornen um 59% und von stummelförmigen Dornen um 78%. Dahingegen wies die Dichte dünner und filopodienähnlicher Dornen keine signifikante Änderung auf (Abb. 11A-E).

Ebenso wurden die Effekte der Syndapin I-Überexpression auf die Synapsendichte durch quantitative Analyse der Dichte anti-PSD-95- und anti-Synapsin 1-immunmarkierter synaptischer Punkte entlang von Dendriten FLAG-Syndapin I-transfizierter Neurone untersucht. Zur Untersuchung der Zellmorphologie wurde auch hier jeweils koexprimiertes PM-mCherry verwendet. Die anti-PSD-95-Immunmarkierungen wiesen einen Anstieg um 10% und die anti-Synapsin 1-Immunmarkierungen wiesen einen Anstieg um 15% in der Post- bzw. Präsynapsendichte bezogen auf PM-mCherry-exprimierende Kontrollzellen auf (Abb. 11F-I; absolute Werte siehe Abb. 37E, F im Anhang A).

Damit bestätigten die Synapsendichten die erhöhte Dichte reifer Dornfortsätze unter Syndapin I-Überexpression. Der Phänotyp der Syndapin I-Überexpression auf die Dornfortsatz- und Synapsendichte zeigte damit konsistenterweise gerade die umgekehrten Effekte im Vergleich zu den Syndapin I RNAi-Phänotypen.

Aus den in Abb. 7, 8, 10 und 11 dargestellten Ergebnissen wurde deutlich, dass postsynaptisches Syndapin I eine SH3-Domänen-Interaktionen-vermittelte Rolle in der Bildung reifer Dornfortsätze und korrelierend in der Bildung von Synapsen spielt.



**Abbildung 11: Syndapin I-Überexpression in der Postsynapse förderte die Dornfortsatz- und Synapsenbildung.** A, Dendriten von primären hippocampalen Rattenneuronen (DIV14) zeigten eine Erhöhung der Gesamtdornendichte und insbesondere der Dichte pilz- und stummelförmiger Dornen unter der Koexpression von FLAG-Syndapin I (Sdp I) und PM-mCherry im Vergleich zur PM-mCherry-Kontrollzellen (Kontrolle). Dargestellt sind die PM-mCherry-Signale, die zur morphologischen Untersuchung genutzt wurden. B-E, Gezeigt ist die Quantifizierung der Gesamtdornendichte (B) sowie der Dichte einzelner Morphologiegruppen (C, pilzförmige; D, dünne und filopodienähnliche; E, stummelförmige Dornen). F-I, Analysen von post- (E, anti-PSD-95) und präsynaptisch (G, anti-Synapsin 1) immungefärbten Synapsen zur Quantifizierung der Synapsendichten entlang von Dendriten Syndapin I- und PM-mCherry-koexprimierender Neurone zeigten eine erhöhte Synapsendichte im Vergleich zu PM-mCherry-Kontrollzellen. G, I, Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Anzahl PSD-95- (G) bzw. Synapsin 1- (I) positiver Punkte entlang von Dendriten transfizierter Neurone. PM-mCherry ist in rot, PSD-95 bzw. Synapsin 1 sind in grün in Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 5 µm.

### 3.1.3 Syndapin I ist auch im postsynaptischen Kompartiment lokalisiert

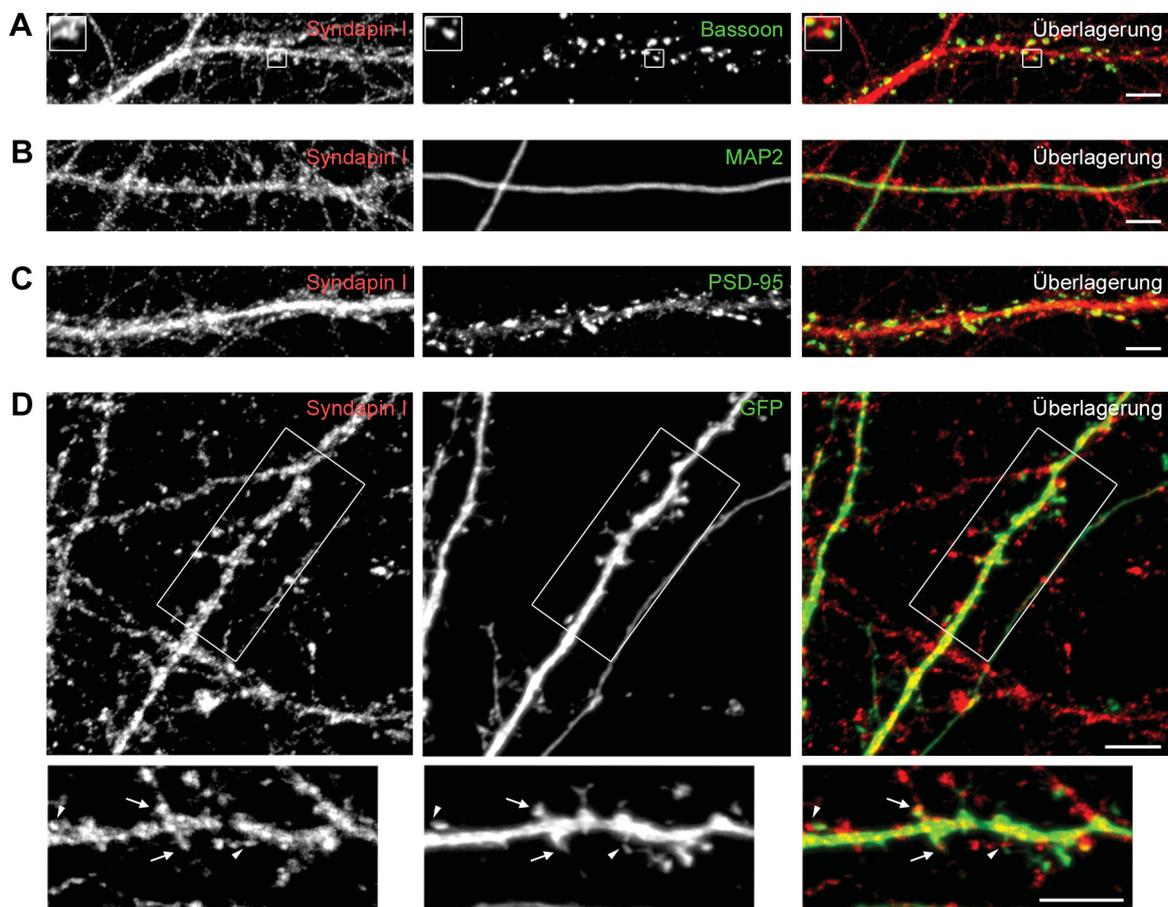
#### 3.1.3.1 Endogenes Syndapin I ist auch im postsynaptischen Kompartiment lokalisiert

Die Untersuchung der postsynaptischen Lokalisation von Syndapin I diente der Bestätigung der kritischen Rolle von Syndapin I in der Entwicklung der Postsynapsen. Dafür wurden die Analysen in stark ausgereiften primären hippocampalen Rattenneuronen (DIV21) mittels Immunfluoreszenzmarkierungen für Syndapin I in Kombination mit Markern für das prä- (Bassoon) und postsynaptische (PSD-95) sowie für das dendritische Kompartiment (MAP2) durchgeführt (Abb. 12).

In Übereinstimmung mit den bereits bekannten präsynaptischen Funktionen (KOCH et al., 2011) und den hier beobachteten postsynaptischen Effekten zeigte sich in den Immunfluoreszenzfärbungen eine Kolo-kalisation sowohl mit Bassoon-markierten Präsynapsen (Abb.

12A) als auch mit PSD-95-markierten Postsynapsen (Abb. 12C). Darüber hinaus wies eine Teilmenge des endogenen Syndapin I eine dendritische Lokalisation durch Überlagerung mit dem Marker MAP2 auf (Abb. 12B). Eine Visualisierung der gesamten Zellmorphologie durch die Expression von GFP und eine Immunmarkierung von endogenem Syndapin I bestätigte die Lokalisation von Syndapin I sowohl im dendritischen bzw. postsynaptischen Kompartiment (Abb. 12D; Pfeile in Vergrößerung) als auch in GFP-negativen Präsynapsen, die die transfizierte Zelle kontaktierten (Abb. 12D; Pfeilspitzen in Vergrößerung).

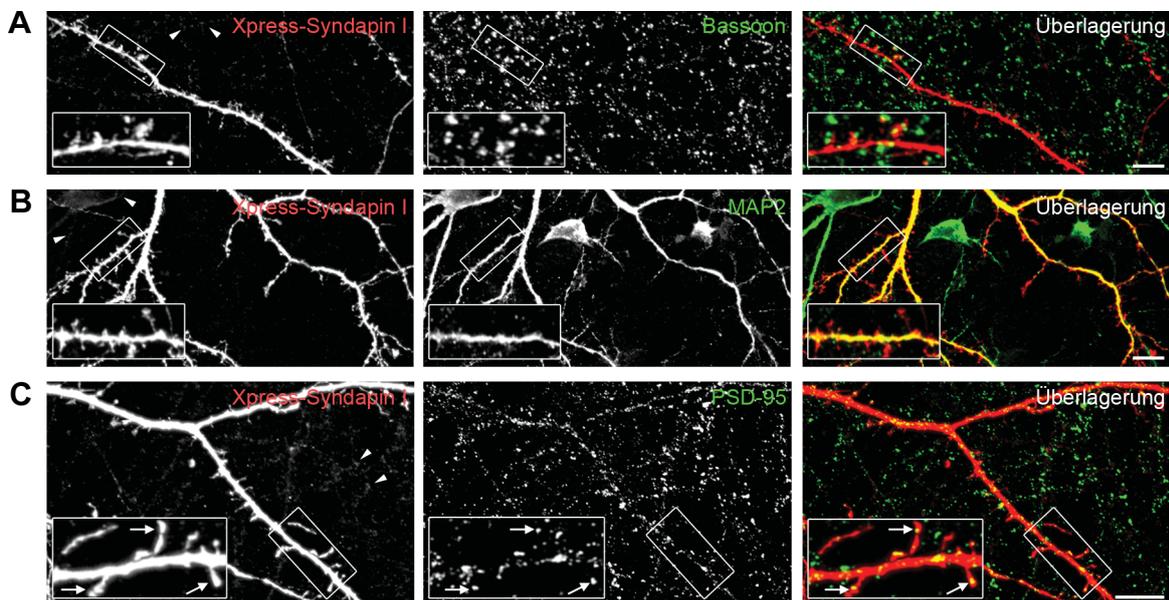
Diese Ergebnisse standen dabei im Einklang mit der bereits beschriebenen Lokalisation von Syndapin I in präsynaptischen Punkten durch lichtmikroskopische Immunfluoreszenzstudien primärer Rattenneurone (QUALMANN et al., 1999) sowie mit der durch elektronenmikroskopische Immungoldmarkierungen beschriebenen prä- und postsynaptischen Lokalisation von Syndapin I (PÉREZ-OTAÑO et al., 2006).



**Abbildung 12: Endogenes Syndapin I war im prä- und postsynaptischen Kompartiment lokalisiert.** A-C, Koimmunfärbungen von Syndapin I und Markern für das präsynaptische (A, anti-Bassoon), dendritische (B, anti-MAP2) und postsynaptische (C, anti-PSD-95) Kompartiment zeigten eine Lokalisation von Syndapin I sowohl in Dendriten als auch in Prä- und Postsynapsen primärer hippocampaler Rattenneurone an DIV21. D, Die Expression von GFP als Zellfüller zur Darstellung der kompletten Neuronenmorphologie zeigte, dass ein deutlicher Anteil der anti-Syndapin I-Immunmarkierung primärer hippocampaler Rattenneurone (DIV14) in Dendriten und dendritischen Dornfortsätzen lokalisiert war. Ausschnitte zeigen synaptisch lokalisiertes Syndapin I und sind zweifache (A) bzw. 1,5-fache (D) Vergrößerungen der umrahmten Areale. Pfeile markieren postsynaptisches, Pfeilspitzen präsynaptisches Syndapin I. Syndapin I ist in rot, Bassoon, MAP2, PSD-95 bzw. GFP sind in grün in Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 5 µm.

### 3.1.3.2 Rekombinantes Syndapin I ist auch im postsynaptischen Kompartiment lokalisiert

Die Lokalisationsanalysen mit rekombinantischem Syndapin I in Neuronen dienten der gezielten Untersuchung der Lokalisation von Syndapin I im postsynaptischen Kompartiment. Mittels der Analyse von Postsynapsen Syndapin I-überexprimierender Neuronen konnte bei geringer Transfektionsrate speziell die Lokalisation des rekombinanten Syndapin I im postsynaptischen Kompartiment, welches nur von Neuronen mit unverändertem Syndapin I-Expressionsniveau kontaktiert wurde, untersucht werden. Diese wurde mit Xpress-Syndapin I-exprimierenden Neuronen durchgeführt, welche gegen Syndapin I und jeweils gegen entsprechende Marker für das prä- und postsynaptische sowie das dendritische Kompartiment immungefärbt wurden (Abb. 13). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Syndapin I-Signals zeigte sowohl rekombinantes Syndapin I als auch davon klar abgrenzbares endogenes Syndapin I (13A-C, Pfeilspitzen). Rekombinantes Syndapin I wurde in Dornfortsätzen exprimiert, welche von Bassoon-positiven Präsynapsen einer nicht-transfizierten Zelle kontaktiert wurden (Abb. 13A). Die Koimmunfärbung mit dem dendritischen Markerprotein MAP2 bestätigte deutlich, dass Syndapin I in Dornfortsätzen, die sich von MAP2-positiven Dendriten abzweigen, lokalisiert ist (Abb. 13B). Durch die PSD-95-Markierung der Dornfortsatzköpfe von Syndapin I-positiven Dornfortsätzen wurde weitergehend bewiesen, dass diese Dornfortsätze eine morphologische Postsynapse aufweisen (Abb. 13C, Pfeilspitzen in Vergrößerung).



**Abbildung 13: Die Expression von Epitop-markiertem Syndapin I zeigte eine Lokalisation von Syndapin I im postsynaptischen Kompartiment.** A-C, Dargestellt ist die Koimmunfärbung von Xpress-Syndapin I (anti-Syndapin I) mit Markern für das präsynaptische (A, anti-Bassoon), dendritische (B, anti-MAP2) und postsynaptische (C, anti-PSD-95) Kompartiment von primären hippocampalen Rattenneuronen an DIV14. Die Koimmunfärbung mit Bassoon (A) resultierte nur in einer geringen Kolokalisation mit postsynaptischem Syndapin I und markierte präsynaptische Kontakte auf transfizierten Dornfortsätzen. Die MAP2-Immunfärbung (B) zeigte klar, dass Syndapin I-positive Dornfortsätze aus den MAP2-positiven Dendriten austreten. Die Syndapin I-immungefärbten Dornfortsatzköpfe waren PSD-95-positiv (C, Pfeile in Ausschnitten). Pfeilspitzen zeigen endogenes Syndapin I, das deutlich von rekombinantischem Syndapin I unterschieden werden konnte. Ausschnitte sind zweifache Vergrößerungen der umrahmten Areale. Syndapin I ist in rot, Bassoon, MAP2 bzw. PSD-95 sind in grün in Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 10 µm.

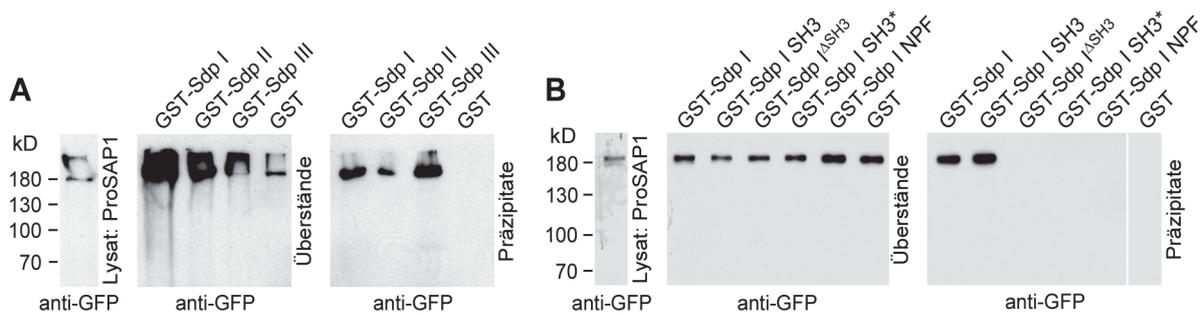
## 3.2 Syndapin I interagiert mit ProSAP/Shank-Proteinen

### 3.2.1 Syndapin I interagiert mit Proteinen der ProSAP/Shank-Familie *in vitro*

Postsynaptische Funktionen von Syndapin I waren bislang nur wenig untersucht. Der hier beobachtete Befund, dass der postsynaptische Syndapin I-Depletionsphänotyp von SH3-Domänen-vermittelten Funktionen abhängig ist (Kap. 3.1), deutete auf Syndapin I-Interaktionspartner hin, die in der Postsynapse angereichert sind. Die beschriebene NPF-Motiv-vermittelte Interaktion von Syndapin I mit der NR3A-Untereinheit von NMDA-Rezeptoren unreifer Postsynapsen lieferte erste Hinweise auf eine postsynaptische Funktion von Syndapin I als wichtiger Faktor während der Entwicklung von Postsynapsen (PÉREZ-OTAÑO et al., 2006). Da die in den Rettungsexperimenten (Abb. 8 und 10) verwendete Syndapin I-Deletionsmutante ohne SH3-Domäne jedoch die NPF-Motive enthielt, sind die hier beobachteten Effekte in der Tat spezifisch auf gestörte SH3-Domänen-vermittelte Interaktionen zurückzuführen.

Die im Vorfeld dieser Arbeit in dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Suchen nach neuen Syndapin I-Interaktionspartnern mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems in *complementary DNA* (cDNA)-Bibliotheken adulter Mausgehirne hatten jedoch keine Hinweise auf vorwiegend postsynaptische Proteine geliefert. Erste Kopräzipitationsanalysen von Prof. Dr. Britta Qualmann mit der Syndapin I SH3-Domäne identifizierten ProSAP1 und ProSAP2 als mögliche Bindungspartner von Syndapin I. Proteine der ProSAP/Shank-Familie stellen die Hauptgerüstproteine der PSD dar, indem sie Neurotransmitterrezeptorkomplexe und Aktinzytoskelettkomponenten miteinander verbinden (BÖCKERS et al., 1999b; 2001; NAISBITT et al., 1999; TU et al., 1999). Weitere in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tobias Böckers, Universität Ulm, durchgeführte Suchen nach neuen ProSAP/Shank-Interaktionspartnern mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems mit eingesetzten ProSAP2-Proteinstücken als Köder identifizierten Syndapin I als möglichen Kandidaten. Diese Ergebnisse gaben somit erste Hinweise auf eine Interaktion der Proteine der Syndapin- und der ProSAP/Shank-Familien. Um die Interaktion zwischen den Syndapin- und ProSAP-Proteinen zu bestätigen und detailliert zu charakterisieren, wurden im Folgenden Kopräzipitationsanalysen durchgeführt.

Die zu diesem Zweck von Dr. Rashmi Ahuja Toivanen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Britta Qualmann, durchgeführten ersten Kopräzipitationsanalysen zeigten, dass alle drei Syndapin-Isoformen der Syndapin-Proteinfamilie in der Lage sind, GFP-ProSAP1 zu präzipitieren (Abb. 14A). Weiterhin wurde in diesen Kopräzipitationsstudien durch den Einsatz verschiedener Syndapin I-Deletionsmutanten nachgewiesen, dass die Syndapin I-Bindung an ProSAP1 über die Syndapin I SH3-Domäne vermittelt wird und diese ausreichend für die Präzipitation von GFP-ProSAP1 ist. Dabei ergab der Kopräzipitationsversuch mit der P434L-Mutante der SH3-Domäne (SH3<sup>\*</sup>), dass es sich bei der Interaktion um eine klassische SH3-Domänen/PxxP-Interaktion handelt (Abb. 14B).



**Abbildung 14: Proteine der Syndapin-Familie interagierten SH3-Domänen vermittelt mit ProSAP1. A, B,** Westernblotanalysen von Kopräzipitationen zeigten, dass GST-Syndapin (Sdp) I, II und III in HEK293-Zellen exprimiertes GFP-ProSAP1 aus Zelllysaten präzipitierten (**A**). Die Syndapin I SH3-Domäne erwies sich als notwendig und ausreichend für die Präzipitation von GFP-ProSAP1 mit GST-Syndapin I (**B**). Die Syndapin I SH3-Domänenmutante (Sdp I SH3\*, P434L) sowie Syndapin I-Deletionsmutanten, die die C-terminale SH3-Domäne nicht enthalten (Sdp I $\Delta$ SH3; Sdp I NPF), präzipitierten in HEK293-Zellen exprimiertes GFP-ProSAP1 nicht aus Zelllysaten (**B**). Weiße Linien kennzeichnen ausgesparte Proben auf den Blots (**B**). Die hier gezeigten Analysen wurden von Dr. Rashmi Ahuja Toivanen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Britta Qualmann, durchgeführt.

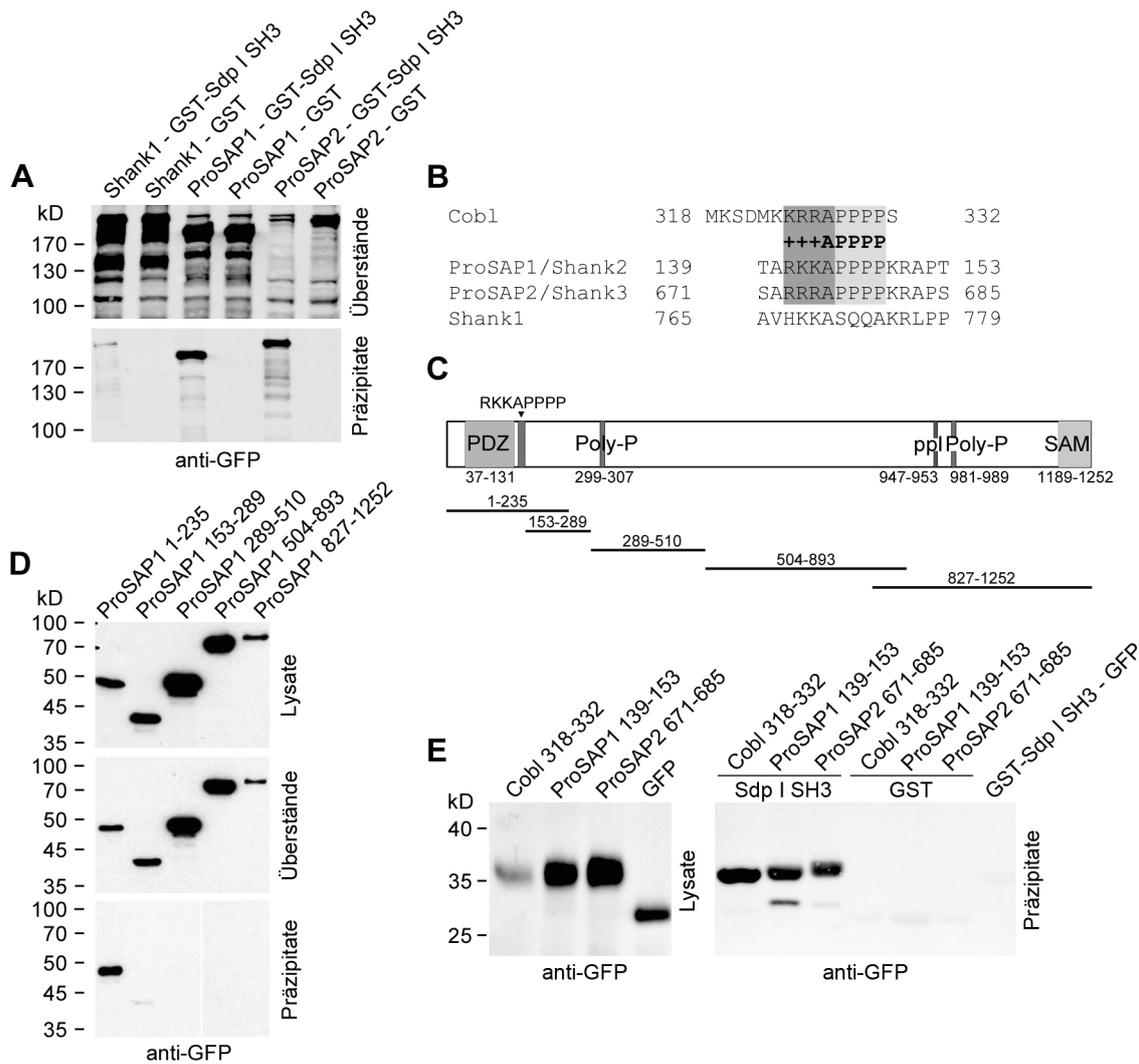
Die während dieser Arbeit durchgeführten Kopräzipitationsanalysen mit allen drei Isoformen der ProSAP-Proteinfamilie, Shank1, ProSAP1 und ProSAP2, zeigten, dass bemerkenswerterweise nur ProSAP1 und ProSAP2 durch die Syndapin I SH3-Domäne gebunden wurden (Abb. 15A).

Auch eine genomweite *in silico*-Suche nach SH3-Domänen-Bindungspartnern unter der Verwendung einer von Dr. Lukas Schwintzer kürzlich etablierten Konsensus-Sequenz (Doktorarbeit SCHWINTZER, 2012) identifizierte die postsynaptisch angereicherten Proteine ProSAP1 und ProSAP2 als mögliche Interaktionspartner von Syndapin SH3-Domänen und gab erste Hinweise auf die putativen Bindungsmotive in ProSAP/Shank.

Bei einem Sequenzvergleich der drei ProSAP-Isoformen mit einem der KrRAPpPP-Motive von Cobl (SCHWINTZER et al., 2011) wurde in ProSAP1 und ProSAP2 eine konservierte +++APPPP-Sequenz im N-terminalen Bereich der Proteine identifiziert, wohingegen der entsprechende Sequenzbereich in Shank1 kein vergleichbares Motiv aufwies (Abb. 15B).

Weitere im Vorfeld dieser Arbeit von Dr. Rashmi Ahuja Toivanen durchgeführte Kopräzipitationsanalysen bestätigten überzeugend, dass von allen getesteten ProSAP1-Deletionsmutanten nur der ProSAP1 N-Terminus (Aminosäuren 1-235) durch Syndapin I präzipitiert wurde. Dieser enthielt die Aminosäurereste RKKAPPPP (Aminosäuren 141-148), die mit der identifizierten +++APPPP-Konsensussequenz übereinstimmten (Abb. 15C, D).

Dieser Befund führte zu der Fragestellung, ob das vorgeschlagene +++APPPP-Motiv in der Tat der Syndapin I SH3-Domänen-Bindestelle entsprach. Um dies zu untersuchen, erfolgten Kopräzipitationsanalysen mit kurzen GFP-Fusionspeptiden, welche die +++APPPP-Motive von ProSAP1 bzw. ProSAP2 enthielten. Als Positivkontrolle diente ein bekanntes Syndapin I SH3-Domänen-bindendes Peptid, welches ein KrRAPpPP-Motiv von Cobl enthielt (SCHWINTZER et al., 2011). Es wurden alle drei GFP-Fusionspeptide durch die Syndapin I SH3-Domäne eindeutig präzipitiert (Abb. 15E).



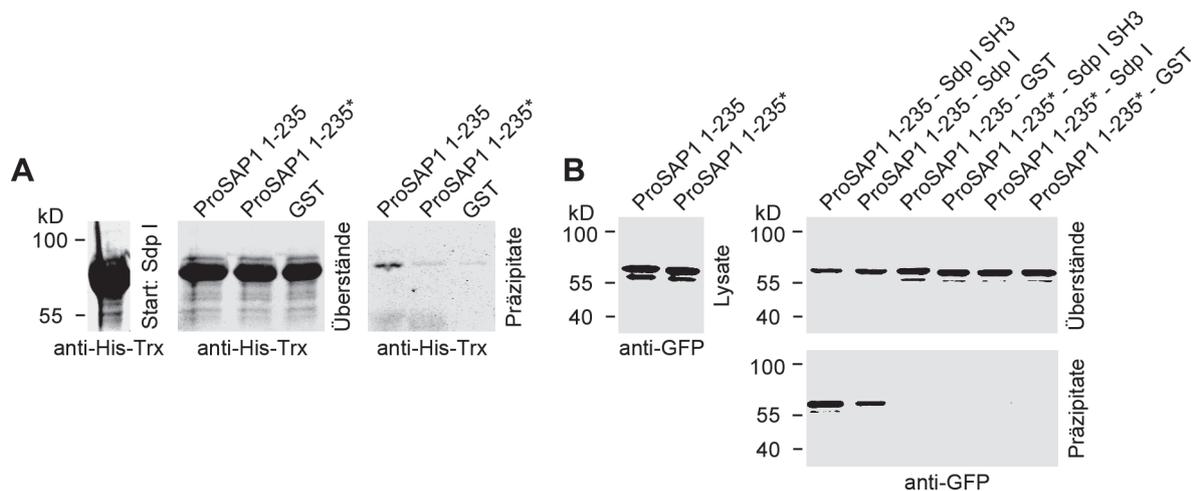
**Abbildung 15: Syndapin I interagiert mit den postsynaptischen Proteinen ProSAP1 und ProSAP2 über ein konserviertes N-terminales +++APPPP-Motiv in ProSAP/Shank.** **A, D, E,** Dargestellt sind mittels Westernblot analysierte Kopräzipitationen von aufgereinigten GST-Fusionsproteinen mit in HEK293-Zellen exprimierten GFP-Fusionsproteinen. **A,** GFP-ProSAP1 und GFP-ProSAP2, jedoch nicht GFP-Shank1, wurden durch die GST-Syndapin I SH3-Domäne aus Zelllysaten präzipitiert. **B,** Gezeigt ist ein Sequenzvergleich der N-terminalen +++APPPP-Konsensusmotive in ProSAP1 und ProSAP2 und der korrespondierenden Aminosäuren in Shank1 mit einer Syndapin I-Bindungsstelle des Aktinnukleators Cob1. Die GI-Nummern der verwendeten Referenzsequenzen sind in Kapitel 2.1.5 aufgeführt. **C,** Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Ratten-ProSAP1b-Proteins und dessen verwendeter Deletionsmutanten. PDZ, PDZ-Domäne; Poly-P, prolinreiche Bereiche; ppI, prolinreiches Motiv der Sequenz KPPVPPKP, welches die Interaktion mit Cortactin vermittelt (Du et al., 1998); SAM, steriles Alpha-Motiv. **D,** GST-Syndapin I präzipitierte den ProSAP1 N-Terminus (GFP-ProSAP1 1-235) aus Zelllysaten, jedoch keine der anderen getesteten GFP-ProSAP1-Deletionsmutanten. **E,** GFP-Fusionspeptide der +++APPPP-Motive von ProSAP1, ProSAP2 und Cob1 banden an die immobilisierte GST-Syndapin I SH3-Domäne, jedoch nicht an GST. Weiße Linien kennzeichnen ausgesparte Proben auf den Blots (**D**). Die in **D** gezeigten Analysen wurden von Dr. Rashmi Ahuja Toivanen durchgeführt.

Ausgehend von den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Effekten von Syndapin I auf die Bildung und Entwicklung unreifer Postsynapsen sowie der kürzlich erschienenen Studie, die ProSAP1 als die am häufigsten exprimierte Isoform in sich entwickelnden Postsynapsen identifizierte (GRABRUCKER et al., 2011), wurde sich im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf die Interaktion von Syndapin I mit ProSAP1 konzentriert. Um zu überprüfen, ob es sich bei der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion um eine direkte Interaktion handelt, erfolgten direkte

Kopräzipitationsanalysen mit aufgereinigten GST- und His-Trx-Fusionsproteinen. His-Trx-Syndapin I wurde dabei durch den immobilisierten GST-ProSAP1 N-Terminus präzipitiert, was die direkte Bindung beider Proteine bewies. Durch Mutation der Aminosäuren 141-150 in ProSAP1 (RKKAPPPPKR zu GAGAAAAAAG) wurde die Syndapin I-Bindung mit dem ProSAP1 N-Terminus sichtbar unterdrückt (Abb. 16A).

Weitere Kopräzipitationsanalysen mit der Mutante des ProSAP1 N-Terminus als GFP-Fusionsprotein zeigten klar, dass die Präzipitation sowohl mit immobilisiertem GST-Syndapin I als auch mit der immobilisierten GST-Syndapin I SH3-Domäne durch diese ProSAP1-Mutation unterdrückt wurde (Abb. 16B).

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen eindrucksvoll, dass das mittels *in silico*-Suche identifizierte RKKAPPPP-Motiv in ProSAP1 die direkte Bindestelle der Syndapin I SH3-Domäne *in vitro* darstellt.



**Abbildung 16: Die Syndapin I/ProSAP1-Interaktion ist direkt und konnte durch Mutation des +++APPPP-Motivs im ProSAP1 N-Terminus gestört werden.** A, B, Westernblotanalysen von Kopräzipitationen zeigten, dass die Mutation der Aminosäuren RKKAPPPPKR (141-150) in ProSAP1 1-235 zu GAGAAAAAAG die direkte Bindung an die Syndapin I SH3-Domäne verhindert. Die Rekonstitution der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion mit aufgereinigten Proteinen zeigte, dass die Interaktion direkt ist (A). His-Trx-Syndapin I kopräzipitierte mit immobilisiertem GST-ProSAP1 N-Terminus (GST-ProSAP1 1-235), wohingegen die Mutation des +++APPPP-Motivs im ProSAP1 N-Terminus (ProSAP1 1-235\*) die Bindung an Syndapin I verhinderte (A). Die Präzipitation von GFP-ProSAP1 1-235 aus HEK293-Zelllysaten sowohl mit GST-Syndapin I als auch mit der GST-Syndapin I SH3-Domäne wurde durch die Mutation des +++APPPP-Motivs (ProSAP1 1-235\*) aufgehoben (B).

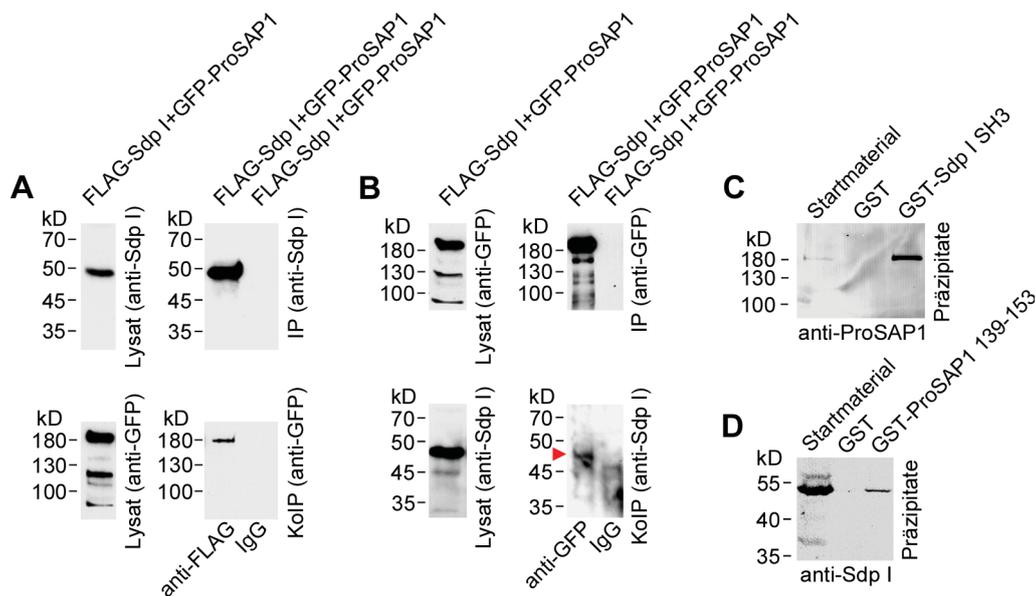
### 3.2.2 Syndapin I interagiert mit ProSAP1 in Zellen

#### 3.2.2.1 Syndapin I bildet mit ProSAP1 Komplexe in Zellen

Aus der *in vitro*-charakterisierten Interaktion von Syndapin I und ProSAP1 ergab sich die Vermutung, dass diese Interaktion auch in intakten Zellen stattfindet. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Komplexbildung biochemisch mittels heterologer Koimmunpräzipitationen sowie mit Kopräzipitationen endogener Proteine aus Gehirnextrakten mit aufgereinigten Fusionsproteinen und die intrazelluläre Komplexbildung mikroskopisch in intakten Zellen analysiert.

Die heterologen Koimmunpräzitationsstudien mit in HEK293-Zellen koexprimiertem FLAG-Syndapin I und GFP-ProSAP1 zeigten, dass durch die Immunpräzitation von FLAG-Syndapin I mit anti-FLAG-Antikörpern Syndapin I/ProSAP1-Komplexe präzipitiert und im Westernblotverfahren durch anti-Syndapin I und anti-GFP-Antikörper nachgewiesen werden konnten (Abb. 17A). Analog wurden in diesen Studien auch nach Immunpräzitation von GFP-ProSAP1 mit anti-GFP-Antikörpern Syndapin I/ProSAP1-Komplexe im Westernblotverfahren durch anti-GFP- und anti-Syndapin I-Antikörper nachgewiesen (Dr. Rashmi Ahuja Toivanen) (Abb. 17B).

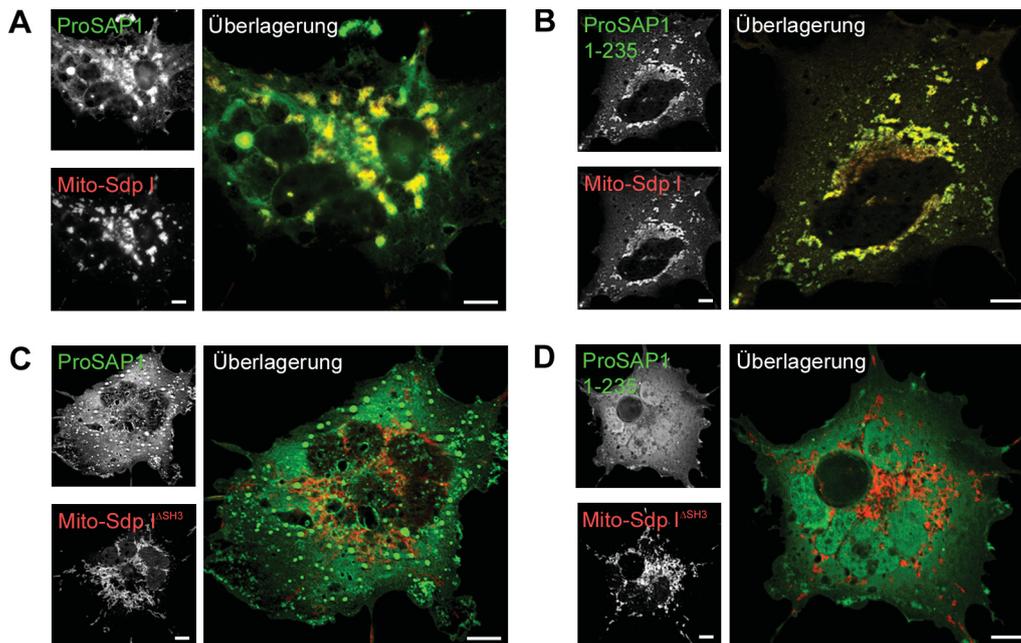
Durch Kopräzitationsstudien mit Maus- und Rattengehirnextrakten wurde ermittelt, ob sich Syndapin I/ProSAP1-Komplexe auch mit endogenem Startmaterial bildeten. Es wurde sowohl endogenes ProSAP1 spezifisch durch die immobilisierte GST-Syndapin I SH3-Domäne aus Mausgehirnextrakten präzipitiert (durchgeführt von Dr. Dennis Koch, Institut für Biochemie I, UKJ) als auch endogenes Syndapin I durch das immobilisierte GST-ProSAP1-RKKAPPPP-Peptid aus Rattengehirnextrakten präzipitiert (Abb. 17C, D).



**Abbildung 17: Syndapin I und ProSAP1 interagierten SH3-Domänen-abhängig in Zellen.** **A**, Gezeigt ist die spezifische Koimmunpräzitation (KoIP) von GFP-ProSAP1 mit anti-FLAG-immunpräzipitiertem FLAG-Syndapin I. **B**, Desweiteren wurde FLAG-Syndapin I (Pfeilspitze) spezifisch mit anti-GFP-immunpräzipitiertem GFP-ProSAP1 koimmunpräzipitiert. **C**, Die immobilisierte GST-Syndapin I SH3-Domäne präzipitierte spezifisch endogenes ProSAP1 aus Mausgehirnextrakten (Startmaterial). **D**, Endogenes Syndapin I wurde aus Rattengehirnextrakten durch immobilisiertes GST-ProSAP1-Fusionspeptid (ProSAP1 139-153), welches das RKKAPPPP-Motiv enthält, präzipitiert. Die in **A** und **B** gezeigten Analysen wurden von Dr. Rashmi Ahuja Toivanen und die in **C** gezeigten Analysen von Dr. Dennis Koch, Institut für Biochemie I, UKJ Jena, durchgeführt.

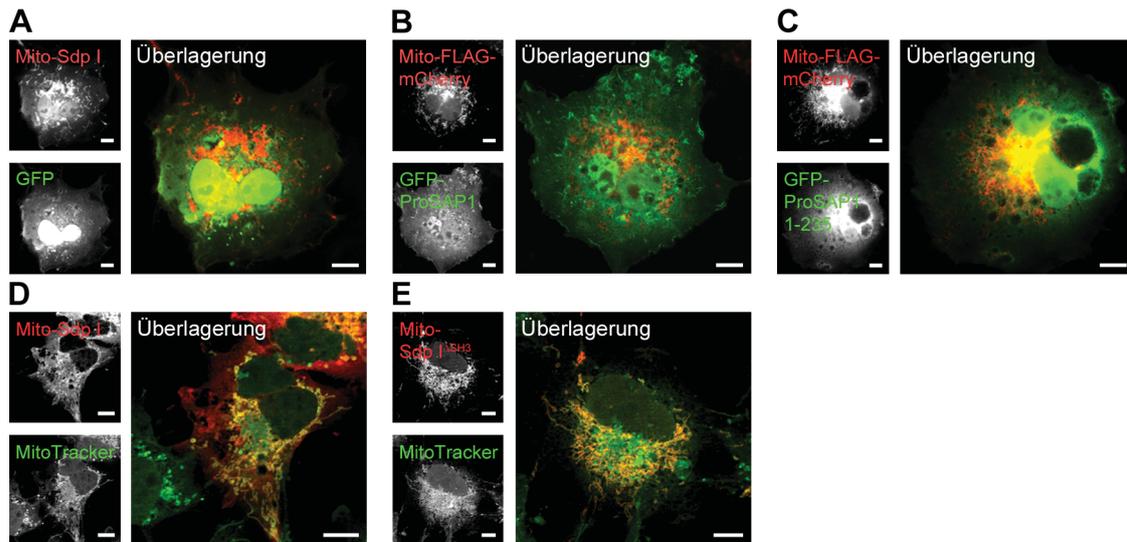
Um zu untersuchen, ob es sich bei der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung um ein während der Proteinextraktion entstandenes Artefakt handelte, wurden Rekrutierungsstudien in intakten COS7-Zellen durchgeführt (Abb. 18). Hierzu wurden verschiedene konstitutiv an die äußere Mitochondrienmembran gebundene (KESSELS und QUALMANN, 2002; MILLAR und SHORE, 1993) Mito-FLAG-mCherry-Syndapin I-Fusionsproteine mit GFP-ProSAP1 bzw. dem GFP-ProSAP1 N-Terminus koexprimiert und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch

analysiert. Dabei zeigte sich, dass ProSAP1 durch die Komplexbildung mit Syndapin I an die Mitochondrienmembran rekrutiert wurde und dort mit Syndapin I kolokalisierte (Abb. 18A). Konsistent mit der Identifikation der Syndapin I-Bindungsstelle im ProSAP1 N-Terminus *in vitro* (Abb. 15) wurde eine ProSAP1-Deletionsmutante, die den N-Terminus umfasste (ProSAP1 1-235), ebenfalls durch Syndapin I an die Mitochondrienmembran rekrutiert (Abb. 18B). Zur Bestätigung der *in vitro* erwiesenen SH3-Domänen-Abhängigkeit der Interaktion wurde eine Syndapin I-Deletionsmutante mit fehlender SH3-Domäne (Mito-Sdp I<sup>ΔSH3</sup>) eingesetzt, welche in der Tat nicht zur Akkumulation von ProSAP1 bzw. ProSAP1 1-235 an Mitochondrien befähigt war (Abb. 18C, D).



**Abbildung 18: Syndapin I und ProSAP1 interagierten SH3-Domänen-abhängig in Zellen.** A-D, Mitochondrienmembranverankertes Syndapin I (Mito-Sdp I) rekrutierte GFP-ProSAP1 (A) und GFP-ProSAP1 1-235 (B) in intakten COS7-Zellen, wohingegen eine mitochondrienmembranverankerte Syndapin I-Deletionsmutante ohne SH3-Domäne (Mito-Sdp I<sup>ΔSH3</sup>) dazu nicht befähigt war (C, D). ProSAP1 ist in grün, Mito-Syndapin I ist in rot in den Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 10 µm.

In Kontrollexperimenten zeigte sich keine unspezifische Rekrutierung von GFP an die Mitochondrienmembran durch Mito-Syndapin I (Abb. 19A). Ebenso zeigten die Experimente mit GFP-ProSAP1 bzw. GFP-ProSAP1 1-235 in Koexpression mit Mito-FLAG-mCherry keine unspezifische Rekrutierung von ProSAP1 (Abb. 19B, C). Weitere Kontrollexperimente zeigten die Überlagerungen der Signale der mit MitoTracker<sup>®</sup> fluoreszenzmarkierten Mitochondrien der Zellen mit den Mito-FLAG-mCherry-Signalen (Abb. 19D, E).



**Abbildung 19: Kontrollen der Rekrutierungsstudien in intakten COS7-Zellen.** **A**, Koexprimiertes GFP wurde durch mitochondrienmembranverankertes Syndapin I (Mito-Sdp I) nicht korekrutiert. **B**, GFP-ProSAP1 wurde nicht durch koexprimiertes Mito-FLAG-mCherry rekrutiert. **C**, GFP-ProSAP1 1-235 wies keine Rekrutierung durch koexprimiertes Mito-FLAG-mCherry auf. **D**, **E**, Die Kolokalisationen von Mito-Sdp I (**D**) bzw. Mito-Sdp I<sup>ΔSH3</sup> (**E**) mit den durch MitoTracker<sup>®</sup> Deep Red FM (MitoTracker) angefärbten Mitochondrien zeigten die spezifische Lokalisation der Mito-Fusionsproteine an die Mitochondrien. Mito-Sdp I bzw. Mito-FLAG-mCherry sind in rot, GFP bzw. GFP-ProSAP1 sowie MitoTracker sind in grün in Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 10 µm.

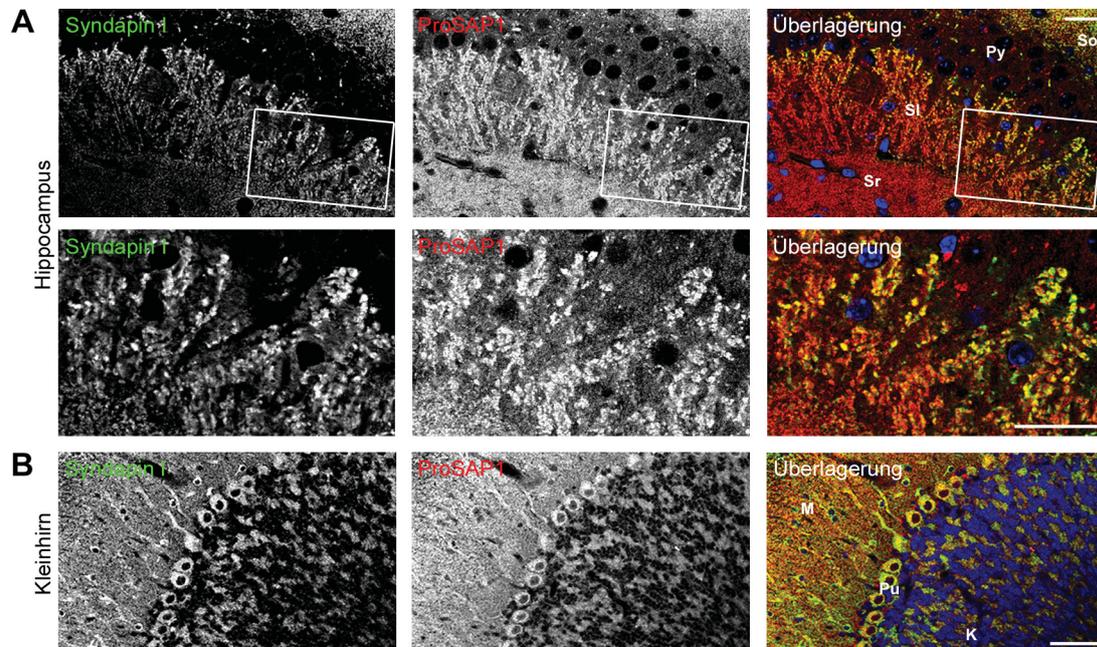
Zusammenfassend bestätigten die hier gezeigten Untersuchungen deutlich die in den *in vitro*-Studien gezeigte Interaktion zwischen dem N-terminalen ProSAP1 RKKAPPPP-Motiv und der Syndapin I SH3-Domäne. Sie zeigten außerdem, dass die Interaktion von Syndapin I mit ProSAP1 auch in lebenden Zellen stattfindet und ausreichend ist, um ProSAP1 an bestimmte Bereiche in der Zelle zu rekrutieren.

### 3.2.2.2 Syndapin I kolokalisiert mit ProSAP1 in Neuronen

Syndapin I ist in adulten Mausgehirngeschnitten im Großhirn besonders im Hippocampus und im Kleinhirn angereichert (PLOMANN et al., 1998). Diese sind Bereiche starker Synapsenbildung und synaptischer Plastizität während Gedächtnisbildungs- und Lernprozessen (BLISS und LØMO, 1973; HEBB, 2002; KANDEL und SCHWARTZ, 1982; MARR, 1969). Auch die Proteine der ProSAP/Shank-Familie sind in dendritischen Arealen des Hippocampus (*Stratum radiatum* und *Stratum oriens*) und in der Molekular- (Shank1 und ProSAP1) bzw. Körnerschicht (ProSAP2) des Kleinhirns besonders stark exprimiert (BÖCKERS et al., 1999a; 1999b; 2004; LIM et al., 1999).

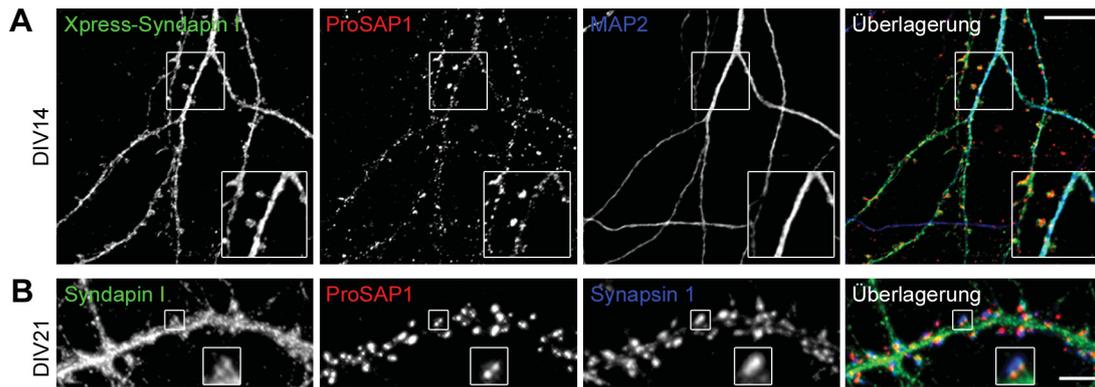
Um der interessanten Fragestellung nachzugehen, ob Syndapin I und ProSAP1 im Zellverband in räumlicher Nähe zueinander stehen, wurden konfokale Aufnahmen von anti-Syndapin I- und anti-ProSAP1-immunfluoreszenzgefärbten Gehirnschnitten adulter wildtypischer Mäuse angefertigt (Abb. 20). In Konsistenz mit den beschriebenen histologischen Beobachtungen für die individuellen Proteine zeigten sich deutliche Überlagerungen des Syndapin I-Signals mit dem ProSAP1-Signal vor allem im *Stratum lucidum* des Hippocampus. Dies stellt einen

gesonderten Hippocampusbereich des *Stratum radiatum* in der CA3-Region dar, welcher eine Großzahl von Moosfasersynapsen aufweist, deren boutonartige Präsynapse multiple synaptische Kontakte mit Dendriten der Pyramidenzellen ausbildet (CHICUREL und HARRIS, 1992) (Abb. 20A). Weiterhin zeigte sich eine Syndapin I/ProSAP1-Kolokalisation in Purkinjezellen der Kleinhirnrinde sowohl in Zellkörpern als auch in Dendritenbäumen (Abb. 20B).



**Abbildung 20: Syndapin I und ProSAP1 kolokalisierten in Hippocampus- und Kleinhirnarealen.** Anti-Syndapin I- und anti-ProSAP1-Immunfärbungen in Gehirnschnitten adulter Mäuse zeigten eine ausgedehnte Kolokalisation von Syndapin I und ProSAP1 sowohl in Multisynapsen der Moosfasern im *Stratum lucidum* der hippocampalen CA3-Region (A) als auch in der Purkinjezellschicht des Kleinhirns (B). Ausschnitte sind 2,5-fache Vergrößerungen der umrahmten Areale. Sl, *Stratum lucidum*; So, *Stratum oriens*; Sr, *Stratum radiatum*; Py, Pyramidalzellschicht; K, Körnerschicht; M, Molekularschicht; Pu, Purkinjezellschicht. Syndapin I ist in grün, ProSAP1 ist in rot und die Kernfärbung (DAPI) in blau in Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 25  $\mu$ m.

In Immunfluoreszenzfärbungen hippocampaler Neuronenkulturen zeigte sich, dass sowohl rekombinantes, Xpress-markiertes, als auch endogenes Syndapin I mit endogenem ProSAP1 in Köpfen dendritischer Dornfortsätze kolokalisierte (Abb. 21). Eine Gegenfärbung des Dendriten zeigte dabei, dass sich rekombinantes Syndapin I im Gegensatz zu endogenem ProSAP1 neben der postsynaptischen Lokalisation auch stark im dendritischen Kompartiment anreicherte (Abb. 21A). Besonders in den Koimmunfluoreszenzfärbungen von endogenem Syndapin I und ProSAP1 zusammen mit dem präsynaptischen Marker Synapsin 1 in stark ausgereiften Neuronen ist eine klare Anreicherung von Syndapin I und ProSAP1 in Dornfortsatzköpfen, die von Präsynapsen kontaktiert werden, sichtbar (Abb. 21B).



**Abbildung 21: Syndapin I und ProSAP1 kolokalisierten in Neuronen.** **A**, Immunfärbungen primärer hippocampaler Rattenneurone transfiziert mit Syndapin I an DIV12 und gefärbt gegen Syndapin I, ProSAP1 und den dendritischen Marker MAP2 an DIV14 zeigten, dass Syndapin I mit ProSAP1 in Dornfortsatzköpfen kolokalisierte. Ausschnitte sind 1,5-fache Vergrößerungen der umrahmten Areale. Größenbalken: 10 µm. **B**, Endogenes Syndapin I kolokalisierte mit ProSAP1 in synaptischen Bereichen kogefärbt mit dem präsynaptischen Markerprotein Synapsin 1 in primären hippocampalen Rattenneuronen an DIV21. Ausschnitte sind zweifache Vergrößerungen der umrahmten Areale. Syndapin I ist in grün, ProSAP1 ist in rot und MAP2 bzw. Synapsin 1 sind in blau in Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 5 µm.

Die Überlagerung in der Lokalisation von Syndapin I und ProSAP1 im Gewebeverband und auf intrazellulärer Ebene war damit konsistent mit den gezeigten Befunden der Analyse von Syndapin I/ProSAP1-Komplexen in intakten Zellen.

### 3.3 Syndapin I kooperiert mit ProSAP1 in der Postsynapsenbildung

Die bisher dargestellten Daten bewiesen deutlich, dass Syndapin I eine wichtige Rolle in der Postsynapsenbildung spielt (Kap. 3.1) und dass darüber hinaus Syndapin I SH3-Domänen-vermittelt und direkt mit einem dem SH3-Domänen-Bindungskonsensus-folgenden +++APPPP-Motiv im ProSAP1 N-Terminus *in vitro* und in Zellen interagiert (Kap. 3.2). Proteine der ProSAP/Shank-Familie nehmen als Gerüstproteine der PSD eine wichtige Rolle in der Organisation von Neurotransmitterrezeptorkomplexen und in der Verknüpfung der PSD mit dem Aktinzytoskelett des Dornfortsatzkopfes ein (BÖCKERS et al., 2002; 2006; SHENG und KIM, 2000). Bisherige Studien der ProSAP/Shank-assoziierten Proteine Cortactin und Abp1 trugen zum Verständnis der Regulation des Zytoskeletts dendritischer Dornfortsätze während deren Reifung und aktivitätsabhängigen morphologischen Veränderung bei (HÄCKEL et al., 2008; HERING und SHENG, 2003), dennoch bleibt die räumliche und zeitliche Organisation postsynaptischer Komponenten während der Postsynapsenbildung weitgehend unverstanden. Aufgrund der hier beschriebenen Interaktion mit ProSAP1 und der bereits bekannten Syndapin I-Funktionen in der Verknüpfung von SH3-Domänen-Interaktionspartnern mit Membranmodulationsvorgängen (DHARMALINGAM et al., 2009; ITOH et al., 2005; KOCH et al., 2011; SCHÜLER et al., 2013; SCHWINTZER et al., 2011) stellt Syndapin I einen möglichen Kandidaten für die räumliche und zeitliche Organisation von ProSAP/Shank-Proteinen während der Dornfortsatzbildung dar. Inwieweit die hier beobachteten Syndapin I-Funktionen

in der Postsynapsenbildung im direkten Zusammenhang mit der ProSAP1-Interaktion und weiterer Syndapin I Domänenfunktionen stehen und inwiefern Syndapin I eine organisatorische Rolle für die ProSAP1-Lokalisation spielt, wurde im Folgenden mittels proteinbiochemischer und funktioneller Studien an Neuronen untersucht.

### **3.3.1 Die Bildung & Morphologie von Postsynapsen ist von der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion abhängig**

#### **3.3.1.1 Die Funktionen von ProSAP1 sind von der Anwesenheit & Komplexbildung mit Syndapin I abhängig**

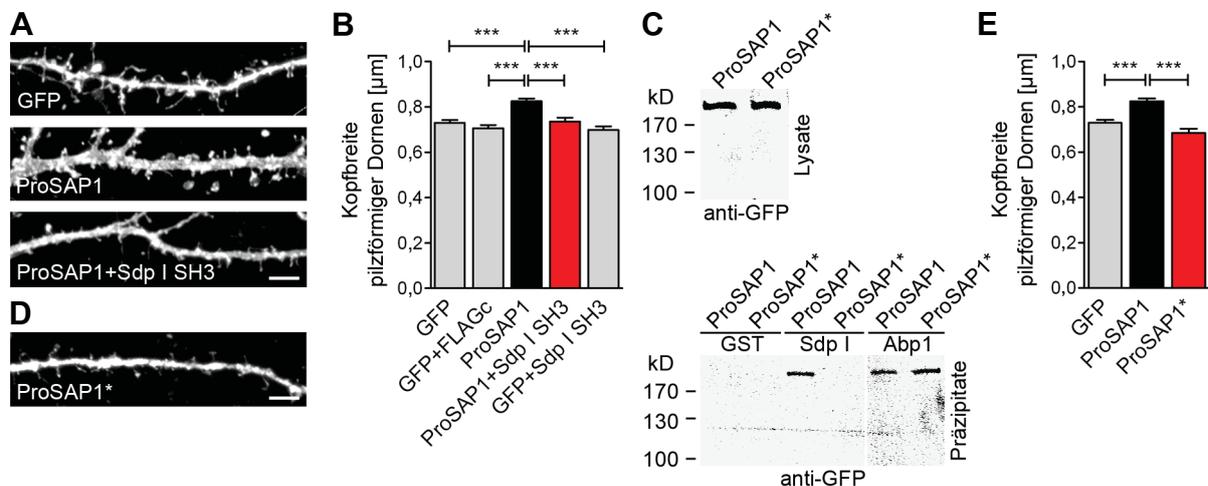
Bereits in vorhergehenden Studien an ProSAP/Shank-Proteinen wurde ein ProSAP/Shank-Überexpressionsphänotyp einer Kopfaufweitung bei pilzförmigen Dornfortsätzen beschrieben (HÄCKEL et al., 2008; SALA et al., 2001). Dieser ProSAP/Shank-Phänotyp wurde in dieser Arbeit für ProSAP1 reproduziert und für funktionelle Untersuchungen der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion genutzt (Abb. 22 und 23). Vorrausgesetzt, dass ProSAP1-Funktionen in der Tat durch Syndapin I/ProSAP1-Komplexe vermittelt oder beeinflusst werden, sollte bei einer Störung der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung der ProSAP1-Überexpressionsphänotyp deutlich beeinträchtigt sein. Diese interessante Hypothese wurde im Folgenden mittels verschiedener Überexpressions- und RNAi-Studien in primären hippocampalen Neuronen untersucht. In quantitativen Studien im Zeitraum der Dornfortsatzbildung (DIV12-14) zeigte die morphologische Analyse und Klassifizierung der Dornfortsätze eine Kopfaufweitung pilzförmiger Dornfortsätze unter der Überexpression von GFP-ProSAP1 um 14% im Vergleich zu GFP-exprimierenden Kontrollzellen (Abb. 22A, B).

Durch Koüberexpression der Syndapin I SH3-Domäne als FLAG-mCherry-Fusionsprotein wurde untersucht, ob die Syndapin I SH3-Domäne die Syndapin I-Bindestelle in ProSAP1 als dominant-negative Mutante blockiert und somit eine Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung verhindert. Tatsächlich unterdrückte die Koexpression der Syndapin I SH3-Domäne den ProSAP1-induzierten Kopfaufweitungseffekt vollständig: Die Kopfbreiten zeigten sich zu GFP-ProSAP1-exprimierenden Zellen signifikant verringert und unterschieden sich nicht vom Niveau in GFP-Kontrollzellen (Abb. 22A, B). Als weitere Kontrollen dienten Zellen, in denen GFP mit FLAG-mCherry (FLAG<sub>c</sub>) bzw. GFP mit der FLAG-mCherry-Syndapin I SH3-Domäne koexprimiert wurde. In diesen Neuronen unterschieden sich die Kopfbreiten pilzförmiger Dornfortsätze jeweils nicht von denen der GFP-Kontrolle.

Da mit der Überexpression der Syndapin I-SH3-Domäne auch die Funktion weiterer SH3-Domänen-Syndapin I-Interaktionspartner in transfizierten Neuronen blockiert wird, können mögliche Effekte auf die Dornfortsatzmorphologie durch einen möglichen Funktionsverlust dieser Proteine nicht ausgeschlossen werden. Um zu untersuchen, ob in der Tat Syndapin I/ProSAP1-Komplexe wichtig für die Bildung reifer Dornfortsätze sind, wurde anschließend eine GFP-ProSAP1-Mutante (ProSAP1\*) mit mutierter Syndapin I-Bindestelle (Aminosäuren 141-150, RKKAPPPPKR zu GAGAAAAAGA, vgl. Abb. 16) in quantitativen Studien der Dornfortsatzmorphologie eingesetzt. Zur Adressierung der Spezifität der generierten Mutante

in Hinblick auf SH3-Domänen-enhaltende Interaktionspartner wurden zunächst Kopräzitationsanalysen durchgeführt. Sie zeigten, dass diese ProSAP1-Mutation die Bindung zu Syndapin I vollständig unterdrückte, jedoch die Bindung zu Abp1, die ebenfalls über eine SH3-Domänen-Interaktion vermittelt wird (QUALMANN et al., 2004), nicht beeinflusste (Abb. 22C).

Durch den Einsatz von ProSAP1\* war es daher möglich, den Einfluss der Komplexbildung mit Syndapin I abgegrenzt von ProSAP1/Abp1-Funktionen zu untersuchen. Unter GFP-ProSAP1\*-Überexpression wurden keine signifikant erhöhten Kopfbreiten pilzförmiger Dornfortsätze festgestellt und die Kopfbreiten pilzförmiger Dornfortsätze ähnelten denen der GFP-Kontrolle (Abb. 22D, E). Damit zeigte sich klar die Abhängigkeit der ProSAP1-vermittelten Kopfaufweitung von der Syndapin I-Bindestelle in ProSAP1.

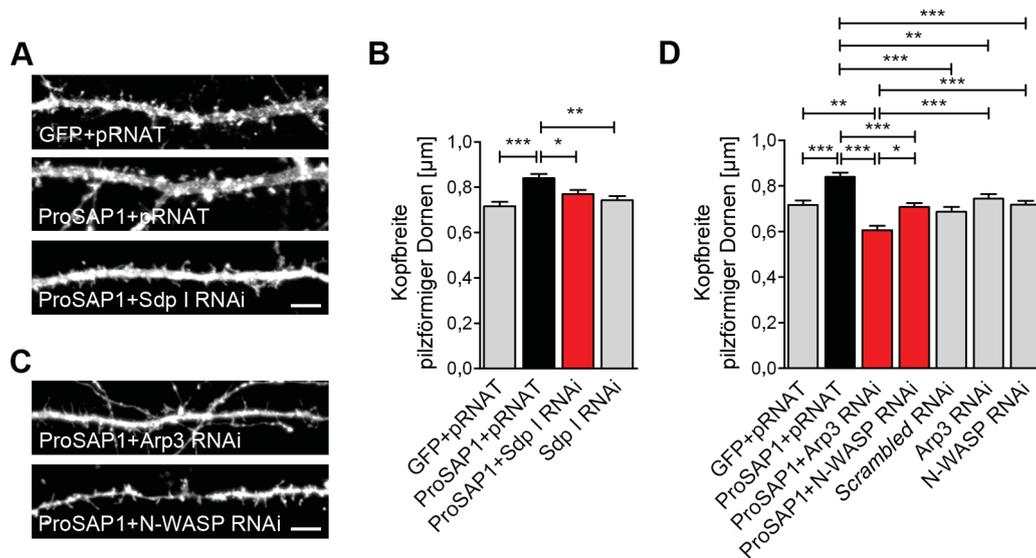


**Abbildung 22: ProSAP1-vermittelte Funktionen in Dornfortsatzköpfen waren von der Komplexbildung mit Syndapin I abhängig.** Die ProSAP1-vermittelte Kopfaufweitung pilzförmiger Dornen wurde durch die Koexpression der Syndapin I SH3-Domäne zur Blockierung der Syndapin I-Bindestelle von ProSAP1 (A, B) sowie durch die Mutation der Syndapin I-Bindestelle in ProSAP1 (AS 141-150, RKKAPPPPKR zu GAGAAAAAAG) (C-E) unterdrückt. A, D, Beispielbilder zeigen Dendritenabschnitte primärer hippocampaler Rattenneurone (DIV14), die für die morphologischen Untersuchungen dendritischer Dornfortsätze genutzt wurden. Gezeigt sind die Signale von PM-mCherry, das zur Darstellung der Zellmorphologie koexprimiert wurde. Größenbalken: 5 µm. B, E, Quantifizierungen zeigten die Zunahme der Kopfbreiten pilzförmiger Dornen von GFP-ProSAP1-exprimierenden Zellen (ProSAP1) im Vergleich zu denen von GFP-Kontrollzellen (GFP) sowie von GFP- und FLAG-mCherry- (GFP+FLAGc) bzw. von GFP- und FLAG-mCherry-Syndapin I SH3-Domäne-koexprimierenden (GFP+Sdp I SH3) Kontrollzellen. Sichtbar sind die ausbleibenden Kopfeffekte bei der Koexpression von GFP-ProSAP1 und FLAG-mCherry-Syndapin I SH3-Domäne (B, ProSAP1+Sdp I SH3) sowie bei der Expression der GFP-ProSAP1-Mutante (E, ProSAP1\*). C, Die Präzipitationsanalysen mit immobilisierten SH3-Domänen von Syndapin I bzw. Abp1 mit wildtypischem GFP-ProSAP1 im Vergleich zu GFP-ProSAP1\* zeigten, dass speziell die Syndapin I SH3-Domänenbindung durch die Mutation des +++APPPP-Motivs in ProSAP1 beeinflusst war, wohingegen die Abp1 SH3-Domänenbindung davon nicht beeinflusst wurde.

Die in Abb. 22 dargestellten Befunde wiesen deutlich auf eine Rolle der SH3-Domänen/RKKAPPPP-Motiv-vermittelten Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung für ProSAP1-Funktionen in Dornfortsatzköpfen hin. Dennoch blieb nicht zweifelsfrei, ob diese Effekte direkt von der Anwesenheit von postsynaptischem Syndapin I abhängig waren oder ob sie sekundäre Effekte einer Blockierung eines unbekanntes Proteins waren. Um diese Frage zu klären, wurden im Folgenden quantitative Analysen ProSAP1-überexprimierender Neurone unter Syndapin I-Depletion durchgeführt. Vergleichend wurde in einem parallelen Ansatz die Dornfortsatzbildung unter Arp3-Depletion, einem Hauptbestandteil des Arp2/3-Komplexes, bzw. N-WASP-Depletion in ProSAP1-überexprimierenden Neuronen untersucht (Abb. 23).

Syndapin I-Depletion führte in GFP-ProSAP1-überexprimierenden Neuronen zur vollständigen Unterdrückung der ProSAP1-vermittelten Kopfaufweitung: Die Kopfbreiten pilzförmiger Dornen von Syndapin I siRNA- und GFP-ProSAP1-koexprimierenden Neuronen zeigten im Gegensatz zu GFP-ProSAP1 (ProSAP1)- und pRNAT-kotransfizierten Neuronen keinen signifikanten Unterschied zu GFP- und pRNAT-kotransfizierten Kontrollneuronen. Sie waren jedoch signifikant unterschiedlich zum ProSAP1-Effekt (Abb. 23A, B).

Analog zur Syndapin I-Depletion führte auch die Depletion von Arp3 bzw. N-WASP in ProSAP1-überexprimierenden Neuronen zu einer vollständigen Aufhebung der ProSAP1-vermittelten Kopfaufweitung und im Falle der N-WASP-Depletion zu ähnlichen Kopfbreiten wie von GFP- und pRNAT-kotransfizierten bzw. von *scrambled* RNAi-Kontrollneuronen. Die Arp3-Depletion führte in ProSAP1-überexprimierenden Zellen sogar zu einer signifikanten Verringerung der Kopfbreiten im Vergleich zu denen von GFP- und pRNAT-kotransfizierten sowie zu *scrambled* RNAi-Kontrollneuronen (Abb. 23C, D). Die hier durchgeführten Experimente zur Arp3- und N-WASP-Abhängigkeit des ProSAP1-Überexpressionsphänotypen sind mit denen in HÄCKEL et al. (2008) durchgeführten Analysen vergleichbar und die hier beschriebenen Ergebnisse entsprechen den in HÄCKEL et al. (2008) beobachteten Effekten. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Abhängigkeit der ProSAP1-vermittelten Funktion in der Stabilität und Modulation dendritischer Dornfortsatzköpfe von Komponenten des Aktinzytoskeletts. Sie zeigten eine zusätzliche Abhängigkeit von der postsynaptischen Anwesenheit von Syndapin I, die mittels Vektor-basierter RNAi gezielt depletiert werden konnte.

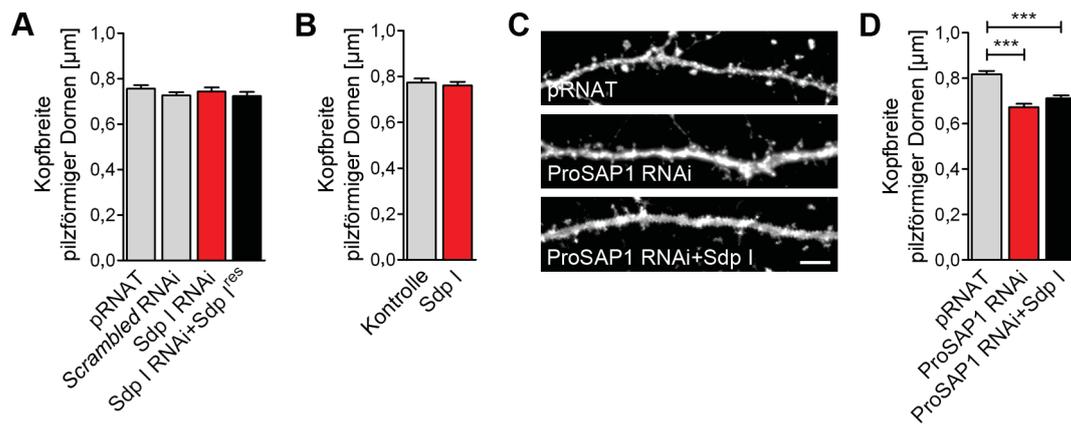


**Abbildung 23: Postsynaptisches Syndapin I erwies sich als wichtig für ProSAP1-vermittelte Funktionen in Dornfortsatzköpfen.** Der ProSAP1-vermittelte Kopfaufweitungseffekt bei pilzförmigen Dornfortsätzen primärer hippocampaler Rattenneurone (DIV14) wurde durch Syndapin I-Depletion (**A**, **B**) sowie durch Arp3- bzw. N-WASP-Depletion (**C**, **D**) unterdrückt. **A**, **C**, Beispielbilder zeigen die PM-mCherry-Signale, die für die morphologischen Auswertungen genutzt wurden. Größenbalken: 5 µm. **B**, **D**, Die Quantifizierungen zeigten, dass sich die Kopfbreiten pilzförmiger Dornen in GFP-ProSAP1-exprimierenden Neuronen unter Koexpression von Syndapin I siRNA (**B**, ProSAP1+Sdp I RNAi) bzw. Arp3 siRNA (**D**, ProSAP1+Arp3 RNAi) oder N-WASP siRNA (**D**, ProSAP1+N-WASP RNAi) signifikant von denen der ProSAP1-überexprimierenden Neuronen (ProSAP1+pRNAT) unterschieden. Diese alleinige ProSAP1-Überexpression führte zu einem signifikanten Kopfaufweitungseffekt im Vergleich zu pRNAT- und GFP-kotransfizierten Kontrollneuronen (pRNAT+GFP) (**B**, **D**). Im Gegensatz dazu kam es durch die jeweilige Koexpression mit Syndapin I siRNA, Arp3 siRNA bzw. N-WASP siRNA zu keinem signifikanten Kopfaufweitungseffekt verglichen mit der pRNAT+GFP-Kontrolle (**B**, **D**) und mit der *scrambled* RNAi (U6.1)-Kontrolle (**D**).

Interessanterweise führte weder die Depletion von Syndapin I mittels RNAi noch die Überexpression von Xpress-markiertem Syndapin I zu einer Veränderung der Kopfbreiten jeweils im Vergleich zu pRNAT-, zu *scrambled* RNAi- bzw. zu PM-mCherry-Kontrollzellen (Abb. 24A, B). Diese Befunde wiesen darauf hin, dass Syndapin I keine Rolle in der Modulation der Kopfbreite pilzförmiger Dornen einnimmt.

In den Studien von BERKEL et al. (2012) wurde kürzlich gezeigt, dass unter ProSAP1-Depletion die Dornfortsätze einen deutlichen Volumenverlust einhergehend mit vermehrt filopodienähnlicher Morphologie aufwiesen. Konsistent mit diesen Daten führte hier die Verwendung der in BERKEL et al. (2012) publizierten ProSAP1 RNAi Sequenz #2 zu einer Verringerung der Kopfbreite pilzförmiger Dornen im Vergleich zu pRNAT-Kontrollzellen. Interessanterweise führte eine Überexpression von FLAG-Syndapin I in ProSAP1 siRNA-exprimierenden Neuronen zu keiner Beeinflussung der verminderten Kopfbreite unter ProSAP1-Depletion (Abb. 24C, D). Dies ist konsistent mit den bisher gezeigten Daten und wies erneut darauf hin, dass Syndapin I allein keinen direkten Einfluss auf die Modulation der Kopfgröße pilzförmiger Dornen hat.

Zusammenfassend verdeutlichten die in Abb. 22, 23 und 24 dargestellten Daten eindrucksvoll die Abhängigkeit der ProSAP1-vermittelten Effekte in der Aufweitung von Dornfortsatzköpfen von der Anwesenheit und Komplexbildung mit Syndapin I, welches allein keinen Einfluss auf die Modulation der Kopfgröße von Dornfortsätzen hat.



**Abbildung 24: Postsynaptisches Syndapin I selbst zeigte keinen Einfluss auf die Kopfbreite pilzförmiger Dornfortsätze.** **A, B**, Morphologische Kopfbreitenanalysen von pilzförmigen Dornen primärer hippocampaler Rattenneurone (DIV14) zeigten, dass weder die Depletion (**A**) noch die Überexpression (**B**) von Xpress-markiertem Syndapin I (Sdp I) allein einen Einfluss auf die Kopfbreite pilzförmiger Dornen verglichen mit der pRNAT- oder *scrambled* RNAi (H1.1)-Kontrolle (**A**) bzw. mit der PM-mCherry-Kontrolle (**B**, Kontrolle) hatte. **C, D**, Gezeigt sind die Kopfbreitenanalysen pilzförmiger Dornen von ProSAP1 siRNA-exprimierenden primären hippocampalen Rattenneuronen (DIV14). **C**, Beispielbilder zeigen die PM-mCherry-Signale, die für die morphologische Quantifizierung genutzt wurden. Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$ . **D**, Die Quantifizierung der Kopfbreite pilzförmiger Dornen von ProSAP1 siRNA- bzw. ProSAP1 siRNA- und FLAG-Syndapin I-exprimierenden Neuronen zeigte eine Verringerung der Kopfbreiten unter ProSAP1-Depletion im Vergleich zu Kontrollneuronen (pRNAT), welche durch die Syndapin I-Überexpression (ProSAP1 RNAi+Sdp I) nicht aufgehoben wurde.

### 3.3.1.2 Die Postsynapsenbildung ist von der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung abhängig

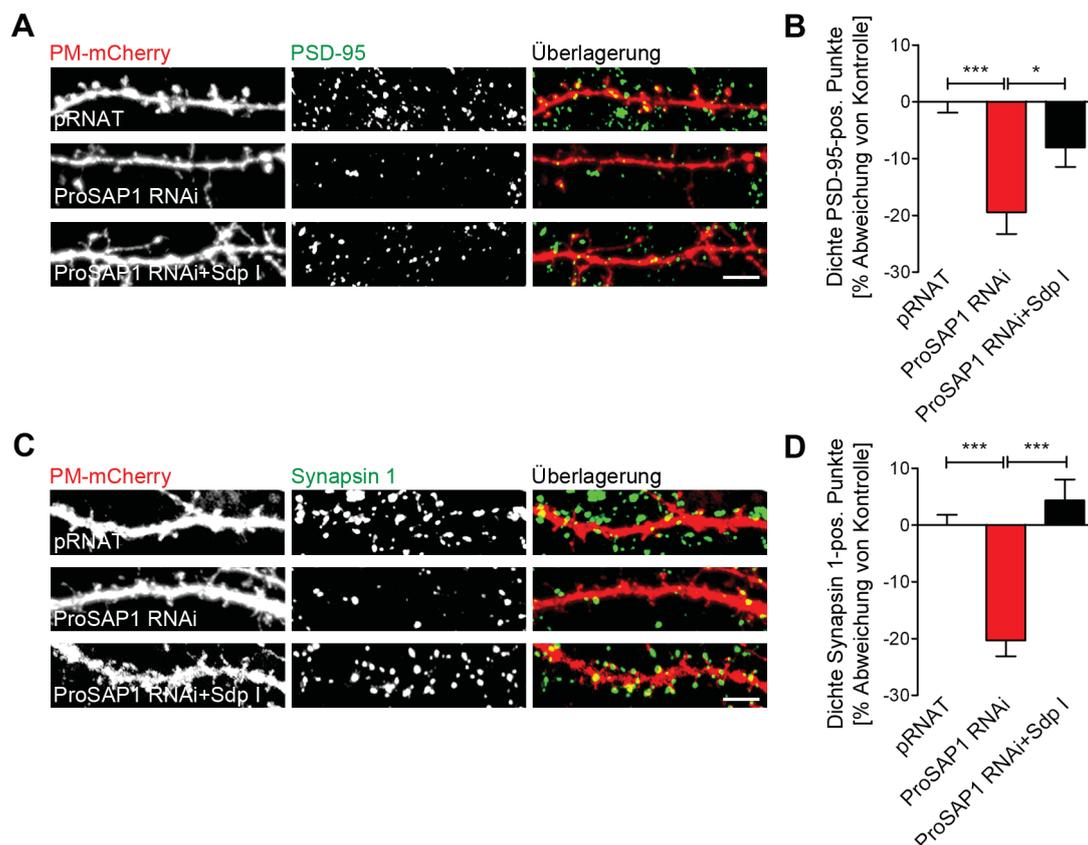
Die bisher dargestellten Daten bewiesen klar die Abhängigkeit der ProSAP1-Funktionen in Dornfortsatzköpfen von der Anwesenheit und Komplexbildung mit Syndapin I (Abb. 22 und 23). Daraus resultierte die interessante Hypothese, dass auch umgekehrt die hier beobachteten Syndapin I-Funktionen in der Postsynapsenbildung (Abb. 6, 7, 8 und 11) von der Komplexbildung mit ProSAP1 abhängig sind. Daher wurde im Folgenden mittels ProSAP1-Depletion untersucht, ob der Verlust an ProSAP1 in Neuronen zu einem ähnlichen Phänotyp wie zu dem unter Syndapin I-Depletion führte. Da Syndapin I-Depletion besonders starke Effekte auf die Bildung von reifen Dornfortsätzen und Synapsen hervorrief, wurde zunächst die Synapsenbildung unter ProSAP1 RNAi durch die Analyse der Dichten von anti-PSD-95- und anti-Synapsin 1-immunmarkierten post- bzw. präsynaptischen Punkten entlang von Dendriten ProSAP1 siRNA- und PM-mCherry-exprimierender Neurone zum Zeitpunkt der Synapsenbildung untersucht (Abb. 25).

In den Studien von GRABRUCKER et al. (2011) und BERKEL et al. (2012) wurde kürzlich gezeigt, dass unter ProSAP1-Depletion in DIV9- bzw. DIV18-Neuronen die synaptische Dichte deutlich verringert war. Im Einklang mit diesen Daten führte im Rahmen dieser Arbeit die Verwendung der in BERKEL et al. (2012) publizierten ProSAP1 RNAi Sequenz #2 in DIV14-Neuronen zu einer signifikanten Verringerung der anti-PSD-95-Immunmarkierungen um 19% bezogen auf pRNAT-Kontrollen (Abb. 25A, B). Ebenfalls zeigten anti-Synapsin 1-Immunmarkierungen eine signifikante Reduktion (20% bezogen auf pRNAT) in Präsynapsen, die transfizierte Neurone kontaktieren (Abb. 25C, D).

Die ebenfalls in dieser Studie verwendete ProSAP1 RNAi Sequenz #1 (BERKEL et al., 2012) ergab zur hier dargestellten RNAi Sequenz #2 vergleichbare Effekte und unterschied sich von ihr nicht signifikant (Daten nicht gezeigt, Werte siehe Tabelle 15 in Anhang A). Als weitere Kontrolle dienten *scrambled* siRNA-exprimierende Zellen, bei denen sich die Post- und Präsynapsendichte signifikant von der Post- und Präsynapsendichte unter ProSAP1 RNAi #1 und #2 unterschied ( $p < 0,001$ , Daten nicht gezeigt, Werte siehe Tabelle 15 in Anhang A). Verglichen mit den in Abb. 8 gezeigten Effekten in der Synapsenbildung ähnelten sich die Phänotypen unter Syndapin I- und ProSAP1-Depletion, was auf wichtige Funktionen beider Proteine während der Synapsenbildung hindeutete.

Auf eine möglicherweise gemeinsame Funktion im Prozess der Synapsenbildung wiesen die Befunde hin, dass eine Koexpression von FLAG-Syndapin I zu einer Aufhebung der unter ProSAP1 RNAi beobachteten reduzierten Post- und Präsynapsendichten führte. Die Synapsendichten dieser Neurone unterschieden sich nicht mehr signifikant vom pRNAT-Kontrollniveau (Abb. 25A-D; absolute Werte siehe Abb. 37G, H im Anhang A).

Anhand der Phänokopie in der Synapsenbildung unter Syndapin I- bzw. ProSAP1-Depletion



**Abbildung 25: ProSAP1-Depletion zeigte, vergleichbar mit Syndapin I RNAi, Defekte in der Synapsenbildung.** A, C, Die Analysen von post- (A, anti-PSD-95) und präsynaptisch- (C, anti-Synapsin 1) immungefärbten Synapsen entlang von Dendriten ProSAP1 siRNA-exprimierender primärer hippocampaler Rattenneurone (DIV14) zeigten im Vergleich zu pRNAT-Kontrollzellen eine ähnlich verminderte Synapsendichte wie unter Syndapin I-Depletion. Eine Koexpression von ProSAP1 siRNA mit FLAG-Syndapin I (ProSAP1 RNAi+Sdp I) hob die durch ProSAP1-Depletion-vermittelte Verminderung auf und führte zu Synapsendichten, die sich nicht signifikant von denen der Kontrollneurone unterschieden. PM-mCherry ist in rot, PSD-95 bzw. Synapsin 1 ist in grün in Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$ . B, D, Gezeigt ist die quantitative Auswertung der Anzahl PSD-95- (B) bzw. Synapsin 1- (D) positiver Punkte entlang von Dendriten transfizierter Neurone.

und der Modulierbarkeit des ProSAP1-Depletionsphänotypen durch Syndapin I wurde sichtbar, dass beide Proteine eng im Prozess der Synapsenbildung zusammenarbeiten.

Aus der möglichen Kooperation von Syndapin I und ProSAP1 in der Synapsenbildung (Abb. 25) und der Korrelation von Synapsen mit reifen Dornfortsätzen (Abb. 9) ergab sich die Frage, inwieweit sich Störungen der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung ebenso auf die Dichte pilzförmiger Dornen auswirken.

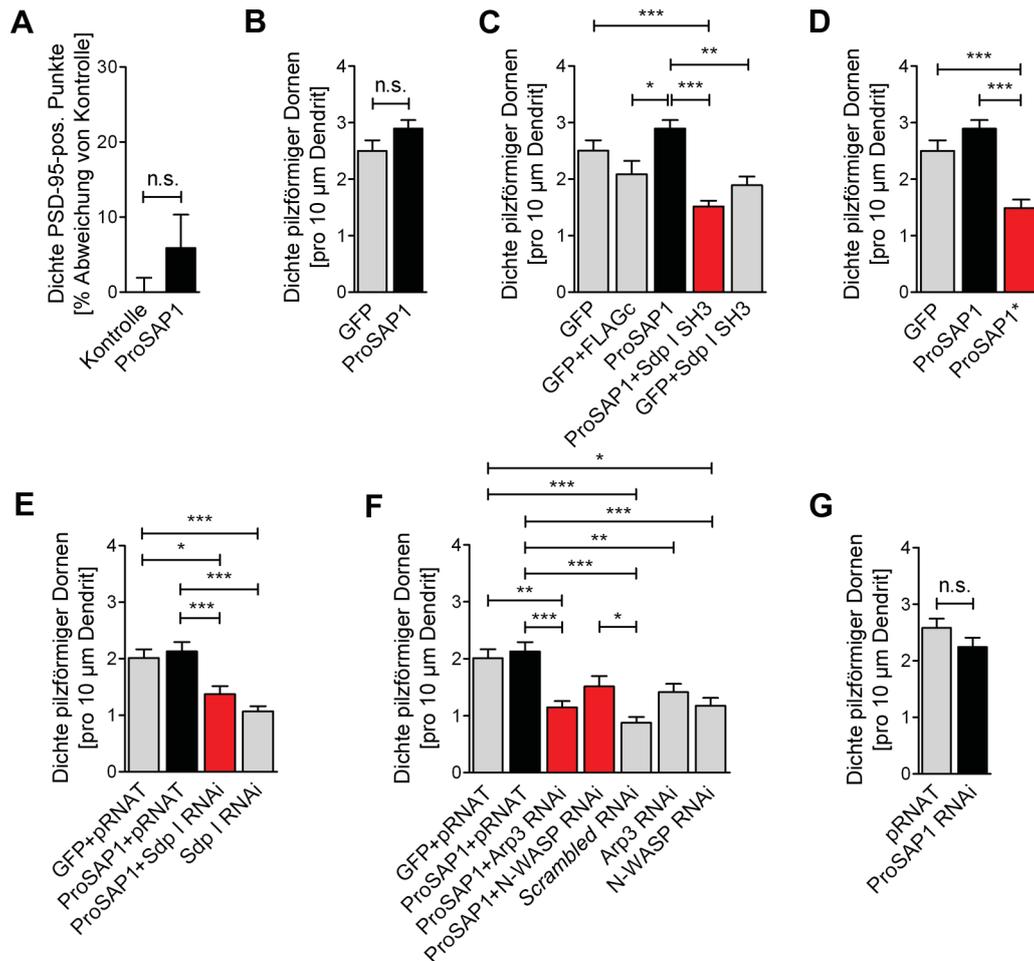
Die morphologischen Analysen und Klassifizierungen der Dornfortsätze von GFP-ProSAP1 allein exprimierenden Neuronen ergaben keine signifikanten Veränderungen in der Dichte von Postsynapsen (Abb. 26A; absolute Werte siehe Abb. 37I im Anhang A) und von pilzförmiger Dornen (Abb. 26B).

Tatsächlich führte die Störung der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung, sowohl mittels der Blockierung der Syndapin I-Bindestelle durch die Koüberexpression der Syndapin I SH3-Domäne als auch mittels der Mutation der Syndapin I-Bindestelle in ProSAP1 (ProSAP1\*) zu einer signifikanten Reduktion pilzförmiger Dornen jeweils verglichen mit GFP-Kontrollzellen und mit GFP-ProSAP1-exprimierenden Zellen (Abb. 26C, D).

Konsistent mit den in Abb. 26C und D beobachteten Effekten der Störung der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung erwies sich die Dichte pilzförmiger Dornen von GFP-ProSAP1-überexprimierenden Neuronen auch unter Syndapin I-Depletion (Abb. 26E) signifikant reduziert. Ebenso zeigte sich unter Arp3-Depletion in ProSAP1-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu GFP- und pRNAT-kotransfizierten Kontrollzellen sowie zu GFP-ProSAP1 allein überexprimierenden Zellen eine verringerte Dichte pilzförmiger Dornen (Abb. 26F). Die N-WASP-Depletion in GFP-ProSAP1-überexprimierenden Neuronen führte im Gegensatz zur Arp3-Depletion zu keiner signifikanten Änderung der Dichte pilzförmiger Dornen im Vergleich zu den Kontrollzellen oder GFP-ProSAP1-überexprimierenden Zellen (Abb. 26F).

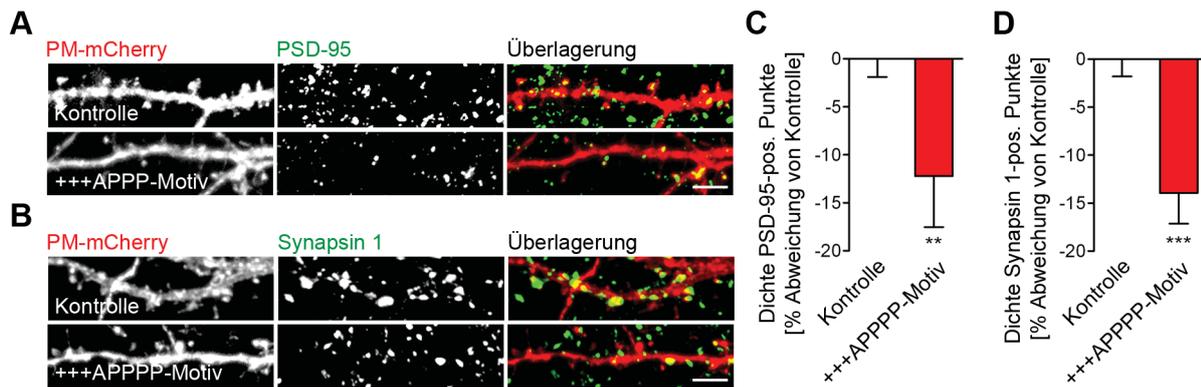
Die Depletion von ProSAP1 in Neuronen führte in Einklang mit der Überexpression von ProSAP1 (Abb. 26B) zu keiner Beeinflussung der Dichte pilzförmiger Dornen (Abb. 26G). Zusammen mit den in Abb. 22, 23 und 25 beobachteten Befunden lieferten die hier dargestellten Beobachtungen der Dichte pilzförmiger Dornen Hinweise auf eine wichtige Rolle von Syndapin I/ProSAP1-Komplexen in der Postsynapsen- und Dornfortsatzbildung.

Aus den im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Syndapin I-Funktionen in der Postsynapsenbildung (Abb. 6, 8 und 11) stellt sich die interessante Frage, inwieweit diese Syndapin I-Funktionen von der SH3-Domänen-vermittelten Interaktion mit +++APPPP-Motiven, wie sie in den postsynaptischen Proteinen ProSAP1 und ProSAP2 (Abb. 15) identifiziert wurden, abhängig sind. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde ein Peptid, welches das dem SH3-Domänen-Bindekonsensus-entsprechenden +++APPPP-Motiv aus Cobl (Aminosäuren 318-332, SCHWINTZER et al., 2011) beinhaltet, als dominant-negativ wirkendes Peptid in quantitativen Analysen der Synapsendichte eingesetzt (Abb. 27).



**Abbildung 26: Störungen der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung führte zu einem Verlust an pilzförmigen Dornfortsätzen.** Dargestellt sind die quantitativen Analysen der Dichten von PSD-95-immunmarkierten Postsynapsen (**A**) und von pilzförmigen Dornfortsätzen (**B-G**) entlang von Dendritenabschnitten primärer hippocampaler Rattenneuronen (DIV14). **A, B**, Die Überexpression von GFP-ProSAP1 (ProSAP1) zeigte keinen Einfluss auf die Postsynapsendichte (**A**) sowie auf die Dichte pilzförmiger Dornen (**B**) im Vergleich zu PM-mCherry-exprimierenden (Kontrolle) bzw. GFP-exprimierenden Kontrollzellen. **C, D**, Die Blockierung der Syndapin I-Bindestelle durch Koexpression von GFP-ProSAP1 mit der FLAG-markierten Syndapin I SH3-Domäne (**C**, ProSAP1+Sdp I SH3) sowie die Mutation der Syndapin I-Bindestelle in ProSAP1 (**D**, ProSAP1\*) führte zu einem signifikanten Verlust an pilzförmigen Dornen im Vergleich zu ProSAP1-überexprimierenden Zellen. **E, F**, In GFP-ProSAP1-überexprimierenden Neuronen führte die Depletion von Syndapin I (**E**, ProSAP1+Sdp I RNAi) bzw. von Arp3 (**F**, ProSAP1+Arp3 RNAi) zu einer signifikanten Reduktion pilzförmiger Dornen jeweils verglichen mit GFP+pRNAT-Kontrollzellen und mit GFP-ProSAP1-überexprimierenden Neuronen. **G**, In ProSAP1 siRNA-exprimierenden Zellen zeigte sich im Vergleich zu pRNAT-Kontrollzellen keine signifikante Veränderung der Dichte pilzförmiger Dornen. n.s., nicht signifikant.

Dazu wurden die Dichten von anti-PSD-95- und anti-Synapsin 1-immunmarkierten synaptischen Punkten entlang von Dendriten von Neuronen, die ein +++APPPP-Motiv-beinhaltenendes FLAG-mCherry-Fusionspeptid exprimieren, analysiert. Die Überexpression des +++APPPP-Motiv-beinhaltenenden Peptids führte zu einer signifikanten Verringerung der Postsynapsendichte um 12% bezogen auf PM-mCherry-exprimierende Kontrollzellen (Abb. 27A, C), sowie zu einer signifikanten Verringerung der Präsynapsendichte um 14% (bezogen auf Kontrolle) (Abb. 27B, D; absolute Werte siehe Abb. 37J, K im Anhang A).

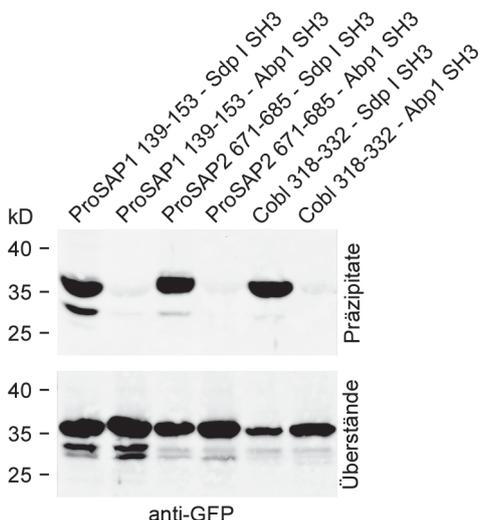


**Abbildung 27: Blockierung der +++APPPP-Motiv-Bindestelle in Syndapin I durch Überexpression eines kurzen +++APPPP-Motiv-beinhaltenen Peptids beeinträchtigte die Synapsenbildung.** **A, B,** Ein FLAG-mCherry-Fusionspeptid, welches ein dem Syndapin SH3-Domänen-Bindekonsensus-entsprechendes +++APPPP-Motiv aus Cobl beinhaltet, (+++APPPP-Motiv) führte überexprimiert in primären hippocampalen Rattenneuronen (DIV14) zu Störungen in der Synapsenbildung ähnlich zu denen unter Syndapin I RNAi. Quantitative Analysen von post- (**A**, anti-PSD-95) und präsynaptisch- (**B**, anti-Synapsin 1) immungefärbten Synapsen zur Quantifizierung der Synapsendichten entlang von Dendriten von +++APPPP-Motiv-Peptid- und PM-mCherry-koexprimierenden Neuronen zeigten eine verringerte Synapsendichte im Vergleich zu PM-mCherry-exprimierenden Kontrollzellen. PM-mCherry ist in rot, PSD-95 bzw. Synapsin 1 ist in grün in Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 5  $\mu$ m. **C, D,** Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Anzahl PSD-95- (**C**) bzw. Synapsin 1-positiver (**D**) Punkte entlang von Dendriten transfizierter Neurone.

Durch die Blockierung der Bindestelle in Syndapin I wurden also ähnliche Effekte in der Postsynapsenbildung wie unter Syndapin I-Depletion beobachtet.

In proteinbiochemischen Kopräzipitationsanalysen wurde bestätigt, dass die GFP-Fusionsproteine, die dem +++APPPP-Konsensus-folgenden Motive enthalten, spezifisch mit der GST-Syndapin I SH3-Domäne, jedoch nicht mit der GST-Abp1 SH3-Domäne, präzipitieren (Abb. 28).

Zusammengenommen bewies die Phänokopie der Syndapin I-Depletion durch die Überexpression eines kurzen Syndapin I SH3-Domänen-Bindemotiv-beinhaltenen Peptids die Bedeutung der Funktion von Syndapin I SH3-Domänen/+++APPPP-Motiv-Interaktionen in der Postsynapsenbildung.



**Abbildung 28: +++APPPP-Motiv-beinhaltenende Peptide binden spezifisch an die Syndapin I SH3-Domäne.** Westernblotanalysen von Präzipitationen mit immobilisierten GST-SH3-Domänen von Syndapin I und Abp1 zeigen, dass GFP-Fusionspeptide der +++APPPP-Motive von ProSAP1, ProSAP2 und Cobl spezifisch durch die Syndapin I SH3-Domäne präzipitiert wurden, wohingegen die Abp1 SH3-Domäne im Überstand verblieb.

### **3.3.2 Membranassoziierte Syndapin I/ProSAP1-Komplexe sind wichtig für die Postsynapsenbildung**

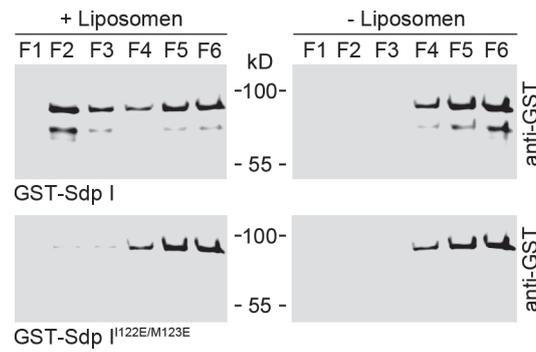
Vorangegangene Studien zeigten eine F-BAR-Domänen-vermittelte Fähigkeit von Syndapin I, an gekrümmte Membranen zu binden (DHARMALINGAM et al., 2009; ITOH et al., 2005; RAO et al., 2010; WANG et al., 2009), und legten eine zeitliche und räumliche Regulation von SH3-Domänen-Bindungspartnern nahe (DHARMALINGAM et al., 2009; KOCH et al., 2011; SCHÜLER et al., 2013; SCHWINTZER et al., 2011). Dies deutete auf eine organisatorische Funktion von Syndapin I in der Postsynapsenbildung hin, die den ProSAP1-vermittelten Funktionen vorgeschaltet ist.

Ausgehend von der Fragestellung, ob Syndapin I-Funktionen in der Postsynapsenbildung durch eine Plasmamembranrekrutierung und die räumliche Kontrolle von SH3-Domänen-Bindungspartnern vermittelt werden, wurde die Membranbindungseigenschaft von Syndapin I manipuliert und die Auswirkungen davon auf die Postsynapsenbildung und -funktion in funktionellen, elektrophysiologischen und proteinbiochemischen Studien analysiert.

#### **3.3.2.1 Die I122E/M123E-Mutation der F-BAR-Domäne beeinträchtigt die Lipidbindungseigenschaft von Syndapin I**

Um zu untersuchen, inwieweit die Membranbindungseigenschaften zur Ausübung der Syndapin I-Funktionen in der Postsynapse benötigt wurden, wurde durch Dr. Dennis Koch, Institut für Biochemie I, UKJ, eine Syndapin I Keilschleifen-Mutante generiert. Die zur Insertion in das innere Blatt einer Lipiddoppelschicht benötigten Keilschleifen der F-BAR-Domäne wurden dabei analog zu einer Studie von WANG et al. (2009) für humanes Syndapin I im Rattenprotein mutiert (I122E/M123E). Nachfolgend wurde die Lipidbindungs- und Dimerisierungseigenschaft der Mutante im Vergleich zu wildtypischem Syndapin I proteinbiochemisch untersucht (Abb. 29 und 30).

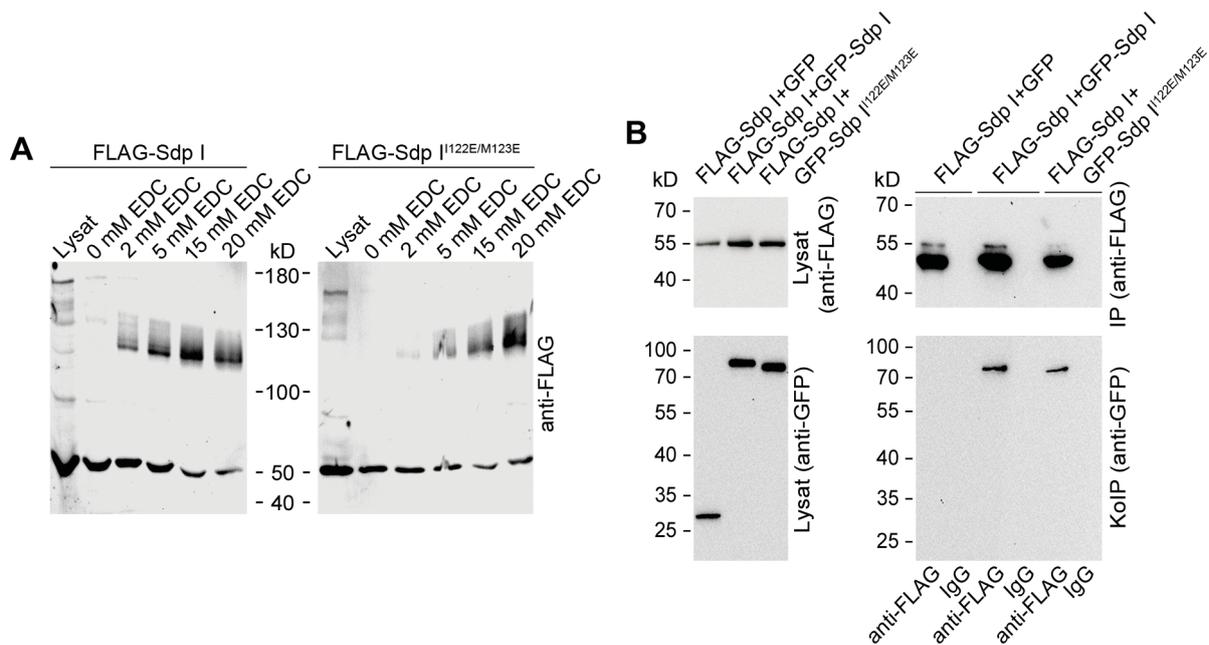
*In vitro*-Rekonstitutionen mit Liposomen nach DHARMALINGAM et al. (2009) ergaben, dass die Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup>-Mutante, im Vergleich zum wildtypischen Syndapin I, nicht mehr mit Liposomen im Dichtegradienten in Fraktion 2 flotierte, sondern in den unteren Fraktionen 4-6 des Gradienten verblieb (Abb. 29).



**Abbildung 29: Die I122E/M123E-Mutation in der F-BAR-Domäne von Syndapin I beeinträchtigte die Lipidbindungsfähigkeit von Syndapin I.** Westernblotanalysen der Gradientenfraktionen von *in vitro*-Protein/Lipid-Interaktionsrekonstitutionen mittels Liposomen aus *Folch fraction* I-Lipiden und aufgereinigtem GST-Syndapin I (GST-Sdp I) bzw. I122E/M123E-mutiertem GST-Syndapin I (GST-Sdp I<sup>I122E/M123E</sup>) zeigten, dass Syndapin I nach Dichtegradientenzentrifugation spezifisch mit den Liposomen in Fraktion 2 (F2) flotierte. Dahingegen verblieb I122E/M123E-mutiertes Syndapin I in den unteren Fraktionen 4-6 des Gradienten (F4-6).

In Proteinquervernetzungs- und Koimmunpräzipitationsanalysen wurde untersucht, ob sich die I122E/M123E-Mutation in Syndapin I auf die Selbstassoziationseigenschaft von Syndapin I auswirkte (Abb. 30). Extrakte von HEK293-Zellen, in denen FLAG-Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup> bzw. wildtypisches FLAG-Syndapin I exprimiert worden war, wurden mit dem Proteinquervernetzer EDC inkubiert und auf das Vorhandensein von Syndapin I-Dimeren untersucht. In den Westernblotanalysen wiesen sowohl die Proben des wildtypischen Syndapin I als auch die des Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup> mit steigender EDC-Konzentration eine stärker werdende Bande bei etwa dem doppeltem Molekulargewicht von Syndapin I (ca. 100 kD) auf. Dabei wurde die Syndapin I-Monomerbande (ca. 50 kD) mit zunehmender EDC-Konzentration deutlich schwächer (Abb. 30A). Dieser Befund zeigte, dass die I122E/M123E-Mutation in der F-BAR-Domäne von Syndapin I keinen Einfluss auf die Dimerisierung von Syndapin I hat. Weiterhin bestätigte sich die Selbstassoziationsfähigkeit der Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup>-Mutante in Westernblotanalysen von heterologen Koimmunpräzipitationen (durchgeführt von David Wolf, Institut für Biochemie I, UKJ). Sowohl wildtypisches Syndapin I als auch Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup> wurden als GFP-Fusionsprotein mit wildtypischem FLAG-Syndapin I in HEK293-Zellen koexprimiert und konnten aus den Zellextrakten jeweils im Komplex mit durch anti-FLAG-immunpräzipitiertem FLAG-Syndapin I koimmunpräzipitiert werden (Abb. 30B).

Diese Ergebnisse bewiesen, dass durch die I122E/M123E-Mutation in der F-BAR-Domäne von Syndapin I keine Lipidbindung mehr möglich war, ohne dabei die ebenfalls F-BAR-Domänen-vermittelten Dimerisierungseigenschaften zu beeinträchtigen.



**Abbildung 30: Die I122E/M123E-Mutation in der F-BAR-Domäne von Syndapin I beeinträchtigt die nicht Dimerisierungseigenschaft von Syndapin I.** **A**, Gezeigt ist die Westernblotanalyse von HEK293-Zellextrakten mit überexprimiertem wildtypischem FLAG-Syndapin I (FLAG-Sdp I) und I122E/M123E-mutiertem FLAG-Syndapin I (FLAG-Sdp I<sup>I122E/M123E</sup>), welche mit verschiedenen Konzentrationen des Proteinquervernetzlers EDC inkubiert wurden. Eine EDC-Inkubation führte konzentrationsabhängig zu einem verstärkten Erscheinen einer Bande mit dem zweifachen Molekulargewicht von Syndapin I (ca. 100 kD) und einer Signalverringering des Syndapin I-Monomers (ca. 50 kD) sowohl für wildtypisches als auch für I122E/M123E-mutiertes Syndapin I. **B**, Dargestellt ist die heterologe Koimmunpräzipitation von GFP-Syndapin I und GFP-Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup> jeweils mit anti-FLAG-immunpräzipitiertem FLAG-Syndapin I koexprimiert in HEK293-Zellen. Westernblotanalysen zeigten, dass die I122E/M123E-Mutation in Syndapin I verglichen mit wildtypischem Syndapin I die Koimmunpräzipitation nicht beeinträchtigte. Die in **B** dargestellte Analyse wurde von David Wolf, Institut für Biochemie I, UKJ, durchgeführt.

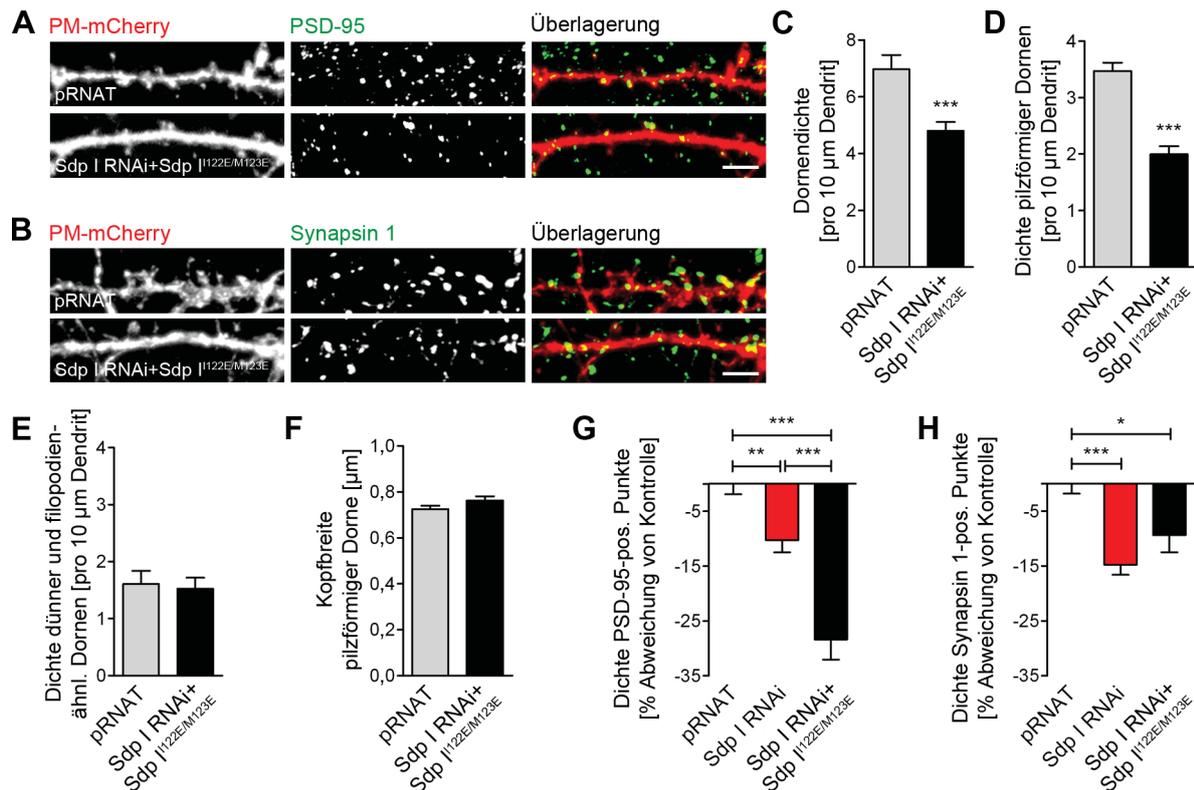
### 3.3.2.2 Die Postsynapsenbildung ist von der Syndapin I-vermittelten Membranbindung abhängig

Eine mögliche postsynaptische Funktion von Syndapin I stellt die F-BAR-Domänen-vermittelte Rekrutierung von postsynaptischen Bindungspartnern an die Plasmamembran dar. Die Untersuchung der Auswirkungen einer gestörten Membranassoziation von Syndapin I auf die Postsynapsenbildung diente dem Nachweis dieser Hypothese. Dazu wurde in quantitativen Analysen der Dornfortsatzmorphologie und Synapsendichte untersucht, ob die bereits beschriebenen Effekte einer Syndapin I-Depletion auf die Postsynapsenbildung (Abb. 7 und 8) von der Membranbindungseigenschaft von Syndapin I abhängen. Es wurden die Gesamtdornendichte, die Dichte individueller Morphologiegruppen sowie die Dichten von anti-PSD-95- und anti-Synapsin 1-Immundefärbungen entlang von Dendriten von Syndapin I siRNA- und RNAi-insensitiven FLAG-Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup>-koexprimierenden Neuronen quantitativ analysiert (Abb. 31).

Im Gegensatz zu Reexpressionsstudien mit RNAi-insensitivem FLAG-Syndapin I (Abb. 7) führte die Koexpression von Syndapin I siRNA und Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup> zu keiner Aufhebung der verringerten Dichte pilzförmiger Dornen (Abb. 31D) und auch die Gesamtdornendichte zeigte sich signifikant verringert (Abb. 31C). Ebenfalls wurden die verringerten Post- bzw. Präsynapsendichten unter Syndapin I RNAi (Abb. 8) nicht aufgehoben (Abb. 31G, H). In Konsistenz

mit den in Abb. 7 und 24 dargestellten Daten der Dichten dünner und filopodienähnlicher Dornen bzw. der Kopfbreiten pilzförmiger Dornen unter Syndapin I-Depletion zeigte die Koexpression von Syndapin I siRNA und dem RNAi-insensitivem FLAG-Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup> weder einen Einfluss auf die Dichte dünner und filopodienähnlicher Dornen (Abb. 31E) noch auf die Kopfbreiten pilzförmiger Dornen (Abb. 31F).

Neben der SH3-Domänen-vermittelten Interaktion mit ProSAP1 spielt demzufolge auch die F-BAR-Domänen-vermittelte Membranbindung von Syndapin I eine entscheidende Rolle in der Postsynapsenbildung.

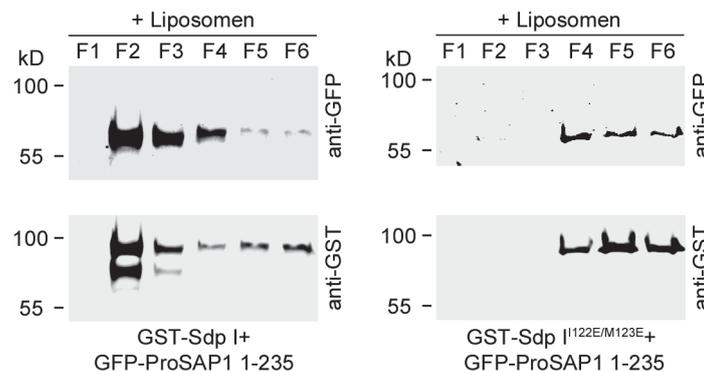


**Abbildung 31: Die F-BAR-Domänen-vermittelte Membranassoziation von Syndapin I ist entscheidend für Syndapin I-Funktionen in der Postsynapsenbildung.** **A, B**, Dargestellt sind Beispielbilder von Dendritenabschnitten von primären hippocampalen Rattenneuronen (DIV14), die Syndapin I siRNA und eine RNAi-insensitive FLAG-Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup>-Mutante (Sdp I<sup>I122E/M123E</sup>) exprimierten und für quantitative Analysen der Dornfortsatzmorphologie und der Dichte von post- (**A**, anti-PSD-95) bzw. präsynaptisch- (**B**, anti-Synapsin 1) immungefärbten Synapsen entlang von exprimierenden Neuronen genutzt wurden. **C-E**, Quantifizierung der Gesamtdornendichte (**C**), sowie der Dichten individueller Morphologiegruppen (**D**, pilzförmige; **E**, dünne und filopodienähnliche Dornen) zeigten einen signifikanten Verlust an Dornfortsätzen, insbesondere an pilzförmigen Dornen, unter Syndapin I RNAi und gleichzeitiger Koexpression von RNAi-insensitivem I122E/M123E-mutiertem Syndapin I. Im Gegensatz dazu waren die Dichten dünner und filopodienähnlicher Dornen (**E**) sowie die Kopfbreite pilzförmiger Dornen (**F**) von dieser Koexpression nicht beeinträchtigt. **G, H**, Die Quantifizierung der Anzahl PSD-95- (**G**) bzw. Synapsin 1- (**H**) positiver Punkte entlang von Dendritenabschnitten transfizierter Neurone ergab im Vergleich zu pRNAT-Kontrollzellen signifikant reduzierte Synapsendichten unter Syndapin I-Depletion, welche durch die Koexpression der RNAi-insensitiven Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup>-Mutante nicht gerettet wurden. PM-mCherry ist in rot, PSD-95 bzw. Synapsin 1 ist in grün in Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 5 µm.

### 3.3.2.3 Syndapin I/ProSAP1-Komplexe binden an Membranlipide

Die Abhängigkeit der Syndapin I-Funktionen von sowohl der SH3-Domänen-vermittelten Interaktion mit ProSAP1 als auch von der F-BAR-Domänen-vermittelten Membranbindung ließ vermuten, dass Syndapin I ProSAP1 an der Plasmamembran verankern könnte. Zur Untersuchung dieser interessanten Fragestellung wurden Syndapin I/ProSAP1-Komplexe durch Kopräzipitationen mit immobilisierten GST-Syndapin I-Fusionsproteinen und in HEK293-Zellen überexprimiertem GFP-ProSAP1 1-235 erzeugt und anschließend auf Membranlipidassoziation mittels Liposomenflotationsexperimenten hin untersucht (Abb. 32).

In Westernblotanalysen der Dichtegradientenfraktionen wurde sichtbar, dass Syndapin I/ProSAP1-Komplexe mit Liposomen in Fraktion 2 flotierten, wohingegen ProSAP1 im Komplex mit I122E/M123E-mutiertem Syndapin I auf dem Grund des Gradienten in den Fraktionen 4-6 verblieb (Abb. 32). Aus diesen Ergebnissen wurde sichtbar, dass die F-BAR-Domänen-vermittelte Lipidbindung von Syndapin I die Rekrutierung von ProSAP1 zu Membranen erlaubt.



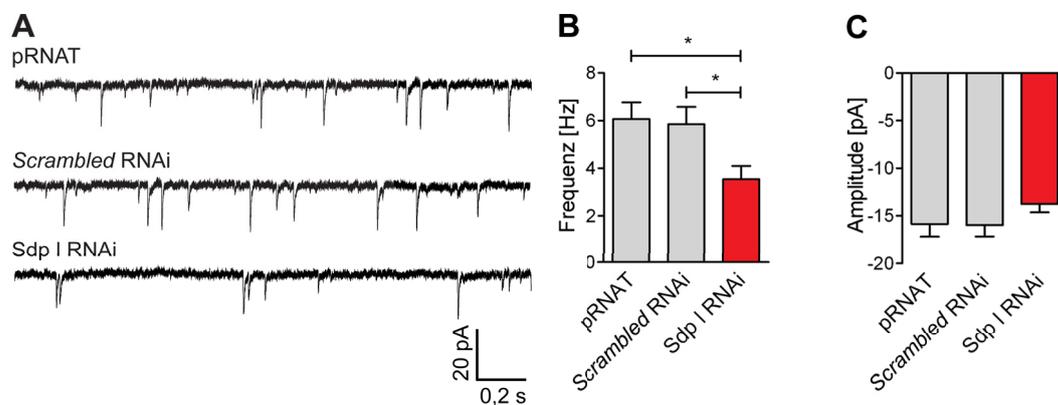
**Abbildung 32: Die F-BAR-Domänen-vermittelte Membranlipidassoziation von Syndapin I rekrutierte ProSAP1 zu Liposomen.** Wildtypisches Syndapin I (Sdp I) und I122E/M123E-mutiertes Syndapin I (Sdp I<sup>I122E/M123E</sup>) wurden in Form von GST-Fusionsproteinen zur Herstellung von Komplexen mit dem ProSAP1 N-Terminus (ProSAP1 1-235), welcher als GFP-Fusionsprotein in HEK293-Zellen überexprimiert wurde, verwendet. Von der Glutathionmatrix eluierte Komplexe wurden mit Liposomen aus *Folch fraction* I-Lipiden inkubiert und mittels Dichtegradientenfraktionierung analysiert. Westernblotanalysen der Gradientenfraktionen (F1-F6) zeigten, dass ProSAP1 1-235 im Komplex mit Syndapin I zusammen mit den Liposomen in Fraktion 2 (F2) flotierte, wohingegen ProSAP1 1-235 im Komplex mit I122E/M123E-mutiertem Syndapin I auf dem Grund des Gradienten in den Fraktionen 4-6 verblieb (F4-F6).

### 3.3.2.4 Postsynaptische Syndapin I-Defizienz führt zu einer gestörten synaptischen Transmission

Die hier dargestellten Ergebnisse charakterisieren die morphologischen Veränderungen dendritischer Dornfortsätze und die Synapsenbildung in Abhängigkeit von SH3- und F-BAR-Domänen-vermittelten Funktionen von Syndapin I in der Postsynapse. Sie schlagen eine kritische Rolle von Syndapin I in der Vernetzung, Membranassoziation und räumlichen Regulation von postsynaptischen Interaktionspartnern in Dornfortsatzköpfen vor. Angesichts der bisher vorliegenden Daten ist naheliegend, dass unter diesen postsynaptischen Interaktionspartnern ProSAP1 eine entscheidende Rolle zukommt. Demzufolge sollte ein Verlust

von Syndapin I in der Postsynapse zu ähnlichen Störungen in der synaptischen Transmission führen wie der Verlust von ProSAP1. In der von SCHMEISSER et al. (2012) durchgeführten Studie an *ProSAP1*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten Messungen von exzitatorischen, postsynaptischen Miniaturströmen (mEPSCs) im Vergleich zu wildtypischen Zellen bei unveränderter mEPSC-Amplitude eine deutlich verringerte Frequenz der mEPSCs.

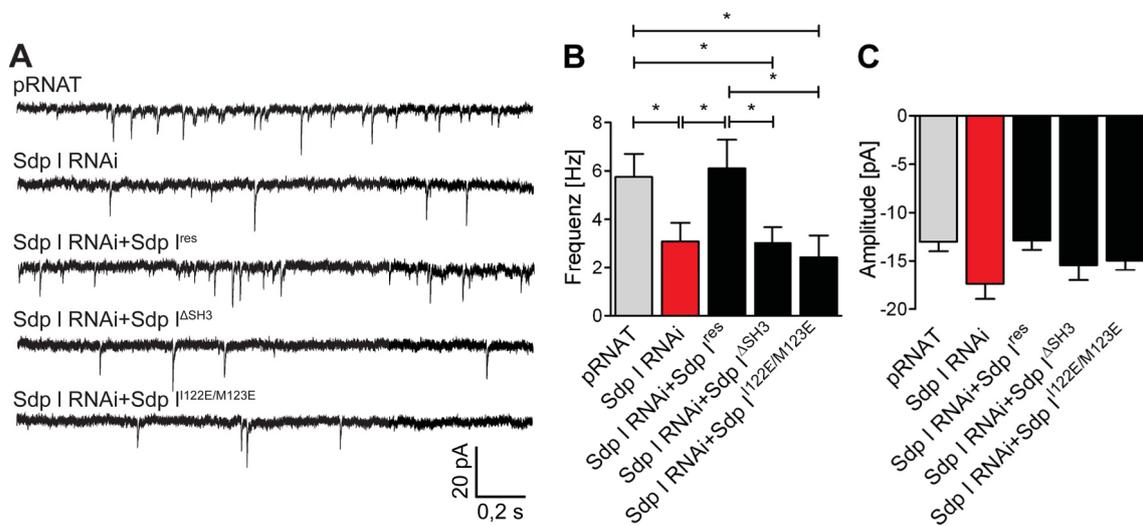
Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Lutz Liebmann, Institut für Humangenetik, UKJ, *Patch-Clamp*-Messungen von mEPSCs nach SINNING et al. (2011) an intakten primären hippocampalen Rattenneuronen durchgeführt. Diese wurden mit Syndapin I RNAi/GFP bzw. *scrambled* RNAi/GFP oder pRNAT/GFP als Kontrolle transfiziert und nach zwei Tagen für elektrophysiologische Messungen verwendet (Abb. 33A). Dabei zeigten sich die Frequenzen der mEPSCs unter Syndapin I RNAi im Vergleich zu den Kontrollen um 40% signifikant reduziert (Abb. 33B), wohingegen die Amplituden der mEPSCs nicht verändert waren (Abb. 33C). Tatsächlich führte also die Syndapin I-Depletion zu ähnlichen Störungen in der synaptischen Transmission wie die Depletion von ProSAP1 in SCHMEISSER et al. (2012). Durch die Messung von postsynaptischen Strömen in Syndapin I siRNA-exprimierenden Zellen und den experimentellen Gegebenheiten konnte davon ausgegangen werden, dass das Syndapin I-Expressionsniveau in den kontaktierenden Präsynapsen nicht verändert war und dass die hier beobachteten Defekte in der synaptischen Transmission ihre Ursache in der Depletion von postsynaptischem Syndapin I haben.



**Abbildung 33: Syndapin I-Depletion führte zu reduzierten Frequenzen von mEPSCs.** **A**, Gezeigt sind Beispielaufnahmen von *Patch-Clamp*-Messungen von mEPSCs an intakten primären hippocampalen Rattenneuronen, die an DIV12 mit Syndapin I RNAi/GFP und mit den Kontrollen *scrambled* RNAi/GFP oder pRNAT/GFP transfiziert (**A**) und jeweils zwei Tage später für elektrophysiologische Messungen verwendet wurden. **B**, In Syndapin I siRNA-exprimierenden Zellen war die Frequenz der mEPSCs im Vergleich zu *scrambled* RNAi- und pRNAT-Kontrollzellen signifikant verringert. **C**, Im Gegensatz dazu waren die Amplituden der mEPSCs nicht signifikant verändert. Die hier dargestellten elektrophysiologischen Messungen wurden von Dr. Lutz Liebmann, Institut für Humangenetik, UKJ, durchgeführt.

Um auch auf der Ebene der elektrophysiologischen Untersuchungen molekular-mechanistische Erkenntnisse zu erhalten, wurden weiterhin Kotransfektionen von Syndapin I RNAi/GFP mit verschiedenen RNAi-insensitiven Syndapin I-Mutanten als FLAG-mCherry-Konstrukte durchgeführt (Abb. 34). Die Neurone für diese Studien wurden ebenfalls zwei Tage nach

Transfektion für *Patch-Clamp*-Messungen von mEPSCs unter gleichen Bedingungen verwendet. Dabei wurde sichtbar, dass durch Koexpression von RNAi-insensitivem, intaktem Syndapin I die verringerte Frequenz unter Syndapin I-Depletion aufgehoben wurde. Derartig gerettete Neurone unterschieden sich in ihren mEPSCs nicht mehr signifikant von Kontrollzellen (Abb. 34B). Dies bewies deutlich, dass die unter Syndapin I RNAi beobachtete Frequenzverminderung spezifisch durch den Verlust an Syndapin I in diesen Zellen vermittelt wurde. Im Gegensatz dazu führte interessanterweise weder die Koexpression einer RNAi-insensitiven Syndapin I-Mutante mit fehlender SH3-Domäne noch die Koexpression einer RNAi-insensitiven Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup>-Mutante zu einer Unterdrückung des Syndapin I RNAi-Effekts auf die Frequenzen der mEPSCs (Abb. 34B). Auf die Amplituden der mEPSCs hatten die Koexpressionen der verschiedenen RNAi-insensitiven Syndapin I-Mutanten mit Syndapin I RNAi keine signifikanten Auswirkungen (Abb. 34C).



**Abbildung 34: Syndapin I-vermittelte Funktionen in der synaptischen Transmission waren abhängig von der Membranassoziationsfähigkeit und der SH3-Domäne.** **A**, Gezeigt sind Beispielaufnahmen von *Patch-Clamp*-Messungen von mEPSCs an intakten primären hippocampalen Rattenneuronen, die an DIV13 mit pRNAT/GFP und FLAG-mCherry (pRNAT) bzw. Syndapin I RNAi/GFP und ggf. zusätzlich mit RNAi-insensitiven FLAG-mCherry-Syndapin I-Mutanten kotransfiziert und jeweils zwei Tage später für elektrophysiologische Messungen verwendet wurden. **B**, Die elektrophysiologischen Untersuchungen von Zellen unter Syndapin I-Depletion und Koexpression von verschiedenen RNAi-insensitiven Syndapin I-Mutanten zeigten, dass nur die Syndapin I-Mutante mit sowohl intakter F-BAR- als auch SH3-Domäne (Syndapin I<sup>res</sup>) zur Aufhebung der durch Syndapin I RNAi verringerten Frequenz der mEPSCs befähigt war. Unter Syndapin I RNAi und Koexpression der RNAi-insensitiven Syndapin I-Mutante mit fehlender SH3-Domäne (Sdp I RNAi+Sdp I<sup>ΔSH3</sup>) sowie mit mutierter F-BAR-Domäne (Sdp I RNAi+Sdp I<sup>I122E/M123E</sup>) blieben die Frequenzen hingegen im Vergleich zu pRNAT-Kontrollzellen signifikant verringert. **C**, Die Koexpressionen der verschiedenen RNAi-insensitiven Syndapin I-Mutanten führten zu keinen signifikanten Veränderungen der Amplituden der mEPSCs. Die hier dargestellten elektrophysiologischen Messungen wurden von Dr. Lutz Liebmann, Institut für Humangenetik, UKJ, durchgeführt.

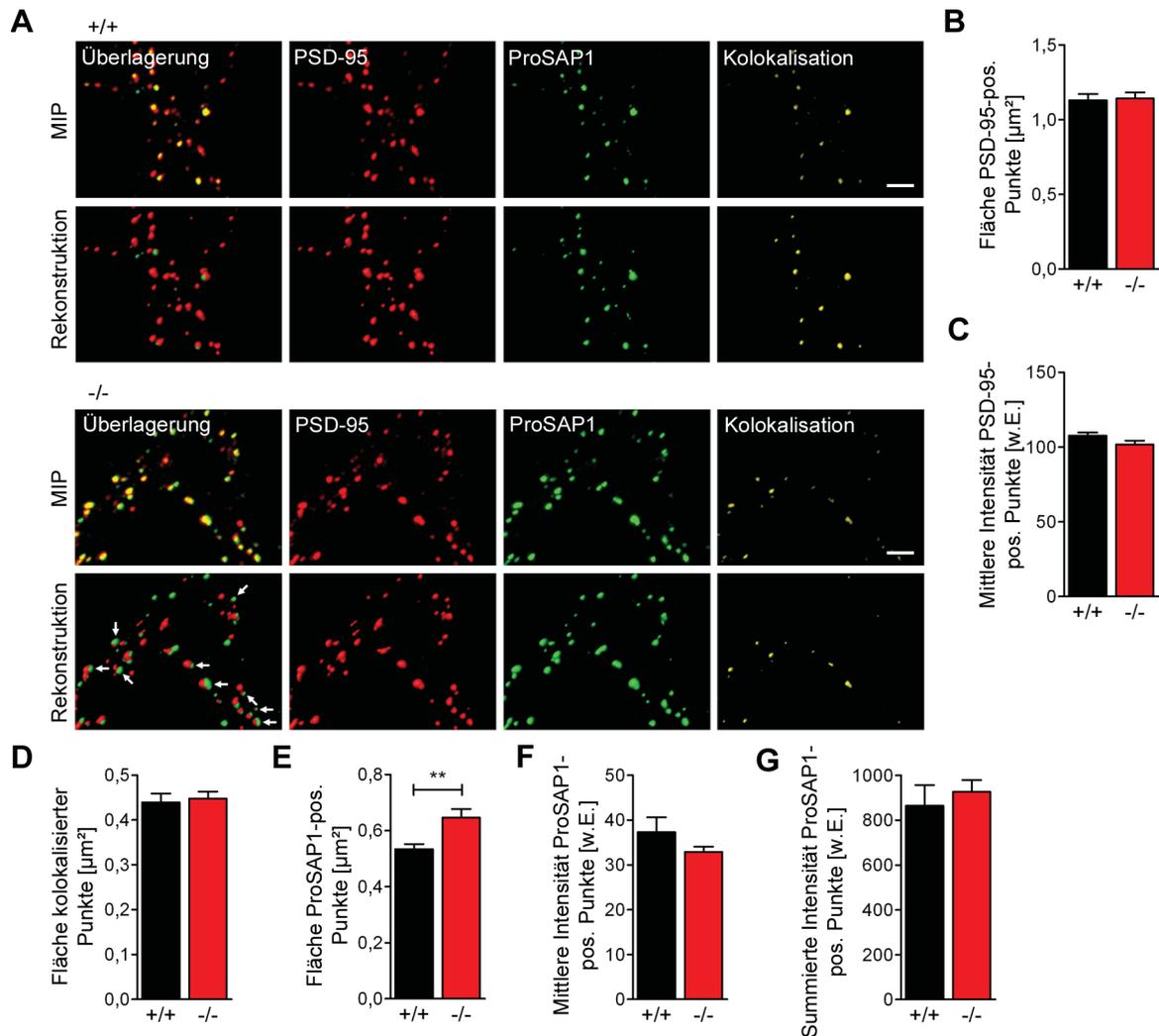
Die elektrophysiologischen Befunde wiesen darauf hin, dass die Funktionen von postsynaptischem Syndapin I in der synaptischen Transmission sowohl von den SH3-Domänen-vermittelten Interaktionen als auch von der Membranassoziation mittels F-BAR-Domäne abhängig sind. Sie stehen damit im Einklang mit den in Abb. 7, 8, 10 sowie 31 dargestellten Beobachtungen und unterstützen die Hypothese, dass Syndapin I und ProSAP1 in der Postsynapsenbildung kooperieren.

### 3.3.2.5 *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Neurone zeigen eine gestörte räumliche Organisation von ProSAP1 in Dornfortsatzköpfen

Aufbauend auf die bisher dargestellten Ergebnisse wurde die Hypothese einer postsynaptischen Funktion von Syndapin I in der Membranassoziation und räumlichen Organisation von ProSAP1 in Dornfortsatzköpfen abschließend durch die Analyse der ProSAP1-Lokalisation in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mausneuronen direkt experimentell adressiert (Abb. 35).

Dazu wurden anti-ProSAP1- und anti-PSD-95-Immunfärbungen von primären hippocampalen Mausneuronenkulturen von wildtypischen und *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen angefertigt. Diese wurden für Oberflächenrekonstruktionen von anti-ProSAP1- und anti-PSD-95-positiven sowie für die räumliche Analyse von rekonstruierten kolokalisierten Punkten genutzt. Die quantitativen Analysen der Flächen und Signalintensitäten zeigten, dass sich weder die Flächen noch die mittleren Signalintensitäten der PSD-95-positiven Punkte in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Neuronen signifikant änderten (Abb. 35B, C). Weiterhin ergaben sich dabei keine Änderung in den Flächen der Kolokalisation von PSD-95 mit ProSAP1 (Abb. 35D). Im Gegensatz dazu waren die Flächen der ProSAP1-positiven Punkte in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Neuronen um 23% vergrößert (Abb. 35E). Die mittleren und summierten Signalintensitäten der ProSAP1-positiven Punkte zeigten sich nicht signifikant verringert (Abb. 35F, G).

Durch die Analyse der summierten Intensitäten wurde sichtbar, dass es trotz einer vergrößerten Fläche des ProSAP1-Signals nicht zu einer Steigerung der ProSAP1-Menge kam, sondern stattdessen eine großflächigere Verteilung des ProSAP1-Signals im Dornfortsatzkopf zu beobachten war.



**Abbildung 35: *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Neurone wiesen Veränderungen in der räumlichen Organisation von ProSAP1 in Dornfortsatzköpfen auf.** **A**, Gezeigt sind die maximalen Intensitätsprojektionen (MIP, jeweilige obere Abschnitte) von anti-PSD-95 und anti-ProSAP1-koimmungefärbten primären hippocampalen Mausneuronenkulturen von wildtypischen (+/+) und *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen (-/-) an DIV14, die für die Rekonstruktionen der Flächen PSD-95- und ProSAP1-positiver sowie PSD-95- und ProSAP1-kolokalisierter Punkte verwendet wurden (jeweilige untere Abschnitte). PSD-95 ist in rot, ProSAP1 ist in grün in Überlagerungen dargestellt. Größenbalken: 2,5  $\mu\text{m}$ . **B-G**, Die quantitative Analysen der Flächen und Signalintensitäten individueller PSD-95- und ProSAP1-positiver sowie kolokalisierter Punkte zeigten, dass es in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Zellen bei gleichbleibender Fläche und Intensität von PSD-95-positiven Punkten (**B**, Fläche; **C**, mittlere Intensität) zu einer signifikanten Vergrößerung der Fläche ProSAP1-positiver Punkte (**E**) kam. Dabei blieb die Fläche der Kolokalisation konstant (**D**). Die Auswertungen der mittleren (**F**) und summierten (**G**) Intensitäten der ProSAP1-positiven Punkte wiesen darauf hin, dass die gleiche Menge an Signal über eine größere ProSAP1-positive Fläche (markiert durch Pfeile in **A**) verteilt vorlag. w.E., willkürliche Einheit.

Zusammengefasst enthüllten die im Rahmen dieser Doktorarbeit dargestellten Ergebnisse nicht nur eine entscheidende Rolle von Syndapin I im Bildungsprozess reifer dendritischer Dornfortsätze, sondern lieferten darüber hinaus deutliche Beweise, dass durch die Lipidbindungs- und Selbstassoziationseigenschaft von Syndapin I eine Verknüpfung, Membranassoziation und räumliche Organisation des postsynaptischen Syndapin I SH3-Domänen-Interaktionspartners ProSAP1 ermöglicht wird.

# 4 Diskussion

## 4.1 Syndapin I beeinflusst die Bildung & Funktion von Postsynapsen

Eine wesentliche Voraussetzung für die Bildung, Reifung, und Aufrechterhaltung von dendritischen Dornfortsätzen und von synaptischen Kontakten ist die räumliche Organisation von Neurotransmitterrezeptoren und Gerüstproteinen der PSD (EHLERS, 1999; PAK et al., 2001; SALA et al., 2001) sowie die Modulation des Aktinzytoskeletts im Dornfortsatzkopf (DUNAEVSKY et al., 1999; FISCHER et al., 1998). Neben Neurotransmitterrezeptorkomplexen, Signalproteinen und Gerüstproteinen spielen Aktinzytoskelett-bindende Adapterproteine, wie z.B. Cortactin und Abp1 (HÄCKEL et al., 2008; HERING und SHENG, 2003), für die Integrität, Funktionalität und Plastizität der PSD eine wichtige Rolle (BÖCKERS, 2006). In der hier vorliegenden Arbeit wird eine postsynaptische Funktion des neuronal angereicherten F-BAR-Domänenproteins Syndapin I während der Bildung und Aufrechterhaltung von dendritischen Dornfortsätzen und funktionellen Synapsen beschrieben.

Syndapin I stellt als F-BAR-Domänenprotein ein wichtiges Adapterprotein während morphologischen Veränderungen und Membrantransportvorgängen neuronaler Zellen dar (KESSELS und QUALMANN, 2002; 2006). Funktionelle Studien im Vorfeld dieser Arbeit erwiesen, dass Syndapin I eine entscheidende Rolle während der Axon- und Dendritenausbildung (DHARMALINGAM et al., 2009; SCHWINTZER et al., 2011) und während der endozytotischen Vesikelabschnürung in der Präsynapse einnimmt (ANGGONO et al., 2006; KOCH et al., 2011).

*Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten mit dem wiederholten Auftreten von generalisierten, klonischen Krampfanfällen, einer veränderten Netzwerkaktivität, einem verringerten Schwellenwert gegenüber dem Krampfanfälle-auslösenden GABA-Rezeptorantagonisten Bicucullin sowie einem vergrößerten Hippocampus typische Merkmale epileptischer Mäuse (KOCH et al., 2011). Da in Epilepsie-Studien verringerte Dornfortsatzdichten beobachtet wurden (SWANN et al., 2000), wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese einer Beeinträchtigung einer Syndapin I-Funktion in der Dornfortsatzbildung als weitere mögliche Ursache für den epileptischen Phänotyp der *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäuse adressiert. Hierzu wurden Untersuchungen der morphologischen Veränderungen von Dornfortsätzen unter veränderter Syndapin I-Expression durchgeführt.

Die morphologischen Untersuchungen von *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-CA1-Mausneuronen in Hippocampus-schnitten ergaben verringerte Dichten von Dornfortsätzen mit ausgebildetem Dornfortsatzkopf, also dünnen und pilzförmigen sowie stummelförmigen Dornen, und belegten demnach postsynaptische Effekte unter Syndapin I-Defizienz.

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien wurde endogenes Syndapin I sowohl dendritisch als auch prä- und postsynaptisch nachgewiesen und konnte in Dornfortsatzköpfen detektiert werden. Immunfluoreszenzfärbungen von rekombinantem

Syndapin I bestätigten, dass Syndapin I-markierte Dornfortsätze sowohl PSD-95-positive Postsynapsen aufwiesen, als auch von Bassoon-positiven Präsynapsen kontaktiert wurden. Die synaptische Lokalisation von Syndapin I war mit den in QUALMANN et al. (1999) und PÉREZ-OTAÑO et al. (2006) dargestellten Beobachtungen konsistent und standen im Einklang mit den bereits bekannten präsynaptischen (ANDERSSON et al., 2008; ANGGONO et al., 2006; DHARMALINGAM et al., 2009; KOCH et al., 2011) sowie kürzlich identifizierten postsynaptischen Funktionen (ANGGONO et al., 2013; SCHÄL et al., 2013).

Zur Bestätigung, dass sich in der Tat der Verlust von Syndapin I in der Postsynapse auf die Dornfortsatzmorphologie auswirkt, wurde die Dornfortsatzmorphologie Syndapin I-defizienter Neurone, die durch den Einsatz eines Vektor-basierten RNAi-Systems erhalten wurden, analysiert. Da diese Zellen lediglich von Präsynapsen nicht-transfizierter Zellen kontaktiert wurden, konnten bei entsprechend geringen Transfektionsraten gezielt postsynaptische Effekte von Syndapin I untersucht werden. Primäre hippocampale Neurone unter Syndapin I RNAi zeigten mit einer verringerten Dichte der pilzförmigen Dornen einen ähnlichen Phänotyp wie die durch Golgi-Färbungen im Hippocampus von *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen visualisierten Neurone. Rettungsexperimente des Syndapin I-Depletionsphänotypen mit der RNAi-insensitiven Syndapin I-Mutante machten sichtbar, dass die in den transfizierten Zellen gestörte Dornfortsatzbildung spezifisch auf einen Verlust von Syndapin I zurückzuführen ist.

Im Einklang mit den Syndapin I RNAi-Analysen und in Konsistenz mit der Studien von SCHÄL et al. (2013) resultierte eine Überexpression von Syndapin I in primären hippocampalen Neuronen in einer Steigerung der Dichte von Dornfortsätzen, insbesondere der von pilzförmigen und stummelförmigen Dornen. Da filopodienähnliche Dornfortsätze als instabile Vorläufer von Dornfortsätzen betrachtet werden (DAILEY und SMITH, 1996; FIALA et al., 1998; HARRIS, 1999; ZIV und SMITH, 1996) und deren Dichte unter Veränderungen des Syndapin I-Expressionsniveaus nicht betroffen war, ließ dies spezifisch auf eine Störung in der Bildung oder in der Stabilität von reifen Dornfortsätzen schließen. Zusammenfassend konnte damit eine kritische postsynaptische Rolle von Syndapin I in der Bildung pilzförmiger Dornen geschlussfolgert werden.

Im Einklang mit einer veränderten Dornfortsatzbildung beeinflusste Syndapin I die Bildung von Synapsen, wie sie spezifisch durch den Einsatz prä- und postsynaptischer Marker gezeigt wurde. Unter Syndapin I-Depletion kam es zu einer reduzierten Anzahl prä- und postsynaptischer Punkte entlang Syndapin I RNAi-Dendriten, also zu einer verringerten Dichte in synaptischen Kontakten. Diese Effekte waren spezifisch auf die veränderte Syndapin I-Expression in diesen Zellen zurückzuführen, wie Rettungsversuche des Syndapin I-Depletionsphänotypen mit RNAi-insensitivem Syndapin I bewiesen.

Aus der in dieser Arbeit durchgeführten Korrelation der Auswertung der Dornfortsatzdichte mit der der Postsynapsendichte wurde deutlich, dass sich unter den hier vorliegenden Bedingungen die Mehrheit aller auf Dornfortsätzen detektierten Postsynapsen auf pilzförmigen Dornfortsätzen befand. Folglich korrelierte die Dichte pilzförmiger Dornen mit der

Postsynapsendichte. Ein Rückgang der Postsynapsendichte unter Syndapin I-Depletion be- stärkte daher die Hypothese, dass die Bildung pilzförmiger, also reifer Dornfortsätzen bei Syndapin I-Verlust gestört ist.

Auffälligerweise zeigte sich eine deutlich größere Verringerung der Dichte pilzförmiger Dornen im Vergleich zur Verringerung der Postsynapsendichte unter Syndapin I-Defizienz. Eine vergleichende Analyse ergab, dass mehr als die Hälfte der detektierbaren Postsynapsen nicht mit einem morphologisch detektierbaren Dornfortsatz korrelierten und daher vermutlich Schaftsynapsen entsprachen. In kultivierten Neuronen wurde bereits durch BOYER et al. (1998) gezeigt, dass etwa die Hälfte aller Synapsen entlang des dendritischen Schafts zu finden ist. Unter der Annahme, dass Syndapin I insbesondere für die Bildung des Anteils an Postsynapsen wesentlich ist, die sich auf reifen Dornfortsätzen befinden, lassen sich demnach die Unterschiede zwischen den Effektstärken auf die Dichte pilzförmiger Dornen und denen auf die Postsynapsendichte durch einen hohen Anteil von Schaftsynapsen in kultivierten Neuronen erklären.

Da die Ausbildung der Präsynapse räumlich und zeitlich mit der der Postsynapse korreliert (OKABE et al., 2001), stand der Rückgang in präsynaptischen Punkten entlang Syndapin I-depletierter Dendriten mit dem Verlust an Postsynapsen unter Syndapin I-Depletion im Einklang. Aus der vergleichenden Analyse von Dornfortsatzdichte und Präsynapsendichte wurde sichtbar, dass die Mehrzahl aller pilzförmiger Dornfortsätze von Präsynapsen kontak- tiert wurden und daher die Präsynapsendichte mit der Dichte pilzförmiger Dornfortsätze korrelierte. Die verminderte Präsynapsendichte entlang Syndapin I-depletierter Dendriten stand also mit dem Rückgang pilzförmiger Dornen unter Syndapin I-Depletion im Einklang. Zusammengefasst bestärkte ein Rückgang von synaptischen Kontakten unter Syn- dapin I-Depletion die Vermutung einer Störung in der Bildung von reifen Dornfortsätzen mit ausgebildeten Postsynapsen.

In Konsistenz mit den Syndapin I RNAi-Effekten auf die Synapsendichte zeigte sich unter Syndapin I-Überexpression der umgekehrte Phänotyp einer erhöhten Anzahl synaptischer Kontakte. Dieser Befund stand mit der erhöhten Dornfortsatzdichte unter Syndapin I-Überex- pression im Einklang und unterstützte eine Syndapin I-Funktion in der Postsynapsenbildung oder -aufrechterhaltung.

Quantitative elektronenmikroskopische Analysen der Anzahl aktiver Zonen, als Maß für die Synapsendichte, in adulten *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-CA3-Synapsen in Hippocampuschnitten hat- ten allerdings keine signifikante Verringerung der Synapsendichte ergeben (KOCH et al., 2011). Diese Unterschiede in den Synapsendichteergebnissen könnten auf Unterschiede im Entwicklungsstadium der Neurone, der Detektionsart der synaptischen Kontakte und mögliche kompensatorische Effekte, die unter RNAi nur im geringem Umfang zu erwarten sind, zurück- zuführen sein. Die hier durchgeführten Untersuchungen an *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-CA1-Neuronen, die hauptsächlich Schaffer-Kollateral-Synapsen aufweisen, zeigten analog zu den Daten in primären Syndapin I RNAi-Neuronen ebenfalls eine Verringerung der Dornfortsatzdichte. Ursachen für diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse der CA3-Synapsendichte

und der CA1-Dornfortsatzdichte in den *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen könnten in den Unterschieden der Dornfortsatzmorphologie und der synaptischen Aktivität zwischen CA1-Schaffer-Kollateral-Synapsen und den großen, stark verzweigten CA3-Moosfasersynapsen liegen. Elektronenmikroskopische Studien von CHICUREL und HARRIS (1992) zeigten diesbezüglich, dass Dornfortsätze der CA3-Region in der Tat eine andere Morphologie im Vergleich zu den Dornfortsätzen der CA1-Region aufweisen. Desweiteren weisen Moosfasersynapsen im Gegensatz zu den Schaffer-Kollateral-Synapsen eine geringe initiale Freisetzungswahrscheinlichkeit und eine präsynaptische LTP auf (HARRIS und COTMAN, 1986; NICOLL und SCHMITZ, 2005; ZALUTSKY und NICOLL, 1990). Die verschiedenen Formen der synaptischen Plastizität von Moosfasersynapse und Schaffer-Kollateral-Synapse ließen vermuten, dass deren Dornfortsätze in Morphologie und Dichte tatsächlich unterschiedlich reguliert werden und das Fehlen von Syndapin I unterschiedliche Auswirkungen in den verschiedenen Hippocampusregionen haben könnte. Um die verringerte CA1-Dornfortsatzdichte tatsächlich mit einer Veränderung in der Synapsendichte in direkten Zusammenhang zu bringen, wäre allerdings eine Analyse der CA1-Synapsendichte von *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen notwendig.

Ausgehend von den in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellten Defekten in der exzitatorischen sowie in der inhibitorischen synaptischen Transmission und von den hier beobachteten Syndapin I-vermittelten Effekten auf die reife Dornfortsatz- und Postsynapsendichte stellte sich die Vermutung einer Rolle von Syndapin I in der Bildung und/oder Aufrechterhaltung funktioneller Postsynapsen. *Patch-Clamp*-Messungen von hippocampalen CA1-Neuronen hatten reduzierte Frequenzen von mEPSCs und mIPSCs bei unveränderten Amplituden in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Neuronen ergeben (KOCH et al., 2011). Da eine Reduktion der Frequenzen von postsynaptischen Miniaturströmen zum einen durch eine verringerte Wahrscheinlichkeit der Neurotransmitterfreisetzung der Präsynapse und demnach durch eine Störung der Neurotransmitterfreisetzung durch Verlust von präsynaptischem Syndapin I erklärt werden kann, andererseits reduzierte mEPSC-Frequenzen aber auch eine verminderte Anzahl AMPA-Rezeptor beinhaltender, also funktioneller, Postsynapsen bedeuten können, wie z.B. Studien an *PSD-95*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten (BÉŒQUE et al., 2006), lieferten die Syndapin I<sup>-/-</sup>-Messungen keinen Aufschluss, ob die beobachteten Effekte auf den Syndapin I-Verlust in der Prä- und/oder Postsynapse zurückzuführen waren.

Die zur Aufklärung dieser Frage im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *Patch-Clamp*-Messungen an Syndapin I RNAi-Neuronen demonstrierten eine Störung in der synaptischen Transmission, die sich in einer signifikanten Verringerung der mEPSC-Frequenzen äußerte. Bei diesen Messungen konnte davon ausgegangen werden, dass Syndapin I-depletierte Neurone aufgrund der niedrigen Transfektionsrate in der Regel präsynaptischen Input von untransfizierten Zellen erhielten und der beobachtete Phänotyp demzufolge spezifisch einen postsynaptischen Effekt der Syndapin I-Depletion widerspiegelte. Die Reduktion der mEPSC-Frequenzen deutete also auf eine verminderte Anzahl funktioneller Synapsen hin. Syndapin I RNAi beeinflusste hingegen nicht die Amplituden der mEPSCs. Die mEPSC-Amplitude ergibt sich aus der Anzahl und Antwort der AMPA-Rezeptoren in der

postsynaptischen Membran. Tatsächlich wurde eine Rolle für Syndapin I in der Internalisation von AMPA-Rezeptoren durch die Interaktion mit dem *protein interacting with C kinase* (C-Kinase-interagierendes Protein, PICK1) während der NMDA-Rezeptor-induzierten LTD vorgeschlagen (ANGGONO et al., 2013). Auch präsynaptische Effekte, wie veränderte Freisetzungsmengen an Neurotransmittern, die durch eine gestörte Vesikelbildung oder gestörte kompensatorische Endozytose entstehen können, können eine Veränderung in der Antwortstärke der AMPA-Rezeptoren bewirken. Die hier gezeigten Daten deuteten allerdings darauf hin, dass Syndapin I in der Summe keinen Einfluss auf die Antwortstärke der Postsynapse hatte. Die elektrophysiologischen Syndapin I RNAi-Analysen wiesen demnach auf eine Störung in der synaptischen Transmission durch eine Verminderung funktioneller Synapsen hin, die in den in *Syndapin I*<sup>-/-</sup> bzw. Syndapin I RNAi-Neuronen beobachteten Störungen in der Bildung und/oder Aufrechterhaltung reifer Dornfortsätze begründet zu sein scheint.

In Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen Hypothese einer gestörten Bildung reifer Dornfortsätze durch Verlust von Syndapin I stand auch die Beobachtungen von PÉREZ-OTAÑO et al. (2006), dass Syndapin I mit der regulatorischen NMDA-Rezeptoruntereinheit NR3A interagiert und deren Internalisierung vermittelt. NR3A wird besonders in unreifen Dornfortsätzen exprimiert und die Internalisierung von NR3A ist für die Bildung reifer Dornfortsätze wichtig (DAS et al., 1998; PÉREZ-OTAÑO et al., 2006; WONG et al., 2002).

Mithilfe von fluoreszenzmikroskopischen Echtzeitbild- (*live imaging*-)Analysen der Dornfortsatzmorphologie von Syndapin I-depletieren Neuronen wäre eine direkte Visualisierung der Hypothese möglich, inwiefern in der Tat spezifisch die Umwandlung von filopodienähnlichen zu pilzförmigen Dornfortsätzen unter Syndapin I-Depletion gestört ist oder ob es sich um eine Störung in der Aufrechterhaltung reifer Dornen unter Syndapin I-Depletion handelt.

Die molekularen Mechanismen der postsynaptischen Effekte von Syndapin I wurden mit Hilfe zweier Syndapin I Mutanten näher eingegrenzt. Die I122E/M123E-Mutation der F-BAR-Domäne nach WANG et al. (2009) ermöglichte die Untersuchung des Einflusses der F-BAR-Domänen-vermittelten Membranassoziationseigenschaft (DHARMALINGAM et al., 2009; ITOH et al., 2005) auf die postsynaptischen Funktionen von Syndapin I. Die proteinbiochemischen Analysen bestätigten, dass durch die Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup>-Mutation die Membranbindungseigenschaft unabhängig von der Selbstassoziationseigenschaft von Syndapin I (KESSELS und QUALMANN, 2006) betrachtet werden konnte. Mit dem Einsatz dieser Mutante zeigte sich, dass der Syndapin I-Depletionsphänotyp in der reifen Dornfortsatz- und Synapsendichte sowie in der synaptischen Transmission von der Membranassoziationsfähigkeit von Syndapin I abhängig war. Die F-BAR-Domänen-vermittelte Fähigkeit von Syndapin I, an Membranen zu binden, diese zu krümmen und so Interaktionspartner räumlich und zeitlich in Membranmodulationsvorgängen zu regulieren (DHARMALINGAM et al., 2009; ITOH et al., 2005), spielt demzufolge eine wesentlich Rolle in der Funktion von Syndapin I in der Postsynapsenbildung. Dies ist konsistent mit einer kritischen Rolle der F-BAR-Domäne von Syndapin I in der präsynaptischen Vesikelbildung, der Zilienorganisation und der frühen

Neuromorphogenese (DHARMALINGAM et al., 2009; KOCH et al., 2011; SCHÜLER et al., 2013; SCHWINTZER et al., 2011).

Die SH3-Domänen-Deletionsmutante zeigte, dass der Syndapin I-Depletionsphänotyp hinsichtlich der Dichte reifer Dornfortsätze, der Synapsendichte sowie der synaptischer Transmission ebenso von SH3-Domänen-vermittelten Syndapin I-Interaktionen abhängig war und belegte somit die funktionelle Relevanz von Syndapin I-SH3-Domänen-Interaktionen in postsynaptischen Syndapin I-Funktionen. Syndapin I interagiert über die SH3-Domäne mit einer Vielzahl von Proteinen (KESSELS und QUALMANN, 2004), beispielweise mit dem Aktinnukleationspromotionsfaktor N-WASP (QUALMANN et al., 1999), mit dem Aktinnukleator Cobl (AHUJA et al., 2007) sowie mit dem endozytotisch relevanten Protein Dynamin und den präsynaptischen Proteinen Synapsin und Synaptojanin (MODREGGER et al., 2000; QUALMANN et al., 1999; QUALMANN und KELLY, 2000). Durch die F-BAR-Domänen-vermittelte Fähigkeit zur Selbstassoziation können darüber hinaus mehrere SH3-Domänen-Bindungspartner räumlich miteinander verknüpft werden (HALBACH et al., 2007; KESSELS und QUALMANN, 2006; SCHWINTZER et al., 2011). Im Vorfeld dieser Arbeit waren keine postsynaptisch angereicherten SH3-Domänen-vermittelten Interaktionspartner bekannt. Die Syndapin I-Bindung an die NMDA-Rezeptoruntereinheit NR3A (PÉREZ-OTÁÑO et al., 2006) wird über die NPF-Motive in Syndapin I realisiert. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte SH3-Domänen-Deletionsmutante, die nicht zur Aufhebung des durch Syndapin I RNAi-vermittelten Phänotypen führte, enthielt die NPF-Motive. Dies wies darauf hin, dass es unbekannte Syndapin I SH3-Domänen-Interaktionspartner gibt, die für die Postsynapsenbildung kritisch sind. Derartige Interaktionen wurden daher näher untersucht.

## 4.2 Syndapin I interagiert mit ProSAP/Shank-Proteinen

Mit ProSAP1 und ProSAP2 wurden zwei neue postsynaptische Interaktionspartner von Syndapin I charakterisiert, die als Gerüstproteine Hauptbestandteile der PSD darstellen (BÖCKERS et al., 1999a; 1999b; LIM et al., 1999; NAISBITT et al., 1999; TU et al., 1999). Neben den bislang bekannten postsynaptisch angereicherten Syndapin I-Interaktionspartnern NR3A und PICK1, die eine Rolle in Membrantransportvorgängen von NMDA- bzw. AMPA-Rezeptoren einnehmen (ANGGONO et al., 2013; PÉREZ-OTÁÑO et al., 2006), stand die Interaktion mit den ProSAP/Shank-Proteinen im Einklang mit der hier aufgedeckten Syndapin I-Funktion in der Bildung und/oder Aufrechterhaltung funktioneller Postsynapsen. Die Proteine ProSAP1 und ProSAP2 waren im Vorfeld dieser Arbeit als putative Syndapin I-SH3-Domänen-Bindungspartner identifiziert (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Britta Qualmann) und in *in vitro*-Bindungsrekonstitutionen als Bindungspartner von allen drei Syndapin-Isoformen bestätigt worden (Dr. Rashmi Ahuja Toivanen).

Da Syndapin I die dominierende Syndapin-Isoform im Gehirn darstellt (MODREGGER et al., 2000; PLOMANN et al., 1998; RITTER et al., 1999; QUALMANN et al., 1999; QUALMANN und KELLY, 2000) und die Syndapin-Isoformen II und III nur in sehr geringen Proteinmengen im

Gehirn exprimiert werden (persönliche Kommunikation, Dr. Dennis Koch), ließ dies vermuten, dass Syndapin I die physiologisch relevanteste Isoform in den meisten Neuronen darstellt. Der entwicklungsabhängige Anstieg in der Syndapin I-Expression, die im adulten Organismus ihr Maximum erreicht (DHARMALINGAM et al., 2009; KOCH et al., 2011; PLOMANN et al., 1998), stand im Einklang mit der vorgeschlagenen Rolle von Syndapin I in der Bildung und/oder Aufrechterhaltung von Postsynapsen. Aus der Studie mit *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen ging desweiteren hervor, dass Syndapin II und III eine Syndapin I-Defizienz nicht kompensieren (KOCH et al., 2011), was auf unterschiedliche zelluläre Funktionen der einzelnen Syndapin-Isoformen schließen ließ.

In weiterführenden Kopräzipitationsanalysen zeigte sich, dass nur die Isoformen ProSAP1 und ProSAP2 an die Syndapin I SH3-Domäne banden. Die N-terminalen Bereiche dieser beiden ProSAP/Shank-Isoformen weisen eine konservierte +++APPPP-Sequenz auf, die nicht in Shank1 vorkommt. Die Befunde, dass sich die ProSAP/Shank-Isoformen neben ihren räumlichen Expressionsmustern im Gehirn (BÖCKERS et al., 2004) auch in ihrer zeitlichen Expression in der PSD unterscheiden, da ProSAP1 und ProSAP2 zeitlich vor Shank1 und, im Gegensatz zu Shank1, SAM-Domänen vermittelt zur Postsynapse rekrutiert werden (BÖCKERS et al., 2005; GRABRUCKER et al., 2011; SALA et al., 2001), legten verschiedene Funktionen der einzelnen ProSAP/Shank-Isoformen während der Bildung, Reifung und Aufrechterhaltung von Dornfortsätzen nahe. Im Einklang dazu deutete die Studie von HUNG et al. (2008) darauf hin, dass Shank1 vermutlich eine größere Rolle in der Aufrechterhaltung und Ausreifung bereits existierender Dornfortsätze spielt. Da ProSAP1 als die dominierende Isoform in frühen Dornfortsatzstadien gilt (BÖCKERS et al., 1999a; GRABRUCKER et al., 2011), stand daher die funktionelle Charakterisierung der Interaktion von Syndapin I mit ProSAP1 in der Postsynapsenbildung in dieser Arbeit im Mittelpunkt.

Die +++APPPP-Sequenz als potentielles Syndapin I SH3-Domänen-Bindemotiv stand im Einklang mit einer *in silico*-Suche mit einer aus den Cobl KrRAPpPP-Motiven etablierten Konsensussequenz (SCHWINTZER et al., 2011; Doktorarbeit SCHWINTZER, 2012). Weiterführend ergaben Kopräzipitationsanalysen, dass die +++APPPP-Bindemotive für die Syndapin I SH3-Domänen-Bindung ausreichend sind und dass Syndapin I/ProSAP1-Komplexe über die beschriebene +++APPPP-Motiv/SH3-Domänen-Bindung direkt miteinander interagieren. Darüberhinaus wurde in Bindungsstudien sichtbar, dass die +++APPPP-Motiv-vermittelte ProSAP1/Syndapin I SH3-Domänen-Bindung von der ProSAP1/Abp1-SH3-Domänen-Bindung abgrenzbar war. Die Bindung zu Abp1, einem F-Aktin-bindenden Protein (KESSELS et al., 2000), wird über mehrere Bindemotive in ProSAP1 vermittelt, von denen keines mit der Syndapin I-Bindestelle in ProSAP1 übereinstimmt (HÄCKEL et al., 2008). Ebenso ist die Syndapin I-Bindung von der SH3-Domänen-Bindung des Aktin-bindenden Proteins Cortactin unterscheidbar, welche über ein in ProSAP1 und ProSAP2 konserviertes ppI-Motiv vermittelt wird (DU et al., 1998).

Auch in intakten Zellen existieren Syndapin I/ProSAP1-Komplexe, wie durch heterologe Koimmunpräzipitationen bestätigt wurde (Dr. Rashmi Ahuja Toivanen). Die Kopräzipitationen der endogenen Proteine aus Ratten- und Mausgehirnextrakten bewiesen, dass diese

Interaktion auch in der physiologischen Umgebung beider Proteine stattfindet. Desweiteren bestätigten fluoreszenzmikroskopische Korekrutierungsstudien, dass sich Syndapin I/ProSAP1-Komplexe in intakten Zellen bilden und dass Syndapin I in der Lage ist, ProSAP1 spezifisch an bestimmte zelluläre Membranen zu rekrutieren. Dieser Befund stand im Einklang mit bisherigen Studien, in denen gezeigt worden ist, dass Syndapin I Interaktionspartner an distinkte Membrankompartimente rekrutiert (DHARMALINGAM et al., 2009; KOCH et al., 2011; SCHÜLER et al., 2013; SCHWINTZER et al., 2011).

Koimmunfärbungen von Syndapin I und ProSAP1 ergaben, dass beide Proteine in Mausgehirnschnitten in Hippocampus und Kleinhirn sowie in intakten kultivierten Zellen in Dornfortsätzen kolokalisieren. Syndapin I und ProSAP1 wiesen eine besonders starke Anreicherung in den Moosfasersynapsen des *Stratum lucidum* im Hippocampusareal CA3 auf. Im Kleinhirn wurde eine deutliche Kolokalisation in Purkinjezellkörpern und in ihren dendritischen Ausläufern in der Molekularschicht sichtbar. Diese Beobachtungen waren mit den bereits beschriebenen Lokalisationen für ProSAP1 in der Molekularschicht des Hippocampus und in der Purkinjezellschicht des Kleinhirns (BÖCKERS et al., 1999a; 1999b; 2004) sowie einer Syndapin I-Anreicherung in Hippocampus, Kleinhirn und Striatum (PLOMANN et al., 1998) konsistent. Der Hippocampus besitzt als Teil des Papez-Neuronen-Kreises eine wichtige Lern- und Gedächtnisbildungsfunktion im deklarativen Gedächtnis und das Kleinhirn sowie das Striatum, als Bestandteil der Basalganglien, nehmen eine wichtige Lern- und Gedächtnisbildungsfunktion in prozeduralen Gedächtnis ein, wodurch diese Gehirnareale Bereiche starker Synapsenbildung und synaptischer Plastizität darstellen (BLISS und LØMO, 1973; HEBB, 2002; KANDEL und SCHWARTZ, 1982; MARR, 1969). Die Kolokalisation von Syndapin I und ProSAP1 in den Regionen starker Synapsenbildung und synaptischer Plastizität bestärkte die Vermutung einer physiologischen Relevanz der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion in neuronalen Zellen und ließ eine gemeinsame Funktion in diesen Prozessen vermuten.

## 4.3 Syndapin I & ProSAP1 kooperieren in der Postsynapsenbildung

Aus den hier dargestellten Analysen der *Syndapin I*<sup>-/-</sup>, der RNAi- sowie der Syndapin I-überexprimierenden Neurone wurde deutlich, dass Syndapin I eine wichtige Rolle in der Bildung und Funktion von Postsynapsen spielt. Darüber hinaus ließ die Interaktion von Syndapin I mit ProSAP1 in neuronalen Zellen eine gemeinsame Funktion in diesen Prozessen vermuten. Dass die Plattform-ähnliche Organisation der ProSAP/Shank-Proteine eine Grundvoraussetzung für die Bildung, Stabilität und Aufrechterhaltung von Dornfortsätzen ist (BARON et al., 2006; GRABRUCKER et al., 2011), bestätigten die hier und in BERKEL et al. (2012) und GRABRUCKER et al. (2011) gezeigten RNAi-vermittelten ProSAP1-Depletionsanalysen in hippocampalen Neuronenkulturen bzw. Studien an *ProSAP1*<sup>-/-</sup>-CA1-Neuronen (SCHMEISSER et al., 2012). Konsistenterweise belegten alle vier Studien, dass Störungen der ProSAP1-vermittelten Funktionen maßgeblich die Anzahl synaptischer Kontakte beeinflussen. In den

hier durchgeführten Analysen zeigten sich signifikant verringerte Dichten prä- und postsynaptischer Punkte entlang ProSAP1 RNAi-exprimierender Dendriten. Dahingegen führte weder die Überexpression noch die RNAi-vermittelte Depletion von ProSAP1 in den hier durchgeführten Dornfortsatzanalysen zu einer signifikanten Veränderung der Dichte von pilzförmigen Dornen kultivierter Neurone. Dieses Ergebnis stand mit RNAi-Depletionsstudien von ProSAP1 (BERKEL et al., 2012) bzw. ProSAP2 (HÄCKEL et al., 2008) sowie Überexpressionsstudien von Shank1 (SALA et al., 2001) im Einklang, aus denen hervorging, dass Änderungen des ProSAP/Shank-Expressionsniveaus keinen direkten Einfluss auf die Dornfortsatzdichte bzw. auf die Dichte pilzförmiger Dornfortsätze kultivierter Neurone haben. Allerdings beschrieb ROUSSIGNOL et al. (2005), dass die Depletion von ProSAP2 zu einem signifikanten Verlust an Dornfortsätzen führt. Im Gegensatz zu den in BERKEL et al. (2012) und hier dargestellten unveränderten Dornfortsatzdichten unter ProSAP1 RNAi in kultivierten Neuronen zeigten auch CA1-Neurone in *ProSAP1<sup>-/-</sup>*-Gehirnschnitten deutlich verringerte Dornfortsatzdichten (SCHMEISSER et al., 2012). Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten in den verschiedenen Reifestadien und morphologischen Analysekriterien der Studien liegen.

Die Phänokopie zwischen ProSAP1- und Syndapin I-Depletion in der Synapsendichte machte deutlich, dass beide Proteine eine wichtige Rolle in der Synapsenbildung einnehmen. Interessanterweise führte eine Überexpression von Syndapin I zu einer Aufhebung des ProSAP1-Depletionsphänotypen. Dieser Befund führte zu der Vermutung einer Kooperativität in der Postsynapsenbildung. Anhand der hier durchgeführten Dichteanalysen pilzförmiger Dornen unter ProSAP1-Überexpression und Störung der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung durch Blockierung oder Mutation der Syndapin I-Bindestelle bzw. Syndapin I-Depletion, die zu einem Verlust von reifen Dornfortsätzen führten, wurde sichtbar, dass die Komplexbildung von Syndapin I und ProSAP1 ein essentieller Faktor für die Bildung reifer Dornfortsätze ist. Dieser Befund bestärkte die Vermutung einer Kooperativität in der Postsynapsenbildung. Desweiteren wurde die Relevanz der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung für die Synapsenbildung anhand der reduzierten Synapsendichte unter +++APPPP-Motiv-Überexpression deutlich. Ein Überangebot von Syndapin I-bindenden +++APPPP-Motiven bewirkte eine Komplexierung von endogenem Syndapin I und führte damit zu Störungen in der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung und demzufolge zu ähnlichen Effekten in der Synapsendichte wie unter Syndapin I-Depletion.

Neben morphologischen Synapsenanalysen erwiesen auch funktionelle Studien eine Phänokopie zwischen Syndapin I- und ProSAP1-Depletion. *ProSAP1<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigten neben einer verminderten Gesamtdornfortsatzdichte ebenfalls reduzierte mEPSC-Frequenzen (SCHMEISSER et al., 2012). Diese Beobachtungen waren denen der *Syndapin I<sup>-/-</sup>*-Mäuse sehr ähnlich (KOCH et al., 2011). Zusammengenommen bekräftigen diese Befunde die Vermutung, dass Syndapin I und ProSAP1 in der Bildung funktioneller Postsynapsen kooperieren. Auch die Abhängigkeit des Syndapin I-Depletionsphänotypen in der Postsynapsenbildung und in der synaptischen Transmission von SH3-Domänen-vermittelten Interaktionen stand mit der Hypothese einer kritischen Rolle von Syndapin I/ProSAP1-Komplexen in der Postsynapsenfunktion im Einklang.

Der Umstand, dass sich die ProSAP1-Überexpressions-vermittelte Kopfaufweitung von der Anwesenheit und der Komplexbildung mit Syndapin I abhängig zeigte, unterstrich die Bedeutung der Komplexbildung von Syndapin I mit ProSAP1 in der Bildung und strukturellen Plastizität von Dornfortsätzen. Der ProSAP1-vermittelte Effekt in der Kopfaufweitung wurde sowohl durch die Blockierung der Syndapin I-Bindestelle in ProSAP1 durch die Koexpression der Syndapin I SH3-Domäne als auch durch die Mutation dieser Bindestelle unterdrückt. Syndapin I RNAi-Experimente belegten, dass die Kopfaufweitung in der Tat explizit von der Anwesenheit von Syndapin I abhängig ist. Die Depletion oder die Überexpression von Syndapin I allein zeigte keinen Einfluss auf die Kopfbreite von Dornfortsätzen. Im Einklang mit diesen Analysen konnte die Überexpression von Syndapin I den Kopfbreitenverlust, der durch die ProSAP1-Depletion ausgelöst wurde, nicht aufheben. Es handelte sich demnach bei der Syndapin I/ProSAP1-Funktion nicht um einen additiven oder alternativen Funktionsmechanismus, sondern vermutlich eher um eine Kooperation im Entwicklungsprozess reifer Dornfortsätze. Zusammengefasst legen diese Analysen nahe, dass Syndapin I eine mögliche organisatorische Funktion in der Entwicklung reifer Dornfortsätze einnimmt, die der ProSAP1-vermittelten Gerüstfunktion vermutlich vorgeschaltet ist.

Damit unterschied sich die Syndapin I/ProSAP1-Interaktion deutlich von der Interaktion der ProSAP/Shank-Proteine mit Abp1, welche eine Rolle in der Aufweitung von Dornfortsatzköpfen einnimmt, wie sie u.a. für morphologische Veränderungen während der synaptischen Plastizität benötigt wird (HÄCKEL et al., 2008). Desweiteren unterschied sich die Syndapin I/ProSAP1-Interaktion von der Interaktion der ProSAP/Shank Isoform Shank1 mit Cortactin (NAISBITT et al., 1999), welche eine Rolle in der aktivitätsabhängigen Regulation der Dornfortsatzlänge und -kopfgroße spielt (HERING und SHENG, 2003).

## 4.4 Syndapin I beeinflusst die räumliche Organisation von ProSAP1

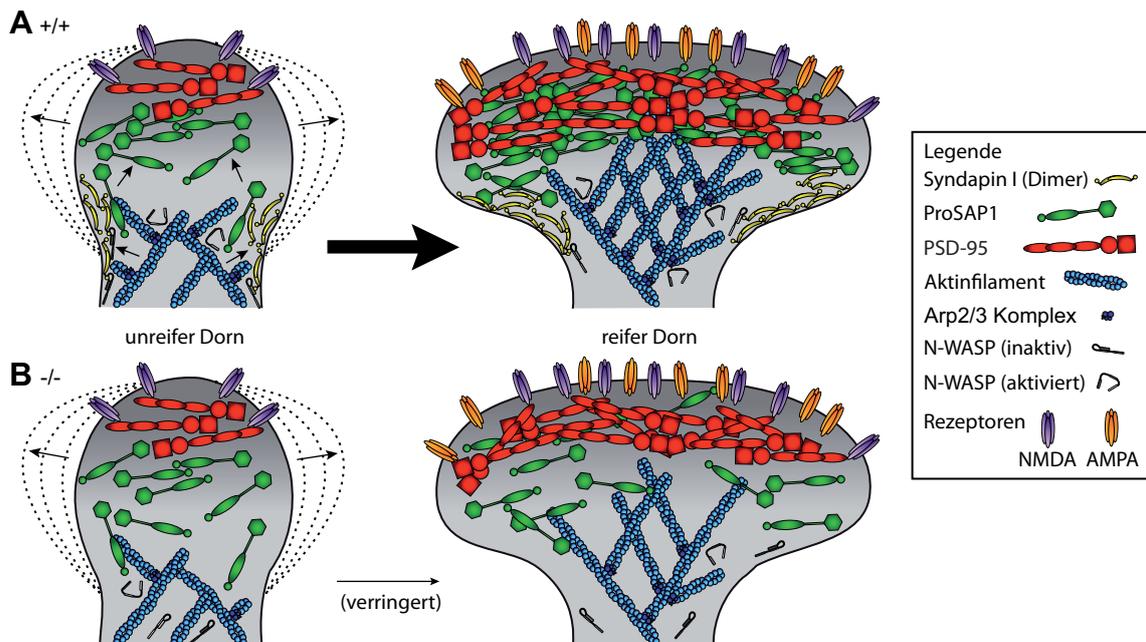
Ausgehend von der organisatorischen Funktion von Syndapin I in der räumlichen Verknüpfung verschiedener Interaktionspartner mit Membranmodulationsvorgängen (DHARMALINGAM et al., 2009; KOCH et al., 2011; MODREGGER et al., 2000; QUALMANN und KELLY, 2000; SCHÜLER et al., 2013; SCHWINTZER et al., 2011), die u.a. während der frühen Neuromorphogenese (DHARMALINGAM et al., 2009; SCHWINTZER et al., 2011) ebenso wie während der Zilienorganisation (SCHÜLER et al., 2013) relevant sind und der hier dargestellten funktionellen Relevanz der SH3- und F-BAR-Domänen-vermittelten Syndapin I-Funktionen sowie der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung in der Bildung funktioneller Postsynapsen ließ vermuten, dass Syndapin I eine maßgebliche Rolle in der Organisation von ProSAP1 in der Postsynapse spielt.

*In vitro*-Liposomenflotationsexperimente mit rekonstituierten Syndapin I/ProSAP1-Komplexen demonstrierten, dass Syndapin I in der Lage ist, ProSAP1 an Membranlipide zu binden und unterstützten somit die Vermutung einer räumlichen Organisation von ProSAP1 durch Syndapin I. Diese Hypothese wurde durch Beobachtungen in elektronenmikroskopischen

Studien an Syndapin I-immunmarkierten Gefrierbruchreplika hippocampaler Neurone bekräftigt, die zeigten, dass membranassoziertes Syndapin I in Dornfortsätzen, insbesondere in stummelförmigen, dünnen sowie in pilzförmigen Dornen, angereichert ist (SCHNEIDER et al., 2014). Dabei war besonders in den Köpfen der Dornfortsätze aller untersuchter Morphologiegruppen eine signifikante Anreicherung von membranassoziertem Syndapin I im Vergleich zum dendritischen Kompartiment sichtbar. Desweiteren zeigten die Studien in SCHNEIDER et al. (2014), dass membranassoziertes Syndapin I in Kopf- und Basisregionen der Dornfortsätze in höhergeordneten Aggregaten vorliegt. Dies bestätigte die in *in vitro*-Studien von KESSELS und QUALMANN (2006) formulierte Hypothese der Ausbildung multimerer Syndapin-Aggregate durch Syndapin-Oligomerisation und führte zu der Vermutung, dass sich membranassoziertes Syndapin I in höhergeordnete Aggregate im Dornfortsatzkopf zusammenlagert, um SH3-Domänen-Bindungspartner der PSD, wie beispielsweise ProSAP1, in der Postsynapse untereinander oder mit anderen SH3-Domänen-Interaktionspartnern zu verknüpfen. Dadurch würden diese Syndapin I-Membranmikrodomänen eine wichtige Rolle in der räumlichen Organisation postsynaptischer Gerüstproteine während der Bildung und Aufrechterhaltung der Postsynapse einnehmen.

Im Einklang mit dieser Hypothese erwies sich die Lokalisation von ProSAP1 in der PSD von *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Neuronen verändert. Die Fläche des ProSAP1-Signals war signifikant vergrößert, die Menge an ProSAP1, gemessen an der summierten Signalintensität, blieb jedoch unverändert. Dies ließ auf eine Störung in der Zusammenlagerung der ProSAP1-Plattformen schließen. Dahingegen traten keine Änderungen in der räumlichen Organisation von PSD-95 in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Neuronen auf. In Einklang damit wiesen auch elektronenmikroskopische Messungen der PSD-Breite in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Gehirnschnitten keine Abweichungen zu wildtypischen Gehirnschnitten auf (KOCH et al., 2011). Diese Befunde legten nahe, dass Syndapin I keinen direkten Einfluss auf die Ausdehnung der PSD hat, sondern eine spezifische Grundlage für die räumliche Organisation seiner Interaktionspartner, wie dem hier beschriebenen ProSAP1, schafft. Die Vermutung einer postsynaptischen Syndapin I-Funktion in der räumlichen Organisation von ProSAP1 wäre besonders während der Entwicklung reifer Dornfortsätze denkbar. Sie steht zudem mit den im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Syndapin I-Defizienz-vermittelten Defekten in der Postsynapsenbildung und -funktion im Einklang (Abb. 36A).

Desweiteren könnte die Syndapin I-vermittelte räumliche Organisation von ProSAP1 die Grundlage für die indirekte oder direkte Rekrutierung weiterer ProSAP-Isoformen zu schon bestehenden ProSAP1-Plattformen darstellen. Studien belegten, dass ProSAP1 eine der ersten Komponenten in sich bildenden PSDs ist, sowie dass die räumliche Organisation von ProSAP/Shank-Isoformen über verschiedene Mechanismen reguliert wird (BÖCKERS et al., 1999a, 2005; GRABRUCKER et al., 2011; SALA et al., 2001). Ausgehend von der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsanalyse der ProSAP/Shank-Isoformen ist denkbar, dass Syndapin I auch über eine Interaktion mit ProSAP2 eine Rolle in dessen räumlicher Organisation spielt. Möglicherweise könnte darüber hinaus auch die räumliche



**Abbildung 36: Modell der Syndapin I-vermittelten ProSAP1-Organisation in der Postsynapsenbildung.** Dargestellt ist ein Modell der Syndapin I-vermittelten ProSAP1-Organisation in der Postsynapsenbildung in *Syndapin I*<sup>+/+</sup> (+/+, **A**) und *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen (-/-, **B**). **A**, In der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Postsynapsen (links, unreifer Dorn) ermöglichen Syndapin I-Membranmikrodomänen im Dornfortsatzkopf die Induktion positiver Membrankrümmung und die Zusammenlagerung von ProSAP1 zu ProSAP1-Plattformen in der PSD sowie die zielgerichtete kortikale Aktinpolymerisation zur notwendigen Kraftgenerierung für die Ausbildung des Dornfortsatzkopfes eines reifen Dorns (rechts). **B**, Das Fehlen von Syndapin I führt zu einer gestörten ProSAP1-Organisation zu ProSAP1-Plattformen in der PSD während der Bildung der Postsynapse. Nicht korrekt ausgebildete ProSAP1-Plattformen sowie eine Beeinträchtigung der zielgerichteten kortikalen Aktinpolymerisation könnten Ursache eines verminderten Übergangs von unreifen zu reifen Dornen darstellen.

Organisation von Shank1 über intermolekulare ProSAP/Shank-Wechselwirkungen indirekt von einer korrekten Syndapin I-Funktion abhängig sein. Um dies näher aufzuklären, wären weitere Studien zur Lokalisation von Shank1 sowie ProSAP2 in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Neuronen notwendig.

Die spezifischen Eigenschaften der Syndapin I-F-BAR-Domäne mit einer Lipidbindungsaffinität zu phosphatidylserinreiche Membranen, wie beispielsweise Plasmamembranen, (DHARMALINGAM et al., 2009; ITOH et al., 2005) und der Keilschleifen-vermittelten Fähigkeit zur vergleichsweise starken Membrankrümmung und -bindung (HENNE et al., 2007; SHIMADA et al., 2007; RAO et al., 2010; WANG et al., 2009) sowie der Selbstassoziationsfähigkeit zu höhergeordneten Schichten, die zur Bildung von tubulären und vesikulären Strukturen mit verschiedenen großen Durchmessern befähigen (WANG et al., 2009), stehen mit der hier vorgeschlagenen Syndapin I-Funktion während der Entwicklung reifer Dornfortsätze und damit einhergehend einer funktionellen Postsynapse im Einklang. Basierend auf den Modellvorstellungen von SHIMADA et al. (2010) zur Induktion von filopodienartigen Ausstülpungen von der Plasmamembran durch Syndapin II, ist eine Zusammenlagerung höhergeordneter Aggregate an der Basis und im unteren Kopfbereich des Dornfortsatzes zur Erzeugung positiver Krümmung für Syndapin I vorstellbar (Abb. 36A). Studien der Dornfortsatz- und Synapsendichte sowie elektrophysiologische Messungen der mEPSCs von Rettungsversuchen

mit Keilschleifen-mutierten Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup>, welche nicht mehr zur Membranassoziation in der Lage ist, unterstrichen die funktionelle Relevanz von postsynaptischem, membranassoziiertem Syndapin I für die Postsynapsenbildung und -funktion.

Für die Bildung reifer Dornfortsätze sowie ihrer Vorläufer ist auch eine Kooperation zwischen verschiedenen (F-)BAR-Domänenproteinen denkbar, die sich in ihren Bindungseigenschaften unterscheiden und bei dem Membrankrümmungsprozess räumlich und zeitlich verschieden funktionieren. Im Einklang dazu wurden kürzlich in den Studien von CARLSON et al. (2011) und WAKITA et al. (2011) für zwei weitere F-BAR-Domänenproteine, das an negativ gekrümmte Membranen bindende inverse F-BAR-Domänenprotein WRP (*WASP Verprolin-homologous protein-associated Rac GTPase-activating protein*) (GUERRIER et al., 2009) und das Formin-bindende Protein (FBP)17, Funktionen in der Bildung bzw. Aufrechterhaltung von Dornfortsätzen vorgeschlagen. Der Verlust von WRP führte zu einer verringerten Dornfortsatzdichte, Störungen der Langzeitgedächtnisbildung und deutete auf eine Relevanz für die Initiation filopodienähnlicher Dornfortsatzvorläufer durch die Induktion stark negativ gekrümmter Membrantopologie hin (CARLSON et al., 2011). In der Studie von WAKITA et al. (2011) wurde deutlich, dass das F-BAR-Domänenprotein FBP17, ähnlich zu Syndapin I, F-BAR- und SH3-Domänen-abhängig sowie abhängig von der kleinen Rho GTPase Rnd2-Interaktion für die Dornfortsatzdichte relevant ist, eine Überexpression im Gegensatz zu Syndapin I jedoch nicht zu einer erhöhten Dornfortsatzbildung führte.

Während der Induktion filopodienähnlicher Dornfortsätze sowie während der Etablierung und Aufrechterhaltung reifer Dornfortsätze ist eine Restrukturierung des kortikalen, verzweigten Aktinzytoskeletts an bestimmten Membranarealen notwendig, um die benötigten Kräfte für die Induktion filopodienähnlicher Strukturen sowie für die Erzeugung der Krümmung des Dornfortsatzkopfes zu generieren und um plastische Prozesse des Dornfortsatzkopfes zu ermöglichen (DUNAEVSKY et al., 1999; ETHELL und PASQUALE, 2005; FISCHER et al., 1998; KOROBOVA und SVITKINA, 2010). Diese Ansicht wurde von Beobachtungen von WEGNER et al. (2008) und KIM et al. (2013) unterstrichen. Diese Studien zeigten, dass der Verlust der N-WASP- bzw. der Arp2/3-Komplex-Funktion in Neuronen zu einem Verlust dendritischer Dornfortsätze führt. Zudem resultierte ein Arp3-Verlust in einem Auftreten von neuropsychiatrischen Verhaltensstörungen (KIM et al., 2013). Da sich der ProSAP1-vermittelte Kopfaufweitungseffekt mittels Depletion von Arp3 sowie mittels Depletion von N-WASP als unterdrückbar erwies, zeigten auch die hier durchgeführten Analysen klar eine Abhängigkeit der ProSAP1-vermittelten Funktionen in Dornfortsatzköpfen von der Anwesenheit des Arp2/3-Komplexes und von N-WASP. Diese Daten werden durch die im Zuge der ProSAP1/Abp1-Untersuchungen erhobenen Befunde von HÄCKEL et al. (2008) unterstützt. Eine Verknüpfung der Aktinnukleationsmaschinerie des Arp2/3-Komplexes über N-WASP-Bindung mit sich ausbildenden ProSAP-Plattformen ist an Syndapin I-Membranmikrodomänen in Kopf- und Basisregionen des sich ausbildenden Dornfortsatzes denkbar (Abb. 36A). Eine Funktion von Syndapin I als Aktindynamik-regulierendes Protein während der Dornfortsatzbildung könnte den Funktionen von anderen Aktinzytoskelett-modulierenden und

ProSAP-bindenden Proteinen, wie Abp1 und Cortactin, zeitlich vorgeschaltet sein. Diese spielen bei während plastischen Veränderungen bereits ausgebildeter Dornfortsatzköpfe eine wichtige Rolle (HÄCKEL et al., 2008; HERING und SHENG, 2003).

Durch das Fehlen von Syndapin I kommt es möglicherweise zu einer gestörten Bildung von ProSAP-Plattformen zusammen mit einer Beeinträchtigung der zielgerichteten Aktinpolymerisation in sich ausbildenden Dornfortsatzköpfen. Dies könnte die Anzahl der reifen Dornen stark beeinträchtigen (Abb. 36B).

Pathologisch relevant ist möglicherweise die Kolo-kalisation von Syndapin I und ProSAP1 in Moosfasersynapsen der hippocampalen CA3-Region, da eine Umstrukturierung des Moosfasernetzwerkes in der Molekularschicht des Gyrus Dentatus als eine Ursache der Temporallappenepilepsie (TLE) betrachtet wird (BABB et al., 1991; BUCKMASTER et al., 2002; OKAZAKI et al., 1995; REPRESA et al., 1989). In der TLE wurde eine starke Quervernetzung der Körnerzellen des Gyrus Dentatus einhergehend mit einem Verlust der hilaren Interneurone beobachtet (BUCKMASTER et al., 2002; OKAZAKI et al., 1995). Das exzitatorisch-inhibitorische Ungleichgewicht durch solche ausgedehnten, rückläufigen Schaltkreise exzitatorischer Neurone senkt die Synchronisationsschwelle der Neurone. Diese Veränderungen können epileptische Krampfanfälle, vergleichbar mit den bei *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachteten Krampfanfällen (KOCH et al., 2011), hervorrufen (ESCLAPEZ et al., 1999; PEREZ et al., 1996). Ein Zusammenhang zwischen Moosfasersynapse, Epilepsie und freien, chelatierbaren Zink-Ionen wurde ebenfalls stark diskutiert (COULTER, 2000; DUDEK, 2001; FREDERICKSON et al., 2005). Interessanterweise sind Zink-Ionen neben ihren neuromodulatorischen Eigenschaften wichtig für die Stabilität der PSD (JAN et al., 2002). Sie tragen zur SAM-Domänen-vermittelten Ausbildung von multimeren Plattformen der zinksensitiven ProSAP/Shank-Isoformen ProSAP1 und ProSAP2 bei (BARON et al., 2006; GRABRUCKER et al., 2011; GUNDELFINGER et al., 2006). Störungen dieser Zink-Ionen-vermittelten ProSAP/Shank-Plattformen werden demzufolge als eine mögliche molekulare Ursache für ASD gehandelt (GRABRUCKER et al., 2014; SCHMEISSER et al., 2012). *ProSAP1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten mit dem Auftreten von Hyperaktivität, von autismusähnlichen Verhaltensmerkmalen wie repetitivem Putzverhalten, von sprachlichen und sozialen Verhaltensstörungen, und von Verkrampfungen der Hinterbeine typische Merkmale des ASD-Mausmodells (SCHMEISSER et al., 2012). Da Epilepsie als Ursache bzw. Begleitsymptom in dem Krankheitsbild der ASD diskutiert wurde (DEONNA und ROULET, 2006), könnte eine gestörte Syndapin I/ProSAP1-Interaktion in Moosfasersynapsen einen möglichen molekularen Zusammenhang zwischen Epilepsie und ASD darstellen. Im Einklang dazu belegten Studien von Patienten mit Defekten in den ProSAP/Shank-Genen epileptische Störungen (JIANG und EHLERS, 2013). Verhaltensanalysen der *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf autismusähnliche Verhalten, wie sie an *ProSAP1*<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt wurden (SCHMEISSER et al., 2012), sowie Untersuchungen des Moosfasernetzwerkes in *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen, wie in BABB et al. (1991) durchgeführt, wären geeignet die Aufklärung der pathologischen Relevanz der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion weiter voranzutreiben.

## 5 Zusammenfassung

Molekulare Grundlage für die Bildung dendritischer Dornfortsätze und deren morphologische Veränderung bilden Proteine, die an der Organisation des postsynaptischen Kompartiments und Prozessen der Membranmodulation und Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind. Die F-BAR-Domänenproteine der Syndapin-Familie sind in der Lage, an gekrümmte Membranen zu binden bzw. Membrankrümmung zu induzieren und diese membrantopologischen Veränderungen zeitlich und räumlich mit Membrantransportprozessen und der Aktindynamik zu verknüpfen. In Neuronen ist diese Syndapin I-Fähigkeit essentiell für die Neuritenbildung, die korrekte Bildung präsynaptischer Vesikel sowie für die neuronale Netzwerkaktivität. In dieser Arbeit wurde eine postsynaptische Funktion von Syndapin I in der Synapsenbildung identifiziert. Der Verlust von Syndapin I führte zu einer verminderten Bildung reifer Dornfortsätze und Synapsen sowie zu reduzierten Frequenzen von mEPSCs. Die postsynaptischen Funktionen von Syndapin I waren sowohl von der SH3-Domänen-vermittelten Interaktion mit dem PSD-Gerüstprotein ProSAP1 als auch von der F-BAR-Domänen-vermittelten Membranassoziationsfähigkeit von Syndapin I abhängig. ProSAP1 nimmt eine wichtige Rolle in der Organisation der PSD während der Bildung von reifen Dornfortsätzen und synaptischen Kontakten ein. Biochemische Studien zeigten eine SH3-Domänen-vermittelte Bindung von Syndapin I an ein spezifisches +++APPPP-Motiv in ProSAP1, welches sich von Bindungsmotiven anderer SH3-Domänen-Interaktionspartner abgrenzen ließ. Die Bildung der Syndapin I/ProSAP1-Komplexe ließ sich *in vitro* und in intakten Zellen nachweisen und beide Proteine kolokalisierten in dendritischen Dornfortsätzen und Gehirnarealen starker Synapsenbildung und synaptischer Plastizität. Dass die Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung für die Bildung von reifen Dornfortsätzen und Synapsen wichtig ist, machten die signifikant verminderten Dichten pilzförmiger Dornfortsätze und synaptischer Kontakte deutlich, die durch Störungen der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung mittels Syndapin I oder ProSAP1 RNAi bzw. -Mutanten induziert wurden. Die Membranassoziationseigenschaft der Syndapin I-F-BAR-Domäne befähigt Syndapin I zur Rekrutierung von ProSAP1 an plasmamembranähnliche Lipidschichten und macht eine räumliche Regulation der ProSAP1-Gerüstfunktion in der Organisation der PSD denkbar. Unter Syndapin I-Defizienz zeigte sich in der Tat eine veränderte räumliche Lokalisation von ProSAP1 in Dornfortsatzköpfen, welche wahrscheinlich zu der beobachteten verringerten Dornfortsatzbildung sowie Störungen in der synaptischen Übertragung in Syndapin I-defizienten Neuronen beiträgt. Durch Ausbildung höhergeordneter, membranassoziiierter Syndapin I-Aggregate ist eine Verknüpfung des SH3-Domänen-Interaktionspartners ProSAP1 mit der Dornfortsatzmembran vorstellbar. Dies würde eine räumliche Organisation des molekularen Apparats der Postsynapse während den morphologischen Veränderungen im Zuge der Bildung reifer Dornfortsätze ermöglichen. Der Verlust exzitatorischer Synapsen durch eine gestörte ProSAP1-Organisation unter Syndapin I-Defizienz stellt eine mögliche Erklärung für das epileptische Krankheitsbild Syndapin I-defizienter Mäuse dar.

## 6 Summary

The molecular basis for the formation of dendritic spines and their morphological changes is provided by proteins involved in the organization of the postsynaptic compartment as well as in membrane sculpting and actin cytoskeleton remodelling events. The F-BAR domain proteins of the syndapin family are able to bind and/or induce curved membrane structures and interconnect these membrane topology changes temporally and spatially with membrane trafficking and actin dynamics. In neurons, syndapin I is essential for neuritogenesis, proper formation of presynaptic vesicles and neuronal network activity. Here I show a postsynaptic function of syndapin I in postsynapse formation. Loss of syndapin I led to reduced dendritic spine and synapse densities as well as to impaired mEPSC frequencies. Postsynaptic functions of syndapin I were dependent on both the SH3 domain-mediated interaction with the PSD master scaffold protein ProSAP1 and the F-BAR domain-mediated membrane association ability of syndapin I. ProSAP1 functions are essential for the PSD organization during the formation of mature spines and the establishment of synaptic contacts. Biochemical studies revealed that the binding of syndapin I to ProSAP1 is mediated by the SH3 domain of syndapin I and a specific +++APPPP-motif in ProSAP1, which differs from SH3 domain binding motifs of other ProSAP1 interaction partners. The formation of syndapin I/ProSAP1 complexes was proven *in vitro* and in intact cells, and both proteins colocalized in dendritic spines and brain areas of high synapse formation and synaptic plasticity. Reduced densities of mushroom spines and synaptic puncta upon impaired syndapin I/ProSAP1 complex formation mediated by syndapin I or ProSAP1 RNAi and mutants, respectively, underlined the critical role of syndapin I/ProSAP1 complexes for the formation of mature spines and synapses. Membrane association of the syndapin I F-BAR domain enables syndapin I to recruit ProSAP1 to membranes and might thereby provide spatial regulation of ProSAP1 scaffold functions. In line with this hypothesis, syndapin I deficiency led to a impaired spatial localization of ProSAP1 in the spine head, which might explain the reduced dendritic spine formation as well as the disturbed synaptic transmission in syndapin I-deficient neurons. Through assembly of higher-ordered clusters of membrane-associated syndapin I the SH3 domain interaction partner ProSAP1 could be linked to defined sites within the membrane of dendritic spines providing spatial cues for the organization of the molecular postsynaptic machinery required for the establishment of mature dendritic spines. A loss of excitatory synapses resulting from an impaired ProSAP1 organization under syndapin I deficiency might provide an explanation for the epileptic phenotype of syndapin I-deficient mice.

# 7 Literaturverzeichnis

- AHUJA, RASHMI, R. PINYOL, N. REICHENBACH, L. CUSTER, J. KLINGENSMITH, M. M. KESSELS und B. QUALMANN (2007). *Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology*. Cell, 131(2):337–50.
- ANDERSSON, FREDRIK, J. JAKOBSSON, P. LÖW, O. SHUPLIAKOV und L. BRODIN (2008). *Perturbation of syndapin/PACSIN impairs synaptic vesicle recycling evoked by intense stimulation*. The Journal of Neuroscience, 28(15):3925–3933.
- ANGGONO, VICTOR, Y. KOÇ-SCHMITZ, J. WIDAGDO, J. KORMANN, A. QUAN, C.-M. CHEN, P. J. ROBINSON, S.-Y. CHOI, D. J. LINDEN, M. PLOMANN und ANDERE (2013). *PICK1 interacts with PACSIN to regulate AMPA receptor internalization and cerebellar long-term depression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 110(34):13976–13981.
- ANGGONO, VICTOR, K. J. SMILLIE, M. E. GRAHAM, V. A. VALOVA, M. A. COUSIN und P. J. ROBINSON (2006). *Syndapin I is the phosphorylation-regulated dynamin I partner in synaptic vesicle endocytosis*. Nature Neuroscience, 9(6):752–60.
- BABB, THOMAS L., W. R. KUPFER, J. K. PRETORIUS, P. H. CRANDALL und M. F. LEVESQUE (1991). *Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata*. Neuroscience, 42(2):351–363.
- BANKER, GARY A. und M. W. COWAN (1977). *Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture*. Brain Research, 126(3):397–425.
- BARON, MARISA K., T. M. BÖCKERS, B. VAIDA, S. FAHAM, M. GINGERY, M. R. SAWAYA, D. SALYER, E. D. GUNDELFINGER und J. U. BOWIE (2006). *An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density*. Science, 311(5760):531–535.
- BAUDE, AGNES, Z. NUSSER, D. B. ROBERTS, E. MULVIHILL, R. JEFFREY MCLLHINNEY und P. SOMOGYI (1993). *The metabotropic glutamate receptor (mGluR $\alpha$ ) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction*. Neuron, 11(4):771–787.
- BÉIQUE, JEAN-CLAUDE, D.-T. LIN, M.-G. KANG, H. AIZAWA, K. TAKAMIYA und R. L. HUGANIR (2006). *Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 103(51):19535–19540.
- BEKKERS, JOHN M. und C. F. STEVENS (1989). *NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus*. Nature.
- BERKEL, SIMONE, C. R. MARSHALL, B. WEISS, J. HOWE, R. ROETH, U. MOOG, V. ENDRIS, W. ROBERTS, P. SZATMARI, D. PINTO und ANDERE (2010). *Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation*. Nature Genetics, 42(6):489–491.
- BERKEL, SIMONE, W. TANG, M. TREVIÑO, M. VOGT, H. A. OBEHHAUS, P. GASS, S. W. SCHERER, R. SPRENGEL, G. SCHRATT und G. A. RAPPOLD (2012). *Inherited and de novo SHANK2 variants associated with autism spectrum disorder impair neuronal morphogenesis and physiology*. Human Molecular Genetics, 21(2):344–357.
- BLISS, TIMOTHY V. P. und T. LÖMO (1973). *Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path*. The Journal of Physiology, 232(2):331–356.
- BÖCKERS, TOBIAS M. (2006). *The postsynaptic density*. Cell and Tissue Research, 326(2):409–422.
- BÖCKERS, TOBIAS M., J. BOCKMANN, M. R. KREUTZ und E. D. GUNDELFINGER (2002). *ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease*. Journal of Neurochemistry, 81(5):903–910.
- BÖCKERS, TOBIAS M., M. R. KREUTZ, C. WINTER, W. ZUSCHRATTER, K.-H. SMALLA, L. SANMARTI-VILA, H. WEX, K. LANGNÄSE, J. BOCKMANN, C. C. GARNER und ANDERE (1999a). *Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density*. The Journal of Neuroscience, 19(15):6506–6518.
- BÖCKERS, TOBIAS M., T. LIEDTKE, C. SPILKER, T. DRESBACH, J. BOCKMANN, M. R. KREUTZ und E. D. GUNDELFINGER (2005). *C-terminal synaptic targeting elements for postsynaptic density proteins ProSAP1/Shank2 and ProSAP2/Shank3*. Journal of Neurochemistry, 92(3):519–524.
- BÖCKERS, TOBIAS M., M. G. MAMEZA, M. R. KREUTZ, J. BOCKMANN, C. WEISE, F. BUCK, D. RICHTER, E. D. GUNDELFINGER und H.-J. KREIENKAMP (2001). *Synaptic scaffolding proteins in rat brain. Ankyrin repeats of the multidomain SHANK protein family interact with the cytoskeletal protein  $\alpha$ -Fodrin*. The Journal of Biological Chemistry, 276(43):40104–40112.
- BÖCKERS, TOBIAS M., M. SEGGER-JUNIUS, P. IGLAUER, J. BOCKMANN, E. D. GUNDELFINGER, M. R. KREUTZ, D. RICHTER, S. KINDLER und H.-J. KREIENKAMP (2004). *Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3 untranslated region of Shank1 mRNA*. Molecular and Cellular Neuroscience, 26(1):182–190.
- BÖCKERS, TOBIAS M., C. WINTER, K.-H. SMALLA, M. R. KREUTZ, J. BOCKMANN, C. SEIDENBECHER, C. C. GARNER und E. D. GUNDELFINGER (1999b). *Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 264(1):247–252.
- BOYER, CHRISTOPHER, T. SCHIKORSKI und C. F. STEVENS (1998). *Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain*. The Journal of Neuroscience, 18(14):5294–5300.
- BRADFORD, MARION M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 72(1):248–254.
- BRAKEMAN, PAUL R., A. A. LANAHAN, R. O'BRIEN, K. W. ROCHE, C. A. BARNES, R. L. HUGANIR und P. F. WORLEY (1997). *Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors*. Nature.
- BRAUN, ANNE, R. PINYOL, R. DAHLHAUS, D. KOCH, P. FONAREV, B. D. GRANT, M. M. KESSELS und B. QUALMANN (2005). *EHD proteins associate with syndapin I and II and such interactions play a crucial role in endosomal recycling*. Molecular Biology of the Cell, 16(8):3642–58.
- BREWER, GREGORY J., R. TORRICE, E. K. EVEGE und P. J. PRICE (1993). *Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal<sup>TM</sup>, a new serum-free medium combination*. Journal of Neuroscience Research, 35(5):567–576.
- BUCKMASTER, PAUL S., G. F. ZHANG und R. YAMAWAKI (2002). *Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit*. The Journal of Neuroscience, 22(15):6650–6658.
- CARLSON, BENJAMIN R., K. E. LLOYD, A. KRUSZEWSKI, I.-H. KIM, R. M. RODRIGUIZ, C. HEINDEL, M. FAYTELL, S. M. DUDEK, W. C. WETSEL und S. H. SODERLING (2011). *WRP/srGAP3 facilitates the initiation of spine development by an inverse F-BAR domain, and its loss impairs long-term memory*. The Journal of Neuroscience, 31(12):4111–4121.

- 31(7):2447–2460.
- CHANG, FEN-LEI L. und W. T. GREENOUGH (1984). *Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice*. Brain Research, 309(1):35–46.
- CHICUREL, MARINA E. und K. M. HARRIS (1992). *Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus*. The Journal of Comparative Neurology, 325(2):169–182.
- COLLINGRIDGE, GRAHAM L., S. J. KEHL und H. MCLENNAN (1983). *Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus*. The Journal of Physiology, 334(1):33–46.
- COLLINS, MARK O., H. HUSI, L. YU, J. M. BRANDON, C. N. G. ANDERSON, W. P. BLACKSTOCK, J. S. CHOUDHARY und S. G. N. GRANT (2006). *Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome*. Journal of Neurochemistry, 97(s1):16–23.
- COULTER, DOUGLAS A. (2000). *Mossy fiber zinc and temporal lobe epilepsy: pathological association with altered “epileptic” gamma-aminobutyric acid A receptors in dentate granule cells*. Epilepsia, 41 Suppl 6:S96–S99.
- CRICK, FRANCIS (1982). *Do dendritic spines twitch*. Trends in Neurosciences, 5:44–46.
- DAILEY, MICHAEL E. und S. J. SMITH (1996). *The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices*. The Journal of Neuroscience, 16(9):2983–2994.
- DAS, SAUMYA, Y. F. SASAKI, T. ROTHE, L. S. PREMKUMAR, M. TAKASU, J. E. CRANDALL, P. DIKES, D. A. CONNER, P. V. RAYUDU, W. CHEUNG und ANDERE (1998). *Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A*. Nature, 393(6683):377–381.
- DE ROBERTIS, EDUARDO D. und S. H. BENNETT (1955). *Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm*. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 1(1):47–58.
- DEONNA, THIERRY und E. ROULET (2006). *Autistic spectrum disorder: evaluating a possible contributing or causal role of epilepsy*. Epilepsia, 47 Suppl 2:79–82.
- DHARMALINGAM, ELAVARASI, A. HÄCKEL, R. PINYOL, L. SCHWINTZER, D. KOCH, M. M. KESSELS und B. QUALMANN (2009). *F-BAR proteins of the syndapin family shape the plasma membrane and are crucial for neuromorphogenesis*. The Journal of Neuroscience, 29(42):13315–27.
- DONG, HUALING, R. J. O’BRIEN, E. T. FUNG, A. A. LANAHAN, P. F. WORLEY und R. L. HUGANIR (1997). *GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors*. Nature.
- DU, YUNRUI, S. A. WEED, W.-C. XIONG, T. D. MARSHALL und T. J. PARSONS (1998). *Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons*. Molecular and Cellular Biology, 18(10):5838–5851.
- DUDEK, EDWARD F. (2001). *Zinc and Epileptogenesis*. Epilepsy Currents, 1(2):66–70.
- DUDEK, SERENA M. und M. F. BEAR (1992). *Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 89(10):4363–4367.
- DUNAEVSKY, ANNA, A. TASHIRO, A. MAJEWSKA, C. MASON und R. YUSTE (1999). *Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96(23):13438–13443.
- DURAND, CHRISTELLE M., C. BETANCUR, T. M. BÖCKERS, J. BOCKMANN, P. CHASTE, F. FAUCHEREAU, G. NYGREN, M. RASTAM, I. C. GILLBERG, H. ANCKARSÄTER und ANDERE (2007). *Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders*. Nature Genetics, 39(1):25–27.
- EHLERS, MICHAEL D. (1999). *Synapse structure: glutamate receptors connected by the shanks*. Current Biology, 9(22):R848–R850.
- ENGERT, FLORIAN und T. BONHÖFFER (1999). *Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity*. Nature, 399(6731):66–70.
- ESCLAPEZ, MONIQUE, J. C. HIRSCH, Y. BEN-ARI und C. BERNARD (1999). *Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy*. Journal of Comparative Neurology, 408(4):449–460.
- ETHELL, IRYNA M. und E. B. PASQUALE (2005). *Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling*. Progress in Neurobiology, 75(3):161–205.
- FARR, CAROL D., P. R. GAFKEN, A. D. NORBECK, C. E. DONEANU, M. D. STAPELS, D. F. BAROFSKY, M. MINAMI und J. A. SAUGSTAD (2004). *Proteomic analysis of native metabotropic glutamate receptor 5 protein complexes reveals novel molecular constituents*. Journal of Neurochemistry, 91(2):438–450.
- FIALA, JOHN C., M. FEINBERG, V. POPOV und K. M. HARRIS (1998). *Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1*. The Journal of Neuroscience, 18(21):8900–8911.
- FIFKOVÁ, EVA und R. J. DELAY (1982). *Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity*. The Journal of Cell Biology, 95(1):345–350.
- FISCHER, MARIA, S. KAECH, D. KNUTTI und A. MATUS (1998). *Rapid actin-based plasticity in dendritic spines*. Neuron, 20(5):847–854.
- FREDERICKSON, CHRISTOPHER J., J.-Y. KOH und A. I. BUSH (2005). *The neurobiology of zinc in health and disease*. Nature Reviews Neuroscience, 6(6):449–462.
- FROST, ADAM, R. PERERA, A. ROUX, K. SPASOV, O. DESTAING, E. H. EGELMAN, P. DE CAMILLI und V. M. UNGER (2008). *Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains*. Cell, 132(5):807–817.
- GAUTHIER, JULIE, N. CHAMPAGNE, R. G. LAFRENIÈRE, L. XIONG, D. SPIEGELMAN, E. BRUSTEIN, M. LAPOINTE, H. PENG, M. CÔTÉ, A. NOREAU und ANDERE (2010). *De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 107(17):7863–7868.
- GEE, STEPHEN H., R. MADHAVAN, S. R. LEVINSON, J. H. CALDWELL, R. SEALOCK und S. C. FROEHNER (1998). *Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins*. The Journal of Neuroscience, 18(1):128–137.
- GLASER, EDMUND M. und H. VAN DER LOOS (1981). *Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain*. Journal of Neuroscience Methods, 4(2):117–125.
- GLUZMAN, YAKOV (1981). *SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants*. Cell, 23(1):175–182.
- GRABRÜCKER, ANDREAS M., M. J. KNIGHT, C. PRÖPPER, J. BOCKMANN, M. JOUBERT, M. ROWAN, U. G. NIENHAUS, C. C. GARNER, J. U. BOWIE, M. R. KREUTZ und ANDERE (2011). *Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation*. The EMBO Journal, 30(3):569–581.
- GRABRÜCKER, STEFANIE, L. JANNETTI, M. ECKERT, S. GAUB, R. CHHABRA, S. PFÄNDER, K. MANGUS, P. P. REDDY, V. RANKOVIC, M. J. SCHMEISSER und ANDERE (2014). *Zinc deficiency dysregulates the synaptic ProSAP/Shank scaffold and might contribute to autism spectrum disorders*. Brain, 137(Pt 1):137–152.

- GRAHAM, FRANK L., J. SMILEY, W. C. RUSSELL und R. NAIRN (1977). *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. Journal of General Virology, 36(1):59–74.
- GRAY, EDWARD G. (1959a). *Azo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study*. Journal of Anatomy, 93:420–433.
- GRAY, EDWARD G. (1959b). *Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex*. Nature, 183(4675):1592–1593.
- GRUTZENDLER, JAIME, N. KASTHURI und W.-B. GAN (2002). *Long-term dendritic spine stability in the adult cortex*. Nature, 420(6917):812–816.
- GUERRIER, SABRICE, J. COUTINHO-BUDD, T. SASSA, A. GRESSET, N. V. JORDAN, K. CHEN, W.-L. JIN, A. FROST und F. POLLEUX (2009). *The F-BAR domain of srGAP2 induces membrane protrusions required for neuronal migration and morphogenesis*. Cell, 138(5):990–1004.
- GUNDELFINGER, ECKART D., T. M. BÖCKERS, M. K. BARON und J. U. BOWIE (2006). *A role for zinc in postsynaptic density asSAMbly and plasticity*. Trends in Biochemical Sciences, 31(7):366–373.
- HAAG, NATJA, L. SCHWINTZER, R. AHUJA, N. KOCH, J. GRIMM, H. HEUER, B. QUALMANN und M. M. KESSELS (2012). *The actin nucleator Cobl is crucial for purkinje cell development and works in close conjunction with the F-actin binding protein Abp1*. The Journal of Neuroscience, 32(49):17842–17856.
- HÄCKEL, AKVILE, R. AHUJA, E. D. GUNDELFINGER, B. QUALMANN und M. M. KESSELS (2008). *The actin-binding protein Abp1 controls dendritic spine morphology and is important for spine head and synapse formation*. The Journal of Neuroscience, 28(40):10031–10044.
- HALBACH, ARNDT, M. MÖRGELIN, M. BAUMGARTEN, M. MILBRANDT, M. PAULSSON und M. PLOMANN (2007). *PACSIN 1 forms tetramers via its N-terminal F-BAR domain*. FEBS Journal, 274(3):773–782.
- HALPAIN, SHELLEY, A. HIPOLITO und L. SAFFER (1998). *Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin*. The Journal of Neuroscience, 18(23):9835–9844.
- HARRIS, ERIC W. und C. W. COTMAN (1986). *Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists*. Neuroscience Letters, 70(1):132–137.
- HARRIS, KRISTEN M. (1999). *Structure, development, and plasticity of dendritic spines*. Current Opinion in Neurobiology, 9(3):343–348.
- HARRIS, KRISTEN M., F. E. JENSEN und B. TSAO (1992). *Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation*. The Journal of Neuroscience, 12(7):2685–2705.
- HARRIS, KRISTEN M. und S. B. KATER (1994). *Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function*. Annual Review of Neuroscience, 17:341–371.
- HARRIS, KRISTEN M. und J. K. STEVENS (1989). *Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics*. The Journal of Neuroscience, 9(8):2982–2997.
- HEBB, DONALD O. (2002). *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. Psychology Press.
- HENNE, WILLIAM M., H. M. KENT, M. G. J. FORD, B. G. HEGDE, O. DAUMKE, P. J. G. BUTLER, R. MITTAL, R. LANGEN, P. R. EVANS und H. T. MCMAHON (2007). *Structure and analysis of FCHO2 F-BAR domain: a dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature*. Structure, 15(7):839–852.
- HERING, HEIKE und M. SHENG (2001). *Dendritic spines: structure, dynamics and regulation*. Nature Reviews Neuroscience, 2(12):880–888.
- HERING, HEIKE und M. SHENG (2003). *Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis*. The Journal of Neuroscience, 23(37):11759–11769.
- HIGGS, HENRY N. und T. D. POLLARD (2000). *Activation by Cdc42 and PIP2 of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex*. The Journal of Cell Biology, 150(6):1311–1320.
- HUNG, ALBERT Y., K. FUTAI, C. SALA, J. G. VALTSCHANOFF, J. RYU, M. A. WOODWORTH, F. L. KIDD, C. C. SUNG, T. MIYAKAWA, M. F. BEAR und ANDERE (2008). *Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1*. The Journal of Neuroscience, 28(7):1697–1708.
- HUSI, HOLGER, M. A. WARD, J. S. CHOUDHARY, W. P. BLACKSTOCK und S. G. N. GRANT (2000). *Proteomic analysis of NMDA receptor–adhesion protein signaling complexes*. Nature Neuroscience, 3(7):661–669.
- INAGAKI, SHINOBU, Y. OHOKA, H. SUGIMOTO, S. FUJIOKA, M. AMAZAKI, H. KURINAMI, N. MIYAZAKI, M. TOHYAMA und T. FURUYAMA (2001). *Sema4c, a transmembrane semaphorin, interacts with a post-synaptic density protein, PSD-95*. Journal of Biological Chemistry, 276(12):9174–9181.
- IRIE, FUMITOSHI und Y. YAMAGUCHI (2002). *EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP*. Nature Neuroscience, 5(11):1117–1118.
- ITO, MASAO, M. SAKURAI und P. TONGROACH (1982). *Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells*. The Journal of Physiology, 324(1):113–134.
- ITOH, TOSHIKI, K. S. ERDMANN, A. ROUX, B. HABERMANN, H. WERNER und P. DE CAMILLI (2005). *Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins*. Developmental Cell, 9(6):791–804.
- JAN, HUEI-HSUAN, I.-T. CHEN, Y.-Y. TSAI und Y.-C. CHANG (2002). *Structural role of zinc ions bound to postsynaptic densities*. Journal of Neurochemistry, 83(3):525–534.
- JIANG, YONG-HUI und M. D. EHLERS (2013). *Modeling autism by SHANK gene mutations in mice*. Neuron, 78(1):8–27.
- KAMMERMEIER, PAUL J., B. XIAO, J. C. TU, P. F. WORLEY und S. R. IKEDA (2000). *Homer proteins regulate coupling of group I metabotropic glutamate receptors to N-type calcium and M-type potassium channels*. The Journal of Neuroscience, 20(19):7238–7245.
- KANDEL, ERIC R. und J. H. SCHWARTZ (1982). *Molecular biology of learning: modulation of transmitter release*. Science, 218(4571):433–443.
- KENNEDY, MARY B. (1995). *Origin of Pdz (Dhr, Glgf) domains*. Trends in Biochemical Sciences, 20(9):350.
- KESSELS, MICHAEL M., Å. E. ENQVIST-GOLDSTEIN und D. G. DRUBIN (2000). *Association of mouse actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7), an Src kinase target, with dynamic regions of the cortical actin cytoskeleton in response to Rac1 activation*. Molecular Biology of the Cell, 11(1):393–412.
- KESSELS, MICHAEL M. und B. QUALMANN (2002). *Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis*. The EMBO Journal, 21(22):6083–94.
- KESSELS, MICHAEL M. und B. QUALMANN (2004). *The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton*. Journal of Cell Science, 117(Pt 15):3077–86.
- KESSELS, MICHAEL M. und B. QUALMANN (2006). *Syndapin oligomers interconnect the machineries for endocytic vesicle formation and actin polymerization*. The Journal of Biological Chemistry, 281(19):13285–13299.

- KIM, EUNJOON, M. NIETHAMMER, A. ROTHSCHILD, Y. N. JAN und M. SHENG (1995). *Clustering of Shaker-type  $K^+$  channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases*. *Nature*, 378(6552):85–88.
- KIM, EUNJOON und M. SHENG (2004). *PDZ domain proteins of synapses*. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10):771–781.
- KIM, IL HWAN, B. RACZ, H. WANG, L. BURIANEK, R. WEINBERG, R. YASUDA, W. C. WETSEL und S. H. SODERLING (2013). *Disruption of Arp2/3 results in asymmetric structural plasticity of dendritic spines and progressive synaptic and behavioral abnormalities*. *The Journal of Neuroscience*, 33(14):6081–6092.
- KOCH, CHRISTOF und A. ZADOR (1993). *The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization*. *The Journal of Neuroscience*, 13(2):413–422.
- KOCH, DENNIS, I. SPIWOKS-BECKER, V. SABANOV, A. SINNING, T. DUGLADZE, A. STELLMACHER, R. AHUJA, J. GRIMM, S. SCHÜLER, A. MÜLLER und ANDERE (2011). *Proper synaptic vesicle formation and neuronal network activity critically rely on syndapin I*. *The EMBO Journal*, 30(24):4955–4969.
- KORKOTIAN, EDUARD und M. SEGAL (2000). *Structure-function relations in dendritic spines: is size important*. *Hippocampus*, 10(5):587–595.
- KORNAU, HANS-CHRISTIAN, L. T. SCHENKER, M. B. KENNEDY und P. H. SEEBURG (1995). *Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95*. *Science*, 269(5231):1737–1740.
- KOROBOVA, FARIDA und T. SVITKINA (2010). *Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis*. *Molecular Biology of the Cell*, 21(1):165–176.
- LÄMMLI, ULRICH K. et al. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227(5259):680–685.
- LARRAMENDI, LUIS M. H. (1969). *Analysis of synaptogenesis in the cerebellum of the mouse*. *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*, S. 803–843.
- LENDVAI, BALAZS, E. A. STERN, B. CHEN und K. SVOBODA (2000). *Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo*. *Nature*, 404(6780):876–881.
- LIAO, DEZHI, X. ZHANG, R. O'BRIEN, M. D. EHLERS und R. L. HUGANIR (1999). *Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons*. *Nature Neuroscience*, 2(1):37–43.
- LIM, SANGMI, S. NAISBITT, J. YOON, J.-I. HWANG, P.-G. SUH, M. SHENG und E. KIM (1999). *Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(41):29510–29518.
- LISSIN, DMITRI V., S. N. GOMPERTS, R. C. CARROLL, C. W. CHRISTINE, D. KALMAN, M. KITAMURA, S. HARDY, R. A. NICOLL, R. C. MALENKA und M. VON ZASTROW (1998). *Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95(12):7097–7102.
- LLEDO, PIERRE-MARIE, X. ZHANG, T. C. SÜDHOF, R. C. MALENKA und R. A. NICOLL (1998). *Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation*. *Science*, 279(5349):399–403.
- LUO, LIQUN, T. K. HENSCH, L. ACKERMAN, S. BARBEL, L. Y. JAN und Y. N. JAN (1996). *Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines*. *Nature*, 379(6568):837–840.
- LYNCH, GARY, J. LARSON, S. KELSO, G. BARRIONUEVO und F. SCHOTTLER (1983). *Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation*. *Nature*, 305(5936):719–721.
- MACHESKY, LAURA M., S. J. ATKINSON, C. AMPE, J. VANDEKERCKHOVE und T. D. POLLARD (1994). *Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose*. *The Journal of Cell Biology*, 127(1):107–115.
- MAJEWSKA, ANIA, E. BROWN, J. ROSS und R. YUSTE (2000a). *Mechanisms of calcium decay kinetics in hippocampal spines: role of spine calcium pumps and calcium diffusion through the spine neck in biochemical compartmentalization*. *The Journal of Neuroscience*, 20(5):1722–1734.
- MAJEWSKA, ANIA, A. TASHIRO und R. YUSTE (2000b). *Regulation of spine calcium dynamics by rapid spine motility*. *The Journal of Neuroscience*, 20(22):8262–8268.
- MALETIC-SAVATIC, MIRJANA, R. MALINOW und K. SVOBODA (1999). *Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity*. *Science*, 283(5409):1923–1927.
- MALINOW, ROBERTO und J. P. MILLER (1986). *Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation*. *Nature*.
- MARR, DAVID (1969). *A theory of cerebellar cortex*. *The Journal of Physiology*, 202(2):437–470.
- MARRS, GLEN S., S. H. GREEN und M. E. DAILEY (2001). *Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites*. *Nature Neuroscience*, 4(10):1006–1013.
- MARSHALL, CHRISTIAN R., A. NOOR, J. B. VINCENT, A. C. LIONEL, L. FEUK, J. SKAUG, M. SHAGO, R. MOESSNER, D. PINTO, Y. REN und ANDERE (2008). *Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder*. *The American Journal of Human Genetics*, 82(2):477–488.
- MARTIN, LEE J., C. D. BLACKSTONE, A. I. LEVEY, R. L. HUGANIR und D. L. PRICE (1993). *AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain*. *Neuroscience*, 53(2):327–358.
- MATSUZAKI, MASANORI, G. C. R. ELLIS-DAVIES, T. NEMOTO, Y. MIYASHITA, M. IINO und H. KASAI (2001). *Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons*. *Nature Neuroscience*, 4(11):1086–1092.
- MATSUZAKI, MASANORI, N. HONKURA, G. C. R. ELLIS-DAVIES und H. KASAI (2004). *Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines*. *Nature*, 429(6993):761–766.
- MATUS, ANDREW, M. ACKERMANN, G. PEHLING, R. H. BYERS und K. FUJIWARA (1982). *High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 79(23):7590–7594.
- MATUS, ANDREW, H. BRINKHAUS und U. WAGNER (2000). *Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses*. *Hippocampus*, 10(5):555–560.
- MIKI, HIROAKI, K. MIURA und T. TAKENAWA (1996). *N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases*. *The EMBO Journal*, 15(19):5326–35.
- MIKI, HIROAKI, T. SASAKI, Y. TAKAI und T. TAKENAWA (1998). *Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP*. *Nature*, 391(6662):93–96.
- MILLAR, DOUGLAS G. und G. C. SHORE (1993). *The signal anchor sequence of mitochondrial Mas70p contains an oligomerization domain*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25):18403–18406.
- MILLER, MICHAEL und A. PETERS (1981). *Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons*. *Journal of Comparative Neurology*, 203(4):555–573.
- MODREGGER, JAN, B. RITTER, B. WITTER, M. PAULSSON und M. PLOMANN (2000). *All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis*. *Journal of Cell Science*, 113 Pt 24:4511–21.

- MULLINS, DYCHE R., J. A. HEUSER und T. D. POLLARD (1998). *The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 95(11):6181–6186.
- NÄGERL, VALENTIN U., N. EBERHORN, S. B. CAMBRIDGE und T. BONHÖFFER (2004). *Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons*. Neuron, 44(5):759–767.
- NAISBITT, SCOTT, E. KIM, J. C. TU, B. XIAO, C. SALA, J. VALTSCHANOFF, R. J. WEINBERG, P. F. WORLEY und M. SHENG (1999). *Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin*. Neuron, 23(3):569–582.
- NICOLL, ROGER A., J. A. KAUER und R. C. MALENKA (1988). *The current excitement in long term potentiation*. Neuron, 1(2):97–103.
- NICOLL, ROGER A. und D. SCHMITZ (2005). *Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses*. Nature Reviews Neuroscience, 6(11):863–876.
- NIETHAMMER, MARTIN, E. KIM und M. SHENG (1996). *Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases*. The Journal of Neuroscience, 16(7):2157–2163.
- NOLZE, ALEXANDER, J. SCHNEIDER, R. KEIL, M. LEDERER, S. HÜTTELMAIER, M. M. KESSELS, B. QUALMANN und M. HATZFELD (2013). *FMRP regulates actin filament organization via the armadillo protein p0071*. RNA, 19(11):1483–1496.
- NUSSER, ZOLTAN, R. LUJAN, G. LAUBE, D. J. D. ROBERTS, E. MOLNAR und P. SOMOGYI (1998). *Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus*. Neuron, 21(3):545–559.
- O'BRIEN, RICHARD J., S. KAMBOJ, M. D. EHLERS, K. R. ROSEN, G. D. FISCHBACH und R. L. HUGANIR (1998). *Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation*. Neuron, 21(5):1067–1078.
- OKABE, SHIGEO, A. MIWA und H. OKADO (2001). *Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules*. The Journal of Neuroscience, 21(16):6105–6114.
- OKAMOTO, KEN-ICHI, T. NAGAI, A. MIYAWAKI und Y. HAYASHI (2004). *Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity*. Nature Neuroscience, 7(10):1104–1112.
- OKAMOTO, PATRICIA M., C. GAMBY, D. WELLS, J. FALLON und R. B. VALLEE (2001). *Dynammin isoform-specific interaction with the shank/ProSAP scaffolding proteins of the postsynaptic density and actin cytoskeleton*. The Journal of Biological Chemistry, 276(51):48458–48465.
- OKAZAKI, MAXINE M., D. A. EVENSON und J. V. NADLER (1995). *Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: visualization after retrograde transport of biocytin*. Journal of Comparative Neurology, 352(4):515–534.
- PAK, DANIEL T., S. YANG, S. RUDOLPH-CORREIA, E. KIM und M. SHENG (2001). *Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP*. Neuron, 31(2):289–303.
- PALAY, SANFORD L. (1956). *Synapses in the central nervous system*. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 2(4 Suppl):193–202.
- PARNASS, ZEV, A. TASHIRO und R. YUSTE (2000). *Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons*. Hippocampus, 10(5):561–568.
- PEÇA, JOÃO, C. FELICIANO, J. T. TING, W. WANG, M. F. WELLS, T. N. VENKATRAMAN, C. D. LASCOLA, Z. FU und G. FENG (2011). *Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction*. Nature, 472(7344):437–442.
- PENZES, PETER, A. BEESER, J. CHERNOFF, M. R. SCHILLER, B. A. EIPPER, R. E. MAINS und R. L. HUGANIR (2003). *Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-Synaptic EphrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF Kalirin*. Neuron, 37(2):263–274.
- PÉREZ-OTAÑO, ISABEL, R. LUJÁN, S. J. TAVALIN, M. PLOMANN, J. MODREGGER, X.-B. LIU, E. G. JONES, S. F. HEINEMANN, D. C. LO und M. D. EHLERS (2006). *Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1*. Nature Neuroscience, 9(5):611–21.
- PEREZ, YAËL, F. MORIN, C. BEAULIEU und J.-C. LACAILLE (1996). *Axonal sprouting of CA1 pyramidal cells in hyperexcitable hippocampal slices of kainate-treated rats*. European Journal of Neuroscience, 8(4):736–748.
- PETERS, ALAN und I. R. KAISERMAN-ABRAMOF (1970). *The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines*. American Journal of Anatomy, 127(4):321–355.
- PINYOL, ROSER, A. HÄCKEL, A. RITTER, B. QUALMANN und M. M. KESSELS (2007). *Regulation of N-WASP and the Arp2/3 complex by Abp1 controls neuronal morphology*. PloS ONE, 2(5):e400.
- PLOMANN, MARKUS, R. LANGE, G. VOPPER, H. CREMER, U. A. HEINLEIN, S. SCHEFF, S. A. BALDWIN, M. LEITGES, M. CRAMER, M. PAULSSON und ANDERE (1998). *PACSIN, a brain protein that is upregulated upon differentiation into neuronal cells*. European Journal of Biochemistry, 256(1):201–211.
- PREHODA, KENNETH E., J. A. SCOTT, R. D. MULLINS und W. A. LIM (2000). *Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex*. Science, 290(5492):801–806.
- QUALMANN, BRITTA, T. M. BÖCKERS, M. JEROMIN, E. D. GUNDELFINGER und M. M. KESSELS (2004). *Linkage of the actin cytoskeleton to the postsynaptic density via direct interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank family*. The Journal of Neuroscience, 24(10):2481–2495.
- QUALMANN, BRITTA und R. B. KELLY (2000). *Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization*. The Journal of Cell Biology, 148(5):1047–62.
- QUALMANN, BRITTA, M. M. KESSELS und R. B. KELLY (2000). *Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton*. The Journal of Cell Biology, 150(5):F111–6.
- QUALMANN, BRITTA, D. KOCH und M. M. KESSELS (2011). *Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code*. The EMBO Journal, 30(17):3501–3515.
- QUALMANN, BRITTA, J. ROOS, P. J. DIGREGORIO und R. B. KELLY (1999). *Syndapin I, a synaptic dynammin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*. Molecular Biology of the Cell, 10(2):501–13.
- RAO, YIJIAN, Q. MA, A. VAHEDI-FARIDI, A. SUNDBORGER, A. PECHSTEIN, D. PUCHKOV, L. LUO, O. SHUPLIAKOV, W. SÄNGER und V. HAUCKE (2010). *Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 107(18):8213–8.
- REEVES, JOHN P. und R. M. DOWBEN (1969). *Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles*. Journal of Cellular Physiology, 73(1):49–60.
- RENART, JAIME, J. REISER und G. R. STARK (1979). *Transfer of proteins from gels to diazobenzylloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 76(7):3116–3120.
- REPRESA, ALFONSO, O. ROBAIN, E. TREMBLAY und Y. BEN-ARI (1989). *Hippocampal plasticity in childhood epilepsy*.

- Neuroscience Letters, 99(3):351–355.
- RITTER, BRIGITTE, J. MODREGGER, M. PAULSSON und M. PLOMANN (1999). *PACSIN 2, a novel member of the PACSIN family of cytoplasmic adapter proteins*. FEBS Letters, 454(3):356–362.
- ROHATGI, RAJAT, L. MA, H. MIKI, M. LOPEZ, T. KIRCHHAUSEN, T. TAKENAWA und M. W. KIRSCHNER (1999). *The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly*. Cell, 97(2):221–231.
- ROUSSIGNOL, GAUTIER, F. ANGO, S. ROMORINI, J. C. TU, C. SALA, P. F. WORLEY, J. BOCKAERT und L. FAGNI (2005). *Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons*. The Journal of Neuroscience, 25(14):3560–3570.
- SABATINI, BERNARDO L. und K. SVOBODA (2000). *Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis*. Nature, 408(6812):589–593.
- SALA, CARLO, V. PIÉCH, N. R. WILSON, M. PASSAFARO, G. LIU und M. SHENG (2001). *Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer*. Neuron, 31(1):115–130.
- SAMBROOK, JOSEPH, E. F. FRITSCH, T. MANIATIS und ANDERE (1989). *Molecular cloning*, Bd. 2. Cold spring harbor laboratory press New York.
- SATO, DAISUKE, V. LENDRIS, C. S. LEBLOND, A. PRASAD, D. PINTO, S. WALKER, I. O’CONNOR, C. RUSSELL, I. E. DRMIC, F. F. HAMDAN und ANDERE (2012). *SHANK1 deletions in males with autism spectrum disorder*. The American Journal of Human Genetics, 90(5):879–887.
- SCHÄL, SYLVIA, J. NÜCHEL, S. MÜLLER, P. PETERMANN, J. KORMANN, I. PÉREZ-OTAÑO, S. M. MARTÍNEZ, M. PAULSSON und M. PLOMANN (2013). *Casein kinase 2 phosphorylation of protein kinase C and casein kinase 2 substrate in neurons (PACSIN) 1 protein regulates neuronal spine formation*. The Journal of Biological Chemistry, 288(13):9303–9312.
- SCHIKORSKI, THOMAS und C. F. STEVENS (1999). *Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96(7):4107–4112.
- SCHMEISSER, MICHAEL J., E. EY, S. WEGENER, J. BOCKMANN, V. A. STEMPEL, A. KUEBLER, A.-L. JANSSEN, P. T. UDVARDI, E. SHIBAN, C. SPILKER und ANDERE (2012). *Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2*. Nature, 486(7402):256–260.
- SCHNEIDER, KATHARINA, E. SEEMANN, L. LIEBMANN, R. AHUJA, D. KOCH, M. WESTERMANN, C. A. HÜBNER, M. M. KESSELS und B. QUALMANN (2014). *ProSAP1 and membrane nanodomain-associated syndapin I promote postsynapse formation and function*. The Journal of Cell Biology, 205(2):197–215.
- SCHÜLER, SUSANN, J. HAUPTMANN, B. PERNER, M. M. KESSELS, C. ENGLERT und B. QUALMANN (2013). *Ciliated sensory hair cell formation and function require the F-BAR protein syndapin I and the WH2 domain-based actin nucleator Cobl*. Journal of Cell Science, 126(1):196–208.
- SCHULTZE, WIEBKE, V. EULENBURG, V. LESSMANN, L. HERRMANN, T. DITTMAR, E. D. GUNDELFINGER, R. HEUMANN und K. S. ERDMANN (2001). *Semaphorin4F interacts with the synapse-associated protein SAP90/PSD-95*. Journal of Neurochemistry, 78(3):482–489.
- SCHWINTZER, LUKAS (2012). *Analyse der molekularen Mechanism und zellbiologischen Funktionen des auf WH2-Domänen basierenden Aktinnukleationsfaktors Cordon-bleu*. Doktorarbeit
- SCHWINTZER, LUKAS, N. KOCH, R. AHUJA, J. GRIMM, M. M. KESSELS und B. QUALMANN (2011). *The functions of the actin nucleator Cobl in cellular morphogenesis critically depend on syndapin I*. The EMBO Journal, 30(15):3147–3159.
- SHENG, MORGAN und E. KIM (2000). *The Shank family of scaffold proteins*. Journal of Cell Science, 113(11):1851–1856.
- SHIMADA, ATSUSHI, H. NIWA, K. TSUJITA, S. SUETSUGU, K. NITTA, K. HANAWA-SUETSUGU, R. AKASAKA, Y. NISHINO, M. TOYAMA, L. CHEN und ANDERE (2007). *Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis*. Cell, 129(4):761–772.
- SHIMADA, ATSUSHI, K. TAKANO, M. SHIROUZU, K. HANAWA-SUETSUGU, T. TERADA, K. TOYOOKA, T. UMEHARA, M. YAMAMOTO, S. YOKOYAMA und S. SUETSUGU (2010). *Mapping of the basic amino-acid residues responsible for tubulation and cellular protrusion by the EFC/F-BAR domain of pacsin2/Syndapin II*. FEBS Letters, 584(6):1111–1118.
- SIMPSON, FIONA, N. K. HUSSAIN, B. QUALMANN, R. B. KELLY, B. K. KAY, P. S. MCPHERSON und S. L. SCHMID (1999). *SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation*. Nature Cell Biology, 1(2):119–124.
- SINNING, ANNE, L. LIEBMANN, A. KOUGIOUMTZES, M. WESTERMANN, C. BRÜHL und C. A. HÜBNER (2011). *Synaptic glutamate release is modulated by the Na<sup>+</sup>-driven Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger Slc4a8*. The Journal of Neuroscience, 31(20):7300–7311.
- SOTELO, CONSTANTINO (1978). *Purkinje cell ontogeny: formation and maintenance of spines*. Progress in Brain Research, 48:149–170.
- SOTELO, CONSTANTINO (1990). *Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice*. Journal of Experimental Biology, 153(1):225–249.
- SRIVASTAVA, SAPNA, P. OSTEN, F. S. VILIM, L. KHATRI, G. J. INMAN, B. A. STATES, C. DALY, S. DESOUZA, R. ABAGYAN, J. G. VALTSCHANOFF und ANDERE (1998). *Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding protein ABP*. Neuron, 21(3):581–591.
- STEFFEN, ANIKA, J. FAIX, G. P. RESCH, J. LINKNER, J. WEHLAND, V. J. SMALL, K. ROTTNER und T. E. B. STRADAL (2006). *Filopodia formation in the absence of functional WAVE-and Arp2/3-complexes*. Molecular Biology of the Cell, 17(6):2581–2591.
- SUMOY, LAURO, R. PLUVINET, N. ANDREU, X. ESTIVILL und M. ESCARCELLER (2001). *PACSIN 3 is a novel SH3 domain cytoplasmic adapter protein of the pacsin-syndapin-FAP52 gene family*. Gene, 262(1):199–205.
- SVITKINA, TATYANA M. und G. G. BORISY (1999). *Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia*. The Journal of Cell Biology, 145(5):1009–1026.
- SVOBODA, KAREL, D. W. TANK und W. DENK (1996). *Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts*. Science, 272(5262):716–719.
- SWANN, JOHN W., S. AL-NOORI, M. JIANG und C. L. LEE (2000). *Spine loss and other dendritic abnormalities in epilepsy*. Hippocampus, 10(5):617–625.
- TADA, TOMOKO und M. SHENG (2006). *Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis*. Current Opinion in Neurobiology, 16(1):95–101.
- TAKÁCS, JÓZSEF, G. GOMBOS, T. GÖRCS, T. BECKER, J. DE BARRY und J. HÁMORI (1997). *Distribution of metabotropic glutamate receptor type 1a in Purkinje cell dendritic spines is independent of the presence of presynaptic parallel fibers*. Journal of Neuroscience Research, 50(3):433–442.

- TASHIRO, AYUMU, A. MINDEN und R. YUSTE (2000). *Regulation of dendritic spine morphology by the Rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho*. Cerebral Cortex, 10(10):927–938.
- TOBABELN, SÖNKE, T. C. SÜDHOF und B. STAHL (2000). *The G protein-coupled receptor CL1 interacts directly with proteins of the Shank family*. The Journal of Biological Chemistry, 275(46):36204–36210.
- TOWBIN, HARRY, T. STAHELIN und J. GORDON (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 76(9):4350–4354.
- TRACHTENBERG, JOSHUA T., B. E. CHEN, G. W. KNOTT, G. FENG, J. R. SANES, E. WELKER und K. SVOBODA (2002). *Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex*. Nature, 420(6917):788–794.
- TU, JIAN CHENG, B. XIAO, S. NAISBITT, J. P. YUAN, R. S. PETRALIA, P. BRAKEMAN, A. DOAN, V. K. AAKALU, A. A. LANAHAN, M. SHENG und ANDERE (1999). *Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins*. Neuron, 23(3):583–592.
- TU, JIAN CHENG, B. XIAO, J. P. YUAN, A. A. LANAHAN, K. LEOFFERT, M. LI, D. J. LINDEN und P. F. WORLEY (1998). *Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors*. Neuron, 21(4):717–726.
- TURRIGIANO, GINA G., K. R. LESLIE, N. S. DESAI, L. C. RUTHERFORD und S. B. NELSON (1998). *Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons*. Nature, 391(6670):892–896.
- URUNO, TAKEHITO, J. LIU, P. ZHANG, Y.-X. FAN, C. EGILE, R. LI, S. C. MUELLER und X. ZHAN (2001). *Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin*. Nature Cell Biology, 3(3):259–266.
- VALTSCHANOFF, JULI G. und R. J. WEINBERG (2001). *Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density*. The Journal of Neuroscience, 21(4):1211–1217.
- VAUGHN, JAMES E. (1989). *Review: fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system*. Synapse, 3(3):255–285.
- VOLFOVSKY, NATALIA, H. PARNAS, M. SEGAL und E. KORKOTIAN (1999). *Geometry of dendritic spines affects calcium dynamics in hippocampal neurons: theory and experiments*. Journal of Neurophysiology, 82(1):450–462.
- WAKITA, YOHEI, T. KAKIMOTO, H. KATOH und M. NEGISHI (2011). *The F-BAR protein Rapostlin regulates dendritic spine formation in hippocampal neurons*. The Journal of Biological Chemistry, 286(37):32672–32683.
- WANG, QI, M. NAVARRO, G. PENG, E. MOLINELLI, S. L. GOH, B. L. JUDSON, K. R. RAJASHANKAR und H. SONDERMANN (2009). *Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pascin/Syndapin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 106(31):12700–5.
- WANG, XIAOMING, P. A. MCCOY, R. M. RODRIGUIZ, Y. PAN, H. S. JE, A. C. ROBERTS, C. J. KIM, J. BERRIOS, J. S. COLVIN, D. BOUSQUET-MOORE und ANDERE (2011). *Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3*. Human Molecular Genetics, 20(15):3093–3108.
- WEAVER, ALISSA M., A. V. KARGINOV, A. W. KINLEY, S. A. WEED, Y. LI, T. J. PARSONS und J. A. COOPER (2001). *Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation*. Current Biology, 11(5):370–374.
- WEGNER, ADAM M., C. A. NEBHAN, L. HU, D. MAJUMDAR, K. M. MEIER, A. M. WEAVER und D. J. WEBB (2008). *N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses*. Journal of Biological Chemistry, 283(23):15912–15920.
- WONG, HON-KIT, X.-B. LIU, M. F. MATOS, S. F. CHAN, I. PÉREZ-OTAÑO, M. BOYSEN, J. CUI, N. NAKANISHI, J. S. TRIMMER, E. G. JONES und ANDERE (2002). *Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain*. The Journal of Comparative Neurology, 450(4):303–317.
- WONG, WAI T., B. E. FAULKNER-JONES, J. R. SANES und R. O. WONG (2000). *Rapid dendritic remodeling in the developing retina: dependence on neurotransmission and reciprocal regulation by Rac and Rho*. The Journal of Neuroscience, 20(13):5024–5036.
- WYSZYNSKI, MICHAEL, J. G. VALTSCHANOFF, S. NAISBITT, A. W. DUNAH, E. KIM, D. G. STANDAERT, R. WEINBERG und M. SHENG (1999). *Association of AMPA receptors with a subset of glutamate receptor-interacting protein in vivo*. The Journal of Neuroscience, 19(15):6528–6537.
- XIAO, BO, J. CHENG TU, R. S. PETRALIA, J. P. YUAN, A. DOAN, C. D. BREDER, A. RUGGIERO, A. A. LANAHAN, R. J. WENTHOLD und P. F. WORLEY (1998). *Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins*. Neuron, 21(4):707–716.
- XIAO, BO, J. CHENG TU und P. F. WORLEY (2000). *Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function*. Current Opinion in Neurobiology, 10(3):370–374.
- YAMAGUCHI, HIDEKI, M. LORENZ, S. KEMPIAK, C. SARMIENTO, S. CONIGLIO, M. SYMONS, J. SEGALL, R. EDDY, H. MIKI, T. TAKENAWA und ANDERE (2005). *Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin*. The Journal of Cell Biology, 168(3):441–452.
- YAO, IKUKO, Y. HATA, K. HIRAO, M. DEGUCHI, N. IDE, M. TAKEUCHI und Y. TAKAI (1999). *Synamon, a novel neuronal protein interacting with synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein*. The Journal of Biological Chemistry, 274(39):27463–27466.
- YUSTE, RAFAEL und T. BONHÖFFER (2001). *Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity*. Annual Review of Neuroscience, 24:1071–1089.
- YUSTE, RAFAEL und T. BONHÖFFER (2004). *Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies*. Nature Reviews Neuroscience, 5(1):24–34.
- ZALUTSKY, ROBERT A. und R. A. NICOLL (1990). *Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons*. Science, 248(4963):1619–1624.
- ZHOU, QIANG, K. J. HOMMA und M.-M. POO (2004). *Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses*. Neuron, 44(5):749–757.
- ZIFF, EDWARD B. (1997). *Enlightening the postsynaptic density*. Neuron, 19(6):1163–1174.
- ZITO, KAREN, G. KNOTT, G. M. G. SHEPHERD, S. SHENOLIKAR und K. SVOBODA (2004). *Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton*. Neuron, 44(2):321–334.
- ZITZER, HEIKE, H.-H. HÖNCK, D. BÄCHNER, D. RICHTER und H.-J. KREIENKAMP (1999a). *Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain*. Journal of Biological Chemistry, 274(46):32997–33001.
- ZITZER, HEIKE, D. RICHTER und H.-J. KREIENKAMP (1999b). *Agonist-dependent interaction of the rat somatostatin receptor subtype 2 with cortactin-binding protein 1*. Journal of Biological Chemistry, 274(26):18153–18156.
- ZIV, NOAM E. und S. J. SMITH (1996). *Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation*. Neuron, 17(1):91–102.

# 8 Abkürzungsverzeichnis

Nicht aufgelistete chemische Bezeichnungen wurden entsprechend der IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) Regeln abgekürzt.

Abp	Aktin-bindendes Protein
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Aqua a.i.	<i>Aqua ad iniectabilia</i>
Arp	<i>Actin related protein</i>
AS	Aminosäure
ASD	<i>Autism spectrum disorder</i>
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	<i>Cornu ammonis</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CIP	Cdc42-interagierendes Protein
Cobl	Cordon-bleu
COS	<i>Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-Dihydrochlorid
dd	doppelt-destilliert
DIV	<i>Days in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraacetat
EHD	Eps15-Homologie-Domäne
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i>
F-BAR	Fes/CIP4-Homologie-Bin/Amphiphysin/Rvs
FBP	Formin-bindendes Protein
FCH	Fes/CIP4-Homologie
FKS	Fötales Kälberserum
GABA	$\gamma$ -Aminobutyric acid
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GKAP	Guanlyatkinase-assoziiertes Protein
GRIP	Glutamatrezeptor-interagierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HBS	HEPES-buffered saline
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
His	Histidin
His-Trx	Polyhistidin-Thioredoxin
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobase
KoIP	Koimmunpräzipitation
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LIN	Leibniz-Institut für Neurobiologie
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
MAGUK	Membranassoziierte Guanylatkinase

MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mEPSC	<i>Miniature excitatory postsynaptic current</i>
mGlu-Rezeptoren	Metabotrope Glutamatrezeptoren
MIP	Maximale Intensitätsprojektion
Mito	Mitochondrienmembran
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPF	Asparagin-Prolin-Phenylalanin
N-WASP	Neurales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
OD	Optische Dichte
PACSIN	<i>Protein kinase C<math>\alpha</math> and casein kinase 2 substrate in neurons</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	<i>Phosphate buffer</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBS-CM	PBS-Calcium/Magnesium
PBS-T	PBS-Tween
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>PSD-95, Discs large, Zona occludens 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PIC	<i>Protease inhibitor cocktail</i>
PICK	<i>Protein interacting with C kinase</i>
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PM	Plasmamembran
PM-mCherry	Plasmamembranständiges mCherry
ProSAP	Prolin-reiches Synapsen-assoziiertes Protein
PSD	Postsynaptische Dichte
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
ROI	<i>Region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
rw	rückwärts
SAM	Steriles Alphanotiv
SAP	Synapsenassoziiertes Protein
Sdp	Syndapin
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Shank	SH3-Domänen und Ankyrin-Wiederholung-beinhaltendes Protein
SH3	Src-Homologie 3
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SOC	SOB-Glucose
Syndapin	Synaptisches Dynamin-assoziiertes Protein
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	<i>Terrific broth</i>
TLE	Temporallappenepilepsie
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UKJ	Universitätsklinikum Jena
ÜN	Über Nacht
v/v	<i>volume/volume</i>
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WB	Westernblot
w.E.	willkürliche Einheit
WP	Waschpuffer
WRP	<i>WASP Verprolin-homologous protein-associated Rac GTPase-activating protein</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
YT	<i>Yeast extract tryptone</i>

# A Anhang

## Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien

Die Biopsien wurden mit 500  $\mu$ l *Tail cut* (TC)-Puffer und 20  $\mu$ l Proteinase K-Lösung versetzt und ÜN bei 55°C und 900 min<sup>-1</sup> inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95°C und danach eine Zentrifugation für 5 min bei 20.800  $\times g$ . Die sich im Überstand befindende genomische DNA wurde anschließend für die Genotypisierungs-PCR verwendet oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

TC-Puffer	10 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl (pH 8,0)
Proteinase K-Lösung	10 mg/ml Proteinase K in 40% (v/v) Glycerol; 10 mM Tris-HCl; 1 mM Calciumacetat (pH 7,5)

## Genotypisierungs-PCR von Syndapin I-Mäusen

Vor Verwendung von *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde deren genomische DNA aus 1-3 mm Schwanzspitzenbiopsien mittels Genotypisierungs-PCR mit spezifischen Primerpaaren auf das Wildtyp-*Syndapin I* (*Syndapin I*<sup>+/+</sup>) bzw. *Syndapin I*<sup>-/-</sup>-Allel (*Syndapin I*<sup>-/-</sup>) überprüft. Bei dieser wurde stets eine Positiv- und Negativkontrolle als Referenz mitgeführt. Verwendete Primerpaare und resultierende PCR-Produktgrößen sind in Tabelle 12 dargestellt. Ein 25  $\mu$ l Ansatz enthielt 3  $\mu$ l genomische DNA aus Schwanzspitzenbiopsien als Matrize, jeweils 1  $\mu$ M Vorwärtsprimer (Primer 1) und Rückwärtsprimer (Primer 2), sowie 0,2 mM Desoxynucleosidtriphosphate, 0,625 Einheiten Taq-DNA-Polymerase und 1 $\times$  Qiagen<sup>®</sup>-PCR-Puffer. Die PCR-Reaktionen wurden im Thermozykler nach dem in Tabelle 13 gezeigten Schema durchgeführt. Zur Überprüfung der Größen der PCR-Produkte erfolgte die Auftrennung der PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese.

**Tabelle 12:** Primer und Produktgrößen bei Genotypisierung-PCRs.

PCR	Primer 1	Primer 2	PCR-Produkt	Aussage
<i>Syndapin I</i> <sup>+/+</sup>	BQ502	BQ497	355 bp	<i>Syndapin I</i> <sup>+/+</sup>
<i>Syndapin I</i> <sup>-/-</sup>	BQ498	BQ536	227 bp	<i>Syndapin I</i> <sup>-/-</sup>
			709 bp	<i>Syndapin I</i> <sup>+/+</sup> gefloxt

**Tabelle 13:** Genotypisierungs-PCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Dauer
1) Initiale Denaturierung	98°C	5 min
2) Denaturierung	98°C	45 s
3) Hybridisierung	60°C	30 s
4) Elongation	72°C	1 min
5) Finale Elongation	72°C	10 min

35 $\times$  Wiederholung der Schritte 2-4

## Präparation & Kultivierung primärer hippocampaler Neurone

**Rattenneurone** Die Präparation embryonaler Rattenhippocampi erfolgte am 18. Tag nach Verpaarung der Elterntiere mit anschließender Vereinzelung der Neurone durch Trypsinisierung mit  $1 \times$  Trypsin-EDTA. Die Kultivierung erfolgte in einer Dichte von 60.000 Neuronen/24-*well*-Platten-Vertiefung auf 12 mm-Durchmesser, Poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläschen in 0,5 ml Neurobasal<sup>®+</sup> je Vertiefung bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> im Zellinkubator. Zur Poly-D-Lysin-Beschichtung wurden die Deckgläschen zunächst einmal mit 10% (w/v) SDS, zweimal mit ddH<sub>2</sub>O, einmal mit 70% (v/v) Ethanol, einmal mit 99% (v/v) Ethanol und einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet, mit 0,3 ml Poly-D-Lysin ÜN bei 37°C inkubiert und abschließend für 1 h getrocknet. Nach 4 Tagen in Kultur und nachfolgend zweimal die Woche wurden 0,3 ml des Zellkulturmediums durch frisches Neurobasal<sup>®-</sup> ersetzt.

Neurobasal <sup>®+</sup>	0,5 mM L-Glutamin; 0,025 mM L-Glutamat; $1 \times$ B-27 <sup>®</sup> in Neurobasal <sup>®</sup>
Neurobasal <sup>®-</sup>	0,5 mM L-Glutamin; $1 \times$ Penicillin/Streptomycin; $1 \times$ B-27 <sup>®</sup> in Neurobasal <sup>®</sup>

**Mausneurone** Nach Präparation postnataler Maushippocampi an Tag 0 bis Tag 4 nach Geburt wurden diese anschließend dreimal in 5 ml HBSS gewaschen und in 5 ml Trypsin-Lösung vereinzelt. Nachfolgend wurden die Hippocampi dreimal in 5 ml HBSS gewaschen, die Zellen mit Glaspasteurpipetten in 2 ml Primärmedium mit 4 µg/ml DNase I vereinzelt und auf 18 mm-Durchmesser, Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen aufgetropft. Nach 45-60 min Inkubation bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> im Zellinkubator wurden die Deckgläschen in 12-*well*-Platten überführt und in 1 ml Mausneuronenmedium weiterkultiviert.

Primärmedium	10% (v/v) Pferdeserum; 0,6% (w/v) Glucose in MEM
Mausneuronenmedium	2 mM Glutamax; 1% (v/v) Pferdeserum; $1 \times$ B-27 <sup>®</sup> ; 5 µM β-Mercaptoethanol; Zugabe von 7 ml Rattenneuronenkulturüberstand in 25 ml Neurobasal <sup>®</sup> -A (sterilfiltriert)
Poly-L-Lysin	0,1% (w/v) Poly-L-Lysin in 150 mM Borsäure (pH 8,5; sterilfiltriert)
Trypsin-Lösung	10 mM HEPES; $1 \times$ Penicillin/Streptomycin; $1 \times$ Trypsin-EDTA (0,5%) in HBSS

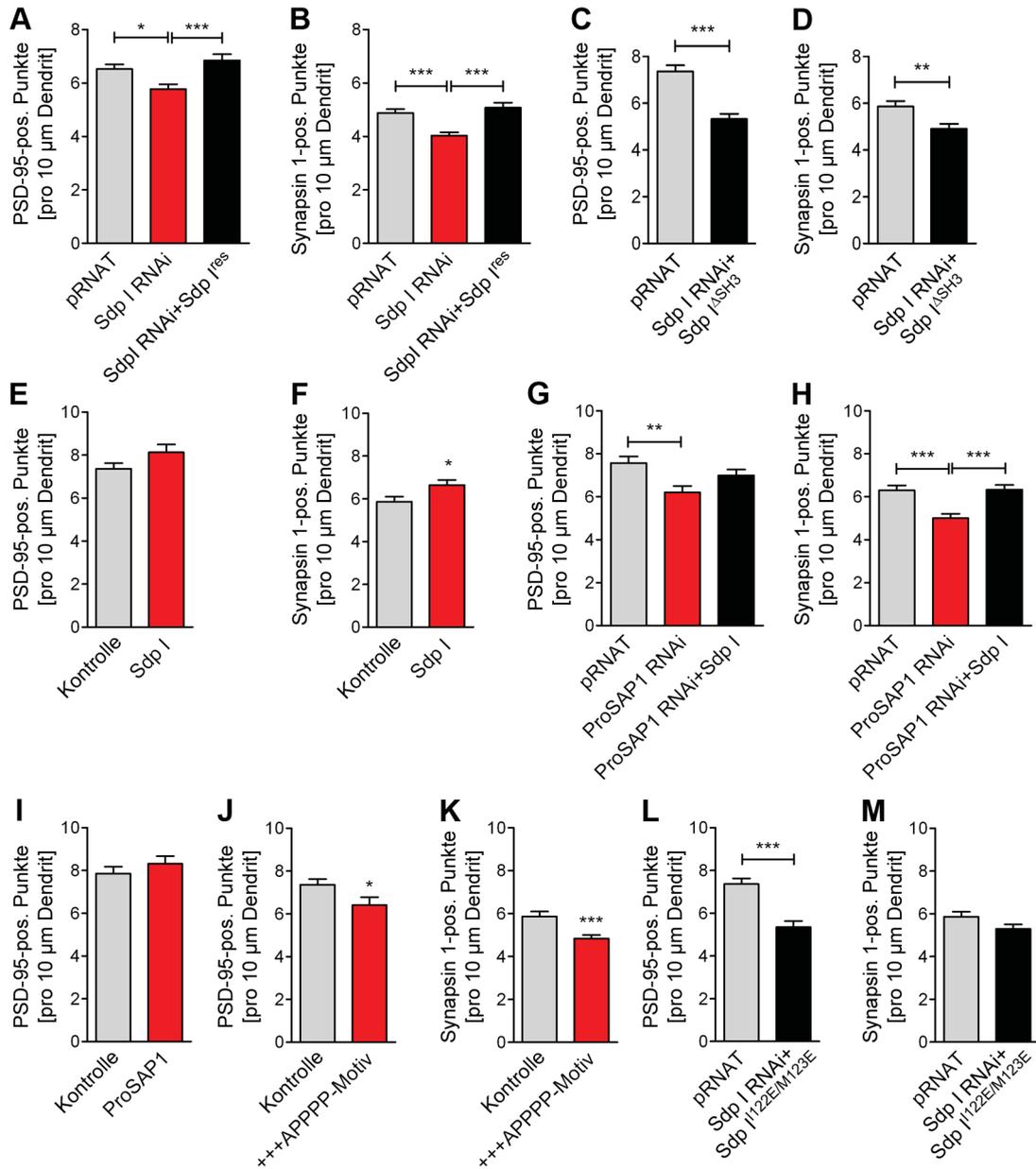
# SDS-Polyacrylamidgele

**Tabelle 14:** SDS-Polyacrylamidgele. Volumina entsprechend für ein Gel.

	Sammelgel	Trenngel	Gradientengel	
			5% Lösung	10% Lösung
ddH <sub>2</sub> O (ml)	0,98	1,82	2,52	1,68
4× Sammelgelpuffer (ml)	0,81	-	-	-
4× Trenngelpuffer (ml)	-	1,25	1,25	1,25
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (ml)	0,50	1,59	0,83	1,67
87% (v/v) Glycerol (ml)	0,69	0,35	0,37	0,37
10% (w/v) APS (μl)	17,2	33,4	26,7	26,7
TEMED (μl)	2,90	3,34	2,67	2,67
Phenolrot (μl)	4,25	-	-	-
Bromphenolblau (μl)	-	2,10	3,34	3,34

TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin; APS, Ammoniumperoxosulfat.

4× Sammelgelpuffer	0,4% (w/v) SDS; 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
4× Trenngelpuffer	0,4% (w/v) SDS; 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung (Verhältnis 37,5:1)
Bromphenolblau	2% (w/v) in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Phenolrot	gesättigt in 40 mM Tris-HCl (pH 8,0)



**Abbildung 37: Quantifizierung der Post- und Präsynapsendichten in absoluten Werten. A-D,** Dichte PSD-95 (A, C) bzw. Synapsin 1 (B, D)-positiver Punkte unter Syndapin I RNAi (A, B) sowie unter Syndapin I RNAi koexprimiert mit RNAi-insensitivem FLAG-Syndapin I (A, B) bzw. FLAG-Syndapin I  $\Delta$ SH3 (C, D), vgl. Abb. 8B, D für normalisierte Werte. **E, F,** Dichte PSD-95 (E) bzw. Synapsin 1 (F)-positiver Punkte unter Überexpression von FLAG-Syndapin I, vgl. Abb. 11G, I für normalisierte Werte. **G, H,** Dichte PSD-95 (G) bzw. Synapsin 1 (H)-positiver Punkte unter ProSAP1 RNAi bzw. ProSAP1 RNAi koexprimiert mit FLAG-Syndapin I, vgl. Abb. 25B, D für normalisierte Werte. **I,** Dichte PSD-95-positiver Punkte unter GFP-ProSAP1 Überexpression, vgl. Abb. 26A für normalisierten Wert. **J, K,** Dichte PSD-95 (J) bzw. Synapsin 1 (K)-positiver Punkte unter Expression eines FLAG-mCherry-+++APPPP-Motiv-beinhaltenden Fusionspeptids, vgl. Abb. 27C, D für normalisierte Werte. **L, M,** Dichte PSD-95 (L) bzw. Synapsin 1 (M)-positiver Punkte unter Syndapin I RNAi koexprimiert mit FLAG-Syndapin I<sup>I122E/M123E</sup>, vgl. Abb. 31G, H für normalisierte Werte.

**Tabelle 15:** Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler,  $n$ -Werte.

<b>Abb. 6</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Dornendichte [pro 10 <math>\mu\text{m}</math>]</b>					
Gesamt	+/+	20,86	7,53	0,72	109
	-/-	17,72	6,18	0,64	93
Stummelförmig	+/+	3,04	1,83	0,18	109
	-/-	2,29	1,61	0,27	93
Pilzförmig	+/+	6,17	3,51	0,34	109
	-/-	4,51	2,62	0,27	93
Dünn	+/+	3,76	1,67	0,16	109
	-/-	3,07	1,44	0,15	93
Filopodienähnlich	+/+	7,89	3,88	0,37	109
	-/-	7,85	3,92	0,41	93
<b>Relative Häufigkeit [%]</b>					
Stummelförmig	+/+	13,95	6,18	0,59	109
	-/-	12,57	7,54	0,78	93
Pilzförmig	+/+	29,16	10,92	1,05	109
	-/-	25,24	10,51	1,09	93
Dünn	+/+	18,20	5,91	0,57	109
	-/-	17,37	5,36	0,56	93
Filopodienähnlich	+/+	38,69	15,16	1,45	109
	-/-	44,82	15,92	1,65	93
<b>Abb. 7</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Dornendichte [pro 10 <math>\mu\text{m}</math>]</b>					
Gesamt	pRNAT	4,83	1,05	0,22	23
	<i>Scrambled</i> RNAi (H1.1)	5,38	1,71	0,46	14
	Sdp I RNAi	4,28	1,26	0,27	22
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>res</sup>	4,98	1,67	0,39	18
Pilzförmig	pRNAT	1,70	0,58	0,12	23
	<i>Scrambled</i> RNAi (H1.1)	1,90	0,65	0,17	14
	Sdp I RNAi	1,10	0,43	0,09	22
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>res</sup>	1,60	0,73	0,17	18
Dünn und filopodienähnlich	pRNAT	2,00	0,78	0,16	23
	<i>Scrambled</i> RNAi (H1.1)	2,30	0,62	0,17	14
	Sdp I RNAi	2,00	0,74	0,16	22
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>res</sup>	2,30	1,10	0,25	18
Stummelförmig	pRNAT	0,98	0,43	0,09	23
	<i>Scrambled</i> RNAi (H1.1)	0,99	0,57	0,15	14
	Sdp I RNAi	0,99	0,54	0,11	22
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>res</sup>	1,00	0,41	0,10	18
<b>Abb. 8</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Dichte positiver Punkte [% Abweichung von Kontrolle]</b>					
PSD-95-positiv	pRNAT	0,00	26,59	1,90	196
	<i>Scrambled</i> RNAi (H1.1)	16,47	33,02	3,76	77
	Sdp I RNAi	-10,29	32,03	2,21	210
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>res</sup>	16,43	34,95	2,73	164
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup><math>\Delta</math>SH3</sup>	-26,92	27,76	3,29	71
Synapsin 1-positiv	pRNAT	0,00	24,65	1,81	186
	<i>Scrambled</i> RNAi (H1.1)	10,68	32,69	3,77	75

<sup>1</sup>Dendritenabschnitte.

**Tabelle 15:** (Fortsetzung) Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler,  $n$ -Werte.

<b>Abb. 8</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
Synapsin 1-positiv	Sdp I RNAi	-14,77	27,45	1,85	219
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>res</sup>	16,12	36,47	2,71	181
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>ΔSH3</sup>	-13,57	33,51	3,66	84
<b>Abb. 9</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Relative Häufigkeit [%]</b>					
PSD-95	Pilzförmig	75,0	-	-	1
	Dünn & filopodienähnlich	25,0	-	-	1
	Stummelförmig	28,6	-	-	1
Synapsin 1	Pilzförmig	66,67	-	-	1
	Dünn und filopodienähnlich	58,10	-	-	1
	Stummelförmig	55,50	-	-	1
<b>Dichte PSD-95-positiver Punkte auf Dornen [pro 10 μm]</b>		1,76	0,84	0,08	101
<b>PSD-95-positive Punkte auf Dornen [% von PSD-95 positiven Punkten]</b>		33,59	15,73	1,57	101
<b>Abb. 10</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Dornendichte [pro 10 μm]</b>					
Gesamt	pRNAT	6,98	1,57	0,50	10
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>ΔSH3</sup>	5,36	1,13	0,30	14
Pilzförmig	pRNAT	3,50	0,47	0,15	10
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>ΔSH3</sup>	2,30	0,71	0,19	14
Dünn und filopodienähnlich	pRNAT	1,60	0,73	0,23	10
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>ΔSH3</sup>	1,70	0,58	0,15	14
<b>Abb. 11</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Dornendichte [pro 10 μm]</b>					
Gesamt	PM-mCherry-Kontrolle	4,88	1,64	0,38	19
	Sdp I	7,08	1,93	0,48	16
Pilzförmig	PM-mCherry-Kontrolle	1,70	0,88	0,20	19
	Sdp I	2,70	0,82	0,20	16
Dünn und filopodienähnlich	PM-mCherry-Kontrolle	1,93	1,02	0,23	19
	Sdp I	2,27	0,83	0,21	16
Stummelförmig	PM-mCherry-Kontrolle	1,01	0,77	0,18	19
	Sdp I	1,79	0,82	0,21	16
<b>Dichte positiver Punkte [% Abweichung von Kontrolle]</b>					
PSD-95-positiv	pRNAT-Kontrolle	0,00	26,59	1,90	196
	Sdp I	10,31	40,80	4,56	80
Synapsin 1-positiv	pRNAT-Kontrolle	0,00	24,65	1,81	186
	Sdp I	14,77	31,81	3,89	67
<b>Abb. 22</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^2</math></b>
<b>Kopfbreite [μm]</b>	GFP	0,73	0,28	0,01	471
	GFP-FLAGc	0,71	0,23	0,01	269
	ProSAP1	0,83	0,31	0,01	663
	ProSAP1+Sdp I SH3	0,74	0,26	0,02	242
	GFP+Sdp I SH3	0,70	0,23	0,02	235
	ProSAP1*	0,69	0,26	0,02	205

<sup>1</sup>Dendritenabschnitte; <sup>2</sup>Dornfortsätze.

**Tabelle 15:** (Fortsetzung) Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler,  $n$ -Werte.

<b>Abb. 23</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^2</math></b>
<b>Kopfbreite [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	GFP+pRNAT	0,72	0,26	0,02	182
	ProSAP1+pRNAT	0,84	0,34	0,02	308
	ProSAP1+Sdp I RNAi	0,77	0,28	0,02	246
	Sdp I RNAi	0,74	0,27	0,02	222
	ProSAP1+Arp3 RNAi	0,61	0,23	0,02	151
	ProSAP1+N-WASP RNAi	0,71	0,25	0,02	202
	<i>Scrambled</i> RNAi (U6.1)	0,69	0,28	0,02	160
	Arp3 RNAi	0,74	0,32	0,02	237
	N-WASP RNAi	0,72	0,24	0,02	197
<b>Abb. 24</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^2</math></b>
<b>Kopfbreite [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	pRNAT	0,76	0,29	0,02	332
	<i>Scrambled</i> RNAi (H1.1)	0,73	0,23	0,01	273
	Sdp I RNAi	0,74	0,27	0,02	222
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>res</sup>	0,72	0,29	0,02	256
<b>Kopfbreite [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	PM-mCherry-Kontrolle	0,77	0,29	0,02	277
	Sdp I	0,76	0,28	0,02	310
<b>Kopfbreite [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	pRNAT	0,82	0,29	0,02	360
	ProSAP1 RNAi #2	0,67	0,28	0,02	303
	ProSAP1 RNAi #2 +Sdp I	0,71	0,24	0,01	376
<b>Abb. 25</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Dichte positiver Punkte [% Abweichung von Kontrolle]</b>					
PSD-95-positiv	pRNAT	0,00	26,59	1,90	196
	<i>Scrambled</i> RNAi (H1.1)	16,47	33,02	3,76	77
	ProSAP1 RNAi #2	-19,44	35,53	3,83	86
	ProSAP1 RNAi #1	-27,49	39,69	5,40	54
	ProSAP1 RNAi #2 +Sdp I	-8,03	30,13	3,43	77
	ProSAP1 RNAi #1 +Sdp I	-22,26	24,96	3,25	59
Synapsin 1-positiv	pRNAT	0,00	24,65	1,81	186
	<i>Scrambled</i> RNAi (H1.1)	10,68	32,69	3,77	75
	ProSAP1 RNAi #2	-20,32	23,15	2,79	69
	ProSAP1 RNAi #1	-17,35	26,53	3,27	66
	ProSAP1 RNAi #2 +Sdp I	4,33	33,97	3,68	85
	ProSAP1 RNAi #1 +Sdp I	0,53	41,08	5,54	55
<b>Abb. 26</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Dichte PSD-95-positiver Punkte [% Abweichung von Kontrolle]</b>	pRNAT-Kontrolle	0,00	26,59	1,90	196
	ProSAP1	5,87	29,89	4,46	45
<b>Dichte pilzförmiger Dornen [pro 10 <math>\mu\text{m}</math>]</b>	GFP	2,50	0,83	0,19	20
	ProSAP1	2,89	0,72	0,15	23
	GFP-FLAGc	2,08	0,79	0,24	11
	ProSAP1+Sdp I SH3	1,51	0,41	0,1	16
	GFP+Sdp I SH3	1,89	0,50	0,15	11
	ProSAP1*	1,49	0,57	0,15	14
	GFP+pRNAT	2,01	0,44	0,15	8
	ProSAP1+pRNAT	2,13	0,64	0,17	15
	ProSAP1+Sdp I RNAi	1,37	0,60	0,14	19
	Sdp I RNAi	1,07	0,43	0,09	22
	ProSAP1+Arp3 RNAi	1,15	0,47	0,11	19
	ProSAP1+N-WASP RNAi	1,52	0,68	0,18	14

<sup>1</sup>Dendritenabschnitte; <sup>2</sup>Dornfortsätze.

**Tabelle 15:** (Fortsetzung) Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler,  $n$ -Werte.

<b>Abb. 26</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Dichte pilzförmiger Dornen</b> [pro 10 $\mu\text{m}$ ]	<i>Scrambled</i> RNAi (U6.1)	0,88	0,45	0,1	20
	Arp3 RNAi	1,41	0,61	0,15	17
	N-WASP RNAi	1,17	0,55	0,14	16
	pRNAT	2,59	0,53	0,16	11
	ProSAP1 RNAi #2	2,24	0,59	0,16	13
<b>Abb. 27</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Dichte positiver Punkte [% Abweichung von Kontrolle]</b>	pRNAT-Kontrolle	0,00	26,59	1,90	196
	+++APPPP-Motiv	-12,22	45,00	5,30	72
Synapsin 1-positiv	pRNAT-Kontrolle	0,00	24,65	1,81	186
	+++APPPP-Motiv	-13,94	28,05	3,20	77
<b>Abb. 31</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Dornendichte [pro 10 <math>\mu\text{m}</math>]</b>	pRNAT	6,98	1,57	0,50	10
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	4,81	1,16	0,31	14
Pilzförmig	pRNAT	3,47	0,47	0,15	10
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	2,00	0,54	0,14	14
Dünn und filopodienähnlich	pRNAT	1,61	0,73	0,23	10
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	1,53	0,71	0,19	14
<b>Kopfbreite [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	pRNAT	0,72	0,29	0,02	340 <sup>2</sup>
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	0,76	0,29	0,02	257 <sup>2</sup>
<b>Dichte positiver Punkte [% Abweichung von Kontrolle]</b>	pRNAT	0,00	26,59	1,90	196
	Sdp I RNAi	-10,29	32,03	2,21	210
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	-28,35	28,35	3,69	59
Synapsin 1-positiv	pRNAT	0,00	24,65	1,81	186
	Sdp I RNAi	-14,77	27,45	1,85	219
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	-9,38	26,01	3,11	70
<b>Abb. 33</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^3</math></b>
<b>Frequenz [Hz]</b>	pRNAT	6,06	2,33	0,70	11
	<i>Scrambled</i> RNAi (H1.1)	5,85	2,51	0,72	12
	Sdp I RNAi	3,54	1,93	0,56	12
<b>Amplitude [pA]</b>	pRNAT	-15,85	4,46	1,35	11
	<i>Scrambled</i> RNAi (H1.1)	-15,97	4,18	1,21	12
	Sdp I RNAi	-13,76	3,05	0,88	12
<b>Abb. 34</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^3</math></b>
<b>Frequenz [Hz]</b>	pRNAT	5,75	4,15	0,95	19
	Sdp I RNAi	3,08	3,50	0,76	21
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>res</sup>	6,10	4,60	1,19	15
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup><math>\Delta</math>SH3</sup>	3,02	2,26	0,65	12
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	2,42	3,27	0,91	13
<b>Amplitude [pA]</b>	pRNAT	-13,03	4,25	0,98	19
	Sdp I RNAi	-17,39	7,13	1,56	21
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>res</sup>	-12,88	3,73	0,96	15
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup><math>\Delta</math>SH3</sup>	-15,43	5,43	1,57	12
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	-14,96	3,60	0,10	13

<sup>1</sup>Dendritenabschnitte; <sup>2</sup>Dornfortsätze; <sup>3</sup>Zellen.

**Tabelle 15:** (Fortsetzung) Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler,  $n$ -Werte.

<b>Abb. 35</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^3</math></b>
<b>Fläche der Punkte [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>					
PSD-95-positiv	+/+	1,13	0,27	0,04	40
	-/-	1,14	0,27	0,04	40
ProSAP1-positiv	+/+	0,53	0,12	0,02	40
	-/-	0,65	0,19	0,03	40
Kokalisiert	+/+	0,44	0,13	0,02	40
	-/-	0,45	0,10	0,02	40
<b>Mittlere Intensität der Punkte [w.E.]</b>					
PSD-95-positiv	+/+	107,64	13,40	2,12	40
	-/-	101,67	16,76	2,65	40
ProSAP1-positiv	+/+	37,24	21,04	3,33	40
	-/-	32,87	7,37	1,17	40
<b>Summierte Intensität der Punkte [w.E.]</b>					
ProSAP1-positiv	+/+	864,13	585,94	92,65	40
	-/-	926,46	330,43	52,25	40
<b>Abb. 37</b>	<b>Kondition</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>SEM</b>	<b><math>n^1</math></b>
<b>Dichte positiver Punkte [pro 10 <math>\mu\text{m}</math>]</b>					
PSD-95-positiv	pRNAT	6,52	2,38	0,17	196
	Sdp I RNAi	5,77	2,65	0,18	210
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>res</sup>	6,85	2,93	0,23	164
Synapsin 1-positiv	pRNAT	4,88	1,95	0,14	186
	Sdp I RNAi	4,03	1,90	0,13	219
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>res</sup>	5,07	2,51	0,19	181
PSD-95-positiv	pRNAT	7,36	2,21	0,26	71
	Sdp I RNAi+Sdp I $\Delta\text{SH3}$	5,32	1,86	0,22	71
Synapsin 1-positiv	pRNAT	5,87	1,74	0,23	57
	Sdp I RNAi+Sdp I $\Delta\text{SH3}$	4,91	1,98	0,22	84
PSD-95-positiv	PM-mCherry-Kontrolle	7,36	2,21	0,26	71
	Sdp I	8,13	3,28	0,37	80
Synapsin 1-positiv	PM-mCherry-Kontrolle	5,87	1,74	0,23	57
	Sdp I	6,64	1,93	0,24	67
PSD-95-positiv	pRNAT	7,57	2,50	0,30	69
	ProSAP1 RNAi #2	6,20	2,86	0,31	86
	ProSAP1 RNAi #2 +Sdp I	6,99	2,42	0,28	77
Synapsin 1-positiv	pRNAT	6,30	1,87	0,23	64
	ProSAP1 RNAi #2	5,00	1,71	0,21	69
	ProSAP1 RNAi #2 +Sdp I	6,33	1,98	0,21	85
PSD-95-positiv	pRNAT-Kontrolle	7,85	2,41	0,33	54
	ProSAP1	8,31	2,36	0,35	45
PSD-95-positiv	pRNAT-Kontrolle	7,36	2,21	0,26	71
	+++APPPP-Motiv	6,41	3,14	0,37	72
Synapsin 1-positiv	pRNAT-Kontrolle	5,87	1,74	0,23	57
	+++APPPP-Motiv	4,84	1,38	0,16	77
PSD-95-positiv	pRNAT	7,36	2,21	0,26	71
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	5,34	2,18	0,28	59
Synapsin 1-positiv	pRNAT	5,87	1,74	0,23	57
	Sdp I RNAi+Sdp I <sup>I122E/M123E</sup>	5,30	1,75	0,21	70

<sup>1</sup>Dendritenabschnitte; <sup>3</sup>Zellen.

# B Abbildungsverzeichnis

1	Morphologieklassen dendritischer Dornfortsätze . . . . .	2
2	Aussehen und Aufbau dendritischer Dornfortsätze . . . . .	3
3	Modelle der Synapsen- und Dornfortsatzbildung . . . . .	7
4	Morphologische Veränderungen dendritischer Dornfortsätze während der synaptischen Plastizität . . . . .	8
5	Domänenorganisation und F-BAR-Dimerstruktur von Syndapin I . . . . .	9
6	Dornfortsätze in <i>Syndapin I</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen . . . . .	40
7	Dornfortsätze unter Syndapin I-Depletion . . . . .	41
8	Synapsen unter Syndapin I-Depletion . . . . .	42
9	Korrelation der Synapsendichte mit der Dichte reifer Dornfortsätze . . . . .	43
10	Dornfortsätze unter Verlust von SH3-Domänen-vermittelten Syndapin I-Funktionen . . . . .	44
11	Dornfortsätze und Synapsen unter Syndapin I-Überexpression . . . . .	46
12	Lokalisation von endogenem Syndapin I in Neuronenkulturen . . . . .	47
13	Lokalisation von rekombinantem Syndapin I in Neuronenkulturen . . . . .	48
14	SH3-Domänen-vermittelte Interaktion der Syndapin-Proteine mit ProSAP1 . . . . .	50
15	Syndapin I-Interaktion mit ProSAP1 und ProSAP2 über ein konserviertes N-terminales +++APPPP-Motiv in ProSAP/Shank . . . . .	51
16	Abhängigkeit der Syndapin I/ProSAP1-Interaktion vom +++APPPP-Motiv im ProSAP1 N-Terminus . . . . .	52
17	Nachweis von Syndapin I/ProSAP1-Komplexen in Zellysaten und Gehirnextrakten . . . . .	53
18	Nachweis von Syndapin I/ProSAP1-Komplexen in Zellen . . . . .	54
19	Kontrollen der Rekrutierungsstudien . . . . .	55
20	Syndapin I/ProSAP1-Kolokalisation in Mausgehirnschnitten . . . . .	56
21	Syndapin I/ProSAP1-Kolokalisation in Neuronen . . . . .	57
22	ProSAP1-Funktionen unter gestörter Komplexbildung mit Syndapin I . . . . .	59
23	ProSAP1-Funktionen unter Syndapin I-Depletion . . . . .	61
24	Syndapin I-Funktionen in der Kopfaufweitung pilzförmiger Dornen . . . . .	62
25	Synapsen unter ProSAP1-Depletion . . . . .	63
26	Pilzförmige Dornfortsätze unter Störung der Syndapin I/ProSAP1-Komplexbildung . . . . .	65
27	Synapsen unter Blockierung der +++APPPP-Motiv-Bindestelle in Syndapin I . . . . .	66
28	Präzipitationsanalyse der +++APPPP-Motiv-Spezifität . . . . .	66
29	Lipidbindungseigenschaft der Syndapin I <sup>I122E/M123E</sup> -Mutante . . . . .	68

---

30	Dimerisierungseigenschaft der Syndapin I <sup>I122E/M123E</sup> -Mutante . . . . .	69
31	Dornfortsätze und Synapsen unter Verlust der F-BAR-Domänen-vermittelten Membranassoziationsfähigkeit von Syndapin I . . . . .	70
32	ProSAP1-Rekrutierung zu Liposomen durch Syndapin I . . . . .	71
33	Störungen in der synaptischen Transmission unter Syndapin I-Depletion . . .	72
34	Domänenabhängigkeit der Syndapin I-Funktionen in der synaptischen Trans- mission . . . . .	73
35	Räumliche Organisation von ProSAP1 in <i>Syndapin I</i> <sup>-/-</sup> -Neuronen . . . . .	75
36	Modell der Syndapin I-vermittelten ProSAP1-Organisation in der Postsynap- senbildung . . . . .	87
37	Absolute Werte der Post- und Präsynapsendichten . . . . .	IV

# C Tabellenverzeichnis

1	<i>E. coli</i> -Bakterienstämme . . . . .	16
2	Vektorplasmide . . . . .	16
3	DNA-Expressionskonstrukte für Mammalia-Zellen . . . . .	17
4	DNA-Expressionskonstrukte für <i>E. coli</i> . . . . .	18
5	RNAi-Konstrukte . . . . .	18
6	<i>Primer</i> . . . . .	18
7	Sekundäre Antikörper . . . . .	19
8	Primäre Antikörper . . . . .	20
9	PCR-Programm . . . . .	24
10	Klassifizierung dendritischer Dornfortsätze . . . . .	37
11	MATLAB-Modulkonfiguration dendritischer Dornfortsätze . . . . .	37
12	Primer und Produkte bei Genotypisierungs-PCR . . . . .	I
13	Genotypisierungs-PCR . . . . .	I
14	SDS-Polyacrylamidgele . . . . .	III
15	Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler, <i>n</i> -Werte . . . . .	V

# Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe. Es wurden keine Textabschnitte Dritter oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen.

Mir ist die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt und Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, sind in der Danksagung genannt.

Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen und Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Ich versichere, dass ich die Dissertation nicht bereits zuvor als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe. Ich habe keine gleiche oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 27. Juni 2014

---

Katharina Schneider

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Katharina Schneider  
Anschrift: Jansonstraße 20  
07745 Jena  
Geburtsdatum: 26.11.1985  
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt jetzt Chemnitz  
Familienstand: ledig

## Promotion

01/2010 – 06/2014 Promotion am Institut für Biochemie I des Universitätsklinikums Jena in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Britta Qualmann mit dem Thema: *Charakterisierung postsynaptischer Funktionen des F-BAR-Domänenproteins Syndapin I*

## Hochschulausbildung

10/2004 – 12/2009 Studium der Humanbiologie (Diplom) an der Philipps-Universität Marburg  
Abschluss: Diplom (Note: 1,2)  
01/2009 – 11/2009 Diplomarbeit am Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Jacob mit dem Thema: *Funktionelle Charakterisierung von Rab13 und Cyhr1 im apikalen Transport in polaren Epithelzellen*

## Praktische Erfahrung

03 – 06/2009 Studentische Hilfskraft am Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Jacob  
05 – 06/2008 Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Jacob (6 Wochen, Thema: *Charakterisierung von Motorproteinen im apikalen Transport in polaren MDCK-Zellen*)  
03 – 05/2008 Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus-Heinrich Röhme (6 Wochen, Thema: *Analyse der Effekte spezifischer Inhibitoren auf die Diphenolase-Aktivität der humanen und fungalen Tyrosinase*)

- 11/2007 – 01/2008 Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer (6 Wochen, Thema: *Funktionelle Analyse des Myc-bindenden Transkriptionsfaktors Miz1 in murinen Keratinozyten*)
- 08 – 10/2007 Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roland Lill (6 Wochen, Thema: *Analyse von BOLA-ähnlichen Proteinen in Hefe*)
- 2000 – 2005 Aushilfskraft im histologischen und zytologischen Labor von Dr. Renate Mehner, DRK Krankenhaus, Chemnitz (jährlich 6-8 Wochen)

### **Schulausbildung**

- 08/1996 – 07/2004 Dr.-Wilhelm-André-Gymnasium Chemnitz  
Abschluss: Abitur (Note: 1,4)
- 08/1992 – 07/1996 Grundschule am Sonnenberg Chemnitz

### **Fortbildungen**

- 11/2012 *Microscopy Workshop* des Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung/*Research Training Group* 1715, Jena

Jena, den 27. Juni 2014

---

Katharina Schneider

# Wissenschaftliche Veröffentlichungen

## Publikationen

SCHNEIDER, KATHARINA, E. SEEMANN, L. LIEBMANN, R. AHUJA, D. KOCH, M. WESTERMANN, C. A. HÜBNER, M. M. KESSELS und B. QUALMANN (2014). *ProSAP1 and membrane nanodomain-associated syndapin I promote postsynapse formation and function*. The Journal of Cell Biology, 205(2):197-215.

ZOBEL, THOMAS, N. KOCH, K. SCHNEIDER, B. QUALMANN, M. M. KESSELS, A. FLEIGE und S. BOGDAN (2014). *Cooperative functions of the two F-BAR proteins Cip4 and Nostrin in Drosophila epithelial morphogenesis*. Journal of Cell Science, eingereicht.

## Posterpräsentationen

SCHNEIDER, KATHARINA, R. AHUJA, A. HÄCKEL, T. M. BÖCKERS, M. M. KESSELS, B. QUALMANN

*Proper formation of mature spines and synapses critically rely on syndapin I.*

3<sup>rd</sup> LIN Symposium, Tangermünde, Deutschland, 27.-30. August 2012.

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Britta Qualmann am Institut für Biochemie I des Universitätsklinikums Jena zwischen Januar 2010 und Juni 2014 angefertigt. Ich bedanke mich bei **Prof. Dr. Britta Qualmann** und **PD Dr. Michael Kessels** für die Vergabe des spannenden Projektes, die intensive und freundschaftliche Betreuung und ihre Diskussionsbereitschaft während der Dissertation.

**Annett Kreuzsch, Christin Scharf, Dirk Schlobinski** und **Michaela Öhler** möchte ich für die regelmäßige Bereitstellung der primären hippocampalen Neuronenkulturen danken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

**Christin Scharf** und **Dr. Natja Haag** danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate und für die vielen praktischen Tipps in der Durchführung histologischer Methoden.

Mein besonderer Dank gilt **Birgit Schade** für die exzellente technische Unterstützung und freundliche Zusammenarbeit während der gesamten Promotionsphase.

**Dr. Nicole Koch** und **Jacqueline Schneider** möchte ich für die wertvolle Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft rund um die mikroskopischen Aufnahmeverfahren und Bildanalysen danken.

Ich danke **Dr. Dennis Koch, Dr. Laura McMillan** sowie **David Wolf** für die intensiven Diskussionen, die Hilfsbereitschaft und die Zusammenarbeit, die zum Voranschreiten des Projekts und zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

**Dr. Rashmi Ahuja Toivanen** danke ich für die ersten proteinbiochemischen Analysen, auf die dieses Projekt aufbaut.

Ich bedanke mich bei **Prof. Dr. Christian Hübner** des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Jena für die freundliche Kollaboration in diesem Projekt und besonders bei **Dr. Lutz Liebmann** für die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen im Rahmen dieser Kollaboration.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die Hilfsbereitschaft, für wertvolle Tipps und Anregungen und für die freundliche Arbeitsatmosphäre während der Promotionsphase.

Ganz besonders danke ich meiner Familie und meinen Freunden, für deren Unterstützung und Motivation ich unendlich dankbar bin.