

**Immunhistochemische und funktionelle Analyse  
der Interaktion des neuronalen  $K^+Cl^-$ -  
Kotransporters KCC2 mit dem GEF-Protein  
 $\beta$ PIX**

---

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften  
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg  
zur Erlangung des Doktorgrades

**Dr. rer. nat.**

angenommene Dissertation

von Annika Döding  
geboren am 31.03.1982 in Lübbecke

Gutachter: Prof. Dr. Hans Gerd Nothwang

Zweitgutachter: Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch

Tag der Disputation: 27.09.2012

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

---

Jena, d. 18.07.2012

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein

*Für meine Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der neuronale K<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>-Kotransporter KCC2</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die Rolle von KCC2 in der Entwicklung der inhibitorischen Neurotransmission	4
1.1.2 Die Funktion von KCC2 in dendritischen Dornen	6
1.1.3 Regulationsmechanismen der Transportaktivität von KCC2	7
<b>1.2 βPIX – ein putativer Interaktionspartner von KCC2</b>	<b>10</b>
1.2.1 Funktionen von βPIX in der neuronalen Entwicklung	11
1.2.2 Die Rolle von βPIX im Trafficking	13
<b>1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit</b>	<b>14</b>
1.3.1 Immunhistochemische Analyse	14
1.3.2 Untersuchung des Effekts von βPIX auf KCC2	14
1.3.3 Entwicklung eines Endozytose-Modells für KCC2 in HEK293-Zellen	15
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Plasmide</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Agenzien</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Versuchstiere und Zellkulturen</b>	<b>20</b>
<b>2.5 Antikörper</b>	<b>20</b>
<b>2.6 Biochemische Methoden</b>	<b>22</b>
2.6.1 KCC2-Aktivitätsmessungen mit radioaktivem Rubidium (Flux)	22
2.6.2 Isolierung von Proteinen aus HEK293-Zellen	23
2.6.3 Proteinquantifizierung	24
2.6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	24
2.6.5 Western Blot	25
2.6.6 Markierung der Proteine mit spezifischen Antikörpern	25
2.6.7 Detektion der nachzuweisenden Proteine	26
2.6.8 Entfernen des Signals zwischen zwei Antikörperdetektionen	26
<b>2.7 Immunhistochemische Methoden</b>	<b>26</b>
2.7.1 Transkardiale Perfusion	26
2.7.2 Anfertigung von Hirnschnitten für die Immunhistochemie	27
2.7.3 Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin	27
2.7.4 Immunhistochemie	27

<b>2.8</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>28</b>
2.8.1	Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin	28
2.8.2	Transiente Transfektion	28
2.8.3	Immuncytochemie	29
2.8.3.1	Markierung der Zelloberfläche mit Weizenkeimagglutinin (WGA)	29
2.8.3.2	Antikörperfärbung von HEK293-Zellen	30
<b>2.9</b>	<b>Mikroskopie</b>	<b>31</b>
2.9.1	Fluoreszenzmikroskopie	31
2.9.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	31
2.9.2.1	Anfertigung von immunhistochemischen Aufnahmen mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie	32
2.9.2.2	Anfertigung von immuncytochemischen Aufnahmen mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie	33
2.9.3	Auswertung der konfokalen Aufnahmen mit ImageJ	33
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von KCC2 und <math>\beta</math>PIX in Hippocampus und Cerebellum</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Analyse der subzellulären Lokalisation von KCC2 und <math>\beta</math>PIX in Hippocampus und Cerebellum 15 Tage alter (P15) Wildtyp-Mäuse</b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Analyse der subzellulären Lokalisation von KCC2 und <math>\beta</math>PIX in Hippocampus und Cerebellum 30 Tage alter (P30) Wildtyp-Mäuse</b>	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>Analyse der Koloalisation von KCC2 und <math>\beta</math>PIX in Hippocampus und Cerebellum von 15 und 30 Tage alten Wildtyp-Mäusen</b>	<b>46</b>
<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung der stabil KCC2 exprimierenden HEK293-Zelllinie</b>	<b>48</b>
<b>3.6</b>	<b>Einfluss von <math>\beta</math>PIX und seinem Interaktionspartner PAK3 auf die Transportaktivität von KCC2</b>	<b>50</b>
<b>3.7</b>	<b>Funktionsanalyse von KCC2 unter Einfluss von <math>\beta</math>PIX und GIT1</b>	<b>51</b>
<b>3.8</b>	<b>Etablierung eines Endozytose-Modells für KCC2 in HEK293-Zellen</b>	<b>54</b>
3.8.1	Pharmakologische Inhibition des KCC2-Traffickings in HEK293-Zellen	54
3.8.2	Untersuchung des Effekts von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) auf KCC2 in HEK293-Zellen	56
<b>3.9</b>	<b>Einfluss der Überexpression von <math>\beta</math>PIX und GIT1 auf die Oberflächenexpression von KCC2</b>	<b>63</b>
<b>3.10</b>	<b>Quantitative Analyse der Koloalisation von KCC2 und <math>\beta</math>PIX sowie GIT1</b>	<b>67</b>
3.10.1	Einfluss des Tyrosins an der Stelle 442 von $\beta$ PIX auf die Koloalisation von KCC2 und $\beta$ PIX	68
3.10.2	Einfluss der GAP-Aktivität von GIT1 auf die Koloalisation zwischen KCC2 und GIT1	69
<b>3.11</b>	<b>Analyse <math>\beta</math>PIX-bindedefizienter KCC2-Mutanten</b>	<b>71</b>

3.11.1	Einfluss von Alanin-Mutationen im $\beta$ PIX-Bindemotiv auf die Transportaktivität von KCC2	71
3.11.2	Einfluss von Alanin-Mutationen im $\beta$ PIX-Bindemotiv auf die subzelluläre Lokalisation von KCC2	73
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Entwicklungsabhängige Veränderungen in der KCC2-Verteilung zwischen P15 und P30</b>	<b>75</b>
4.1.1	Veränderungen in der KCC2-Verteilung zwischen P15 und P30 im Hippocampus	75
4.1.2	Veränderungen in der KCC2-Verteilung zwischen P15 und P30 im Cerebellum	77
<b>4.2</b>	<b>Entwicklungsabhängige Veränderungen in der <math>\beta</math>PIX-Verteilung zwischen P15 und P30</b>	<b>78</b>
4.2.1	Veränderungen in der $\beta$ PIX-Verteilung zwischen P15 und P30 im Hippocampus	78
4.2.2	Veränderungen in der $\beta$ PIX-Verteilung zwischen P15 und P30 im Cerebellum	80
<b>4.3</b>	<b>KCC2 und <math>\beta</math>PIX liegen in den Somata neuronaler Zellen kolokalisiert vor</b>	<b>82</b>
<b>4.4</b>	<b>Veränderung der KCC2-Transportaktivität unter Einfluss von <math>\beta</math>PIX und seinen Interaktionspartnern</b>	<b>85</b>
4.4.1	Die Überexpression der Wildtypen von $\beta$ PIX und PAK3 hat keinen Einfluss auf die Transportaktivität von KCC2	86
4.4.2	Die Überexpression von $\beta$ PIX- und GIT1-Mutanten wirkt sich negativ auf die KCC2-Transportaktivität in HEK293-Zellen aus	87
4.4.2.1	$\beta$ PIX und GIT1 haben in HEK293-Zellen keinen Einfluss auf das Trafficking von KCC2	88
4.4.2.2	$\beta$ PIX und GIT1 scheinen die Regulation der Transportkinetik von KCC2 involviert zu sein	89
<b>4.5</b>	<b>Einzelmutationen im <math>\beta</math>PIX-Bindemotiv an KCC2 wirken sich negativ auf die Transportaktivität jedoch nicht auf die Oberflächenexpression aus</b>	<b>92</b>
<b>4.6</b>	<b>Erstellung eines möglichen Modells für den Einfluss von <math>\beta</math>PIX und GIT1 auf die Transportaktivität von KCC2</b>	<b>93</b>
<b>4.7</b>	<b>Die Behandlung von HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen mit Wasserstoffperoxid hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von KCC2</b>	<b>97</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNGEN</b>	<b>100</b>
<b>5.1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>5.2</b>	<b>Summary</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>103</b>
<b>ANHANG</b>		<b>119</b>
		III

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Hypothetisches Topologiemodell von KCC2 nach Payne 1997	1
Abb. 1.2:	Modell des D/H-Wechsels in neuronalen Zellen	5
Abb. 1.3:	Übersicht über die verschiedenen KCC2-Regulationsmechanismen	10
Abb. 3.1	KCC2- und $\beta$ PIX-Immunreaktivität in Hippocampus und Cerebellum von 15 (P15) und 30 (P30) Tage alten C57Bl6-Mäusen	37
Abb. 3.2:	Doppelfärbungen von KCC2 und $\beta$ PIX im Hippocampus und im Cerebellum P15 alter C57Bl6-Mäuse	40
Abb. 3.3:	Doppelfärbungen von KCC2 und $\beta$ PIX im Hippocampus und im Cerebellum P30 alter C57Bl6-Mäuse	43
Abb. 3.4:	Kolokalisationsanalyse von KCC2 und $\beta$ PIX in Hippocampus und Cerebellum von 15 und 30 Tage alten C57Bl6-Mäusen	47
Abb. 3.5:	Transportaktivität in HEK293 <sup>KCC2</sup> -Zellen unter Einfluss von Furosemid	49
Abb. 3.6:	Transportaktivität von KCC2 in Abhängigkeit von $\beta$ PIX und PAK3	50
Abb. 3.7:	Transportaktivität von KCC2 in Abhängigkeit von $\beta$ PIX und GIT1	52
Abb. 3.8:	Überprüfung der Expression der transfizierten Konstrukte und der KCC2-Abundanz mittels Immunoblots	53
Abb. 3.9:	Transportaktivität von KCC2 in unter Einfluss von Brefeldin A (BfA) und des Na <sup>+</sup> -Ionophors Monensin	55
Abb. 3.10:	Vitalitätstest von HEK293 <sup>KCC2</sup> -Zellen unter Einfluss von Monensin und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	57
Abb. 3.11:	Vitalitätstest von HEK293 <sup>KCC2</sup> -Zellen unter Einfluss von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	58
Abb. 3.12:	Einfluss von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die Transportaktivität von KCC2 in HEK293 Zellen	59
Abb. 3.13:	Untersuchung der Wirkung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf KCC2 in HEK293 Zellen	61
Abb. 3.14:	Auswirkung von Cytochalasin D auf den durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induzierten Effekt auf KCC2	62
Abb. 3.15:	Untersuchung der Verteilung von KCC2 nach Überexpression von $\beta$ PIX und GIT1 sowie ihrer Mutanten in HEK293-Zellen	64
Abb. 3.16	Quantifizierung der Veränderung der membranständigen Lokalisation von KCC2 unter Einfluss von $\beta$ PIX und GIT1 sowie ihrer Mutanten in HEK293 Zellen über die Kolokalisation mit WGA	66
Abb. 3.17:	Quantifizierung der Kolokalisation von KCC2 mit $\beta$ PIX <sup>wt</sup> und $\beta$ PIX <sup>Y442F</sup>	68

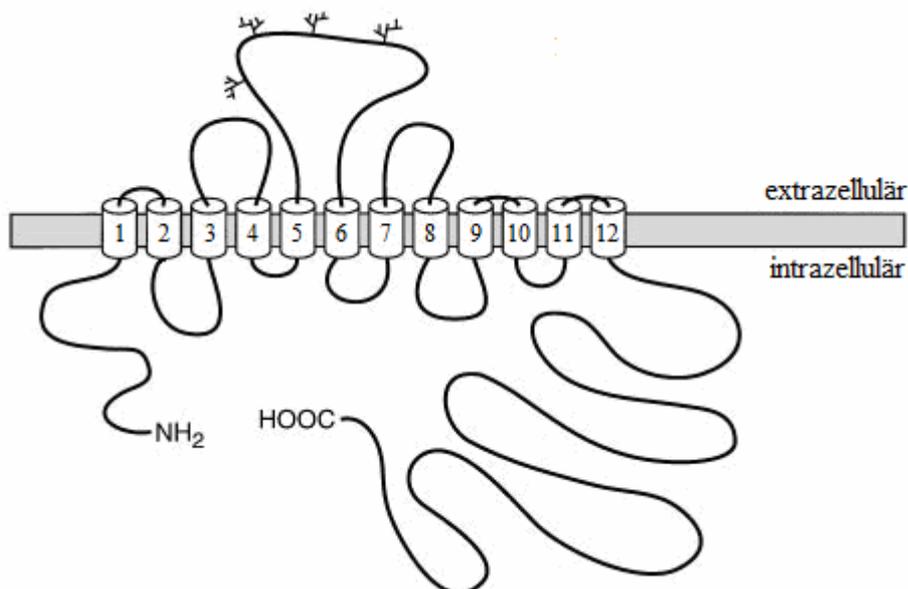
Abb. 3.18:	Quantifizierung der Kollokalisation von KCC2 mit GIT1 <sup>wt</sup> und ArfGAP-defizienten GIT1-Mutanten	70
Abb. 3.19:	Transportaktivität von $\beta$ PIX-bindedefizienten KCC2-Mutanten	72
Abb. 3.20:	Quantifizierung der membranständigen Lokalisation von KCC2 und seinen Mutanten in HEK293 Zellen über die Kollokalisation mit WGA	74
Abb. .4.1:	Analyse der Kollokalisation von KCC2 und $\beta$ PIX im Str. radiatum der CA1-Region	83
Abb. 4.2:	Modell für die Wirkung von $\beta$ PIX- und GIT1-Komplexen auf KCC2	95
Abb. 4.3:	Modell zur Regulation der KCC2-Transportaktivität über Src- abhängige Effektoren in HEK293-Zellen	97

# 1 Einleitung

## 1.1 Der neuronale $K^+Cl^-$ -Kotransporter KCC2

Ionentransporter sind integrale Membranproteine, welche den Austausch von Ionen zwischen der Zelle und seiner Umgebung kontrollieren. Primäraktive Transporter beziehen ihre Energie aus der ATP-Hydrolyse (z.B. durch die  $Na^+/K^+$ -ATPase), während sekundäraktive Transporter das durch die ATPase geschaffene Konzentrationsgefälle von Ionen für ihre Transportaktivität ausnutzen. Eine prominente Familie unter den sekundäraktiven Transportern ist die Familie der Kationen-Chlorid-Kotransporter (Cation-Chloride-Cotransporter - CCC). Sie umfasst bei Säugetieren 9 Mitglieder, welche durch die Gene *Slc12A1-9* kodiert werden. Zu diesen Mitgliedern zählen  $Na^+K^+2Cl^-$ -Kotransporter (NKCC1 und 2),  $Na^+Cl^-$ -Kotransporter (NCC),  $K^+Cl^-$ -Kotransporter (KCC1-4) sowie auch solche, die nicht transportaktiv sind (CCC8 und 9) (Mount et al. 1998; Gamba 2005). Diese Transporter nutzen den durch die  $Na^+/K^+$ -ATPase aufgebauten  $Na^+$ - oder  $K^+$ -Gradienten, um in einem elektroneutralen Transport  $Cl^-$  über die Membran zu transportieren. Dadurch tragen die CCCs wesentlich zur zellulären pH- und Volumenregulation bei (Payne et al. 2003).

KCC2 ( $K^+Cl^-$ -Kotransporter 2) wird durch das Gen *SlcA5* kodiert und ist ein 1116 AS langes Polypeptid. In dem 1997 von Payne vorgeschlagenen Topologiemodell besitzt KCC2 12 transmembrane (TM) Domänen, welche durch einen intrazellulären C- und N-Terminus



**Abb.1. 1: Hypothetisches Topologiemodell von KCC2 nach Payne 1997.**

KCC2 besitzt 12 transmembrane Domänen und zwei intrazellulär lokalisierte Termini. Zwischen den Transmembrandomänen 5 und 6 liegt eine große extrazelluläre Schleife, in der sich 4 putative Glykosylierungsstellen befinden.

flankiert werden. Zwischen den TMs 5 und 6 befindet sich eine große extrazelluläre Schleife, in welcher 4 putative Glykosylierungsstellen lokalisiert sind (vgl. Abb. 1.1). Durch die Glykosylierung verändert sich das auf 123,6 kDa berechnete Molekulargewicht von KCC2 auf 135 kDa. Heterolog in HEK (human embryonic kidney) 293-Zellen exprimiert liegt das Molekulargewicht von KCC2 bei ~150 kDa, was auf einen noch höheren Glykosylierungsgrad von KCC2 in diesen Zellen zurückzuführen ist (Williams et al. 1999).

Ebenso wie die übrigen KCCs ist auch KCC2 unter hypotonischen Bedingungen aktiv. Darüber hinaus ist KCC2 als einziger KCC im Besitz einer 15 AS langen ‚ISO‘-Sequenz, welche im C-Terminus lokalisiert ist (AS1021-1035). Diese Sequenz ermöglicht eine KCC2-Transportaktivität auch unter isotonischen Bedingungen (Mercado et al. 2006).

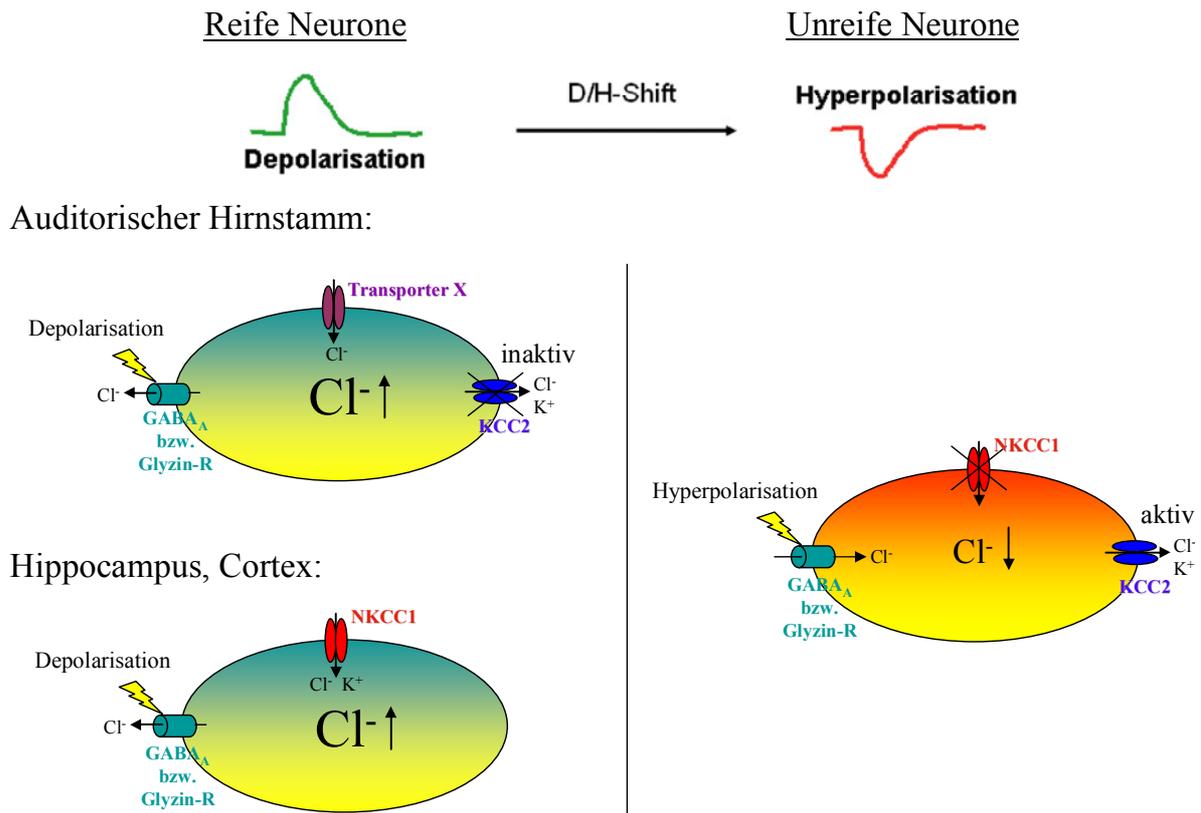
Alternatives Spleißen ist ein weit verbreitetes Phänomen, welches die Biodiversität erhöht. Im Falle von KCC2 sind zwei Spleißvarianten bekannt: KCC2a und KCC2b. Die 2007 von Uvarov et al. beschriebene Isoform KCC2a weist im N-Terminus 40 AS auf, welche in der b-Isoform (Payne et al. 1996) nicht vorliegen. Die KCC2a-Isoform zeigt während der Postnatalentwicklung eine gleich bleibende Abundanz. Im adulten Gehirn trägt die mRNA-Menge von KCC2a 5-10% zur gesamten KCC2-mRNA bei (Uvarov et al. 2007). KCC2 ist das einzige Mitglied der CCC-Familie, das ausschließlich neuronal exprimiert wird. Dabei wird KCC2 im Verlauf der ersten 3 bis 4 postnatalen Wochen im Gehirn hochreguliert (Lu et al. 1999; Stein et al. 2004). Die entwicklungsabhängige Hochregulation trifft allerdings nicht für alle Bereiche des postnatalen Gehirns zu. Im Hirnstamm konnte zwischen P (Postnataltag) 1 und P16 keine entwicklungsabhängige Hochregulation auf mRNA- oder Proteinebene detektiert werden (Balakrishnan et al. 2003; Blaesse et al. 2006). Im Hippocampus hingegen wird KCC2 entwicklungsabhängig hochreguliert (mRNA - Rivera et al. 1999; Protein - Lu et al. 1999). Auf mRNA-Ebene ist die entwicklungsabhängige Hochregulation um P15 abgeschlossen (Rivera et al. 1999). Dabei scheint das räumlich-zeitliche Verteilungsmuster mit der funktionellen Reifung der einzelnen Hippocampusbereiche einherzugehen. Die funktionelle Reifung beinhaltet dabei u.a. die Synapsenbildung zwischen hippocampalen Dendriten und Axonen, welche aus anderen Bereichen in den Hippocampus projizieren. Im Bezug auf den Gyrus dentatus wurde beispielsweise gezeigt, dass der Eingang aus entorhinalen Afferenzen im dorsalen (suprapyramidalen) Blatt (der CA1-Region zugewandter Bereich) des Gyrus dentatus' früher als im ventralen (infrapyramidalen) Blatt angelegt wird (Tamamaki 1999). Dementsprechend weist das dorsale Blatt des Gyrus dentatus' früher als das ventrale eine KCC2-mRNA-Abundanz auf (Rivera et al. 1999). Immunhistochemische Analysen bekräftigten diese Befunde (Gulyás et al. 2001). Mittels einer Immunogoldfärbung konnte KCC2 bereits um P2 in

den Plasmamembranen der distalen Dendriten hippocampaler Pyramidalzellen detektiert werden. Im Gegensatz zum adulten Stadium ist KCC2 in frühen Postnatalstadien darüber hinaus in dendritisch lokalisierten Transportvesikeln detektierbar (Gulyás et al. 2001). Im adulten Stadium weist KCC2 eine starke plasmamembranständige Lokalisation auf. Dabei liegt KCC2 stärker in den Plasmamembranen der Dendriten als in denen der Somata vor (Gulyás et al. 2001; Báldi et al. 2010). Auch in dendritischen Dornen ist KCC2 während der Entwicklung und im adulten Stadium detektierbar (Gulyás et al. 2001; Báldi et al. 2010; Gauvain et al. 2011).

In den Purkinjezellen des Cerebellums ist KCC2 bereits im Embryonalstadium (~ E15) abundant (Stein et al. 2004; Takayama and Inoue 2007). Die KCC2-mRNA wird in diesen Zellen bis P21 hochreguliert (Mikawa et al. 2002). Die in der Molekularschicht lokalisierten Stern- und Korbzellen exprimieren KCC2 erst nach abgeschlossener Migration (Mikawa et al. 2002; Simat et al. 2007). Ebenso verhält es sich mit der KCC2-Expression in den neuronalen Zellen der inneren granulären Schicht (inner granular layer - IGL). Die äußere granuläre Schicht (external germinal layer - EGL), in welcher die granulären Zellen gebildet werden, weist demgegenüber während der gesamten postnatalen Entwicklung keine KCC2-IR auf (Takayama and Inoue 2006). Im adulten Stadium ist die EGL nicht mehr vorhanden (Altman 1982). In den neuronalen Somata der Zellen in der Granulär- und der Molekularschicht eine deutliche plasmamembranständige Abundanz zu verzeichnen (Williams et al. 1999). Dabei herrscht bezüglich der Abundanz in den Purkinjezellsomata eine gewisse Uneinigkeit. Während die Gruppe um Delpire anführte, dass das Signal an den Plasmamembranen der Purkinjezellen auch aus der IR der umgebenden Dendriten der Korbzellen resultieren könnte (Lu et al. 1999), postulierten Williams et al. im gleichen Jahr eine plasmamembranständige Abundanz von KCC2 an den Somata dieser Zellpopulation. Neuere Daten deuten jedoch an, dass KCC2 im Verlauf der Entwicklung von den Purkinjezellsomata in die Dendriten umverteilt wird. Dadurch liegt an den Plasmamembranen der Purkinjezellsomata in frühen postnatalen Stadien ein kräftigeres Signal vor als in adulten Tieren (Arata et al. 2010). Die in der Molekularschicht verlaufenden Dendriten zeigen ein punktuell gefärbtes Muster, welches von Williams et al., 1999 noch über die Abundanz von KCC2 in inhibitorischen Synapsen interpretiert wurde. Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand könnte es sich bei den punktuell gefärbten Bereichen jedoch zum Teil auch um KCC2-positive dendritische Dornen handeln (Gauvain et al. 2011). Die Funktionen von KCC2 in diesen Bereichen werden in Kapitel 1.1.2 erörtert.

### 1.1.1 Die Rolle von KCC2 in der Entwicklung der inhibitorischen Neurotransmission

Schnelle inhibitorische Neurotransmission wird von den Neurotransmittern GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) und Glyzin vermittelt. Diese Transmitter binden an ligandengesteuerte ionotrope Rezeptoren (GABA<sub>A</sub>- und Glyzinrezeptoren) und induzieren dadurch einen Chloridfluss, dessen Richtung vom elektrochemischen Gradienten abhängig ist. Dieser ist in adulten Tieren nach innen gerichtet. Infolgedessen führt im adulten Stadium die Bindung von Glyzin oder GABA zu einer Hyperpolarisation (Kaila 1994). In embryonalen oder frühen postnatalen Stadien hingegen liegt intrazellulär eine höhere Chloridkonzentration vor, wodurch der elektrochemische Gradient für Chlorid nach außen gerichtet ist. Dies führt dazu, dass bei Öffnen der GABA<sub>A</sub>- oder Glyzinrezeptoren Chlorid aus der Zelle herausströmt und sie somit depolarisiert (Obata et al. 1978; Ben-Ari et al. 1989; Cherubini et al. 1991). In jungen Neuronen induziert die Depolarisation das Öffnen spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle. Durch diese strömt Ca<sup>2+</sup> in die Zelle und setzt verschiedene für Reifungsprozesse essentielle Signalkaskaden in Gang (Ganguly et al. 2001). Dieses Phänomen der Veränderung der Wirkung der inhibitorischen Neurotransmitter während der Entwicklung wurde unter der Begrifflichkeit D/H-Wechsel bekannt. Bereits nach den ersten funktionellen Analysen von KCC2 vermuteten Payne (1997), dass dieser Transporter für die Veränderungen in der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, welche den Richtungswechsel des elektrochemischen Gradienten induzieren, verantwortlich sein könnte. Die Gruppe um Rivera konnte erstmalig zeigen, dass die entwicklungsabhängige Hochregulation von KCC2 in den Pyramidalzellen des Rattenhippocampus mit einer Veränderung des Umkehrpotentials von Cl<sup>-</sup> einhergeht (Rivera et al. 1999). Unter Verwendung von Antisense-Oligodesoxynukleotiden regulierten sie KCC2 herunter. Elektrophysiologische Messungen belegten, dass in derart behandelten Zellen der D/H-Wechsel ausblieb. Ähnlich Ergebnisse konnten auch unter Verwendung von KCC2<sup>-/-</sup>-Mäusen erzielt werden (Hübner et al. 2001a). Dieses Modell erwies sich jedoch für die Untersuchung in Postnatalstadien als kritisch, da die Tiere innerhalb von 15 Minuten nach Geburt auf Grund motorischer Defizite, welche schließlich zum Atemstillstand führen, sterben (Hübner et al. 2001a). Die Gruppe um Delpire beschrieb 2002 ein von ihnen generiertes KCC2-knockdown-Mausmodell (Woo et al. 2002), in welchem die KCC2b-Isoform deletiert wurde (Blaesse et al. 2009). Durch die Expression der KCC2a-Isoform überleben diese Tiere bis zu 2 Postnatalwochen. Untersuchungen in diesem KCC2-knockdown-Modell zeigten ein Ausbleiben des D/H-Wechsels im Hippocampus (Woo et al. 2002), sowie auch in kortikalen Neuronen (Zhu et al. 2005). Die



**Abb.1. 2: Modell des D/H-Wechsels in neuronalen Zellen.**

In jungen Neuronen liegt entweder kein plasmamembranständiger  $K^+Cl^-$ -Kotransporter 2 (KCC2) vor (z.B. im unreifen Hippocampus oder Cortex) oder er ist noch transportinaktiv (Hirnstamm, primäre dissoziierte Hippocampuskulturen). Stattdessen liegen in jungen Neuronen aktive  $Cl^-$ -Einwärtstransporter vor (NKCC1 in Hippocampus und Cortex; ein bislang nicht bekannter  $Cl^-$ -Transporter im auditorischen Hirnstamm). Dadurch liegt intrazellulär eine relativ hohe Chloridkonzentration ( $[Cl^-]_i$ ) vor. Die Bindung von GABA bzw. Glyzin öffnet ligandengesteuerte GABA- bzw. Glyzin-Rezeptoren. Aufgrund des nach außen gerichteten elektrochemischen Gradienten kommt es zu einem Efflux von Chlorid und die Zelle depolarisiert. In reifen Neuronen ist KCC2 in der Plasmamembran abundant und transportaktiv. Die Aktivität der  $Cl^-$ -Einwärtstransporter (NKCC1 und Transporter X) hingegen ist offenbar abgesenkt (durch verringerte Expression oder Inhibition). Daher liegt eine verringerte  $[Cl^-]_i$  vor. Nach Binden von GABA bzw. Glyzin an seinen Rezeptor kommt es aufgrund des nach innen gerichteten elektrochemischen Gradienten von  $Cl^-$  zu einem  $Cl^-$ -Einstrom und die Zelle hyperpolarisiert. Auf Grund der nicht eindeutigen Datenlage bezüglich der entwicklungsabhängigen Expression von NKCC1 wurde dieser Transporter als in reifen Neuronen abundant und transportinaktiv dargestellt. Der  $Cl^-$ -Einwärtstransporter in unreifen Hirnstammneuronen wurde bislang nicht beschrieben. Aus diesem Grund wurde er in den reifen Neuronen (auch aus Übersichtlichkeitsgründen) weggelassen).

wichtige Rolle von KCC2 für den D/H-Wechsel wurde auch durch pharmakologische Untersuchungen untermauert. So konnte über die pharmakologische Blockade von KCC2 durch das Schleifendiuretikum Furosemid im Hippocampus (Woo et al. 2002) und im Cortex (DeFazio et al. 2000) gezeigt werden, dass die Absenkung der  $[Cl^-]_i$  von KCC2 vermittelt wird. Die Überexpression von KCC2 in jungen dissoziierten hippocampalen und kortikalen Neuronen induzierte eine vorzeitige Veränderung der GABA-Wirkung von de- zu hyperpolarisierend (Fiumelli et al. 2005; Chudotvorova et al. 2005; Lee et al. 2005; Succol et al. 2012). Zusammen-

mengenommen zeigen diese Befunde, dass KCC2 tatsächlich eine bedeutende Rolle im entwicklungsabhängigen D/H-Wechsel spielt. Dennoch trägt KCC2 die Veränderungen in der  $[Cl^-]_i$ -Konzentration nicht alleine (vgl. Abb. 1.2). In jungen Neuronen liegt eine intrazelluläre  $Cl^-$ -Konzentration vor, welche nicht mit einer rein passiven Verteilung vereinbar ist (Ludwig et al. 2003; Gonzalez-Islas et al. 2009). Untersuchungen an unreifen kortikalen (Yamada et al. 2004) und hippocampalen Neuronen (Dzhala et al. 2005; Sipilä et al. 2006, Pfeffer et al. 2009) zeigten, dass in diesen Bereichen der  $Cl^-$ -Einwärtstransport von dem  $Na^+K^+Cl^-$ -Kotransporter 1 (NKCC1) getragen wird. In den unreifen Neuronen des auditorischen Hirnstammes hingegen konnte keine NKCC1-mRNA detektiert werden (Balakrishnan et al. 2003). Daher wurde dieses Protein als aktiver  $Cl^-$ -Einwärtstransporter ausgeschlossen. In Abbildung 1.2 ist daher der Einwärtstransporter in den unreifen Neuronen des auditorischen Hirnstammes als ‚Transporter X‘ gekennzeichnet. Die Datenlage bezüglich der entwicklungsabhängigen Regulation von NKCC1 ist strittig. Die Befunde zur entwicklungsabhängigen Expression von NKCC1 reichen von einer Herunterregulation des Proteins im Gehirn (Clayton et al. 1998; Hübner et al. 2001a) und einer Umverteilung in Gliazellen (Hübner et al. 2001a) bis zur Hochregulation auf mRNA-Ebene (Wang et al. 2002; Mikawa et al. 2002). Des Weiteren wurden verschiedene reziproke Regulationsmechanismen für die Transportaktivitäten von NKCC1 und KCC2 beschrieben (durch Mikrodomänen - Hartmann et al. 2009; durch Kinasen - Gagnon et al. 2006; de Los Heros et al. 2006; Arion and Lewis 2011; Rinehart et al. 2011; vgl. auch Kapitel 1.1.3).

### 1.1.2 Die Funktion von KCC2 in dendritischen Dornen

Dendritische Dornen sind kleine Ausstülpungen an dendritischen Ausläufern. Sie empfangen typischerweise exzitatorische Eingänge von Axonen anderer Neurone. Umso überraschender war der Befund, dass KCC2, der wichtig für die inhibitorische Neurotransmission ist, in dendritischen Dornen lokalisiert ist. Untersuchungen an hippocampalen Neuronen ergaben, dass KCC2 als morphogener Faktor an der Entwicklung dendritischer Dornen beteiligt ist (Li et al. 2007). Ein Vergleich zwischen dissoziierten kortikalen Neuronen aus  $KCC2^{+/+}$ - und  $KCC2^{-/-}$ -Mäusen zeigte, dass die Neurone aus den Knockout-Tieren im Gegensatz zu den Wildtyp-Neuronen lange, filopodienartige Ausläufer an ihren Dendriten aufwiesen. Die Überexpression einer transport-inaktiven KCC2-Mutante in den  $KCC2^{-/-}$ -Kulturen führte zur Bildung morphologisch unauffälliger reifer Dornen (Li et al. 2007). Diese Befunde zeigten, dass KCC2 unabhängig von seiner Transportaktivität an der Ausbildung dendritischer Dornen beteiligt ist. Die morphogene Funktion beruht dabei wahrscheinlich auf einer Interaktion von

KCC2 mit dem Zytoskelett der dendritischen Dornen. Diese wird indirekt über die FERM-Domäne (F - Protein 4.1, E - Ezrin, R - Radixin, M - Moesin) (Ward et al. 2001) des Strukturproteins 4.1N vermittelt (Li et al. 2007). 4.1N interagiert direkt mit dem Aktin-Zytoskelett und ist an der Stabilisierung des Spektrin/Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Walensky et al. 1999; Shen et al. 2000). Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass KCC2 durch seine morphogene Funktion in dendritischen Dornen die exzitatorische Transmission stimuliert. Unter Berücksichtigung der Rolle von KCC2 bezüglich des D/H-Wechsels lässt sich schlussfolgern, dass durch die entwicklungsabhängige Hochregulation dieses Transporters die exzitatorischen und inhibitorischen Eingänge in ihrer entwicklungsabhängigen Aktivität synchronisiert werden.

Kürzlich wurde eine Rolle für KCC2 in reifen dendritischen Dornen beschrieben. Dabei induzierte das Ausschalten von KCC2 durch eine shRNA in reifen dendritischen Dornen eine Reduktion in der Amplitude der mEPSCs (miniature excitatory postsynaptic current) in den dort lokalisierten Synapsen (Gauvain et al. 2011). Dieser Effekt ging mit einer Veränderung der Verteilung der GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors einher. Die Überexpression des C-Terminus (CTD - c-terminal domain) von KCC2 übte zum Knock-down vergleichbare Effekte aus. Unter pharmakologischer Blockade der KCC2-Transportaktivität hingegen konnten keine derartigen Auswirkungen detektiert werden. Die Befunde deuteten insgesamt darauf hin, dass die Reduktion der mEPSCs auf eine verstärkte laterale Diffusion des in Dornen lokalisierten AMPA-Rezeptors zurückzuführen ist. Diese wird offenbar durch die Interaktion des Aktin-Zytoskeletts mit KCC2, 4.1N und dem GluR1 reguliert. Die Überexpression der CTD führte zur Konkurrenz zwischen der CTD und endogenem KCC2 in der 4.1N-Bindung. Dadurch wurde die Interaktion zwischen dem endogenen KCC2 und dem Aktinzytoskelett unterbunden. Insgesamt deuteten die Daten darauf hin, dass KCC2 in reifen dendritischen Dornen offenbar durch Verankerung mit dem Zytoskelett über das Protein 4.1N die laterale Proteindiffusion in der Plasmamembran einschränkt. Dadurch wird ein Verteilungsmuster stabilisiert, welches für die exzitatorische postsynaptische Aktivität in dendritischen Dornen essentiell ist (Gauvain et al. 2011).

### **1.1.3 Regulationsmechanismen der Transportaktivität von KCC2**

Die Regulationsmechanismen der KCC2-Transportaktivität sind vielfältig und erstrecken sich von der Transkription bis hin zu posttranslationalen Modifikationen, welche sowohl die Kinetik und die Oberflächenexpression als auch den Abbau beeinflussen.

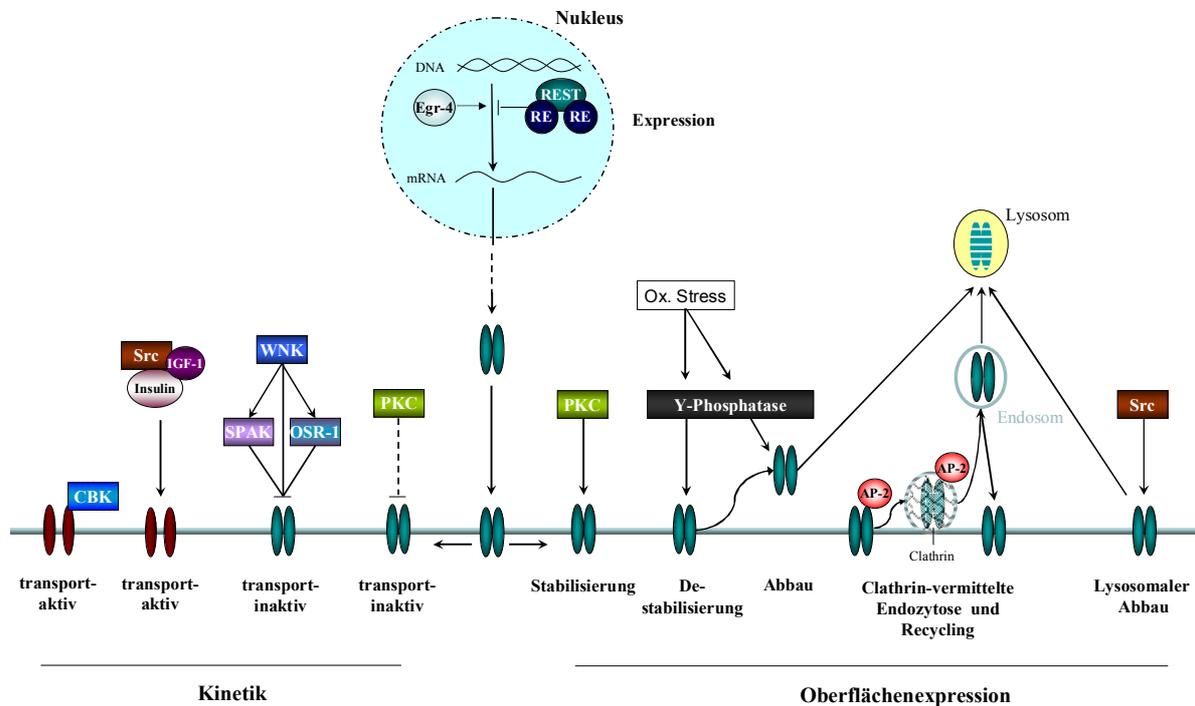
Zu den zellulären Regulationsmechanismen gehört die entwicklungsabhängige Expression. Diese wird durch Bindung von Transkriptionsfaktoren eingeleitet. Uvarov und Kollegen konnten 2006 eine Reihe putativer Transkriptionsfaktoren für KCC2 identifizieren. Zu diesen zählt auch Egr4 (early growth response 4). Da die mRNA-Menge von Egr4 sowohl in Ratten als auch in Mäusen während der ersten Postnatalwochen hochreguliert wird (Crosby et al. 1992; Uvarov et al. 2006) stellt dieses Protein einen geeigneten Kandidaten für die entwicklungsabhängige Regulation von KCC2 dar. Dennoch scheint die entwicklungsabhängige KCC2-Expression nicht durch Egr4 allein bewerkstelligt zu werden, da der Knock-down dieses Proteins in primären Kulturen die KCC2-Expression nicht vollständig unterbinden konnte. Eine andere Gruppe postulierte einen REST-RE-1-Komplex als möglichen Kandidaten für die Regulation der KCC2b-Expression. Dabei bindet REST an zwei RE-1-Elemente, welche an verschiedenen Seiten der Startsequenz für die Transkription von KCC2 lokalisiert sind. Durch die Bindung von REST an beide RE-1-Elemente wird die Transkription von KCC2 inhibiert. Darüber hinaus konnte in diesem Zusammenhang auch ein Rückgang des Chloridtransports über die Membran detektiert werden (Yeo et al. 2009).

Ein weiteres, bereits recht gut untersuchtes Feld der KCC2-Regulation ist die Phosphorylierung. Die Regulation der Transportaktivität durch Veränderung des Phosphorylierungsstatus' ermöglicht schnelle Modulationen auf Proteinebene. In verschiedenen Zellsystemen konnten bereits eine Reihe von Kinasen und Phosphatasen bezüglich ihres Einflusses auf die KCC2-Transportaktivität beschrieben werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Transportkinetiken von NKCC1 und KCC2 in heterologen Expressionssystemen reziprok durch Serin/Threonin-Phosphorylierungen reguliert werden. Diese führen im Allgemeinen zur Aktivierung von NKCC1 und Inhibition von KCC2. Die reziproke Wirkung einer Kinase auf KCC2 und NKCC1 ermöglicht die schnelle und effektive Regulation des Chloridhaushaltes einer Zelle. Die Phosphorylierungen werden unter anderem durch die Aktivitäten der Mitglieder der WNK (with no lysine [K]) -Familie von Serin/Threonin-Kinasen (WNK1-4) vermittelt (Rinehart et al. 2009). Während die WNK3 die CCCs direkt in ihrer Funktion moduliert (de Los Heros et al. 2006) agieren WNK1 und 4 über die Aktivierung der Ste20 Serin/Threonin-Kinasen SPAK (Ste20-related proline alanine rich kinase) und OSR-1 (oxidative stress-responsive kinase 1) (Gamba 2005; Kahle et al. 2006; Rinehart et al. 2011). Für die gehirnspezifische WNK2 wurde kürzlich ebenfalls eine Funktion in der Aktivierung von NKCC1 und Inhibition von KCC2 gezeigt. Allerdings ist dabei bislang unklar, ob diese Kinase direkt oder ebenfalls über die Aktivierung einer Ste20-Kinase agiert (Rinehart et al. 2011). Weiterhin konnte die gehirnspezifische Creatinkinase B (CKB) als Interaktionspartner von KCC2

identifiziert werden (Inoue et al. 2004). Die Interaktion zwischen KCC2 und der CKB führte in HEK293-Zellen zur Aktivierung des Transporters (Inoue et al. 2006). Ein weiterer Mechanismus der KCC2-Aktivierung wurde in unreifen hippocampalen Primärkulturen beschrieben. Dort liegt endogen exprimierter KCC2 zunächst in einem transport-inaktiven Zustand vor und wird im Verlauf der Reifung aktiviert (Kelsch et al. 2001; Khirug et al. 2005; Titz et al. 2003). Kelsch et al. (2001) konnten die Aktivierung in diesem System durch Zugabe von Insulin und dem Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) beschleunigen. Durch zusätzliche Applikation der Tyrosinkinase c-Src (cellular Sarcoma) konnte dieser Effekt gesteigert werden (Kelsch et al. 2001; Watanabe et al. 2009). In reifen Kulturen hingegen vermittelt die Aktivität der Src-Kinase eine Tyrosinphosphorylierung im C-Terminus von KCC2. Diese Phosphorylierung induziert eine Verringerung der Oberflächenexpression durch einen vermehrten lysosomalen Abbau von KCC2 (Lee et al. 2010). Am besten aufgeklärt ist bislang die Rolle der Proteinkinase C (PKC) für die Aktivität von KCC2. Untersuchungen in HEK293-Zellen und primären hippocampalen Neuronen ergaben, dass PKC KCC2 an einem Serin an der Aminosäureposition 940 phosphoryliert. Dies trägt zur Stabilisierung des Transporters an der Plasmamembran bei (Lee et al. 2007). Interessanterweise wird darüber hinaus ein inhibierender Effekt von PKC auf die KCC2-Transportkinetik vermutet (Fiumelli et al. 2005). Allerdings ist bislang nicht bekannt, ob PKC KCC2 direkt oder über Modulation der Aktivität anderer Kinasen inhibiert (Fiumelli et al. 2005). Eine andere Gruppe konnte einen Einfluss von oxidativem Stress auf die Oberflächenexpression von KCC2 zeigen. Dabei führt die Applikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in hippocampalen Primärkulturen insgesamt zu einer Abnahme der Tyrosinphosphorylierung. Dies induziert zunächst eine Verringerung der Oberflächenexpression. Lang andauernder ( $\geq 3$  h) oxidativer Stress führt schließlich zu einer Reduktion von KCC2 auf Proteinebene (Wake et al. 2007).

In akuten hippocampalen Schnitten weist KCC2 eine geringe Verweildauer an der Plasmamembran auf (Rivera et al. 2004). Durch immunhistochemische Analysen in adulten Maushirnschnitten konnte eine Kollokalisierung zwischen KCC2 und dem Clathrin-bindenden Adapterprotein-2 (AP-2) – Komplex nachgewiesen werden (Zhao et al. 2008). In HEK293-Zellen wurde gezeigt, dass KCC2 clathrinabhängig endozytiert wird. Die AP-2-Bindestelle an KCC2 wurde dabei auf ein Di-Leucin-Endozytosemotiv (<sub>657</sub>LLXXEE<sub>662</sub>) im C-Terminus von KCC2 eingegrenzt. Das endozytierte KCC2 wird der Recycling-Maschinerie zugeführt, von wo aus es wieder zur Plasmamembran transportiert werden kann (Zhao et al. 2008). Die konstitutive Endozytose in Verbindung mit dem Recycling vermittelt eine weitere Möglichkeit, die Transportaktivität von KCC2 zu regulieren. Dabei sind die Proteine, welche an der Regulation der

Endozytose und des Recyclings beteiligt sind, trotz ihrer funktionellen Bedeutung noch unbekannt.



**Abb.1. 3: Übersicht über die verschiedenen KCC2-Regulationsmechanismen**

Die Regulation der Expression von KCC2 wird über Egr-4 hochreguliert. Die Bindung des REST-RE-Komplexes hingegen führt zur Suppression der Transkription. Posttranslational existieren mindestens zwei Möglichkeiten der Regulation. Die eine beeinflusst die Transportkinetik und die andere die Oberflächenexpression. Die Regulationsmöglichkeiten der Transportkinetik sind auf der linken Seite dargestellt. Sie erfolgen zum einen über die Aktivität von PKC. Die gestrichelte Linie deutet an, dass dabei noch nicht bekannt ist, ob die Inhibition der KCC2-Transportaktivität direkt durch PKC vermittelt wird oder ob andere Effektoren zwischengeschaltet sind. Weitere Regulatoren der Transportkinetik von KCC2 sind die WNK-Kinasen, welche direkt oder über SPAK bzw. OSR-1 die Transportaktivität von KCC2 inhibieren. Zum anderen können Insulin und IGF-1 KCC2 aktivieren; diese Aktivierung kann unter Einfluss der Src-Kinase beschleunigt werden. Zusätzlich kann KCC2 durch Interaktion mit der gehirn-spezifischen Creatinkinase aktiviert werden. Die Regulationsmechanismen der Oberflächenexpression sind auf der rechten Seite zusammengefasst. Da die Transportaktivität von KCC2 nicht nur von seiner Lokalisation abhängt, sind die Transporter in einem inaktiven Zustand dargestellt. Die Phosphorylierung von KCC2 durch PKC führt zur Stabilisierung von KCC2 an der Plasmamembran. Demgegenüber führt oxidativer Stress über die Aktivierung einer Tyrosinphosphatase zur Dephosphorylierung von KCC2. Dadurch wird die Lokalisation von KCC2 an der Oberfläche destabilisiert. Eine verlängerte KCC2-Behandlung führt über eine verstärkte Tyrosindephosphorylierung schließlich zum Abbau von KCC2. Die Clathrin-vermittelte Endozytose führt zunächst zur Lokalisation von KCC2 in einem Speicherkompartiment. Aus diesem kann es entweder recycelt oder dem Abbau zugeführt werden. Die Phosphorylierung durch die Src-Kinase induziert in reifen hippocampalen Neuronen unweigerlich den lysosomalen Abbau von KCC2.

## 1.2 *βPIX* – ein putativer Interaktionspartner von KCC2

Das Hefe-2-Hybridsystem (Y2H – yeast-2-hybrid) ist eine gängige Methode für groß angelegte Screenings auf Interaktionen. So konnten im Bezug auf KCC2 durch das Y2H-System be-

reits die Interaktionen mit den Kinasen SPAK und CKB gefunden werden (Piechotta et al. 2002; Inoue et al. 2004). Als ein weiterer putativer Interaktionspartner von KCC2 wurde ebenfalls im Y2H-System  $\beta$ PIX identifiziert (Guillemin 2006). Weiterführende Untersuchungen im Y2H ergaben, dass KCC2 durch zwei C-terminale Bereiche mit  $\beta$ PIX interagiert. Dabei umfasst der vordere Bereich ein 4 Aminosäuren langes Motiv ( ${}_{673}\text{QLLV}_{676}$ ), wohingegen der hintere Bereich nach dem aktuellen Erkenntnisstand deutlich länger ist und zwischen den Aminosäuren 1073 und 1108 liegt (Guillemin 2006). Beide Bereiche erwiesen sich im Y2H-System als für die Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX notwendig. Quantitative Analysen im Y2H zeigten, dass Einzelmutationen im QLLV-Motiv, in denen die jeweiligen Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurden, die Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX um 75-80 % reduzierten (Tabelle 1.1; Zapatka 2008). Die Daten aus dem Y2H-System deuten darauf hin, dass jede der vier Aminosäuren des Bindemotivs für die Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX essentiell ist.

**Tabelle 1.1: Einfluss von Einzelmutationen im C-Terminus von KCC2 auf die Interaktion mit  $\beta$ PIX.**

	Mittelwert der $\beta$ Gal-Aktivität [%]	Standardabweichung	Signifikanz
pLexA-g leer	4,8	0,8	
KCC2wt	100	0	
KCC2Q673A	24	10,4	*
KCC2L674A	24	3,8	***
KCC2L675A	21	3,5	***
KCC2V676A	26	5,6	**

Die Interaktionsstudien wurden im Y2H-System durchgeführt. Angezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, sowie die Standardabweichungen und Signifikanzen ( $p \leq 0,05$ , \*;  $p \leq 0,01$ , \*\*;  $p \leq 0,001$ , \*\*\*). Die ermittelten Werte wurden auf die  $\beta$ -Gal-Aktivität aus der Cotransformation des unmutierten C-Terminus von KCC2 (KCC2wt) mit  $\beta$ PIX (100 %) normiert. Der leere pLexA-g-Vektor diente als Negativkontrolle. Die Daten entstammen der Diplomarbeit von M. Zapatka (2008).

### 1.2.1 Funktionen von $\beta$ PIX in der neuronalen Entwicklung

$\beta$ PIX wurde erstmals im Jahre 1996 von der Gruppe um Edward Manser als Interaktionspartner von PAK (p21-activated kinase) beschrieben.  $\beta$ PIX reguliert PAK dabei indirekt über die Aktivierung kleiner GTPasen (Manser et al. 1998; Loo et al. 2004; Hoefen and Berk 2006). In seiner Funktion als GEF (guanine nucleotide exchange factor)-Protein vermittelt  $\beta$ PIX die Aktivierung der GTPasen durch den Austausch von GDP gegen GTP. Dadurch kommt es zur lokalen Anhäufung von PAK in diesen Bereichen, welche eine Autophosphorylierung dieser Kinase induziert (Hoefen and Berk 2006). Durch die Aktivierung von PAK kann eine Viel-

zahl von Signalprozessen in Gang gesetzt werden. Diese gehen oftmals mit Veränderungen des Zytoskeletts einher (Szczepanowska 2009). PAK aktiviert u.a. die LIM-Kinase, welche durch Inhibition von Cofilin das Aktinzytoskelett stabilisiert (Pollard et al. 2000). Dendritische Dornen sind zytoskelettreiche Strukturen.  $\beta$ PIX wird gemeinsam mit PAK und GIT1 (G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactor) eine Rolle in der Dornenmorphogenese zugeschrieben (Menon et al. 2010). Zusammen mit der kleinen GTPase Rac1 reguliert der PIX/GIT/PAK-Komplex Anzahl und Morphologie dendritischer Dornen (Zhang et al. 2003; Calabrese et al. 2006). Gemeinsam mit der CAMKK (Calmodulin-abhängige Kinase Kinase) und CAMKI reguliert dieser Komplex darüber hinaus die NMDA-Rezeptor-vermittelte Synaptogenese (Saneyoshi et al. 2008). Des Weiteren wirkt  $\beta$ PIX in dendritischen Dornen als Gerüstprotein, indem es über die Interaktion mit Shank PAK an postsynaptischen Dichten (PSD) rekrutiert (Park et al. 2003).

Eine weitere Funktion von  $\beta$ PIX in der neuronalen Morphogenese ist das Neuritenwachstum (Za et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einer  $\beta$ PIX-Mutante ohne GEF-Aktivität zur Rückbildung bereits entwickelter Neuriten führte (Shin et al. 2004). Viele der bereits genannten Funktionen von  $\beta$ PIX laufen durch die Bildung fokaler Komplexe ab. Fokale Komplexe sind Strukturen, welche eine Vielzahl von Proteinen enthalten. Sie verbinden über transmembrane Rezeptoren (Integrine) die extrazelluläre Matrix einer Zelle mit dem Aktinzytoskelett (Rosenberger and Kutsche 2006). Fokale Komplexe sind hochdynamische Strukturen. Ihre Assemblierung und Disassemblierung wird über verschiedene Proteine reguliert. So fördert die Dimerisierung von  $\beta$ PIX seine Lokalisation an fokalen Kontakten (Kim et al. 2001; Koh et al. 2001). Die Bindung von GIT1 an  $\beta$ PIX induziert die transiente Lokalisation von PAK an Fokalkontakten (Premont et al. 2004). Die Phosphorylierung von  $\beta$ PIX hingegen führt zu einer Ablösung von GIT1, welches den Fokalkomplex über Paxillinbindung an der Plasmamembran lokalisiert. Dies führt schließlich zur Disassemblierung des Fokalkomplexes (Zhao et al. 2000; Feng et al. 2010).

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass  $\beta$ PIX gemeinsam mit PAK und GIT wichtige Funktionen in der neuronalen Entwicklung übernehmen. Daher ist es nicht überraschend, dass  $\beta$ PIX im Verlauf der Entwicklung im Gesamtgehirn herunterreguliert wird (Park et al. 2003). In primären neuronalen Kulturen sowie auch im Gewebe ist  $\beta$ PIX in den dendritischen Bereichen lokalisiert. Dabei liegt es sowohl in prä- als auch in postsynaptischen Bereichen vor. Des Weiteren ist eine starke  $\beta$ PIX-Abundanz im Bereich der Somata neuronaler Zellen gezeigt worden (Park et al. 2003). Eine mögliche Bedeutung für diese subzelluläre Lokalisation wird im folgenden Punkt erörtert.

### 1.2.2 Die Rolle von $\beta$ PIX im Trafficking

Die Neuritogenese und das Trafficking transmembraner Proteine gehen oftmals Hand in Hand. So konnten Za et al. 2006 einen Zusammenhang zwischen dem Recycling des Transferrinrezeptors (TfR) und dem Neuritenwachstum in retinalen Neuronen herstellen.  $\beta$ PIX ist an einer Vielzahl vesikulärer Transportprozesse beteiligt. So reguliert es beispielsweise die Endozytose des EGF- (epidermal growth factor) Rezeptors (Feng et al. 2006). Der EGF-Rezeptor wird durch Ubiquitin-Ligase Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) zum Abbau gekennzeichnet. Am Tyrosin 442 phosphoryliertes  $\beta$ PIX komplexiert Cbl und den EGFR und inhibiert auf diese Weise die Endozytose und den Abbau des EGFRs (Schmidt et al. 2006; Feng et al. 2006).

Die Trafficking-Funktion von  $\beta$ PIX steht oftmals im Zusammenhang mit GIT1. Dieses Protein interagiert direkt mit  $\beta$ PIX, indem es an dessen GB (GIT1 binding)-Domäne (AS 460-555) bindet (Koh et al. 2001). Darüber hinaus ist GIT1 in Besitz einer N-terminal lokalisierten Arf-GAP-Domäne, über welche es die Aktivität von Arf6, einem GTP-bindenden Protein, das am Membrantransport zwischen Endosomen und Zelloberfläche beteiligt ist, reguliert (Za et al. 2006). Gemeinsam mit GIT1 reguliert  $\beta$ PIX das Recycling des Thyrotropin-Rezeptors (Lahuna et al. 2005) und inhibiert nach Überexpression die Endozytose des Transferrin-Rezeptors (Za et al. 2006).

Diese Daten belegen die Beteiligung von  $\beta$ PIX an verschiedenen Endozytose- und Recyclingprozessen. Die Funktion von  $\beta$ PIX ist dabei sehr variabel und reicht von einer Beteiligung am Trafficking bis zur Regulation der Internalisierung und dem Abbau von Transmembranproteinen.

### **1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand zunächst darin, die Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX näher zu charakterisieren. Der Arbeitsplan lässt sich in drei Teile untergliedern:

#### **1.3.1 Immunhistochemische Analyse**

KCC2 und  $\beta$ PIX sind bezüglich ihrer subzellulären Verteilung in adulten Neuronen beschrieben. Beide Proteine sind im Somata und Dendriten neuronaler Zellen vorhanden. Dabei ist KCC2 in erster Linie plasmamembranständig lokalisiert (Gulyás et al. 2001; Báldi et al. 2010), wohingegen  $\beta$ PIX vornehmlich in den intrazellulären Bereichen vorliegt (Park et al. 2003). Beide Proteine sind auf Grund ihrer Funktionen in der Dornenmorphogenese in diesen Bereichen exzitatorischen Inputs angesiedelt (Gulyás et al. 2001; Li et al. 2007; Gauvain et al. 2011; Park et al. 2003). Durch Doppelfärbungen in Hirnschnitten von C57Bl6-Mäusen sollte die Möglichkeit einer Interaktion *in vivo* untersucht werden. Der Fokus lag dabei auf den hippocampalen und cerebellaren Bereichen. Der subzelluläre Bereich der Kolo-kalisation sollte erste Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der Interaktion geben.

#### **1.3.2 Untersuchung des Effekts von $\beta$ PIX auf KCC2**

Über seine Interaktion mit PAK kann  $\beta$ PIX Kinasekaskaden in Gang setzen (Hoefen and Berk 2006). Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Aktivität von KCC2 durch Kinasen reguliert wird (Blaesse et al. 2009). Dementsprechend wurde die Wirkung dieser beiden Proteine auf die Transportaktivität von KCC2 untersucht.

Darüber hinaus ist  $\beta$ PIX in endozytotische und exozytotische Mechanismen mehrerer Proteine involviert. Die untersuchten Mechanismen laufen dabei in Abhängigkeit von Clathrin ab (Baratti-Elbaz et al. 1999; Singh et al. 2004; Jiang et al. 2003; Damke et al. 1994). Auch KCC2 wird Clathrin-abhängig endozytiert (Zhao et al. 2008). Zudem liegt die Bindestelle für AP-2, ein Adapterprotein für die Clathrin-vermittelte Endocytose (CME – clathrin-mediated endocytosis) in fast unmittelbarer Nachbarschaft zum  $\beta$ PIX-Bindemotiv. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit ein Effekt von  $\beta$ PIX auf die Endozytose von KCC2 in HEK293-Zellen untersucht werden. Zum Abschluss dieses Teiles wurde der Effekt einer Unterbrechung der Interaktion durch Mutationen im KCC2-Bindemotiv für  $\beta$ PIX determiniert.

### **1.3.3 Entwicklung eines Endozytose-Modells für KCC2 in HEK293-Zellen**

In primären hippocampalen Kulturen wird KCC2 als Reaktion auf oxidativen Stress dephosphoryliert und endozytiert. Dies führt final zum Abbau des Proteins (Wake et al. 2007). Auf Grund der Vermutung, dass  $\beta$ PIX am Trafficking von KCC2 beteiligt sein könnte, sollte auf Basis der Erkenntnisse in Primärkulturen ein artifizielles System zur Erhöhung der Endozytose in HEK293-Zellen entwickelt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

<b>Blocker</b>		Carrier	
	2 % (w/v)	Kälberserumalbumin (BSA)	Roth
	10 % (v/v)	Ziegen Serum	PAA
<b>Blockierlösung (Western Blot)</b>	1 x	TBS	
	0,1 % (v/v)	Tween-20	Sigma
	5 % (w/v)	Milchpulver	Sucofin
<b>Bradford-Reagenz (5x)</b>	0,04 % (w/v)	Coomassie Brillant Blue G-250	Roth
	10 % (v/v)	Ethanol	Normapur
	34 % (v/v)	Phosphorsäure	AppliChem
<b>Carrier</b>	1 x	PBS	
	1 % (w/v)	Kälberserumalbumin (BSA)	Roth
	1 % (v/v)	Ziegen Serum	PAA
	0,3 % (v/v)	Triton-X-100	Serva
<b>Chloralhydrat</b>	7 % (w/v)	Chloralhydrat	AppliChem
<b>Inkubationspuffer</b>	100 mM	N-methyl-d-Glucamin (NMDG)-Cl	Fluka
	5 mM	HEPES	Roth
	5 mM	KCl	Roth
	2 mM	CaCl <sub>2</sub>	Fluka
	0,8 mM	MgSO <sub>4</sub>	Roth
	5 mM	Glukose	Roth
	100 µM	Ouabain	Fluka
	1 µCi/ml	<sup>86</sup> Rubidium	Perkin Elmer
		pH 7,4 mit HCl	

<b>5 x Laemmliprobenpuffer</b>	312 mM	Tris	Roth
	10 % (w/v)	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth
	50 % (w/v)	Glyzerin	Roth
	Spur	Bromphenolblau pH 6,8	Roth
<b>Lysepuffer</b>	150 mM	NaCl	Normapur
	15 mM	Tris	Roth
	1 % (w/v)	n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (DDM)	Roth
	0,4 % (w/v)	Iodactetamid (IAA)	Sigma
<b>8 % Paraformaldehyd- (PFA-) Lösung</b>	8 g	PFA	Roth
	1000 ml	H <sub>2</sub> O (VE) pH 7,4 mit NaOH	
<b>4 % Paraformaldehyd- (PFA-) Lösung</b>	1 VT	8 % PFA-Lösung	
	1 VT	0,2 M PB	
<b>0,2 M PB (Phosphate buffer)</b>	0,2 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4 mit 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth Roth
<b>PBS (Phosphate buffered saline)</b>	130 mM	NaCl	Normapur
	7 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth
	3 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
		pH 7,4	
<b>PBS-T</b>	1 x	PBS	
	0,05 % (v/v)	Triton-X-100	Serva
<b>Physiologischer PBS</b>	136,9 mM	NaCl	Normapur
	2,7 mM	KCl	Roth
	10,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth
	1,8 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
		pH 7,4	

<b>Präinkubationspuffer</b>	100 mM	NMDG	Fluka
	5 mM	HEPES	Roth
	5 mM	KCl	Roth
	2 mM	CaCl <sub>2</sub>	Fluka
	0,8 mM	MgSO <sub>4</sub>	Roth
	5 mM	Glukose	Roth
	100 µM	Ouabain	Fluka
		pH 7,4 mit HCl	
<b>SDS-Gelelektrophorese- puffer (10 x)</b>	250 mM	Tris	Roth
	1,9 M	Glyzin	Roth
	1 % (w/v)	SDS	Roth
<b>Striplösung</b>	62,5 mM	Tris-HCl	Roth
	2 % (w/v)	SDS	Roth
	100 mM	β-Mercaptoethanol	Roth
<b>30 % Sucrose in PBS</b>	1 x	PBS	
	30 % (w/v)	Sucrose	Roth
<b>Tank Blot Puffer</b>	1 x	SDS-Gelelektrophoresepuffer	
	10 % (v/v)	Methanol	Normapur
<b>TBS (5x)</b>	20 mM	Tris	Roth
	150 mM	NaCl	Normapur
		pH 7,5 mit HCl	
<b>TBS-T</b>	1 x	TBS	
	0,1 % (v/v)	Tween-20	Sigma
<b>Trägerlösung</b>	1 x	PBS	
	10 % (v/v)	Ziegen Serum	PAA
	0,2 % (v/v)	Triton-X-100	Serva



### 2.3 Agenzien

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Pharmaka auf ihre Wirkung auf KCC2 in HEK293-Zellen getestet. Diese sind einschließlich ihrer Wirkungen in Tabelle 2.2 aufgelistet.

**Tabelle 2. 22: In der vorliegenden Arbeit verwendete Pharmaka**

<b>Agenz</b>	<b>Genutzte Wirkung bzgl. der vorliegenden Arbeit</b>	<b>Herkunft</b>
Brefeldin A (BfA)	Zerstört Struktur und Funktion des Golgi-Apparates (Fujiwara et al. 1988)	Sigma
Furosemid	Schleifendiuretikum, welches u.a. den durch KCC2 vermittelten Kotransport inhibiert (Payne 1997)	Sigma
Monensin	Zerstört Struktur und Funktion des Golgi-Apparates und unterbindet den vesikulären Transport in eukaryotischen Zellen (Rosa et al. 1992, Pheng et al. 2003)	Sigma
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Erhöht die Endocytoserate von KCC2 in primären hippocampalen Kulturen (Wake et al. 2007)	Sigma

### 2.4 Versuchstiere und Zellkulturen

Für Versuche wurden Mäuse der Wildtypelinie C57/Bl6N beiderlei Geschlechts aus der Zucht des Tierhauses der Universität Oldenburg eingesetzt. Den Tieren standen Wasser und Futter *ad libitum* bei einem zwölfstündigen hell-dunkel Rhythmus zur Verfügung. Bei der Zucht sowie den Experimenten wurden die in Deutschland gültigen Bestimmungen zum Tierschutz eingehalten. Der Tag der Geburt wurde mit Postnataltag (P) 0 festgelegt.

Als heterologes Expressionssystem diente die HEK Flp-In™-293 Zelllinie (HEK293) von Invitrogen.

### 2.5 Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sowie auch ihr Verwendungszweck und die verwendeten Verdünnungen sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 2. 3; Verwendete Antikörper; IHC-Immunhistochemie, ICC-Immuncytochemie, IB-Immunoblot**

Antikörper	Herkunft	Verwendung	Verdünnung	Inkubationsdauer und -temperatur
Mouse-anti-cKCC2 clone N1/12	UCDavis/NIH <i>NeuroMab</i> Facility	IHC	1:100	19 h 4°C
		ICC	1:1000	1h RT
Rabbit-anti-cKCC2	Hergestellt von I. Guillemin, TU Kaiserslautern	IB	1:1000	2h RT + ÜN 4°C
Rabbit anti-KCC2 (Upstate)	Millipore, Schwalbach Katalog-Nr.: 07-432	ICC	1:250	1h RT
Rabbit-anti-βPIX	Millipore, Schwalbach Katalog-Nr.: 07-1450	IB	1:1000	2h RT + ÜN 4°C
		IHC	1:100	19 h 4°C
Mouse-anti-GIT clone N39B/8	UCDavis/NIH <i>NeuroMab</i> Facility	IB	1:1000	2h RT + ÜN 4°C
Rabbit-anti-FLAG	Abcam, Cambridge, UK, Katalog-Nr.: ab1162	ICC	1:500	1h RT
Mouse-anti-Myc clone 4A6	Millipore, Schwalbach Katalog-Nr.: 05-724	ICC	1:250	1h RT
Goat-anti-mouse-AlexaFluor488	Invitrogen, Darmstadt Katalog-Nr.: A11029	IHC	1:500	2h RT
		ICC	1:1000	1h RT
Goat-anti-mouse-AlexaFluor568	Invitrogen, Darmstadt Katalog-Nr.: A11031	ICC	1:1000	1h RT
Goat-anti-rabbit-AlexaFluor488	Invitrogen, Darmstadt Katalog-Nr.: A11034	ICC	1:1000	1h RT
Goat-anti-rabbit-AlexaFluor568	Invitrogen, Darmstadt Katalog-Nr.: A11036	ICC	1:1000	1h RT
Goat-anti-mouse-AlexaFluor594	Invitrogen, Darmstadt Katalog-Nr.: A11032	IHC	1:1000	2h RT
Goat-anti-rabbit-HRP	Santa Cruz, Heidelberg Katalog-Nr.: sc-2030	IB	1:2500	2h RT
Goat-anti-mouse-HRP	Santa Cruz, Heidelberg Katalog-Nr.: sc-2031	IB	1:2500	2h RT

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 KCC2-Aktivitätsmessungen mit radioaktivem Rubidium (Flux)

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Pharmaka und Proteine sowie von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) auf die Transportaktivität von KCC2 untersucht.

Zur Bestimmung der Transportaktivität von KCC2 wurden radioaktive Fluxmessungen an HEK293 Zellen, welche stabil mit KCC2 transfiziert waren ( $\text{HEK293}^{\text{KCC2}}$ ) durchgeführt. Fluxmessungen mit radioaktiv markiertem Rubidium ( $^{86}\text{Rb}^+$ ) wurden erstmalig von Payne (1997) beschrieben. Dabei wird ausgenutzt, dass in HEK293-Zellen exprimierter KCC2  $^{86}\text{Rb}^+$  als Congener von Kalium transportiert und eine sehr hohe Affinität für extrazellulär vorliegendes  $^{86}\text{Rb}^+$  ( $\text{K}^+$ ) aufweist. Sowohl für  $\text{K}^+$  als auch für  $^{86}\text{Rb}^+$  konnten ähnliche Transportkinetiken gezeigt werden (Williams and Payne 2004). Die  $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in  $\text{HEK293}^{\text{KCC2}}$  über KCC2 kann nach Waschen der Zellen und anschließender Lyse direkt gemessen werden. Die Messung der emittierten  $\beta$ -Strahlung erfolgte mittels der Flüssigszintillation.

Die auf 10 cm Kulturschalen transfizierten  $\text{HEK293}^{\text{KCC2}}$ -Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion abtrypsinisiert und in 6 ml Kulturmedium aufgenommen. Nach der mechanischen Vereinzelnung wurden die Zellen ausgezählt und jeweils  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen in eine mit PLL beschichtete Vertiefung einer 6-Loch Zellkulturschale gegeben. Pro Transfektion wurden drei technische Replika ausgesät und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Die verbleibende Zellsuspension ( $\sim 3$  ml) wurde im Immunoblot weiterverwendet (2.1.2). Am Folgetag wurde das Medium von den Zellen abgenommen und jeweils 1 ml Präinkubationspuffer in die Vertiefungen gegeben. Um die Aktivitäten der endogenen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zu unterbinden, wurden dem Präinkubations- sowie dem Inkubationspuffer Ouabain zugesetzt. Die Aktivität des endogen exprimierten Transporters NKCC1 wurde durch Substitution von  $\text{NaCl}$  mit NMDG unterdrückt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit wurde der Präinkubationspuffer abgenommen und jeweils 1 ml Inkubationspuffer, welcher zusätzlich zu 5 mM  $\text{K}^+$  1  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{86}\text{Rb}^+$  enthielt, zugegeben. Nach 10 Minuten wurde der Inkubationspuffer abgenommen und das nicht aufgenommene  $^{86}\text{Rb}^+$  durch 3 Waschschrte mit Fluxpuffer entfernt. Die Zellen wurden mit 0,25 M  $\text{NaOH}$  (500  $\mu\text{l}$ ) lysiert und die Suspension nach einer Stunde durch Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  Eisessig neutralisiert. Zur Bestimmung der aufgenommenen Radioaktivität wurden 150  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in 6 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Zusätzlich zu den Ansätzen wurden jeweils zwei Leerproben und zwei Proben, welche 5  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer (Standards) enthielten, gemessen. Die in der Szintillationsflüssigkeit enthaltene Probe wurde durch mehrmaliges Invertieren homogen verteilt und in einem Szintillationszähler die Radioaktivität bestimmt.

Da die gemessene Radioaktivität von der Zellzahl abhängt, wurde zu ihrer indirekten Bestimmung ein Proteinnachweis mit BCA (BCA Protein Assay Reagent, Product 23225) nach Angaben des Herstellers (Thermo fisher scientific, Schwerte) mit BSA als Standard durchgeführt. Aus den der radioaktiven Messung entstammenden ‚Counts‘, unter Berücksichtigung der Leerproben und der Standards, und den Proteinkonzentrationen konnte die Transportaktivität in  $\text{nmol K}^+ / (\text{mg Protein} * \text{min})$  berechnet werden. Diese wurden in Relation zu den jeweils mitgeführten Mock-Transfektionen gesetzt und als Prozentwerte dargestellt.

Die Behandlung mit den verschiedenen Pharmaka bzw. Wasserstoffperoxid erfolgte je nach Versuchsziel vor und während der Präinkubation bzw. Inkubation. Für die Erstellung der Datensätze, welche mit dem Zusatz ‚ohne Erholung‘ gekennzeichnet sind, wurde mit der Behandlung vor der Präinkubation begonnen und neben dem Wachstumsmedium (DMEM + 1 % P/S + 10 % FCS), in dem die erste Inkubation stattfand, auch der Präinkubations- sowie der Inkubationspuffer mit dem entsprechenden Agens versetzt.

Bei den Datensätzen, welche ‚mit Erholung‘ generiert wurden, wurden Pharmaka bzw. Wasserstoffperoxid ebenfalls vor der Präinkubation in das Wachstumsmedium appliziert und für den angegebenen Zeitraum auf den Zellen belassen. Dann erfolgte ein Austausch gegen frisches Wachstumsmedium. Bei diesen Ansätzen waren auch Präinkubations- und Inkubationspuffer frei von den entsprechenden Zusätzen und sowohl die Präinkubations- als auch die Inkubationszeit wurden in die Erholungsphase einberechnet.

Das in den vorliegenden Experimenten verwendete Wasserstoffperoxid wurde vor den Experimenten frisch aus einer 30 %igen Stocklösung in dem verwendeten Wachstumsmedium (DMEM + P/S + 10 % FCS) auf die entsprechende Konzentration verdünnt.

### **2.6.2 Isolierung von Proteinen aus HEK293-Zellen**

Zum Nachweis der heterologen Expression wurde mit der zweiten Hälfte der Zellen, welche für die Fluxmessung von der 10 cm-Kulturschale abgelöst wurden (vgl. 2.6.1), ein Immunoblot durchgeführt. Dazu wurden die verbliebenen 3 ml Zellsuspension für 10 min bei 1000 x g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach wurden die Zellen entweder sofort verwendet oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Zellpellets wurden, sofern sie eingefroren waren, auf Eis aufgetaut, in 80 µl eiskaltem Lysepuffer (150 mM NaCl, 15 mM Tris, 1 % DDM, 0,4 % IAA) resuspendiert und in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Durch eine 5-minütige Inkubation bei 25 °C wurden die Zellen aufgeschlossen. Nicht solubilisierete Proteine wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 125 000 x g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.6.3 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung nach der Isolierung der Proteine erfolgte mittels des Bradford-Assays. Dieser Nachweis basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Brillant Blue G 250 von 470 auf 595 nm bei Bindung an kationische oder unpolare Seitenketten eines Proteins (Bradford 1976). Diese Verschiebung kann photometrisch bei 595 nm gemessen werden. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels einer mit BSA angefertigten Standardreihe quantifiziert.

### 2.6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung der Proteine wurden 10 %ige Polyacrylamidgele gewählt. Diese wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen und hatten Abmessungen von 9,5 x 7,5 cm und eine Dicke von 1 oder 1,5 mm.

#### Trenngel:

10 %	(w/v)	Acrylamid
0,267 %	(w/v)	<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid
0,375 M		Tris
0,1 %	(w/v)	SDS
0,04 %	(v/v)	TEMED
0,1 %	(w/v)	Ammoniumpersulfat
		pH 8,8

#### Sammelgel:

4 %	(w/v)	Acrylamid
0,1 %	(w/v)	<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid
0,375 M		Tris
0,13 %	(v/v)	TEMED
0,08 %	(w/v)	Ammoniumpersulfat
		pH 6,8

Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde das Gel in ein Kammeresystem eingespannt (BioRad). Um den Stromfluss zwischen Anode und Kathode zu gewährleisten, wurde die innere Kammer vollständig und die äußere zu etwa  $\frac{2}{3}$  mit 1 x SDS-Gelelektrophoresepuffer befüllt.

Jeweils 40  $\mu$ g der Proteinsuspensionen wurden in einem Verhältnis von 5:1 mit Laemmli-Probenpuffer verdünnt auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung der Molekulargewichte der

nachzuweisenden Proteine wurde ein vorgefärbter Größenstandard aufgetragen (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; Fermentas).

Der Lauf des Gels wurde unter einer Stromstärke von 20 mA/Gel gestartet. Nachdem die Proben das Sammelgel passiert hatte, wurde der Strom auf 40 mA/Gel erhöht. Der Lauf wurde abgestoppt, sobald das im Laemmli-Puffer enthaltene Bromphenolblau aus dem Gel austrat.

### **2.6.5 Western Blot**

Um bestimmte Proteine in einem Proteingemisch spezifisch nachweisen zu können, werden die im Zuge der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels eines angelegten Stroms auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Roti®-PVDF) transferiert. Auf dieser bleiben Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften und sind für die im nachfolgenden Punkt verwendeten Antikörper leichter zugänglich als im Polyacrylamidgel.

Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel aus der Kammer genommen und das Sammelgel entfernt. Die PVDF-Membran wurde in 100 % Methanol aktiviert und anschließend in Tankblot-Puffer äquilibriert. Das Blot-Sandwich wurde nach Angaben des Herstellers in Tankblot-Puffer zusammengebaut und dann zusammen mit einem Kühlakku in die Blotkammer eingespannt. Die Kammer wurde mit Tankblot-Puffer befüllt. Der Transfer lief 1 Stunde bei einem konstanten Strom von 380 mA.

### **2.6.6 Markierung der Proteine mit spezifischen Antikörpern**

Nachdem der Blotvorgang abgeschlossen war, wurde die PVDF-Membran zunächst für 10 Minuten auf einem Rollenschüttler mit Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBS-T) inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung zugegeben und die Membran für 2 h bei Raumtemperatur und 4 °C über Nacht auf dem Rollenschüttler inkubiert. Am Folgetag wurde der primäre Antikörper abgenommen und die Membran viermal mit TBS-T gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde ein Peroxidase-markierter sekundärer Antikörper, welcher gegen den F<sub>c</sub>-Teil des primären Antikörpers gerichtet war, ebenfalls in Blockierlösung aufgegeben. Mit diesem Antikörper wurde der Blot für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rollenschüttler inkubiert und vor der Detektion viermal mit TBS-T gewaschen, um überschüssigen sekundären Antikörper zu entfernen.

### **2.6.7 Detektion der nachzuweisenden Proteine**

Die Detektion der nachzuweisenden Proteine erfolgt über eine Luminol-basierende Chemilumineszenzreaktion. Dabei wird die Oxidation von Luminol mittels Wasserstoffperoxid durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert und das durch das Luminol emittierte Lichtsignal durch einen Enhancer verstärkt.

Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurde der Puffer abgegossen und der Blot auf eine saubere Klarsichtfolie gelegt. Der Blot wurde mit der Detektionslösung (WESTERN LIGHTNING™ *Chemiluminescence Reagent Plus*, Perkin Elmer, Rodgau-Juegesheim), welche sich aus einem Teil Luminol/Enhancer- und einem Teil stabiler Wasserstoffperoxidlösung zusammensetzt, bedeckt und eine zweite Folie wurde luftblasenfrei aufgelegt. Nach einer 1-minütigen Inkubation wurde das überschüssige Reagenz ausgestrichen. Die Detektion erfolgte mit dem LAS-3000-System von Fuji (Japan).

### **2.6.8 Entfernen des Signals zwischen zwei Antikörperdetektionen**

Um das Signal des vorangegangenen Antikörpers nach der Detektion zu entfernen, wurden zweierlei Methoden angewendet:

Handelte es sich um einen Antikörper aus einer anderen Spezies, wurde die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase über eine 5-minütige Behandlung mit einer 30 %igen Wasserstoffperoxidlösung gefolgt von zwei Waschschriften irreversibel inaktiviert (Baynton et al. 1994). Vor Applikation des nächsten primären Antikörpers wurde der Blot zweimal mit TBS-T gewaschen.

Wurden zwei Antikörper aus der gleichen Spezies hintereinander verwendet, wurde der Blot 'gestrippt'. Bei dieser Methode wurde der Blot für 30 Minuten bei 60 °C in der Striplösung inkubiert. Durch die Behandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und Wärme wurde der primäre Antikörper denaturiert und damit vom Epitop gelöst. Anschließend wurde die Striplösung abgegossen und die Überreste durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T entfernt.

## **2.7 Immunhistochemische Methoden**

### **2.7.1 Transkardiale Perfusion**

Für die immunhistochemischen Analysen wurde das zu untersuchende Gewebe vorab mittels einer transkardialen Perfusion fixiert. Dazu erhielten die Tiere zunächst intraperitoneal eine letale Dosis Chloralhydrat (700 mg/kg Körpergewicht). Nach Ausbleiben von Schmerzreflexen wurde das Tier mit der Ventralseite nach oben liegend auf einer Platte fixiert. Nach Frei-

legung des Herzens und Entfernung des Perikards wurde eine Infusionsnadel in den linken Ventrikel eingeführt und das rechte Atrium eingeschnitten. Zum Ausspülen des Blutes aus dem Kreislaufsystem wurden abhängig von Alter und Gewicht des Tieres 10-20 ml eiskalter PBS mittels einer Peristaltikpumpe durch den Körper gepumpt, bis die austretende Flüssigkeit klar war. Im Anschluss daran wurde über dieselbe Kanüle bei gleich bleibendem Druck 30-60 ml der ebenfalls eiskalten Fixierlösung (Zamboni-Lösung) verabreicht.

Für die Gehirnpräparation wurde die Maus dekapitiert. Die Schere wurde entlang der Medulla unterhalb der Schädeldecke eingeführt und die Schädeldecke durch Schneiden des Schädelsknochens entlang der medialen Linie geöffnet. Nach der Freilegung wurde das Gehirn herausgelöst und für 4 Stunden bei Raumtemperatur in Zamboni-Lösung nachfixiert. Die Gehirne wurden anschließend dreimal 10 Minuten in PBS gewaschen und bis zum Schneiden (aber mindestens 2 Nächte) bei 7 °C in saccharosehaltigem (30 %) PBS gelagert.

### **2.7.2 Anfertigung von Hirnschnitten für die Immunhistochemie**

Für die Immunhistochemie wurden 30 µm dicke sagittale Schnitte angefertigt. Dazu wurde das entlang der medialen Linie halbierte Gehirn mittels 30 %iger Saccharose (in PBS) auf den Kühltisch des Schlittenmikrotoms aufgefroren. Die Schnitte wurden in direkt aufeinander folgenden Serien in 15 % Saccharose in PBS gesammelt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 5-10 Minuten in PBS gewaschen und bis zur Verwendung bei 7 °C in PBS gelagert.

### **2.7.3 Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin**

Um eine bessere Anhaftung der Schnitte auf Objektträgern zu erreichen, wurden diese zuvor mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Dazu wurden die unbehandelten Träger in eine 0,1 %ige PLL-Lösung gegeben und verblieben dort für eine Stunde. Um überschüssiges PLL zu entfernen, wurden die Träger anschließend dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und konnten direkt verwendet werden.

### **2.7.4 Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie wurde mittels der Free floating Methode durchgeführt. Dabei schwimmen die Schnitte während der Wasch- und Inkubationsschritte frei in den entsprechenden Lösungen. Die Schnitte wurden direkt in 12er-Kalotten mit 1 ml Trägerlösung gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Zuge dieses Inkubationsschrittes wurden

die Schnitte durch das in der Trägerlösung enthaltene Triton X-100 permeabilisiert und unspezifische Bindestellen durch das enthaltene Ziegen Serum blockiert. Anschließend wurden die primären Antikörper gegen  $\beta$ PIX und KCC2 (vgl. Tabelle 2.3) zugegeben. Die 12er-Kalotten-Platte wurde mit Parafilm versiegelt und die Schnitte 16-19 Stunden unter sanftem Schütteln bei 7°C inkubiert.

Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 Minuten in ~ 7 ml PBS-T gewaschen und anschließend in Trägerlösung, welche mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern versetzt war, überführt. Zur Detektion des  $\beta$ PIX-Antikörpers (*rabbit*) wurde der Sekundär-Antikörper AlexaFluor488 goat anti-rabbit verwendet. Der monoklonale KCC2-Antikörper (*mouse*) wurde mit dem Sekundärantikörper AlexaFluor594 goat anti-mouse nachgewiesen. Bei der Wahl der sekundären Antikörper (Fa. Fisher scientific) wurde, da Kolokalisationsstudien angestrebt wurden, der Reinheitsgrad *highly-cross adsorbed* gewählt. Dadurch wurde die Gefahr von Kreuzreaktionen erheblich verringert. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte lichtgeschützt unter leichtem Schwenken für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Schnitte abermals dreimal für jeweils 10 Minuten in PBS-T gewaschen und dann auf mit PLL beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden unter Ausschluss von Licht an der Luft getrocknet und mit Vectashield anti-fade mounting medium (AXXORA Deutschland GmbH, Lörrach) eingedeckelt.

## **2.8 Zellbiologische Methoden**

### **2.8.1 Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin**

Zur Verbesserung der Anhaftung der Zellen auf Deckgläschen wurden diese zunächst mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Dazu wurden die Deckgläschen mit PLL bedeckt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das PLL abgenommen und die Deckgläschen dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Mit PBS überschichtet können die beschichteten Deckgläschen bis zu zwei Wochen bei 7 °C gelagert werden.

### **2.8.2 Transiente Transfektion**

Da HEK293-Zellen kein endogenes KCC2-Protein besitzen, wurde auf eine stabile Linie zurückgegriffen, welche zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung stand (Hartmann et al. 2009). Um den Einfluss von  $\beta$ PIX und GIT1 auf die Transportaktivität und subzelluläre Verteilung von KCC2 zu untersuchen, wurden die entsprechenden Konstrukte sowie auch Mutan-

ten in der stabilen Linie (HEK293<sup>KCC2</sup>) überexprimiert. Die entsprechenden Gene lagen bereits in eukaryotischen Vektoren (pcDNA3.1, pEGFP\_C1, pBK) vor.

Für die transiente Transfektion wurde das Transfektionsreagenz Turbofect<sup>TM</sup> (Fermentas) gewählt. Dieses kationische Polymer formt stabile Komplexe mit der zugegebenen DNA. Diese Komplexe sind positiv geladen und schützen die DNA vor Degradation. Nach der Aufnahme des Turbofect-DNA-Komplexes fusioniert dieser mit intrazellulären Endosomen. Die Freisetzung der DNA in das Cytosol, welche die Voraussetzung für die Aufnahme in den Zellkern ist, erfolgt über einen massiven Protonentransport gefolgt von einem Chloridstrom in das Endosom. Durch den entstehenden osmotischen Druck wird das Endosom lysiert. Die freigesetzte DNA wird den Zellkern transloziert. Im Gegensatz zur stabilen Transfektion wird bei der transienten Expression die Fremd-DNA nicht in das Genom der Wirtszelle integriert und kann dadurch nicht an Tochterzellen weitergegeben werden.

Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion 60-70 % konfluent ausgesät. Für die Transfektion wurden die DNA zunächst mit OPTIMEM (serumfrei) gemischt. Das Transfektionsreagenz wurde gevortext und zu der verdünnten DNA gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise unter sanftem Schwenken der Platte auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde für 10 Minuten bei RT unter sanftem Schwenken auf einem Horizontalschüttler und anschließend im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Analysen erfolgten 36-48 Stunden nach der Transfektion. In Tabelle 3 sind die verwendeten DNA-Mengen und Volumina für Transfektionen auf 12-wells (immuncytochemische Analysen; enthalten PLL-beschichtete Deckgläschen) und 10 cm-Platten (<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-Aufnahmestudien) aufgeführt.

**Tabelle 2. 4: DNA-Mengen und Volumina für die Transfektion von HEK293-Zellen mit TurboFect**

	<b>10cm-Platte</b>	<b>12-well</b>
<b>OPTIMEM</b>	900 µl	50 µl
<b>Turbofect</b>	36 µl	2,5 µl
<b>DNA</b>	9 µg	1,5 µg

## 2.8.3 Immuncytochemie

### 2.8.3.1 Markierung der Zelloberfläche mit Weizenkeimagglutinin (WGA)

Da in der vorliegenden Arbeit die Oberflächenexpression von KCC2 untersucht wurde, wurde der Immunfärbung eine Färbung der Membran mit dem fluoreszenzmarkierten Lektin Wei-

zenkeimagglutinin (Wheat-germ agglutinin (WGA)) vorgezogen. WGA bindet die Zuckerreste von Membranglykoproteinen und kann daher für eine Markierung der Zelloberfläche sowie auch für die intrazellulären Membranen (z.B. Golgi-Apparat, TGN) benutzt werden (Roselli et al. 2004).

Um die Markierung möglichst auf die Zelloberfläche zu begrenzen, wurden die auf PLL-beschichteten Deckgläschen ausgesäten Zellen 48 h nach der Transfektion zweimal mit eiskaltem physiologischem PBS gewaschen. Diese Waschschriffe erfolgten auf Eis, um zelluläre Prozesse wie insbesondere die Endozytoserate zu vermindern und eine möglichst gleichmäßige Färbung der Zelloberfläche zu erhalten (von Zastrow and Kobilka 1994; Wang et al. 2007). Die Inkubation mit 10 µg/ml Alexa633-gelabeltem WGA (Invitrogen) erfolgte für 15-30 Minuten unter Lichtausschluss auf Eis. Um ungebundenes WGA zu entfernen, wurden die Zellen erneut mit eiskaltem physiologischem PBS gewaschen und im Anschluss daran für 10 Minuten mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Durch diese Art der Fixierung bleibt die Zellmorphologie und –stabilität im Zuge der nachfolgenden Färbeschritte erhalten.

### ***2.8.3.2 Antikörperfärbung von HEK293-Zellen***

Im Anschluss an die Oberflächenmarkierung mit WGA erfolgte der Nachweis von Proteinen in immortalisierten HEK293-Zelllinien (stabile KCC2- und Überexpression) über die indirekte Immunfluoreszenz. Alle Schritte erfolgten unter Lichtausschluss, um ein Ausbleichen des an das WGA gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Der 10-minütige Fixierschritt mit 4 %igem PFA wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS abgestoppt. Durch Auftropfen von 100 µl Blocker wurden die Zellen permeabilisiert (Triton-X-100 im Blocker) und unspezifische Bindestellen blockiert (BSA und Ziegenserum im Blocker). Nach 30 Minuten bei RT wurde der Blocker abgesaugt und der primäre Antikörper in der gewünschten Konzentration in Carrier für 1 Stunde in einer Feuchtkammer zugegeben. Nach Ablauf der Inkubation wurde der überschüssige Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und der Sekundärantikörper, ebenfalls in Carrier verdünnt, für eine Stunde in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden der ungebundene Sekundärantikörper durch drei Waschschriffe entfernt und die auf den Deckgläschen befindlichen Zellen an der Luft unter Lichtausschluss getrocknet. Die getrockneten Deckgläschen wurden mit Vectashield anti-fade mounting medium (AXXORA Deutschland GmbH, Lörrach) eingedeckelt und bis zur Mikroskopie lichtgeschützt bei 7°C gelagert.

Eine Auflistung der verschiedenen Antikörper und der verwendeten Verdünnungen findet sich in Tabelle 2.3.

## **2.9 Mikroskopie**

### **2.9.1 Fluoreszenzmikroskopie**

Einige der mikroskopischen Auswertungen erfolgten mittels des digitalen Fluoreszenzmikroskops BZ 8100 E von Keyence (Neu-Isenburg, Deutschland). Dieses Mikroskop ist mit einer Hochdruck-Quecksilberslampe sowie verschiedenen Objektiven, von denen allerdings nur zwei (PlanApo 4x NA 0.20 und PlanApo VC30x HNA1.40 Oil, beide von Nikon) genutzt wurden, ausgestattet. Des Weiteren ist das Mikroskop mit drei Filtersets (BZ Filter DAPI-BP, BZ Filter GFP-BP, BZ Filter TexasRed) ausgerüstet. Die Steuerung des Mikroskops erfolgte über die BZ observation application und die Bearbeitung der Bilder über die BZ image analysis application Software.

Das Fluoreszenzmikroskop wurde in erster Linie für die immunhistochemischen Übersichtsaufnahmen benutzt. Dabei wurden für die Übersichtsbilder von einem Ausschnitt in beiden Kanälen (rot und grün) Z-Stapel-Aufnahmen in jeweils 0,2  $\mu\text{m}$ -Abständen angefertigt. Diese wurden dann als Stapel in das Bearbeitungsprogramm importiert und in einer Vollfokussierung zu einem omnifokalen Bild kombiniert. Da dieses Bild mehrere Ebenen enthält, wurde es nicht für Kolokalisationsanalysen verwendet. Diese Analysen wurden mittels eines konfokalen Mikroskops (vgl. 2.9.2) durchgeführt.

### **2.9.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Der Vorteil der verwendeten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie liegt in der signifikanten Suppression aller Fluoreszenzen, welche nicht im Fokus liegen. Das bedeutet, dass auf der Ebene der Bilderstellung die Informationen, welche nicht im fokalen Bereich liegen, herausgefiltert werden können. Die Lichtquelle ist typischerweise ein Laser, welcher hochenergetisches kohärentes Licht einer definierten Wellenlänge aussendet. Das Verhältnis zwischen Licht aus dem Fokus und nicht-fokalem Signal (Signal-Rausch-Verhältnis) ist, wenn es auf den Photomultiplier fällt, maximal. Dies wird durch eine spezielle Anordnung optischer Linsen entlang der konjugierten Punkte des Lichtweges bewerkstelligt. Zunächst wird der Laserstrahl durch eine Lochblende (*pinhole*) gebündelt und anschließend durch einen dichromatischen Spiegel abgelenkt. Der Lichtstrahl passiert das Linsensystem eines Objektivs, welches den Strahl auf einen Punkt der fluoreszierenden Probe fokussiert. Dies resultiert in einem

Gemisch aus reflektiertem Licht und emittierter Fluoreszenz. Der reflektierte Anteil wird durch einen dichromatischen Reflektor abgelenkt, wohingegen der emittierte Anteil auf den Photomultiplier fällt. Vor dem Multiplier befindet sich eine justierbare Lochblende, welche nur der Fluoreszenzanteil aus dem Fokus passiert und somit das Rauschen, also den durch die Fluoreszenz aus anderen Ebenen verursachten Hintergrund, herausfiltert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie sowohl für immunhistochemische Aufnahmen als auch zur Auswertung der Immunocytochemie eingesetzt. Das konfokale Mikroskop (Leica) sowie die zugehörige Software (Leica confocal software, LCS) wurden von der AG Elektrochemie und Grenzflächen kondensierter Systeme (Prof. Dr. G. Wittstock) zur Verfügung gestellt.

### ***2.9.2.1 Anfertigung von immunhistochemischen Aufnahmen mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie***

Die Detailaufnahmen der Immunfärbungen von Gewebeschnitten wurden mittels eines konfokalen Mikroskops angefertigt. Da die Gewebeschnitte eine Dicke von 30  $\mu\text{m}$  aufwiesen, waren Aufnahmen mittels eines Fluoreszenzmikroskops aufgrund der durchscheinenden Fluoreszenz aus anderen Ebenen nicht möglich. Da es sich des Weiteren um Kolokalisationsstudien handelte, ist es notwendig, die detektierten Fluoreszenzen auf eine Ebene zu beschränken, damit es nicht zu falsch positiven Überlappungen zwischen den beiden Kanälen kommt.

Die Anregung des AlexaFluor 594-Farbstoffes (KCC2) erfolgte über einen Helium-Neon-Laser (Emission bei 563 nm). Das aus der Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes resultierende Emissionsmaximum liegt bei 618 nm, die Detektionsbreite zwischen 600 und 650 nm. Das AlexaFluor 488-Fluoreszenzlabel ( $\beta\text{PIX}$ ) wurde mittels eines Argonlasers angeregt, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm emittiert. Das aus dieser Anregung resultierende Emissionsspektrum des Farbstoffes weist ein Maximum bei 519 nm auf und wurde bezüglich der Detektion auf eine Breite zwischen 500 und 550 nm begrenzt.

Die Aufnahmen wurden mittels eines 63x-Objektivs (Leica HCX PL APO 63x) unter der Nutzung von Glycerin erstellt. Dabei wurde zunächst der gewünschte Bereich des Schnittes unter dem Fluoreszenzmikroskop fokussiert und anschließend auf den konfokalen Betrieb umgestellt. Jede Linie wurde jeweils zweimal pro Durchlauf bei insgesamt 8 Durchläufen des jeweiligen Bildausschnittes gescannt. Dabei betrug die Auflösung 2048 x 2048 Pixel.

### **2.9.2.2 *Anfertigung von immuncytochemischen Aufnahmen mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie***

Für die Analyse der Verteilung von KCC2 in HEK293-Zellen wurden Tripelfärbungen angefertigt. Dafür wurde das im benutzten Zellsystem stabil transfizierte KCC2 mit einem im orangen Bereich emittierenden sekundären Antikörper (AlexaFluor 568) nachgewiesen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde gewählt, da sich die Emissionsspektren des AlexaFluor 594 nm-Farbstoffes und des AlexaFluor 633 nm-Farbstoffes zu stark überlagern und daher eine saubere Trennung der beiden Kanäle nicht möglich wäre. Die überexprimierten Proteine (GIT1 und  $\beta$ PIX sowie ihre Mutanten) waren mit einem grün fluoreszierenden sekundären Antikörper (AlexaFluor 488) markiert und das Weizenkeimagglutinin, welches die Oberfläche der Zelle bindet, direkt an einen rot fluoreszierenden Farbstoff (AlexaFluor 633) gekoppelt. Die Anregung des AlexaFluor 568-Farbstoffs erfolgte mit einem Helium-Neon-Laser (543 nm). Der Fluoreszenzfarbstoff emittiert mit einem Maximum bei 603 nm. Zur Detektion des AlexaFluor 488-Farbstoffes wurde das Objekt mit einem Argon-Laser, welcher bei Strahlung einer Wellenlänge von 488 nm abgibt, angeregt. Sein Emissionsmaximum liegt bei 519 nm. Der Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 633, welcher an den Oberflächenmarker WGA gekoppelt war, wurde durch Anregung mit einem anderen Helium-Neon-Laser, welcher Licht einer Wellenlänge von 633 nm abgibt, zur Emission bei maximal 648 nm angeregt. Die Aufnahmen wurden mittels eines 63x-Objektivs (Leica) unter der Benutzung von Glycerin erstellt. Die Detektionsgrenzen lagen dabei für AlexaFluor 488 zwischen 500 und 540 nm, für AlexaFluor 568 zwischen 580 und 620 nm und für das 633 nm-Label des WGA zwischen 650 und 680 nm. Zur besseren Unterscheidbarkeit des WGA- und KCC2-Signals wurde das WGA-Signal nach dem Scan durch die Leica-Confocal-Software digital blau gefärbt. Einzelne Bildausschnitte wurden aus der Originalabbildung herausgeschnitten und vergrößert dargestellt ohne jedoch die Originalgröße des Ausschnittes zu überschreiten, um Artefakte durch zusätzliche Pixel, welche bei digitalen Vergrößerungen entstehen können, zu vermeiden.

### **2.9.3 *Auswertung der konfokalen Aufnahmen mit ImageJ***

Die Auswertung der konfokalen Aufnahmen erfolgte mittels der Bearbeitungssoftware ImageJ unter der Benutzung des Plugins ‚OBCOL‘ (organelle-based colocalization) (Woodcroft et al. 2009). Dafür wurden die Einzelkanalbilder zunächst in Form einer Bildsequenz importiert, in ein RGB-Format konvertiert und als virtueller Stack angezeigt. Um den durch andere gefärbte Zellen verursachten Hintergrund zu minimieren, wurden einzelne Zellen ausgeschnitten und auf einen neuen schwarzen Hintergrund kopiert. Dies wurde für alle Kanalaufnahmen der

entsprechenden Zelle durchgeführt, so dass die einzelnen Bilder in Form von monochromatischen Bildern vorlagen. Die nachfolgenden Schritte wurden für die einzelnen Kanäle getrennt voneinander durchgeführt:

Zunächst wurden die Hintergrundfluoreszenz und Rauschen in den Einzelbildern mittels eines 1 Pixel Median Filters verringert. Um die Hintergrundfluoreszenz vollständig aus den Einzelbildern zu entfernen, wurde ein Schwellenwert gesetzt, welcher die Untergrenze für die Intensität der zu messenden Fluoreszenz bestimmte. In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwellenwert für die KCC2- und  $\beta$ PIX-Signale so gesetzt, dass der Zellkernbereich frei von Signal war. Die Fluoreszenzen aus der WGA-Färbung hingegen wurden nach Möglichkeit auf die Membranregionen begrenzt. Der Schwellenwert, welcher hierbei ermittelt wurde, wurde als Cut-off gesetzt und somit jedes Signal, das geringer als die geforderte Intensität war, herausgefiltert. (PLUGINS > COLOCALISATION PIPELINE > CUTOFF...). Schließlich wurden die Einzelkanalbilder in OBCOL eingefügt und die Colocalisation-Pipeline gestartet (PLUGINS > COLOCALISATION PIPELINE > PIPELINE...). Die übrige Auswertung erfolgte mittels Excel. Es wurden dafür folgende Berechnungen durchgeführt:

$$\sum Pixel_{KanalA} + \sum Pixel_{KanalA+B} = Pixel_{KanalAgesamt}$$

$$\frac{\sum Pixel_{KanalA+B}}{Pixel_{KanalAgesamt}} \cdot 100[\%] = Pixel_{KanalA+B} [\%]$$

**Formel 1; Berechnung der relativen Kolokalisation zweier unterschiedlich angefärbter Proteine. Die Bezeichnung  $Pixel_{KanalA}$  beschreibt die Zahl der Pixel, welche ausschließlich in Kanal A gemessen wurde. Die  $Pixel_{KanalA+B}$  hingegen bezeichnen die Anzahl der Pixel, welche sowohl in Kanal A als auch in Kanal B detektiert werden.**

Dabei beschreiben die Pixel in Kanal A die vermessene KCC2-Immunfluoreszenz. Die Pixel in Kanal B stellen die Oberflächenmarkierung durch das WGA dar. Unter  $Pixel_{KanalA}$  sind die Pixel angegeben, welche ausschließlich in Kanal A (also cytosolisch) detektiert wurden. Die  $Pixel_{KanalA+B}$  geben die Pixel an, welche in beiden Kanälen (KCC2 und WGA) sichtbar waren. Sie kennzeichnen die Überlappungsbereiche von KCC2 und WGA (plasmamembranständiges KCC2). Die Summe aller Pixel aus Kanal A und Kanal A+B ergibt die KCC2-Gesamtmenge ( $Pixel_{KanalAgesamt}$ ). Das Verhältnis der überlappenden Signale zur Gesamtmenge an KCC2 gibt die prozentuale Kolokalisation, also die verhältnismäßige KCC2-Oberflächenlokalisierung, an. Pro Transfektion wurden mindestens 20 Zellen vermessen und die relative Kolokalisation ebenfalls mittels Excel ausgewertet. Dafür wurden die Einzelwerte auf den Mittelwert der Kontrollen als 100 % normiert. Des Weiteren wurden die Standardabweichungen berechnet und die Signifikanzen über einen Student's *t* Test ermittelt.

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation wurde das GEF-Protein  $\beta$ PIX über das Y2H-System als Interaktionspartner von KCC2 identifiziert (Guillemin 2006). In der vorliegenden Arbeit sollte diese Interaktion näher charakterisiert werden. Die Ergebnisse lassen sich in drei verschiedene Bereiche unterteilen. Zunächst wurde immunhistochemische Analyse durchgeführt, um die Frage zu klären, ob und wo die beiden Proteine in Neuronen koloalisieren. Darauf aufbauend wurden funktionelle Analysen durchgeführt, um die Wirkung von  $\beta$ PIX auf die Transportaktivität von KCC2 zu bestimmen. In den diese Arbeit abschließenden Experimenten sollte dann der zugrunde liegende Mechanismus (Regulation der Oberflächenexpression oder der Transportkinetik) der KCC2-Regulation näher charakterisiert werden.

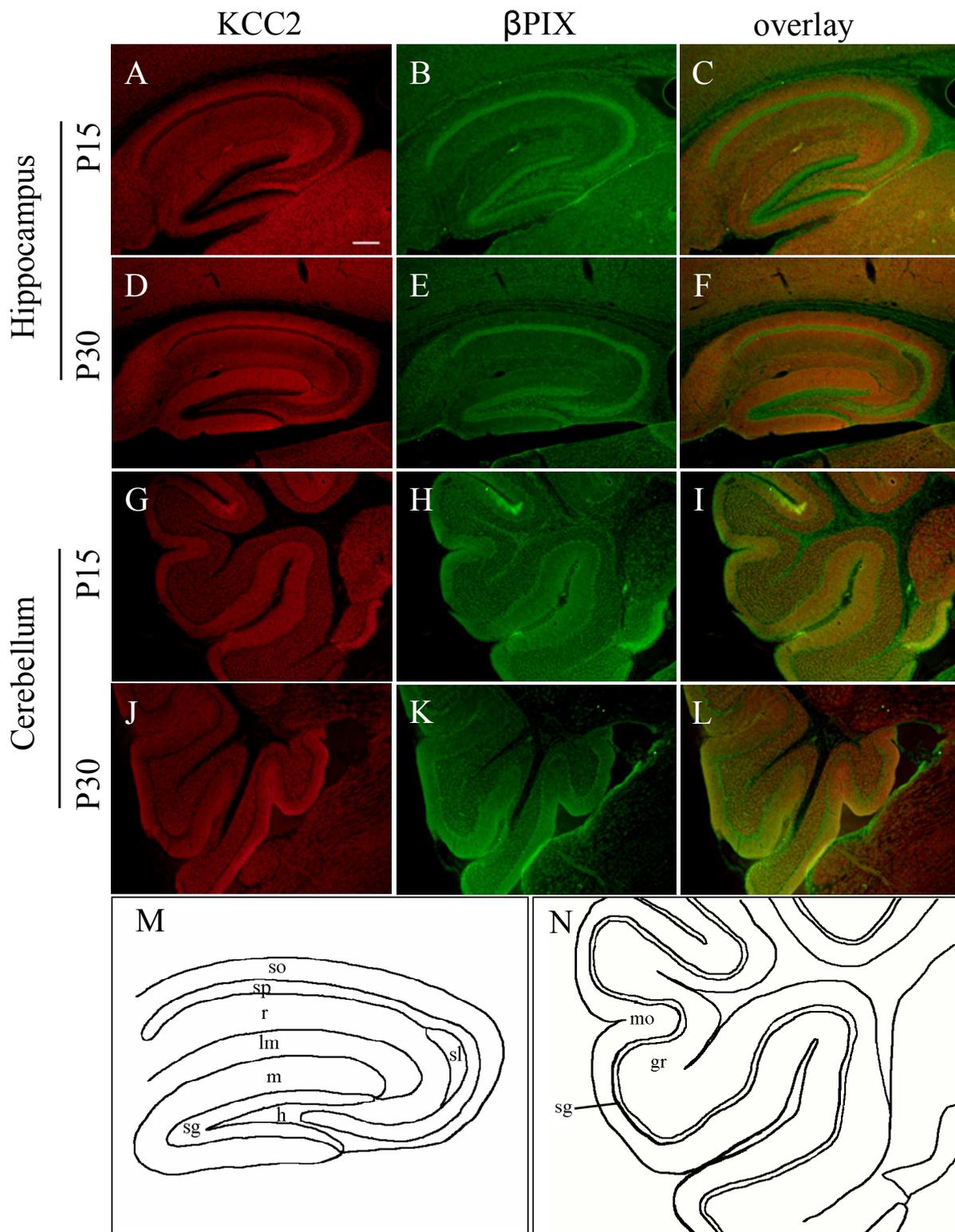
#### ***3.1 Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von KCC2 und $\beta$ PIX in Hippocampus und Cerebellum***

KCC2 und  $\beta$ PIX sind in reifen Neuronen in den Bereichen der Somata und Dendriten sowie auch dendritischen Dornen lokalisiert (Li et al. 2007; Park et al. 2003). Im Gegensatz zu KCC2, welches sich primär an der Plasmamembran befindet (Williams et al. 1999; Hübner et al. 2001a; Gulyás et al. 2001; Báldi et al. 2010), liegt  $\beta$ PIX in erster Linie intrazellulär vor (Botrugno et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden neuronale Zellen in Hippocampus und Cerebellum immunhistochemisch auf Koloalitionen untersucht. Aufgrund der verschiedenen Funktionen von KCC2 in Neuronen (vgl. Einleitung) sollte der Bereich der Koloalitionen (Somata bzw. Dornen) Hinweise liefern, ob  $\beta$ PIX die Transportaktivität von KCC2 modulieren oder eine Interaktion beider Proteine in der Dornenmorphogenese in Frage kommen könnte. Um auch entwicklungsabhängige Veränderungen zu erfassen, wurde die Analyse für 2 Altersstadien durchgeführt. Bei P15-Tieren bestehen die Fortsätze an den Dendriten hippocampaler Neurone zu gleichen Teilen aus filopodienartigen Ausläufer und pilzförmigen Dornen (Kirov et al. 2004). Diese tragen zum Großteil noch unreife Synapsen (Harris et al. 1992). Bei 30 Tage alten Tieren sind die Dornenmorphogenese und die Synaptogenese weitestgehend abgeschlossen (Cottrell et al. 2006; Tan et al. 2009).

Für die Doppelfärbung in sagittalen Schnitten wurde ein monoklonaler Antikörper gegen KCC2, welcher gegen den intrazellulär lokalisierten C-Terminus gerichtet ist, verwendet. Der Nachweis von  $\beta$ PIX erfolgte über einen polyklonalen Antikörper, welcher an die SH3-Domäne bindet. In Abbildung 3.1 sind die Übersichtsaufnahmen des sagittal angeschnittenen Hippocampus und Cerebellums von P15- und P30-Tieren zu sehen. Kontrollen, in denen nur

die sekundären Antikörper verwendet wurden, zeigten keine oder nur sehr geringe Färbungen (Daten nicht gezeigt). Die erste Spalte zeigt in rot die KCC2-Immunreaktivität (IR), die mittlere Spalte (grün) die  $\beta$ PIX-IR und die dritte Spalte die Überlagerungsdarstellung der beiden IRs. Die KCC2-IR im Hippocampus von P15-Tieren (Abb. 3.1A) deutete auf vergleichbare KCC2-Abundanzen im Str. (Stratum) oriens und radiatum der Cornu ammonis (CA) 1- und CA3-Region, sowie in den Str. lacunosum moleculare und moleculare und im Hilus des Gyrus dentatus' (DG) hin. Daher waren diese Regionen zum Teil nicht klar voneinander abgrenzbar. Das Str. pyramidale der CA1- und CA3-Region sowie das Str. granulare des DG wiesen eine sehr viel schwächere IR von KCC2 auf. Die KCC2-Verteilung im Hippocampus von P30-Tieren (Abb. 3.1D) zeigte demgegenüber die stärkste Immunreaktivität im Str. oriens der CA1- und CA3-Regionen sowie im Str. moleculare des DG. Die KCC2-IR im Str. moleculare des DG schien zwischen P15 und P30 zuzunehmen. Bei älteren Tieren war daher die moderate Färbeintensität des Str. lacunosum moleculare der CA1-Region klar gegen die des Str. moleculare des DG abgrenzbar. Eine ähnlich starke Färbung wie das Str. lacunosum moleculare wiesen auch die proximalen Bereiche des Str. radiatum der CA1-Region auf. Die distalen Dendriten der CA1- und CA3-Regionen zeigten schwächere IR. Diese waren mit der ebenfalls geringen Färbeintensitäten im Hilus des DG vergleichbar. Wie auch bei P15 (A) zeigte sich die schwächste KCC2-IR bei P30 im Str. pyramidale der CA1- und CA3-Regionen sowie im Str. granulare des DG. Das Verteilungsmuster von KCC2 bei P30-Tieren stimmte insgesamt mit den vorher beschriebenen IR von KCC2 im adulten Rattenhippocampus überein (Gulyás et al. 2001; Báldi et al. 2010). Die  $\beta$ PIX-IR lag bei beiden Altersstadien primär im Str. pyramidale der CA1- und CA3-Region sowie im Str. granulare des DG. Auch im Hilus des DG fand sich eine moderate  $\beta$ PIX-IR, wohingegen die Färbungen in den übrigen Bereichen (Str. oriens, Str. radiatum der CA1- und CA3-Region, Str. lacunosum moleculare und Str. moleculare) eher schwach und auf einzelne Zellen begrenzt erschien. Ein Unterschied zwischen den beiden Altersstadien fand sich im Str. radiatum der CA3-Region: in Übereinstimmung mit den Daten von Park et al. 2003 war die pyramidale Zellschicht bei P30 (Abb. 3.1E) klar vom Str. lucidum abgrenzbar war. Bei 15 Tage alten Tieren hingegen lag im Str. lucidum (Abb. 3.1.B) eine verstärkte  $\beta$ PIX-IR vor. Die Überlagerungsdarstellungen zeigten, dass die stärkste  $\beta$ PIX-IR sich weitestgehend auf die Bereiche der Somata beschränkte, wohingegen die IR von KCC2 primär in den dendritischen Bereichen des Hippocampus' vorlag.

Im Cerebellum von P15- und P30-Tieren (Abb. 3.1G,J) zeigte sich die stärkste KCC2-IR in der Molekularschicht. In der Körnerschicht hingegen waren moderate Intensitäten erkennbar.



**Abb. 3.1: KCC2- und βPIX-Immunreaktivität in Hippocampus und Cerebellum von 15 (P15) und 30 (P30) Tage alten C57Bl6-Mäusen.**

Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen von KCC2- und βPIX-Färbungen in sagittalen Hirnschnitten von 15 (P15) und 30 (P30) Tage alten C57Bl6-Mäusen. Dargestellt sind Hippocampus (A-F) und Cerebellum (G-L) beider Altersstadien in den Einzelfärbungen und in einer Überlagerungsdarstellung (overlay) sowie eine schematische Übersicht über die genannten Schichten des Hippocampus (M) und des Cerebellums (N). **A, D** In beiden Altersstadien zeigen alle Bereiche des Hippocampus eine KCC2-IR. Während die IR bei P15 (A) in allen molekularen Schichten (Str. oriens (so), Str. radiatum (r), Str. lacunosum moleculare (lm), Str. lucidum (sl), Str. moleculare (m)) vergleichbar stark ist, liegen bei P30 (D) die stärksten Signale im Str. oriens (so) der CA1- und

CA3-Regionen sowie im Str. moleculare (m) des DG vor. Das Str. lacunosum moleculare (lm) zeigt eine moderate IR. Die schwächste Färbung in den molekularen Schichten weisen das Str. radiatum (r) der CA1- und CA3-Regionen sowie der Hilus (h) des DG auf. Die granulären Schichten (Str. pyramidale (sp) der CA1- und CA3-Region sowie das Str. granulare (sg) des DG) weisen bei beiden Altersstadien nur sehr geringe IR auf. **B,E** Die  $\beta$ PIX-IR liegt bei beiden Altersstadien verstärkt in den Bereichen der Somata (Str. pyramidale (sp) der CA1- und CA3-Region, Str. granulare (sg) des DG). Im Hilus (h) des DG findet sich eine moderate  $\beta$ PIX-IR. In den molekularen Bereichen ist die IR eher schwach. Bei P15 liegt eine verstärkte Färbung des Str. lucidum (sl) vor, welche bei P30 nicht mehr zu sehen ist. **C,F** Die Overlay-Darstellungen zeigen, dass die IR von  $\beta$ PIX sich weitestgehend auf die Bereiche der Somata beschränkt und KCC2 primär in den dendritischen Bereichen des Hippocampus vorliegt. **G,J** Die KCC2-IR im Cerebellum von P15- (G) und P30-Tieren (J) zeigt sich am stärksten in der Molekularschicht (Str. moleculare; mo) und ist moderat in der Körnerschicht (granular layer; gr). Die Purkinjzellschicht (Str. ganglionare; sg) hingegen weisen in beiden Altersstadien vergleichsweise schwache Färbereintensitäten auf. **H,K** Die  $\beta$ PIX-IR lässt in beiden Altersstadien starke Signale im Bereich der Purkinjzellen (sg) und geringere Intensitäten in der Körner- (gr) sowie in der Molekularschicht (mo) erkennen. **I,L** Die Überlagerungsdarstellungen der IR von KCC2 und  $\beta$ PIX im Cerebellum deuten auf eine verstärkte Abundanz von KCC2 in den dendritischen und von  $\beta$ PIX in den somatischen Bereichen hin. Größenstandard in A: 200  $\mu$ m. **M, N** Schematische Darstellung des Hippocampus und des Cerebellums.

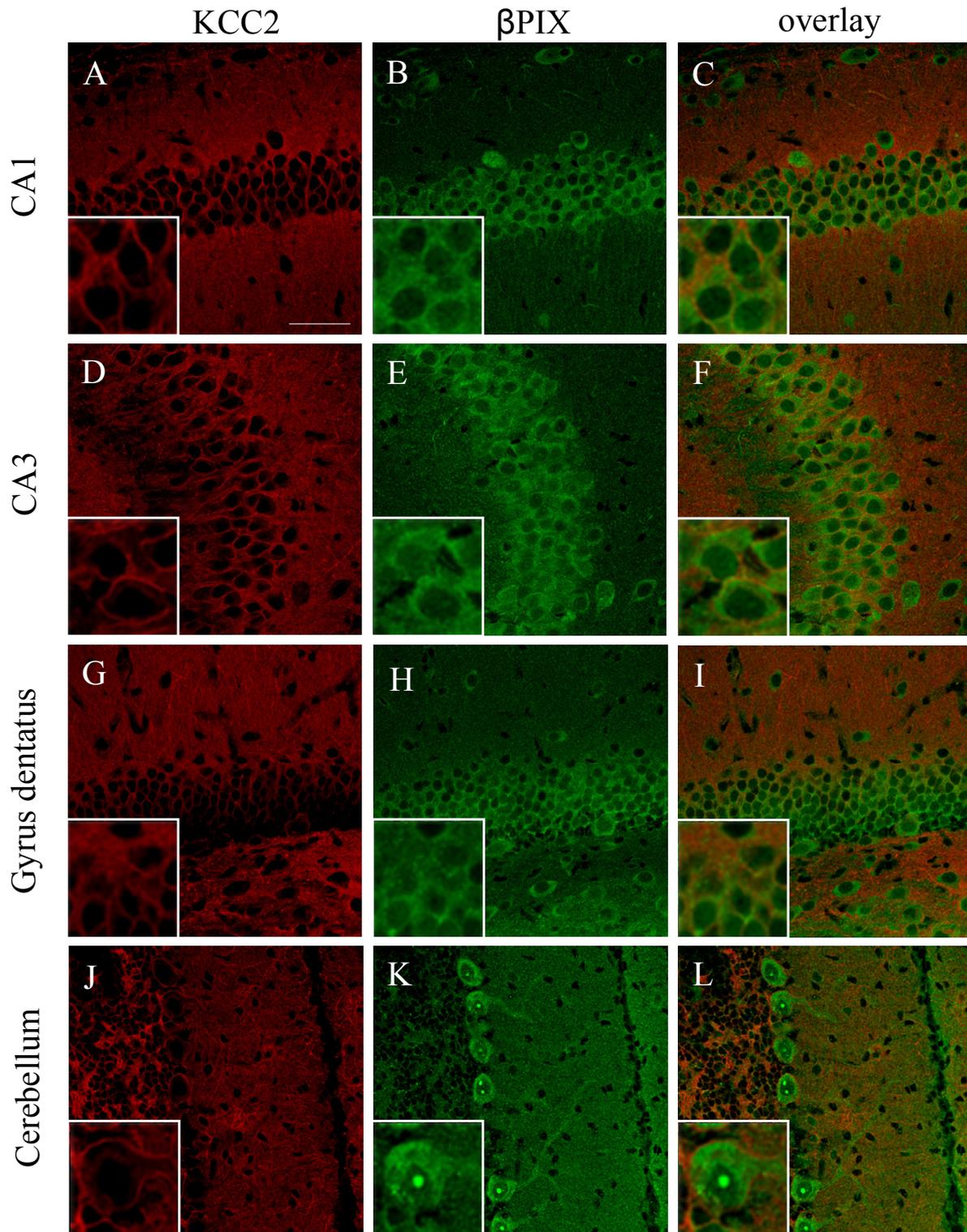
Die KCC2-IR in den Purkinjzellen stellte sich bei beiden Altersstadien vergleichsweise schwach dar. Die  $\beta$ PIX-IR ließ in beiden Altersstadien (Abb. 3.1H,K) starke Signale im Bereich der Purkinjzellen erkennen, wohingegen die Intensitäten in der Körnerschicht und in der Molekularschicht zwar auch recht kräftig, aber schwächer waren. In den lateralsten Bereichen der Molekularschicht befindet sich bei P15 Tage alten Tieren die externe Körnerschicht (EGL – external granular layer). In dieser werden die unreifen Zellen der inneren Körnerschicht (IGL – inner granular layer) gebildet. Diese Schicht ist nur in der Überlagerungsdarstellung (Abb. 3.1I) erkennbar, da die unreifen Zellen in diesem Bereich ausschließlich  $\beta$ PIX- (Kim et al. 2000), nicht jedoch KCC2-positiv (Mikawa et al. 2002) sind. Da die Entwicklung der IGL um P21 abgeschlossen ist, ist die EGL in adulten Tieren nicht mehr detektierbar (Altman 1982). Ebenso wie beim Hippocampus deuteten die IR in der Überlagerungsdarstellung von KCC2 und  $\beta$ PIX im Cerebellum auf eine verstärkte Abundanz von KCC2 in den dendritischen und von  $\beta$ PIX in den somatischen Bereichen hin.

Um Aufschluss über eine Kolokalisation von KCC2 und  $\beta$ PIX in einzelnen Zellen des Hippocampus' und Cerebellums zu erhalten, wurden mittels konfokaler Mikroskopie Aufnahmen mit einem 63x-Objektiv erstellt (Abb. 3.2 und 3.3). Zusätzlich sind Vergrößerungen von einzelnen Zellverbänden dargestellt (Bildeinsätze in Abb. 3.2 und 3.3). Der Fokus lag dabei auf den Somata der Neurone. Dementsprechend wurden die vergrößerten hippocampalen Aufnahmen ausschließlich im Str. pyramidale der CA1- und CA3-Regionen und dem Str. granulare des DG erstellt. Im Cerebellum lag das Hauptaugenmerk auf der Purkinjzellschicht. Für die Analyse einer möglichen Kolokalisation von KCC2 und  $\beta$ PIX in Dendriten und dendritischen Dornen wurden gefärbte Schnitte beider examinierter Altersstadien zur Untersuchung durch A. Ludwig nach Helsinki versendet. Ein Teil dieser Daten befindet sich in der Diskussion (Abb. 4.1).

### **3.2 Analyse der subzellulären Lokalisation von KCC2 und $\beta$ PIX in Hippocampus und Cerebellum 15 Tage alter (P15) Wildtyp-Mäuse**

Die KCC2-IR bei P15-Tieren zeigte im Str. oriens des Hippocampus eine starke Färbung des Neuropils nahe dem Str. pyramidale der CA1-Region (Abb. 3.2A). Dabei waren vereinzelte stark gefärbte Dendriten vom Neuropil abgrenzbar. Die im Str. pyramidale lokalisierten Somata der Pyramidalzellen wiesen ein gut erkennbares plasmamembranständiges und sehr ein sehr viel geringeres intrazelluläres KCC2-Signal auf. Bei Betrachtung des Str. radiatum der CA1-Region war eine starke, diffuse Färbung des Neuropils zu verzeichnen. Über dem Neuropil hoben sich vereinzelt stark immunreaktive Dendriten ab. Das Str. oriens der CA3-Region (Abb. 3.2D) zeigte eine der CA1-Region vergleichbare starke IR im Neuropil über dessen diffuser Verteilung nur einzelne Dendriten erkennbar waren. Die pyramidale Zellschicht wies demgegenüber eine schwächere KCC2-IR auf. Diese manifestierte sich in einer kräftigeren Färbung der Plasmamembranen und einer schwachen Fluoreszenz in den intrazellulären Bereichen der Somata. Im Str. lucidum der CA3-Region waren über dem punktuellen Färbemuster des Neuropils kräftige Dendriten durch eine starke plasmamembranständige KCC2-IR abgrenzbar. Im Str. moleculare des DG (Abb. 3.2G) war eine kräftige KCC2-IR im Neuropil erkennbar, über der sich vereinzelte stark fluoreszierende Dendriten abhoben. Dabei war die Färbung im gezeigten Bereich von einer gleichförmigen Intensität. Das Str. granulare des DG wies in den äußeren, dem Str. moleculare zugewandten Bereichen eine kräftige KCC2-IR an den dort befindlichen Plasmamembranen auf. Diese nahm jedoch graduell in Richtung der inneren, dem Hilus benachbarten Bereiche ab. Im Hilus selbst lag bei P15 eine dem Str. moleculare vergleichbare Fluoreszenzintensität des Neuropils vor. Über dieser waren einzelne KCC2-immunreaktive Zellkörper sowie auch Dendriten sichtbar.

Die  $\beta$ PIX-IR deutete auf eine geringe Abundanz von  $\beta$ PIX im Str. oriens der CA1-Region hin (Abb. 3.2B). Diese erstreckte sich in einem punktförmigen Färbemuster über das Neuropil und färbte die Somata der in diesem Bereich lokalisierten Interneurone an. Die Somata der Pyramidalzellen, welche im Str. pyramidale lokalisiert sind, wiesen eine starke  $\beta$ PIX-IR auf und waren nicht klar voneinander abgrenzbar. Die aus dieser Schicht in das Str. radiatum projizierenden apikalen Dendriten der Pyramidalzellen waren vereinzelt über dem dominierenden punktförmigen Verteilungsmuster im Neuropil dieser Region erkennbar. Im Str. oriens des CA3-Areales (Abb. 3.2E) lag, ebenso wie in der CA1-Region, ein punktuelles Färbemuster des Neuropils vor. Über diesem hob sich die intrazelluläre Färbung einzelner inhibitorischer Interneurone ab. Die  $\beta$ PIX-IR im Str. pyramidale der CA3-Region lag in den intrazellu-



**Abb. 3.2: Doppelfärbungen von KCC2 und  $\beta$ PIX im Hippocampus und im Cerebellum P15 alter C57Bl6-Mäuse.**

Antikörperfärbungen sagittaler Hirnschnitten von P15-Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper gegen KCC2 (N1/12; Neuromab) und einem polyklonalen anti- $\beta$ PIX-Antikörper von Millipore. **A,D,G,J** Die KCC2-Immunreaktivität (IR) erstreckt sich in allen dargestellten Bereichen des Hippocampus<sup>6</sup> (A,D,G) über Somata und Dendriten. Dabei ist die KCC2-IR in den Somata primär in den Plasmamembranbereichen abundant und intrazellulär in einem sehr viel geringeren Maße detektierbar. Im Cerebellum (J) sind die Zellen der Körnerschicht stark bis moderat gefärbt, wohingegen die Zellen der Purkinjezellschicht eine sehr deutliche IR im Bereich der Plasmamembran aufweisen, welche sich in die in der Molekularschicht befindlichen dendritischen

Plasmamembranen fortsetzt. **B,E,H,K** Die  $\beta$ PIX nachweisende IR erstreckt sich über die Somata der Zellen des Str. pyramidale der CA1- und CA3-Region sowie der des Str. granulare des DG. Dabei sind die Plasmamembranen nicht klar abgrenzbar. Auch die Dendriten im Str. radiatum der CA1-Region und im Str. lucidum der CA3-Region weisen  $\beta$ PIX-IR auf, welche allerdings aufgrund des punktuellen Färbemusters im Neuropil zum Teil nicht ganz klar erkennbar sind (B,E,H). Die Körnerschicht im Cerebellum (K) weist eine schwache  $\beta$ PIX-IR auf, wohingegen die Somata der Purkinjezellen eine sehr viel stärkere Immunfluoreszenz zeigen. Die intrazelluläre Färbung der Somata setzt sich in die in der Molekularschicht befindlichen Dendriten der Purkinjezellen fort und ist gegen den Hintergrund abgrenzbar. **C,F,I,L** Die Überlagerungsdarstellung der beiden Kanäle zeigt zunächst, dass die KCC2- und  $\beta$ IX-IR in den gleichen Zellen in den gezeigten hippocampalen Bereichen sowie im Cerebellum von P15 abundant sind. Des Weiteren ist eine Kollokalisierung von KCC2 und  $\beta$ PIX in den Plasmamembranen oder plasmamembrannahen Bereichen möglich. Größenstandard in A: 50  $\mu$ m (A-L), 20  $\mu$ m in Bildeinsätzen

lären Bereichen der Somata der Pyramidalzellen. Dennoch wies dieses Areal, wie bereits in der CA1-Region beobachtet, ein interzelluläres Färbemuster auf, in dem die Einzelzellen nicht immer ganz klar erkennbar waren. Im angrenzenden Str. lucidum der CA3-Region waren keine einzelnen  $\beta$ PIX-positiven Dendriten abgrenzbar. Stattdessen wies das Neuropil dieser Region eine diffuse, punktförmig verteilte  $\beta$ PIX-IR auf. Die Molekularschicht des DG (Abb. 3.2H) ließ neben der punktförmigen Verteilung im Neuropil keine einzelnen  $\beta$ PIX-positiven Dendriten erkennen. Die an die Molekularschicht angrenzende granuläre Schicht des DG wies eine in Richtung des Hilus' leicht zunehmende intrazelluläre Färbung der Körnerzellen auf. Der Hilus selbst zeigte eine moderate punktuelle Färbung des Neuropils und intrazellulär angefärbte Neurone. Allerdings waren auch in diesem Bereich keine einzelnen  $\beta$ PIX-positiven Dendriten erkennbar. Die Überlagerungsdarstellungen aus den verschiedenen Regionen des Hippocampus' von P15-Tieren zeigten, dass die KCC2- und  $\beta$ PIX-IR in den gleichen Zellen abundant waren. In den somatischen Abschnitten lag die KCC2-IR primär im Bereich der Plasmamembranen vor, während  $\beta$ PIX in erster Linie intrazellulär lokalisiert war. Die Immunreaktivitäten beider Proteine erstreckten sich überdies in die Bereiche des Str. radiatum der CA1- und in das Str. lucidum der CA3-Region.

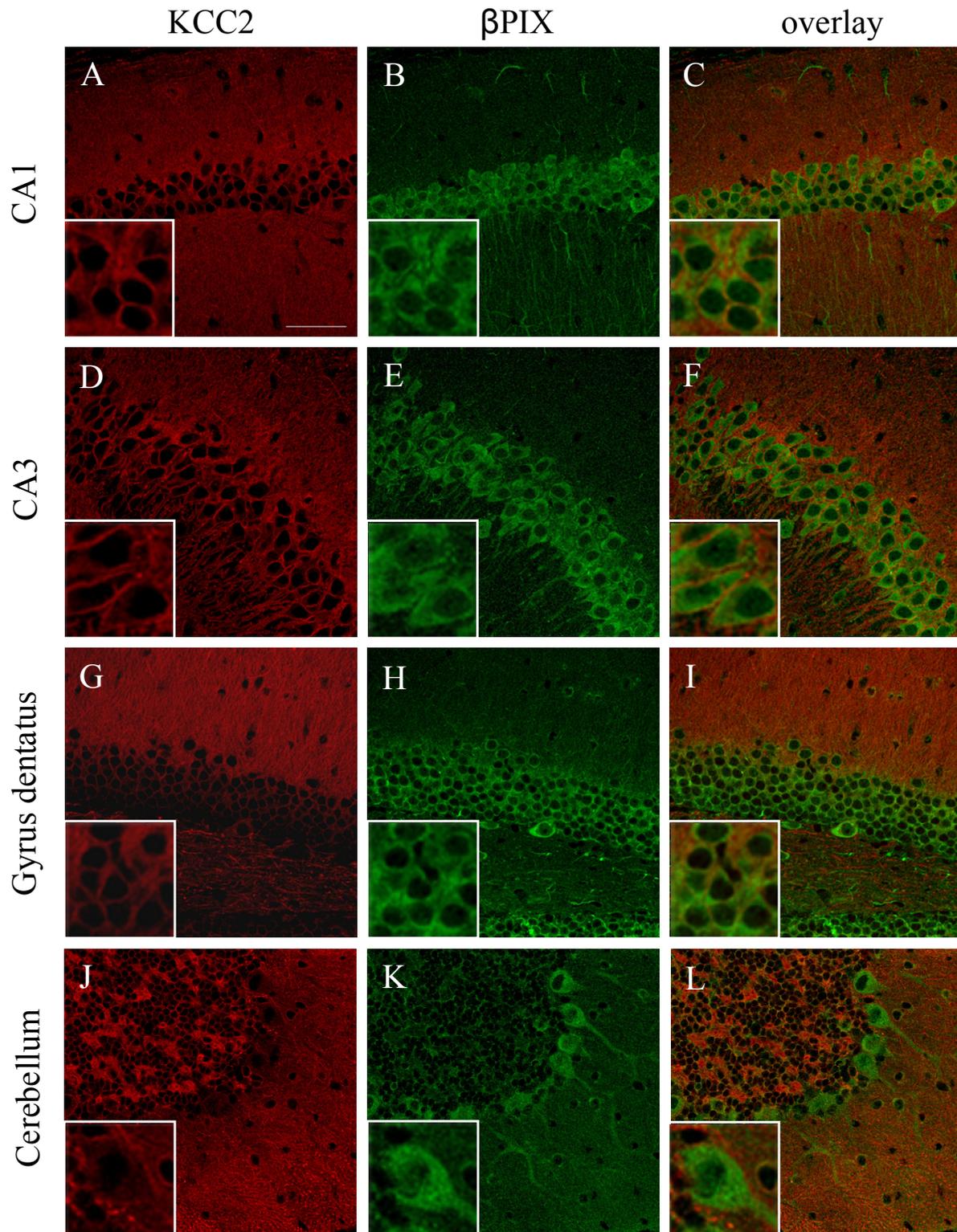
Im Cerebellum 15 Tage alter Mäuse (Abb. 3.2J) lag eine starke KCC2-IR innerhalb des Str. granulare vor. In den Körnerzellen war KCC2 in erster Linie an den Plasmamembranen lokalisiert. Die Purkinjezellen in dem der Körnerschicht caudal gelegenen Str. ganglionare wiesen eine vergleichsweise kräftige plasmamembranständige und nur moderate intrazelluläre KCC2-Abundanz auf. Die KCC2-IR im Str. moleculare erstreckte sich über die in der Molekularschicht verlaufenden Dendriten. Die Plasmamembranen der Purkinjezellhauptdendriten waren deutlich durch die KCC2-IR abgrenzbar. Des Weiteren waren in dieser Region die Plasmamembranen einzelner inhibitorischer Interneurone angefärbt.

Die  $\beta$ PIX-IR war im Str. granulare des Cerebellums (Abb. 3.2K) nur schwach. Die stärkste Intensität war im Str. ganglionare zu verzeichnen. Die Somata der Purkinjezellen wiesen un-

regelmäßige intrazellulär lokalisierte  $\beta$ PIX-IR auf. Im Bereich der Zellkerne waren große runde  $\beta$ PIX-positive Cluster zu sehen. Bei diesen Strukturen handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Kernkörperchen (Nucleoli). In der Molekularschicht lag ein in erster Linie diffuses Färbemuster vor. Die Hauptdendriten der Purkinjezellen waren in diesem Bereich klar abgrenzbar. Die Überlagerungsdarstellung beider IR im Cerebellum (Abb. 3.2L) zeigte, dass KCC2 und  $\beta$ PIX in gleichen Zellen abundant sind. Dabei war die KCC2-IR primär auf die Bereiche der Plasmamembranen begrenzt. Dies war besonders gut in den Somata erkennbar. Die  $\beta$ PIX-IR hingegen war in erster Linie in den intrazellulären Bereichen der Somata nachweisbar. Des Weiteren war eine deutliche plasmamembranständige Färbung durch KCC2 in den Hauptdendriten der Purkinjezellen detektierbar, während die  $\beta$ PIX-IR sich auch in diesen Abschnitten der Zelle auf die intrazellulären Bereiche zu beschränken schien. In diesem Altersstadium waren die in der Molekularschicht verlaufenden Dendriten, welche aus anderen cerebellaren Schichten in diesen Bereich projizieren, zwar deutlich KCC2-positiv, jedoch nicht durch die  $\beta$ PIX-IR abgrenzbar. Diese lag bei P15 eher diffus vor und ließ keine einzelnen Dendriten in der Molekularschicht erkennen.

### ***3.3 Analyse der subzellulären Lokalisation von KCC2 und $\beta$ PIX in Hippocampus und Cerebellum 30 Tage alter (P30) Wildtyp-Mäuse***

Die KCC2-Verteilung im Hippocampus 30 Tage alter C57Bl6-Mäuse (vgl. Abb. 3.3A,D,G) wies moderate Unterschiede zu der Verteilung bei 15 Tage alten Tieren auf (vgl. Abb. 3.2A,D,G). Ähnlich P15 (Abb. 3.2A,D), wies das Str. oriens des Hippocampus der CA1- und CA3-Regionen bei P30 (Abb.3.3A,D) eine starke Färbung des Neuropils nahe dem Str. pyramidale, über der einzelne Dendriten erkennbar waren. Die Somata im angrenzenden Str. pyramidale (CA1 und CA3) zeigten plasmamembranständig eine deutlich erkennbare und intrazellulär eine schwache IR. Im Neuropil des Str. radiatum der CA1-Region zeigte sich eine starke Immunfluoreszenz, über der vereinzelt apikale Dendriten von Pyramidalzellen abgrenzbar waren. Im Str. lucidum der CA3-Region waren, wie bei P15, die vergleichsweise dicken Dendriten der Pyramidalzellen aus der CA3-Region sichtbar. Im Gegensatz zu P15 waren bei P30 jedoch die großen gelappten Dornen an diesen Dendriten, welche Kontakte zu den Moosfasern aus dem DG bilden (Graumann and Sasse 2005), erkennbar. Wie auch bei P15 (Abb. 3.2G) zeigte das Str. moleculare des DG bei P30 (Abb. 3.3G) eine KCC2-IR, welche sich gut sichtbar aus dendritischen Einzelfärbungen zusammensetzte. Die bereits in Kapitel 3.1 erwähnten Intensitätsunterschiede in diesem Bereich ließen sich durch Vergleiche der 63x-Vergrößerungen auf eine augenscheinliche Zunahme der Dendritendichte zurückführen.



**Abb. 3.3: Doppelfärbungen von KCC2 und  $\beta$ PIX im Hippocampus und im Cerebellum P30 alter C57Bl6-Mäuse.**

Antikörperfärbungen sagittaler Hirnschnitten von P30-Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper gegen KCC2 (N1/12; Neuromab) und einem polyklonalen anti- $\beta$ PIX-Antikörper von Millipore. **A,D,G,H** Die KCC2-Immunreaktivität (IR) erstreckt sich in allen dargestellten Bereichen des Hippocampus<sup>1</sup> (A,D,G) über Somata und Dendriten. Dabei ist die KCC2-IR in den Somata primär in den Plasmamembranbereichen abundant und intrazellulär in einem sehr viel geringeren Maße detektierbar. Die IR von KCC2 im Cerebellum (H) ist in der Körnerschicht stark bis moderat detektierbar. Die in der Purkinjeschicht befindlichen Somata weisen eine IR auf, welche sich von der Plasmamembran in die intrazellulären Bereiche erstreckt und in diesen Zellbereichen derart

ähnliche Intensitäten aufweist, dass die Plasmamembran nicht immer klar abgrenzbar ist. In der Molekularschicht sind die Dendritenbäume der Purkinjezellen deutlich in einem zum Teil punktuellen Färbemuster abgrenzbar. **B,E,H,K** Die  $\beta$ PIX nachweisende IR erstreckt sich über die Somata der Zellen des Str. pyramidale der CA1 (B)- und CA3 (E)-Region sowie der des Str. granulare des DG (H). Dabei sind die Zellen in diesem Altersstadium klar voneinander abgrenzbar. Auch die Dendriten der CA1- und CA3-Regionen sind klar zu erkennen (B,E), wohingegen die Dendriten, welche in der Molekularschicht des DG (H) lokalisiert sind, eine schwächere IR aufweisen. Die Körnerschicht im Cerebellum (L) weist eine schwache  $\beta$ PIX-IR auf, wohingegen die Somata der Purkinjezellen sehr viel stärkere Immunfluoreszenzen zeigen. Die intrazelluläre Färbung der Somata setzt sich in die in der Molekularschicht befindlichen Dendriten der Purkinjezellen fort und ist klar gegen den Hintergrund abgrenzbar. **C,F,I,L** Die Überlagerungsdarstellung der beiden Kanäle zeigt, dass die KCC2- und  $\beta$ IX-IR in den gleichen Zellen in den gezeigten hippocampalen Bereichen bei P30 abundant sind. Des Weiteren ist eine Kolokalisation von KCC2 und  $\beta$ PIX in den Plasmemembranen oder plasmamembrannahen Bereichen nicht ausgeschlossen. Insbesondere in der Purkinjezellschicht des Cerebellums, bei welcher der intrazelluläre KCC2-Anteil sehr hoch ist, könnte eine Kolokalisation der beiden nachgewiesenen Proteine vorhanden sein. Größenstandard in A: 50  $\mu$ m (A-L), 20  $\mu$ m in Bildeinsätzen.

Im Str. granulare des DG wiesen die Perikarya der Körnerzellen in Richtung des Hilus abnehmende die KCC2-IR auf. Im Hilus war, im Gegensatz zu P15, keine diffuse Färbung des Neuropils erkennbar. Stattdessen lagen in diesem Bereich gut abgrenzbar KCC2- positive Dendriten vor. Plasmamembranöse Färbungen von Somata waren in diesem Bereich nur vereinzelt abgrenzbar. Zusammengenommen waren diese Färbemuster im Hippocampus von P30-Tieren mit den bereits 2001 von Gulyás et al. publizierten Immunfluoreszenzdaten von adulten Ratten vergleichbar.

Die  $\beta$ PIX-IR im Str. oriens der CA1- und CA3-Regionen von P30-Tieren (Abb. 3.3B,E) wies eine P15-Tieren vergleichbare Neuropilfärbung auf. Im Str. pyramidale der CA1- und CA3-Region war ein nahezu rein somatisches Färbemuster sichtbar. Im Gegensatz zu P15 waren in diesem Alterstadium die Perikarya klar voneinander abgrenzbar. Dabei wiesen die Zellkörper ein verkleinertes Volumen im Vergleich zu P15-Tieren auf, welches vermutlich ursächlich für das veränderte Bild ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich die Größe der pyramidalen Perikarya im Hippocampus von der dritten Postnatalwoche bis zum adulten Stadium um 50 % verringert (Koh and Loy 1989). In dem an das Str. pyramidale der CA1-Region angrenzenden Str. radiatum (Abb. 3.3B) hoben sich über dem diffus gefärbten Neuropil deutlich die apikalen Dendriten der Pyramidalzellen ab. Im Str. radiatum der CA3-Region (Abb. 3.3E) waren ebenfalls deutlich die Dendriten der Pyramidalzellen erkennbar, zwischen denen sich eine nur noch moderate Färbung des Neuropils manifestierte. Im Str. moleculare des DG (Abb. 3.3H) waren in der Neuropilfärbung einzelne  $\beta$ PIX-positive Dendriten hervorgehoben, dennoch nahm sich die Färbung dieser Region eher schwach gegen die des angrenzenden Str. granulare aus. Im Str. granulare, in welchem die Somata der Körnerzellen lokalisiert sind, war im Gegensatz zu P15 eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenzintensitäten zu beobachten. Dabei lag eine in erster Linie intrazelluläre Immunreaktivität vor, obgleich eine plasmamembranständige Färbung nicht ausgeschlossen werden konnte. Im benachbarten Hilus waren

über der diffusen Fluoreszenzverteilung im Neuropil einzelne Dendriten klar erkennbar. Die  $\beta$ PIX-Immunreaktivitäten im Hippocampus von 30 Tage alten C57Bl6-Mäusen zeigten große Übereinstimmungen mit denen von Park et al. 2003 veröffentlichten Verteilungsmustern von  $\beta$ PIX im adulten Rattenhippocampus.

Die Überlagerungsdarstellung im Hippocampus von P30-Tieren (Abb. 3.3C,F,I) zeigte, ebenso wie bei P15-Tieren, dass KCC2 und  $\beta$ PIX in den gleichen Zellen und überdies auch in den gleichen Abschnitten (Somata und Dendriten) einer Zelle vorkommen. Dabei erstreckte sich die KCC2-IR in erster Linie über die plasmamembranösen Areale während  $\beta$ PIX eine scheinbar ausschließlich intrazelluläre Lokalisation aufwies.

Wie auch im Cerebellum von P15-Tieren (Abb. 3.2J) wiesen auch die Plasmamembranen der im Str. granulare lokalisierten Zellen von 30 Tage alten Mäusen (Abb. 3.2J) eine starke IR für KCC2 auf. Die beiden davon peripher gelegenen Schichten, das Str. ganglionare und das Str. moleculare, zeigten Veränderungen bezüglich der KCC2-IR im Vergleich zu P15. In den Purkinjezellen des Str. ganglionare lag, verglichen mit P15, ein verändertes Verhältnis zwischen intrazellulärer und plasmamembranöser KCC2-Abundanz vor. Während bei P15 die Plasmamembranen ein klares KCC2-Signal zeigten und intrazellulär nur eine moderate KCC2-IR nachzuweisen war (vgl. Kapitel 3.2), sind bei P30 in einzelnen Zellen die Plasmamembranen dieses Zelltyps zum Teil nicht mehr klar erkennbar. Im Str. moleculare waren in erster Linie die vom Str. ganglionare in die Peripherie ziehenden Dendriten zu erkennen. In der Molekularschicht sind zum Teil die ausgewachsenen Dendritenbäume der Purkinjezellen erkennbar. Diese weisen mitunter ein punktuellles Färbemuster auf. Dies stimmt mit den Befunden von Williams et al. 1999 überein. Das punktuellle Färbemuster im Neuropil ist wahrscheinlich auf angeschnittene Dendriten von Stern- und Korbzellen zurückzuführen. Zwischen den KCC2-immunreaktiven Dendriten und Dornen waren weiterhin die Plasmamembranen der Stern- und Korbzellen klar erkennbar.

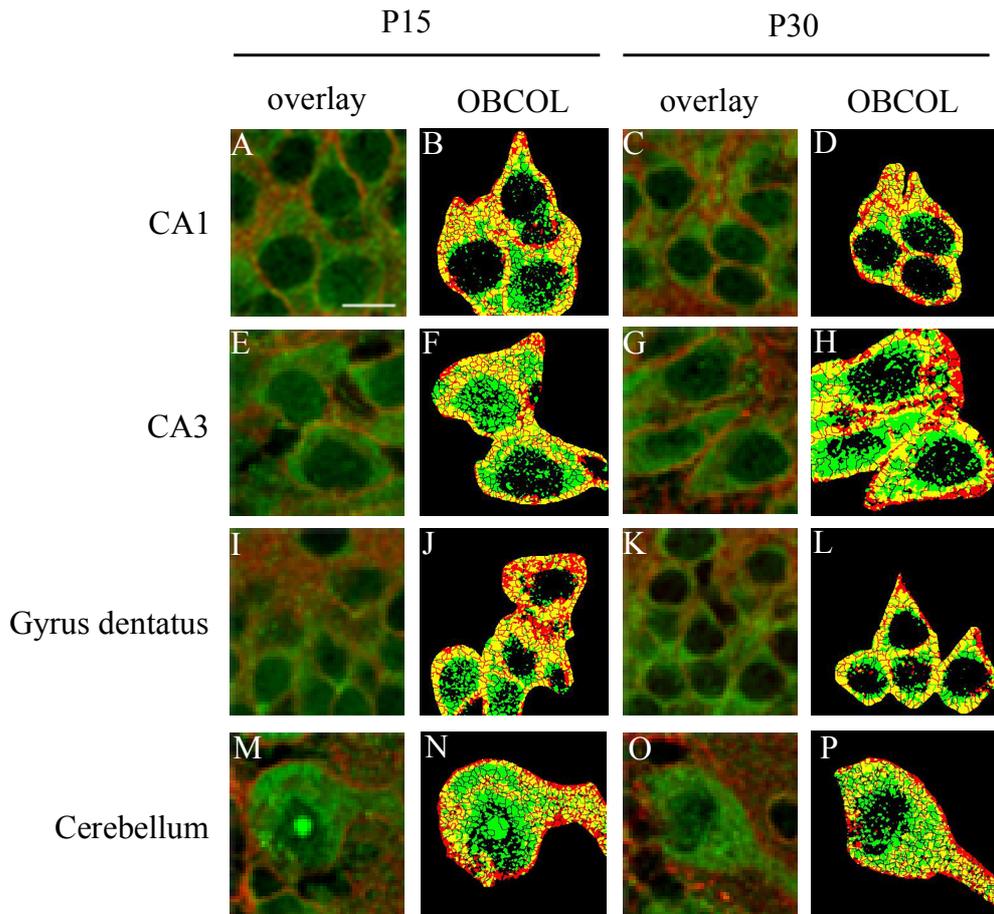
Die  $\beta$ PIX-IR im Str. granulare des Cerebellums bei P30 (Abb. 3.3K) wies keine augenscheinlichen Veränderungen im Vergleich zu P15 auf (Abb. 3.2K). In den in diesem Bereich lokalisierten Zellen schien  $\beta$ PIX nur in geringem Maße abundant zu sein. Im Bereich der Purkinjezellen (Str. ganglionare) war eine starke Immunfluoreszenz im intrazellulären Bereich der Somata zu verzeichnen. Die im Str. moleculare lokalisierten primären Dendritenbäume der Purkinjezellen, welche in Abbildung 3.3K in angeschnittener Form sichtbar sind, wiesen nach wie vor eine intrazelluläre  $\beta$ PIX-IR auf, welche sich deutlich von der Färbung des Neuropils abhob. Neben den Dendriten der Purkinjezellen waren in der Molekularschicht Neuriten erkennbar, welche vom Str. ganglionare in die Peripherie der Molekularschicht zogen. Auf-

grund der nachgewiesenen Abundanz von  $\beta$ PIX in Axonen (Park et al. 2003) handelte es sich dabei mit großer Wahrscheinlichkeit um Kletterfasern, welche aus der Körner- in die Molekularschicht projizieren. Des Weiteren wiesen in diesem Altersstadium auch die in der Molekularschicht befindlichen Korb- und Sternzellen eine deutliche  $\beta$ PIX-IR auf.

Die Überlagerungsdarstellung (Abb. 3.3L) ließ erkennen, dass sich die IR beider Proteine auf die gleichen Zellen erstreckten und sowohl in den Somata als auch den Dendriten abundant waren. Dabei befand sich die KCC2-IR in Somata der Purkinjezellen zu nahezu gleichen Teilen plasmamembranös und intrazellulär, wohingegen die  $\beta$ PIX-IR sich auf die intrazellulären Bereiche der Zelle zu beschränken schien. Darüber hinaus waren beide Proteine in den Dendriten und in den Stern- und Korbzellen der Molekularschicht abundant.

### ***3.4 Analyse der Kolokalisation von KCC2 und $\beta$ PIX in Hippocampus und Cerebellum von 15 und 30 Tage alten Wildtyp-Mäusen***

In den vorangestellten immunhistochemischen Darstellungen konnte eine Kolokalisation von KCC2 und  $\beta$ PIX nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die KCC2-IR ist, wie bereits unter Kapitel 3.2 und 3.3 erwähnt, kräftig an der Plasmamembran und intrazellulär vergleichsweise schwach. Im Gegensatz dazu liegt in den intrazellulären Bereichen ein sehr starkes  $\beta$ PIX-Signal vor. Um auszuschließen, dass die mangelnde Gelbfärbung (Overlay der roten KCC2-IR und der grünen  $\beta$ PIX-IR) darauf zurückzuführen ist, dass eines der beiden Signale sehr viel intensiver ist als das andere, wurden einzelne Zellen weitergehend analysiert. Diese Analyse wurde mittels des ImageJ-Plugins OBCOL (**O**rganelle-**b**ased **C**olocalization) durchgeführt. Mittels dieser Software können Kolokalisationen intensitätsunabhängig untersucht werden. Die Analyse basiert auf der Abundanz von Pixeln in bestimmten Strukturen (z. B. Membranen, Transportvesikel oder ER). Das bedeutet, dass diffuse Signale, aus welchen zufällige Überlappungen resultieren, aus der Kolokalisationsanalyse ausgeschlossen werden (Woodcroft et al. 2009). Für die nachfolgenden Abbildungen wurden zunächst einzelne Zellen bzw. kleine Zellverbände aus den unbearbeiteten Originalbildern herausgeschnitten und auf einen schwarzen Hintergrund transferiert. Dies wurde für beide Kanalaufnahmen getrennt voneinander durchgeführt. Wie unter Kapitel 2.9.3 beschrieben, wurde das Hintergrundrauschen herausgefiltert und ein Schwellenwert ermittelt, unterhalb dessen alle Signale eliminiert wurden. Anschließend wurde die Kolokalisations-Funktion gestartet und die gegeneinander abgeglichenen Bilder konnten in den ursprünglichen Farben in Form einer intensitätsun-



**Abb. 3.4: Kolokalisationsanalyse von KCC2 und  $\beta$ PIX in Hippocampus und Cerebellum von 15 und 30 Tage alten C57Bl6-Mäusen.**

A,C,E,G,I,K,M,O Dargestellt sind konfokale Overlayaufnahmen aus den hippocampalen Regionen CA1(A,C), CA3 (E,G) und DG (I,K) von P15 (A,E,I) und P30 (C,G,K) Tieren, sowie aus der Purkinjeschicht des Cerebellums (M,O) von P15 (M) und P30 (O) Mäusen. In diesen Darstellungen sind im Overlay möglicherweise auf Grund der starken plasmamembranständigen IR von KCC2 und der ebenfalls kräftigen intrazellulären  $\beta$ PIX-IR keine Kolokalisierungen sichtbar. B,D,F,H,J,L,N,P Die abgebildeten Zellen wurden über das ImageJ-Plugin OBCOL analysiert und in einer intensitätsunabhängigen Überlappungsabbildung dargestellt. Die roten Bereiche stehen für KCC2, die grünen für  $\beta$ PIX und die gelben kennzeichnen den Overlay beider Proteine. Im Str. pyramidale der CA1- und CA3-Region sowie im Str. granulare des DG von P15- (B,F,J) und P30-Tieren (D,H,L) ist eine plasmamembranständige aber auch eine intrazelluläre Gelbfärbung erkennbar. Die Purkinjeschicht des Cerebellums (N,P) deutet bei beiden Altersstadien auf eine geringe plasmamembranöse und stärkere subplasmamembranöse Kolokalisation hin. Größenstandard in A: 10  $\mu$ m.

abhängigen Pixel-Darstellung angezeigt werden. In Abbildung 3.4 sind die Originalbilder aus den Bereichen der Somata der CA1- und CA3-Region sowie des DG und des Cerebellums beider Altersstadien (Abb. 3.4A,C,E,G,I,K,M,O) den mittels ImageJ erstellten Pixeldarstellungen (Abb. 3.4B,D,F,H,J,L,N,P) direkt gegenübergestellt.

Die über OBCOL erstellten Abbildungen (Abb. 3.4B,D,F,H,J,L,N,P) deuteten auf eine Kolokalisation von KCC2 und  $\beta$ PIX in den Somata aller dargestellten Bereiche bei beiden Altersstadien hin, welche bei den originalen immunhistochemischen Abbildungen (Abb. 3.4A,C,E,G,I,K,M,O) nicht erkennbar waren. Dabei erstreckte sich die Überlappung der beiden IR in

den hippocampalen Regionen (Abb. 3.4B,D,F,H,J,L) über die Plasmamembran und direkt angrenzende submembranöse Bereiche. Vereinzelt waren auch intrazelluläre Kolokalisationen zu verzeichnen. Dabei schienen von P15 bis P30 keine starken Veränderungen vorzustatten zu gehen. In den Somata der Purkinjezellen des Cerebellums (Abb. 3.4N,P) lag bei beiden Altersstadien eine etwas schwächere plasmamembranöse Kolokalisation vor. Intrazellulär waren in beiden Altersstadien gelbe Pixel zu sehen, welche allerdings, wie bereits in den hippocampalen Bereichen, in den Vergrößerungen der histochemischen Bilder (Abb. 3.4M,O) nicht sichtbar waren.

Obgleich eine gemeinsame Funktion von KCC2 und  $\beta$ PIX im Bezug auf die Dornenmorphogenese nicht ausgeschlossen kann, lieferten die Daten der vorliegenden Arbeit starke Hinweise auf eine Interaktion der beiden Proteine im somatischen Bereich neuronaler Zellen. Die Kolokalisation von KCC2 und  $\beta$ PIX beschränkte sich dabei weitestgehend auf die Plasmamembran sowie angrenzende Bereiche. Daher ist es möglich, dass  $\beta$ PIX einen Einfluss auf die Transportaktivität von KCC2 ausübt. Dies sollte in nachfolgenden Untersuchungen im HEK293-Zellsystem überprüft werden.

### **3.5 Charakterisierung der stabil KCC2 exprimierenden HEK293-Zelllinie**

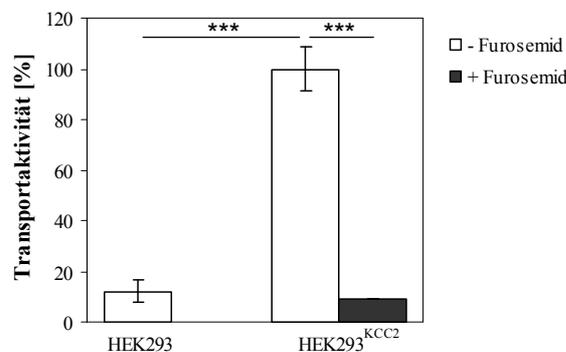
In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Pharmaka und Agenzien sowie unterschiedlicher Proteine auf die Transportaktivität von KCC2 untersucht werden. Heterologe Expressionen können auf Grund statistischer Schwankungen in der Transfektionseffizienz mitunter starken Variabilitäten unterworfen sein. Daher wurde auf eine stabil mit KCC2 transfizierte HEK293-Zelllinie (HEK293<sup>KCC2</sup>) zurückgegriffen. Die Verwendung dieser Zelllinie ermöglicht es darüber hinaus, anstelle von Doppel- oder gar Dreifachtransfektionen auf Einfach- und Doppeltransfektionen zurückzugreifen. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, KCC2 und die zu untersuchenden putativen Effektoren in den gleichen Zellen vorzufinden.

Über im Vorfeld angefertigte immunzytochemische Färbungen der HEK293<sup>KCC2</sup>-Linie mit einem monoklonalen Antikörper konnte bereits die Expression von KCC2 in dieser Linie nachgewiesen werden. Im Zuge dieser Färbungen wurden auch HEK293-Wildtyp-Zellen negativ auf eine KCC2-Expression getestet (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus ist in vorangegangenen Arbeiten bereits ausführlich dokumentiert worden, dass HEK293-Zellen kein endogenes KCC2 exprimieren (Wenz 2008).

Um festzustellen, ob und inwiefern der unter den gewählten Bedingungen in der stabilen Linie detektierbare Rubidiumflux auf KCC2 zurückzuführen ist, wurden eingangs Experimente unter dem Einfluss von Furosemid durchgeführt. Dieses Agens ist ein Schleifendiuretikum,

welches KCC2 mit einem  $IC_{50}$  von  $50 \mu\text{M}$  inhibiert (Hartmann et al. 2010). Für die vollständige Inhibition von KCC2 wurden HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen für 25 Minuten mit 2 mM Furosemid behandelt und die Transportaktivität mittels eines Rubidiumaufnahme-Assays ermittelt. Zu Vergleichszwecken wurde die Rubidiumaufnahme in unbehandelten HEK293- und HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen ebenfalls bestimmt. Um die gemessene Transportaktivität auf KCC2 beschränken zu können, wurde anstelle von  $\text{Na}^+$  NMDG verwendet. Dadurch wird der natriumabhängige Transport durch den endogen in HEK293 vorliegenden NKCC1 unterbunden. Des Weiteren wurde den benutzten Puffern Ouabain beigegeben, um die Aktivität der endogenen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zu inhibieren.

In Abbildung 3.5 sind die Rubidiumaufnahmeleistungen von unbehandelten HEK293- und HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen sowie von stabil mit KCC2 transfizierten HEK293-Zellen nach Furosemid-Behandlung dargestellt. Die Werte sind auf unbehandelte HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen als 100 % normiert. Durch die Behandlung mit Furosemid konnte die Transportaktivität in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen, welche durch die stabile Transfektion mit KCC2 um beinahe 10-fach höher war als in HEK293-Wildtyp-Zellen ( $100 \pm 8,4 \%$  zu  $12,1 \pm 4,5 \%$ ) vollständig inhibiert werden ( $9,0 \pm 0,1 \%$ ). Das bedeutet, dass der in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen gemessene Rubidiumfluss fast ausschließlich auf KCC2 zurückzuführen ist.

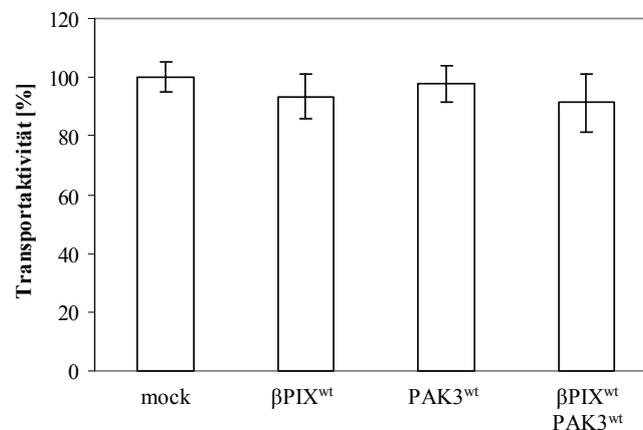


**Abb. 3.5: Transportaktivität in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen unter Einfluss von Furosemid.**

Stabil mit KCC2 transfizierte HEK293-Zellen (HEK293<sup>KCC2</sup>) wurden für 25 Minuten mit 2 mM Furosemid behandelt und die Transportaktivität von KCC2 mittels  $^{86}\text{Rb}^+$ -Messungen ermittelt. Zusätzlich wurden unbehandelte Wildtyp-HEK293-Zellen bezüglich ihrer Transportaktivität vermessen. Die nach Expression von KCC2 erhöhte Transportaktivität in HEK293-Zellen ist vollständig durch 2 mM Furosemid (25 min) blockierbar. Die ermittelten Werte sind auf die Mock-Transfektion in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen als 100% normiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.  $n \geq 3$ . ( $p \leq 0,001$ , \*\*\*, Student's *t*Test)

### 3.6 Einfluss von $\beta$ PIX und seinem Interaktionspartner PAK3 auf die Transportaktivität von KCC2

KCC2 wird unter anderem durch die Aktivität von Kinasen in seiner Funktion und Lokalisation reguliert (vgl. Kapitel 1.1.3; Lee et al. 2007; Payne et al. 2003; Wake et al. 2007).  $\beta$ PIX stimuliert über die Aktivierung kleiner GTPasen die Kinaseaktivität von PAK (Brown et al. 2002; Loo et al. 2004). Dementsprechend stellt PAK einen putativen Mediator für die Wirkung von  $\beta$ PIX auf KCC2 dar. In der vorliegenden Arbeit wurde daher überprüft, ob  $\beta$ PIX und PAK3 alleine oder in Kombination einen Einfluss auf die Transportaktivität von KCC2 ausüben. Dazu wurden  $\beta$ PIX und PAK3 in Einzel- oder Doppeltransfektionen in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen eingebracht. Die Zellen wurden 36 bis 48 h nach der Transfektion von den 10 cm-Platten abgelöst und auf PLL-beschichtete 6-Loch-Platten ausgesät. Anschließend wurden sie vor der Präinkubation zwecks Anheftung und Erholung 3 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Transportaktivität von KCC2 wurde in NMDG- und Ouabain-haltigen Puffern über Rubidium-Fluxmessungen ermittelt und die gemessenen Aktivitäten auf mit pcDNA3.1 (mock-) transfizierte HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen normiert.



**Abb. 3.6: Transportaktivität von KCC2 in Abhängigkeit von  $\beta$ PIX und PAK3.**

Das GEF-Protein  $\beta$ PIX, die Kinase PAK3 oder eine Kombination beider wurden heterolog in stabil mit KCC2 transfizierten HEK293-Zellen (HEK293<sup>KCC2</sup>) exprimiert und die Transportaktivität von KCC2 mittels <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-Fluxmessungen ermittelt. Vermessen wurden jeweils 3 technische Replikate pro unabhängiges Experiment, von denen mindestens 2 durchgeführt wurden. Weder bei den Einzel- noch bei der Doppeltransfektion waren signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Mock-Transfektion detektierbar. Die ermittelten Werte sind auf die Mock-Transfektion (pcDNA-3) als 100 % normiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

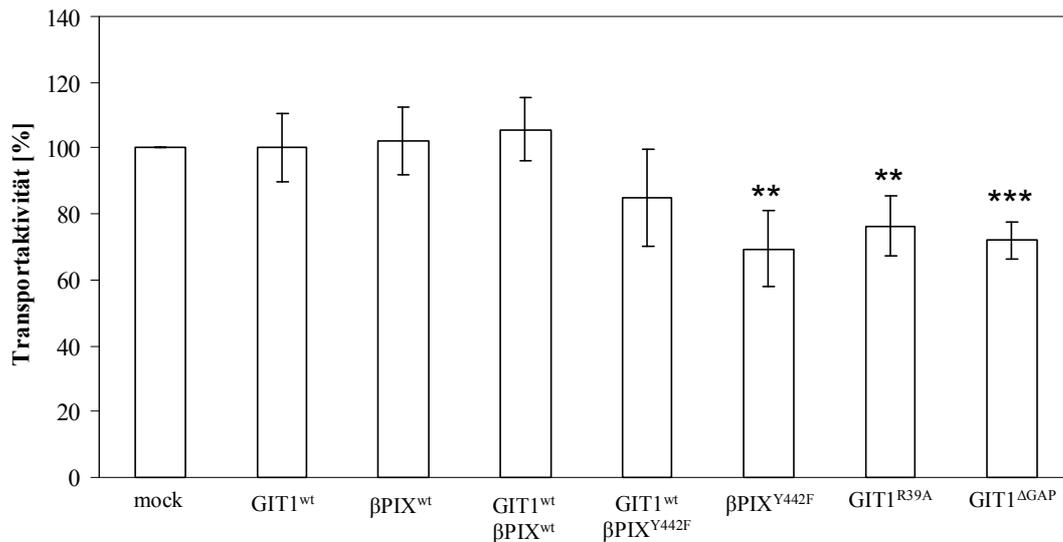
Abbildung 3.6 zeigt, dass weder die Überexpression von  $\beta$ PIX oder PAK3 alleine, noch die Kombination beider einen Einfluss auf die Transportaktivität von KCC2 hat. Die ermittelten Transportaktivitäten der Mock-Transfektion wiesen eine Standardabweichung von 5,11 % auf. Die nach Überexpression ermittelten Transportaktivitäten von KCC2 zeigen leichte Vari-

ationen unter Einfluss von  $\beta$ PIX ( $93,5 \pm 7,5 \%$ ), PAK3 ( $97,9 \pm 6,4 \%$ ) oder einer Kombination beider Proteine ( $91,4 \pm 9,9 \%$ ). Allerdings ergaben sich keine signifikanten Abweichungen ( $p \geq 0,05$ ).

### 3.7 Funktionsanalyse von KCC2 unter Einfluss von $\beta$ PIX und GIT1

Aufgrund der verschiedenen Rollen, welche  $\beta$ PIX, auch im Zusammenspiel mit GIT1, bezüglich der Endozytose verschiedener Proteine nachgewiesen wurde (vgl. Kapitel 1.2.2), schien eine Auswirkung von  $\beta$ PIX auf die Oberflächenexpression von KCC2 denkbar. Dafür wurde die KCC2-Transportaktivität als indirektes Maß für die Oberflächenlokalisation verwendet. Um die Wirkung von  $\beta$ PIX und GIT1 auf KCC2 zu ermitteln, wurden sie einzeln oder in Kombination heterolog in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen exprimiert. Darüber hinaus standen Mutanten beider Proteine zur Verfügung. Dabei handelte es sich im Fall von  $\beta$ PIX um eine Y442F-Punktmutante, welche keine GEF-Aktivität gegenüber der kleinen GTPase Cdc42 mehr besitzt und die Endozytose des EGFR einleitet (Feng et al. 2006). Bei den GIT1-Mutanten hingegen wurde die für das Recycling des TfR essentielle GAP-Aktivität (Za et al. 2006) zum einen durch eine Punktmutation (GIT1<sup>R39A</sup>) und zum anderen durch eine Deletion (GIT1 <sup>$\Delta$ GAP</sup>) entfernt. Die transfizierten Zellen wurden 24 h nach der Transfektion auf 6-Loch-Platten ausgesät und vor der Messung für weitere 12-15 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Brutschrank inkubiert. Die Transportaktivität von KCC2 wurde in NMDG- und Ouabain-haltigen Puffern über Rubidium-Fluxmessungen ermittelt und die gemessenen Aktivitäten auf mock-transfizierte HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen normiert.

In Abbildung 3.7 sind die Ergebnisse von 5 unabhängigen KCC2-Aktivitätsmessungen unter Einfluss von  $\beta$ PIX und GIT1 sowie ihren Mutanten zusammengefasst. Es stellte sich heraus, dass die heterologe Expression der Wildtypen beider Proteine keine Veränderung der Fluxaktivität von KCC2 zur Folge hatte (GIT1<sup>wt</sup>:  $100,3 \pm 9,3 \%$ ;  $\beta$ PIX<sup>wt</sup>:  $102,1 \pm 9,1 \%$ ). Auch die Kombination des GIT1-Wildtyps mit  $\beta$ PIX<sup>wt</sup> ( $105,8 \pm 8,7 \%$ ) bzw.  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> ( $85,0 \pm 13,0 \%$ ) resultierte in unveränderter KCC2-Aktivität ( $p \geq 0,05$ ). Unter Einfluss der einzeln überexprimierten Mutanten von  $\beta$ PIX und GIT1 ließ sich jedoch ein signifikanter Effekt auf die Transportaktivität verzeichnen. Die Überexpression der Y442F-Mutante von  $\beta$ PIX hatte einen Rückgang in der gemessenen Fluxaktivität von 30 % im Vergleich zur Mock-Transfektion zur Folge (auf  $69,5 \pm 10,3 \%$ ). Auch die ArfGAP-defizienten GIT1-Mutanten hatten einen negativen Einfluss auf den durch KCC2 vermittelten Rubidiumtransport und führten zur Reduktion um 24 (GIT1<sup>R39A</sup>;  $76,3 \pm 8,1 \%$ ) bis 28 % (GIT1 <sup>$\Delta$ GAP</sup>;  $72,1 \pm 5,2 \%$ ). Die Veränderungen

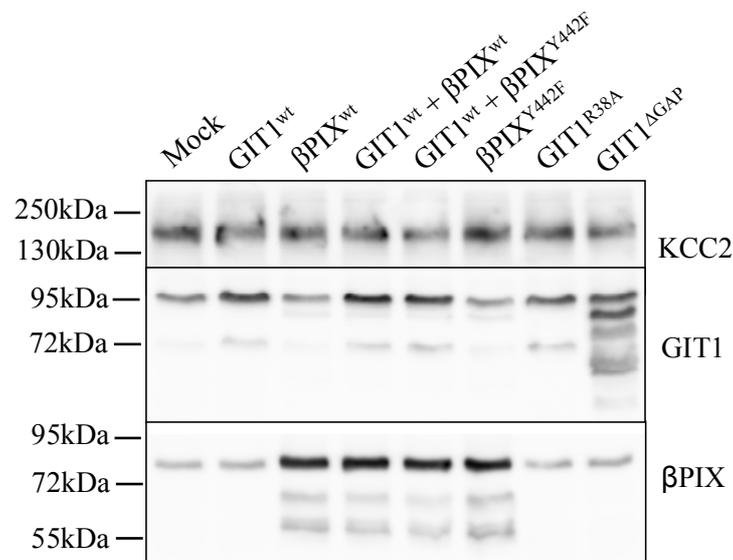


**Abb. 3.7: Transportaktivität von KCC2 in Abhängigkeit von βPIX und GIT1.**

Stabil mit KCC2 transfizierte HEK293-Zellen (HEK293<sup>KCC2</sup>) wurden mit GEF-Protein βPIX und/oder dem GAP-Protein GIT1 bzw. Mutanten dieser beiden Proteine transfiziert und die Transportaktivität mittels <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-Fluxmessungen ermittelt. Wt, Wildtyp, βPIX<sup>Y442F</sup>, ein βPIX ohne GEF-Aktivität für Cdc42, GIT1<sup>R39A</sup> und GIT1<sup>ΔGAP</sup> sind GIT1 Mutanten ohne GAP-Aktivität. Die Wildtypen von βPIX und GIT1 hatten keinen Einfluss auf die Transportaktivität von KCC2. Die Kombination von GIT1<sup>wt</sup> mit βPIX<sup>Y442F</sup> zeigte ebenfalls keinen signifikanten Effekt. Die heterologe Expression von βPIX<sup>Y442F</sup> und GIT1<sup>R39A</sup> sowie GIT1<sup>ΔGAP</sup> führte zu einem signifikanten Absinken der Transportaktivität von KCC2 auf 69,46 ± 11,56 % (βPIX<sup>Y442F</sup>), 76,26 ± 9,02 % (GIT1<sup>R39A</sup>) bzw. 72,09 ± 5,73 % (GIT1<sup>ΔGAP</sup>) der Kontrolle. Die ermittelten Werte sind auf die Mock-Transfektion (pcDNA-3) als 100 % normiert. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n ≥ 3. (p ≤ 0,01, \*\*, p ≤ 0,001, \*\*\*, Student's *t*Test)

bezüglich der Transportaktivität waren dabei hoch (p ≥ 0,01; βPIX<sup>Y442F</sup> und GIT1<sup>R39A</sup>) bis höchst (p ≥ 0,001; GIT1<sup>ΔGAP</sup>) signifikant. Mittels immunzytochemischer Färbungen mit gegen die Tags (vgl. Tabelle 2.1) gerichteten Antikörpern wurden die Transfektionseffizienzen von βPIX und GIT1 sowie ihrer Mutanten in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen auf etwa 25 – 35% abgeschätzt (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend scheint die Überexpression der Mutanten die Transportaktivität in den transfizierten Einzelzellen nahezu vollständig zum Erliegen zu bringen. Zum gezielten Nachweis der Überexpression der jeweiligen Proteine in den einzelnen Experimenten, wurde bei jeder Transfektion für eine Aktivitätsmessung jeweils etwa die Hälfte der Zellen für einen Immunoblot präpariert (vgl. Kapitel 2.6.1). Die PVDF-Membran wurde nacheinander mit Antikörpern gegen KCC2, GIT1 und βPIX inkubiert und das an den sekundären Antikörper gekoppelte HRP-Signal nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Luminol detektiert. Der in Abbildung 3.8 dargestellte Immunoblot zeigt auf einer Höhe zwischen 130 und 250 kDa eine Bande. Das Molekulargewicht entspricht mit ~ 150 kDa dem in HEK293-Zellen höher glykosylierten KCC2-Monomer (Williams et al. 1999). Zwischen den einzelnen Bahnen lag im Bezug auf die Intensitäten der KCC2-Banden augenscheinlich kein Unterschied vor. Somit

war eine Verringerung des Expressionsniveaus als Ursache für das Absinken der KCC2-Transportaktivitäten unter Überexpression der  $\beta$ PIX- und GIT1-Mutanten auszuschließen. Mittels des GIT1-Antikörpers wurde in den Bahnen 1, 3 und 6 das in HEK293-Zellen endogen exprimierte GIT1 sichtbar. Die Überexpression von GIT1<sup>wt</sup> und GIT1<sup>R39A</sup> ließ sich anhand einer Intensivierung der 95 kDa-Bande sowie an der Abundanz einer zweiten Bande bei etwa 72 kDa nachweisen. Einzig bei der Überexpression von der GIT1 <sup>$\Delta$ GAP</sup>-Mutante wurde ein Muster bestehend aus 5 Banden ersichtlich, welches auf einen verstärkten Abbau dieses Proteins schließen ließ. Über die Inkubation des Immunoblots mit einem anti- $\beta$ PIX-Antikörpers ließ sich das endogen vorliegende  $\beta$ PIX mit einer Größe von zwischen 72 und 95 kDa ( $\sim$  85 kDa) nachweisen. Die exogene Expression der  $\beta$ PIX-Konstrukte resultierte in einer Verstärkung der Bande zwischen 72 und 95 kDa. Darüber hinaus waren drei zusätzliche Banden unterhalb der 72 kDa-Markierung detektierbar, welche aller Wahrscheinlichkeit Abbauprodukte darstellen.



**Abb. 3.8: Überprüfung der Expression der transfizierten Konstrukte und der KCC2-Abundanz mittels Immunoblots.**

Es wurden jeweils 40  $\mu$ g der aus HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen isolierten Proteine auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. Für KCC2 konnte eine Bande im Bereich oberhalb der 130 kDa detektiert werden, welche bezüglich der Größe dem Monomer von KCC2 entspricht. Zwischen den einzelnen Bahnen liegt im Bezug auf die Intensitäten der KCC2-Banden augenscheinlich kein Unterschied vor. Die Überexpression von GIT1<sup>wt</sup> und GIT1<sup>R39A</sup> führt zu einer Verstärkung der aus endogenen GIT1 resultierenden Bande und einem zweiten Signal bei  $\sim$ 72kDa. Die Überexpression von der GIT1 <sup>$\Delta$ GAP</sup>-Mutante stellt sich in einem Muster bestehend aus 5 Banden dar. Mittels des anti- $\beta$ PIX-Antikörpers lässt sich das endogen vorliegende  $\beta$ PIX mit einer Größe von zwischen 72 und 95 kDa nachweisen. Die heterologe Expression der  $\beta$ PIX-Konstrukte resultiert in einer Verstärkung der Bande zwischen 72 und 95 kDa und in drei zusätzlichen Banden unterhalb der 72 kDa-Markierung.

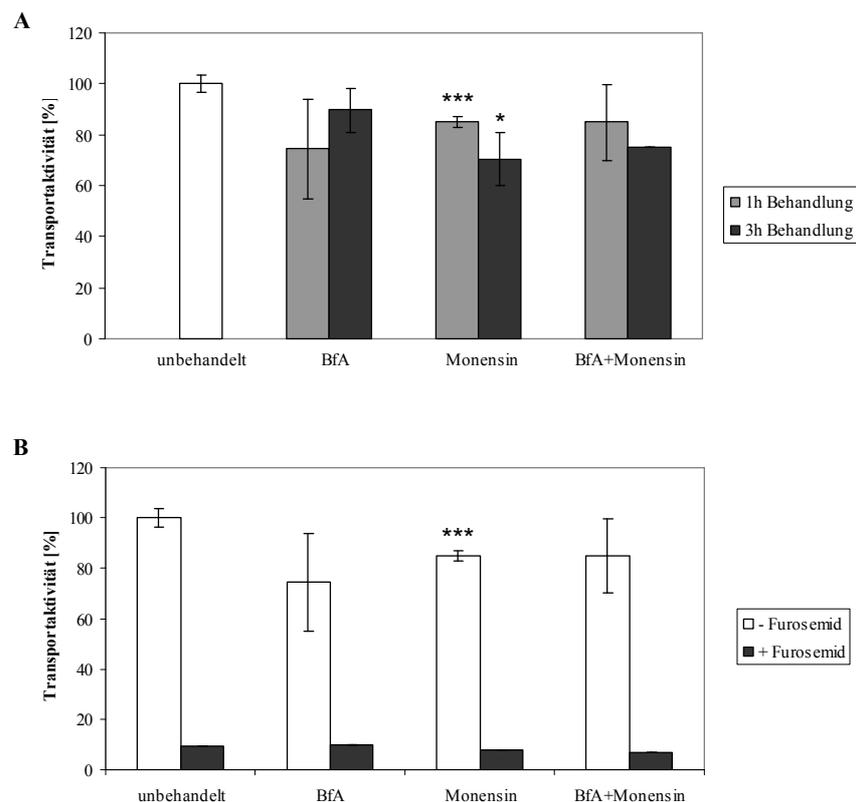
Insgesamt zeigen die Daten, dass die Überexpression der  $\beta$ PIX- und GIT1-Mutanten nicht jedoch der entsprechenden Wildtypen einen inhibierenden Effekt auf die Transportaktivität von KCC2 ausüben. Dabei bleibt das Expressionslevel von KCC2 jedoch augenscheinlich unverändert.

### ***3.8 Etablierung eines Endozytose-Modells für KCC2 in HEK293-Zellen***

#### **3.8.1 Pharmakologische Inhibition des KCC2-Traffickings in HEK293-Zellen**

Auf Grund der unter Kapitel 3.7 dargestellten Daten ist es möglich, dass  $\beta$ PIX im Zusammenspiel mit GIT1 eine Funktion beim Trafficking von KCC2 übernimmt. In akuten hippocampalen Schnitten weist KCC2 einen erhöhten Turnover mit einer Zeitkonstante  $\tau$  von  $19 \pm 1$  min auf (Rivera et al. 2004). In HEK293-Zellen konnte bislang gezeigt werden, dass KCC2 über die Clathrin-vermittelte Endozytose innerhalb von 30 Minuten das endosomale Kompartiment erreicht. Von diesem perinukleären Bereich ausgehend wird KCC2 dem Recycling-Weg zugeführt und zur Membran zurücktransportiert (Zhao et al. 2008). Um einen Eindruck zu bekommen, in welchem Maße KCC2 in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen recycelt wird, wurden Pharmaka verwendet. Der Vorteil in der pharmakologischen Inhibition einzelner Transportwege besteht darin, dass die verwendeten Substanzen auf alle Zellen im gleichen Maße wirken. Dadurch ist es möglich, anhand der ermittelten Werte direkt auf die Relationen zwischen den Transportwegen zu schließen. Dafür fanden in der vorliegenden Arbeit das Lacton-Antibiotikum Brefeldin A (BfA) und das Na<sup>+</sup>-Ionophor Monensin Verwendung. Die Wirkung von BfA besteht dabei in der Inhibition von ADP-Ribosylierungsfaktoren. Dadurch wird der Golgi-Apparat in Struktur und Funktion gestört und der anterograde Transport von ER zum Golgi Apparat unterbunden (Fujiwara et al. 1988; Klausner et al. 1992; Helms and Rothman 1992; Solé et al. 2009). Das Na<sup>+</sup>-Ionophor Monensin hingegen inhibiert durch den Antiport von H<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> die Ansäuerung endosomatischer Vesikel (Malecki et al. 2002). Auf diese Weise unterbricht es zum einen das Trafficking aus dem Recycling-Kompartiment zur Membran (Pheng et al. 2003) und zum anderen den Transport innerhalb des Golgi-Apparates (Rosa et al. 1992). Die Wirksamkeit dieser beiden Pharmaka auf die Oberflächenexpression von KCC2 in HEK293-Zellen wurde indirekt über die Transportaktivität ermittelt. Auf Grund der bekannten Wirkungen wurde erwartet, dass die Differenz zwischen den Effekten von BfA und Monensin die Recyclingrate widerspiegelt. Da beide Pharmaka auf verschiedenen Wegen den Transport von neu synthetisiertem KCC2 an die Plasmamembran unterbinden sollten war bei gemeinsamer Verwendung beider Substanzen kein additiver Effekt zu erwarten.

Stabil mit KCC2-transfizierte Zellen (HEK293<sup>KCC2</sup>) wurden zunächst für 1 oder 3 h mit 10 µg/ml BfA (Loo et al. 2008), 50 µM Monensin (Koch et al. 2005) oder der Kombination beider Substanzen behandelt. Dafür wurden die Pharmaka in der entsprechenden Konzentration dem Medium beigegeben und die Zellen bis zum Ablauf des gewünschten Zeitintervalls bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> belassen. Zusätzlich wurden unbehandelte Kontrollen mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen zunächst für 15 Minuten mit Pharmaka-freiem Präinkubations- und anschließend 10 Minuten mit einem entsprechenden Inkubationspuffer inkubiert. Um herauszufinden, inwieweit die pharmakologischen Effekte auf KCC2



**Abb. 3.9: Transportaktivität von KCC2 in unter Einfluss von Brefeldin A (BfA) und des Na<sup>+</sup>-Ionophors Monensin.**

Die Transportaktivität von KCC2 wurde mittels <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-Messungen unter Einfluss verschiedener Pharmaka ermittelt. Dabei wurden die Pharmaka in der angegebenen Konzentration in das Wachstumsmedium gegeben. Die Inkubationszeit mit <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> betrug 10 Minuten in Inkubationspuffer, welcher keines der Pharmaka enthielt. Das in (B) verwendete Furosemid war sowohl dem Prä- als auch dem Inkubationspuffer beigegeben.

**A** Stabil mit KCC2 transfizierte HEK293-Zellen (HEK293<sup>KCC2</sup>) wurden für 1 und 3 h mit 10 µg/ml BfA und/oder 50 µM Monensin behandelt. Während die Behandlung mit BfA ± Monensin keine signifikanten Effekte zur Folge hatte, führte die Applikation von 50 µM Monensin nach einer Stunde zu einem Rückgang der Transportaktivität um 15 %. Nach zwei weiteren Stunden unter Monensin betrug die Transportaktivität von KCC2 noch 70 % der Kontrolle (unbehandelt). **B** Bestimmung der Transportaktivität nach einer Stunde Behandlung mit BfA und/oder Monensin ± Furosemid (2 mM, 25 Minuten). Die durch Monensin-Behandlung bereits um 15 % reduzierte Transportaktivität ist durch Furosemid ebenso blockierbar, wie bei unbehandelten Zellen. Die ermittelten Werte sind auf die Mock-Transfektion in unbehandelten HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen als 100% normiert. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n ≥ 3. (p ≤ 0,001, \*\*\*, Student's *t*Test). Da bei den Messungen mit BfA ± Monensin zusätzlich Furosemid n=1 war, sind diese Werte ohne Standardabweichungen und Signifikanzen angegeben.

zurückzuführen sind, wurde jeweils ein 1-h-Ansatz pro Substanz während der Präinkubation und Inkubation mit 2 mM Furosemid versetzt. In Abbildung 3.9 sind die auf unbehandelte HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen als 100 % normierten Ergebnisse dieser Messungen grafisch dargestellt. Verglichen mit den unbehandelten HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen zeigte die Inkubation mit 10 µg/ml BfA für 1 und 3 h behandelten Zellen keine signifikanten Effekte auf die Transportaktivität. Dies deutet darauf hin, dass in HEK293-Zellen nur geringe KCC2-Mengen aus der Neusynthese in die Plasmamembran eingebaut werden. Die Behandlung mit 50 µM Monensin hingegen resultierte in einem Absinken der Transportaktivität auf  $85,0 \pm 2,1$  % nach 1 h und  $70,5 \pm 10,6$  % nach 3 h. Die grafische Darstellung der Behandlung mit einer Kombination beider Pharmaka für 1 h deutet zwar ebenfalls auf ein Absinken der Transportaktivität hin ( $85,8 \pm 14,9$  % Restaktivität nach 1 h), jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Nach 3 h unter BfA und Monensin wurde eine KCC2-Transportaktivität von 74,9 % im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Da diese Messung jedoch nur einmal durchgeführt wurde, ist sie lediglich als Hinweis zu betrachten. Die Transportaktivitäten unter BfA und/oder Monensin zuzüglich Furosemid (Abb. 3.9B) befanden sich auf dem gleichen Niveau, wie die Kontrolle in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen, welche nur mit Furosemid behandelt wurde. Diese Daten zeigen, dass der Rückgang im Flux auf KCC2 zurückzuführen ist.

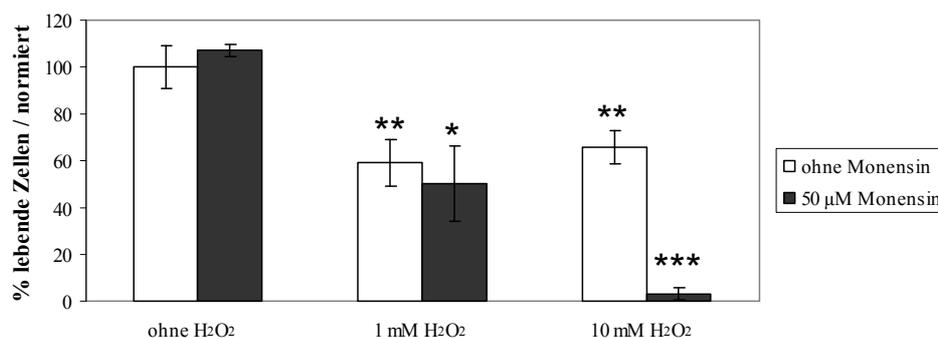
Da Brefeldin keinen signifikanten Effekt induzierte, deuteten diese Daten insgesamt also darauf hin, dass innerhalb der ersten Stunde etwa 15 % des an der Plasmamembran lokalisierten KCC2 der konstitutiven Endozytose zugeführt wird. In den folgenden 2 h sinkt die Oberflächenexpression um weitere 15 %.

### **3.8.2 Untersuchung des Effekts von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) auf KCC2 in HEK293-Zellen**

Die durch Monensin bewirkte Fluxreduktion ist relativ gering, legt man den in Neuronen beschriebenen hohen Turnover von KCC2 zugrunde. Da die durch Monensin induzierten Effekte bei erhöhter Endozytoserate deutlicher hervortreten sollten, wurden die Zellen durch Applikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidativem Stress ausgesetzt. Dieser Ansatz basiert auf von der Gruppe von Nabekura publizierten Daten im Zusammenhang mit KCC2 und oxidativem Stress (Wake et al. 2007). Diese Daten zeigen, dass die Applikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Verminderung der Oberflächenexpression von KCC2 in primären hippocampalen Neuronen resultiert. Diesem Ansatz folgend wurden HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen zunächst für 1 oder 3 h mit 50 µM Monensin behandelt und im Anschluss daran für einen Zeitraum von 40 Minuten mit 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhang et al. 2003) inkubiert. Die Transportaktivität wurde direkt im Anschluss an die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-

Behandlung gemessen. Diese war nach einstündiger Behandlung mit Monensin und 40 Minuten unter  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf 80 % der Kontrolle abgesunken. Bei einer verlängerten Inkubationszeit mit Monensin verringerte sich dieser Wert um weitere 40 % verringert (Daten nicht gezeigt). Um zytotoxische Effekte von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Monensin oder der Kombination beider ausschließen zu können, wurde ein Vitalitätstest durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst ausgesät in eine 6-Loch Zellkulturschale ausgesät und am Folgetag zunächst für 3 h mit Monensin und anschließend für 40 Minuten mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen abgelöst und die Zellsuspension 1:5 mit Trypanblau gemischt. Dieses Gemisch wurde in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und sowohl die toten als auch die lebenden Zellen ausgezählt. Die prozentual berechneten Werte wurden auf unbehandelte HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen als 100 % normiert.

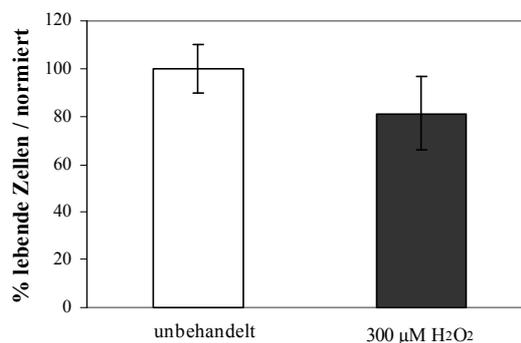
Der in Abbildung 3.10 dargestellte Vitalitätstest zeigt, dass die Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Monensin keine Auswirkung auf die Vitalität der Zellen hat. Allerdings führte die Behandlung mit 1 und auch 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einer Abnahme in der Anzahl der lebenden Zellen auf  $59,2 \pm 10,1$  % (1 mM) bzw.  $65,9 \pm 7,1$  % (10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in Relation zur Kontrolle. Die Abnahme in beiden Fällen war hoch signifikant ( $p \leq 0,01$ ). Die Zugabe von Monensin hatte auf die Vitalität von mit 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -behandelten Zellen keinen weiteren abnehmenden Effekt ( $50,5 \pm 16,1$  %). Die 3-stündige Applikation von Monensin vor der Inkubation mit 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  verrin-



**Abb. 3.10: Vitalitätstest von HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen unter Einfluss von Monensin und  $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

Die Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Monensin behandelt. Nach 3 h wurde das Medium abgenommen und Wasserstoffperoxid in einer finalen Konzentration von 1 oder 10 mM in Medium aufgegeben. Nach 40 Minuten wurde das  $\text{H}_2\text{O}_2$  enthaltende Medium abgenommen, die Zellen abgelöst und 1:5 mit Trypanblau gemischt. Die Auszählung der lebenden und toten Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Die relative Anzahl der lebenden Zellen nach der Behandlung wurde auf die relative Anzahl lebender Zellen, welche bei unbehandelten Zellen ermittelt wurde, normiert (Vitalität unbehaltener Zellen = 100 %). Der Vergleich zwischen den behandelten und den unbehaltenden Zellen zeigte keinen Unterschied bezüglich der Vitalität nach Behandlung 50  $\mu\text{M}$  Monensin. Die Behandlung mit verschiedenen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen führte zu einem signifikanten Rückgang in der Vitalität der Zellen (1mM:  $59,2 \pm 10,1$  %; 10mM:  $65,9 \pm 7,1$  %), welche durch zusätzliche Applikation von Monensin noch weiter verringert wurde (1mM:  $50,5 \pm 16,1$  %, 10mM:  $2,9 \pm 2,6$  %). Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.  $n=3$ . ( $p \leq 0,05$ , \*,  $p \leq 0,01$ , \*\*,  $p \leq 0,001$ , \*\*\*, Student's *t*Test).

gerte die Vitalität der Zellen auf  $2,9 \pm 2,6$  % der Kontrolle. Da die zytotoxischen Effekte auf das verwendete  $\text{H}_2\text{O}_2$  zurückzuführen waren, wurden in den nachfolgenden Versuchen Bedingungen etabliert, unter denen die Zellen auch unter Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  weiterhin vital waren. Die Gruppe um Whittmore veröffentlichte 1995 Versuche, in denen sie die Auswirkungen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in primären kortikalen Kulturen beschrieben. Dabei stellten sie fest, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  innerhalb der ersten 5 Minuten nach der Verdünnung aus einer 30%igen Stocklösung eine stark zytotoxische Wirkung auf die Zellen ausübte. Dieses Phänomen führten sie auf die hochreaktiven Eigenschaften von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zurück. Des Weiteren ist bekannt, dass zytotoxische Effekte oftmals eine Abhängigkeit von der Zellkonzentration aufweisen (Gülden et al. 2010). Gemäß den oben genannten Erkenntnissen von Whittmore et al. (1995) wurde das  $\text{H}_2\text{O}_2$  mindestens 5 Minuten vor Versuchsbeginn verdünnt. Darüber hinaus wurden verschiedene Variationen von Zelldichten und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen für weitere Vitalitätstests verwendet. Es zeigte sich, dass eine Zellzahl unterhalb von  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro Vertiefung (6-Loch Kulturschale) bei jeder der verwendeten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen zu einer Abnahme in der Vitalität der Zellen führte (Daten nicht gezeigt). Der finale Test ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Am Tag vor der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung wurden  $\sim 2,5 \cdot 10^6$  Zellen pro Vertiefung ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen für 1 h mit  $300 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (maximale  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration für die Folgeversuche) behandelt. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als Kontrollen mitgeführt. Nach 1 h wurden die Zellen von den Platten abgelöst und 1:5 mit Trypanblau versetzt. Die Zellsuspensionen wurden in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und die Kontrollen und die mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelten Zellen alternierend ausgezählt. Die Vitalität der behandelten Zellen wurde auf die

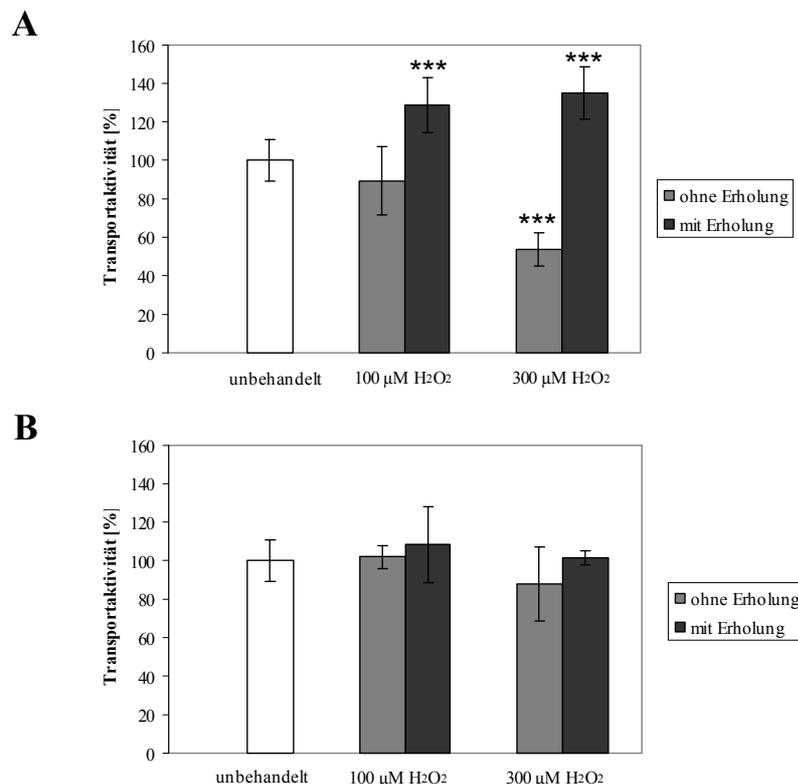


**Abb. 3. 11: Vitalitätstest von HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen unter Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

Am Tag vor der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung wurden  $2,5 \cdot 10^6$  HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen pro Vertiefung auf 6-Loch Kulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden für 1 h mit  $300 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt und anschließend in einem Vitalitätstest mit Trypanblau analysiert. Die relative Anzahl der lebenden Zellen nach der Behandlung wurde auf die relative Anzahl lebender Zellen, welche bei unbehandelten Zellen ermittelt wurde, normiert (Vitalität unbehandelter Zellen = 100 %). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Vitalität behandelter und unbehandelter Zellen. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.  $n=3$ ,  $p > 0,05$ , Student's  $t$ Test.

unbehandelte Kontrolle als 100 % normiert und in Abbildung 3.11 zuzüglich der Standardabweichung dargestellt. Die Überprüfung der Signifikanz über den Student's *t*Test ergab, dass bezüglich der Vitalität der Zellen nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle vorlagen ( $p > 0,05$ ). Diesem Ergebnis entsprechend war für die nachfolgenden Rubidiummessungen eine Maximalkonzentration von 300  $\mu\text{M}$  unproblematisch.

Im Rahmen weiterer Untersuchung zur Auswirkung von oxidativem Stress auf KCC2 in HEK293-Zellen, wurde der Effekt von 100 und 300  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über die Transportaktivität von KCC2 verfolgt. Die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgte gemäß den etablierten Bedingungen und dauerte 1 (Abb. 3.12A) oder 3 h (Abb. 3.12B). Die KCC2-Transportaktivität wurde anschließend entweder direkt (hellgraue Balken) oder nach 1 h Erholung in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-freiem Medium oder

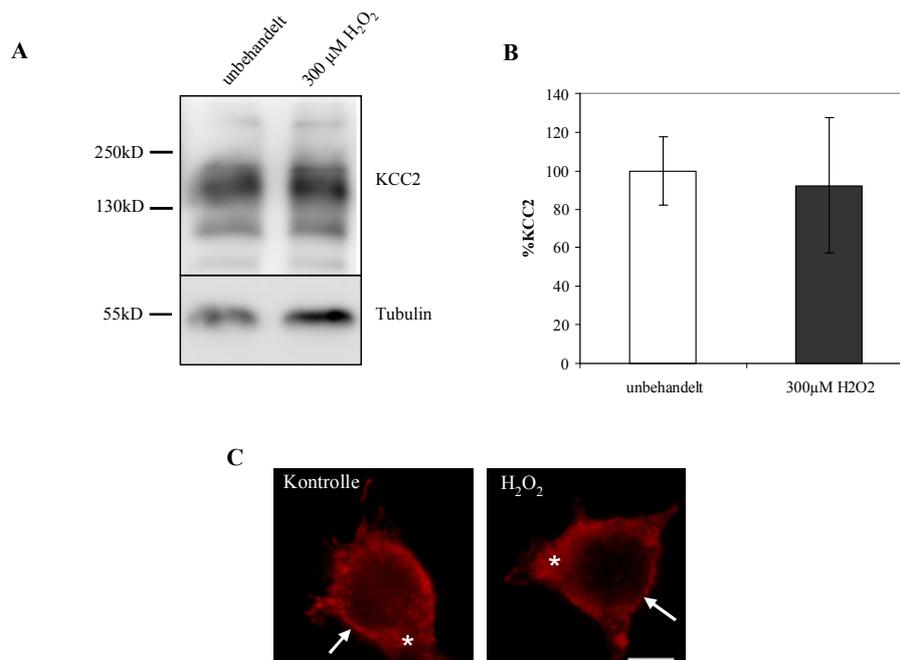


**Abb. 3.12: Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Transportaktivität von KCC2 in HEK293 Zellen.**

**A** HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen wurden für 1 h mit 100 oder 300  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Anschließend wurde nach unterschiedlich langer Erholungsdauer (in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-freiem Medium oder Puffer) die <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-Aufnahme bestimmt. Während die Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direkt im Anschluss an die Behandlung (ohne Erholung) keinen signifikanten Effekt zeigte, ist die <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-Aufnahme direkt nach Ende der Behandlung mit 300  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> halbiert ( $53,41 \pm 8,52$  %) und steigt danach wieder an, bis sie nach 1 h Erholungszeit auf einen Wert terminiert wurde, der um mehr als 30 % höher war als bei unbehandelten Zellen ( $135,05 \pm 13,47$  %). **B** Die dreistündige Behandlung von HEK293<sup>KCC2</sup> Zellen mit 100 oder 300  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte weder direkt nach der Behandlung noch nach einer einstündigen Erholungszeit den gewünschten Effekt bezüglich der Transportaktivität von KCC2. Die ermittelten Werte sind auf unbehandelte HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen als 100% normiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.  $n \geq 3$ . ( $p \leq 0,05$ , \*,  $p \leq 0,01$ , \*\*,  $p \leq 0,001$ , \*\*\*, Student's *t*Test).

Puffer (dunkelgraue Balken) gemessen. Die Fluxaktivitäten wurden auf unbehandelte HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen (weiße Balken) als 100 % normiert. Während direkt im Anschluss an die einstündige Behandlung (ohne Erholung) mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  keine Veränderungen in der Fluxaktivität sichtbar waren, führte die Applikation von 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  unter den gleichen Bedingungen zu einer Halbierung in der Transportaktivität ( $53,4 \pm 8,5$  %). Nach 1 h Erholungszeit lagen die KCC2-Aktivitäten bei den mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelten Zellen bei  $128,7 \pm 14,5$  %. Die mit 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubierten Zellen wiesen nach 1 h Erholung eine Transportaktivität von  $135,1 \pm 13,5$  % der Kontrolle auf (Abb. 3.12A). Die in Abbildung 3.12B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die dreistündige Behandlung mit 100 oder 300  $\mu\text{M}$  weder direkt (ohne Erholung) noch nach einer einstündigen Erholungszeit einen Effekt auf die Transportaktivität von KCC2 hatte. Das Ausbleiben eines Langzeiteffekts nach 3-stündiger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung ist dabei wahrscheinlich auf den Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch endogene Enzyme (Glutathionperoxidasen, Katalasen und Peroxiredoxine) zurückzuführen (Li et al. 2006).

In Schaferythrocyten resultiert die Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einer Aktivierung des  $\text{K}^+\text{Cl}^-$ -Kotransports (Bize and Dunham 1995). Daher sollte im Folgenden ausgeschlossen werden, dass der Rückgang und spätere Anstieg in der Fluxaktivität auf eine Herunterregulation von KCC2 auf Proteinebene gefolgt von einer Aktivierung zurückzuführen ist. Des Weiteren sollte eine immunzytochemische Analyse erste Hinweise auf die mögliche endozytotische Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  liefern. Für diese Analysen wurden  $2,5 \cdot 10^6$  HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät und für 1 h mit 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt. Sowohl für die behandelten Zellen als auch für die Kontrolle wurden drei biologische Replikate angefertigt. Für den Immunoblot wurden die Zellen nach Ablauf dieser Zeit von der Platte abgelöst und die Proteine wie unter Kapitel 2.6.2 beschrieben aus den HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen isoliert. Von den Proteinsuspensionen wurden jeweils 40  $\mu\text{g}$  auf eine 10%ige SDS-PAGE aufgetragen. Der sich daran anschließende Immunoblot wurde zunächst mit anti-KCC2 und später mit anti-Tubulin als Ladekontrolle detektiert (Abb. 3.13A). Die Quantifizierung erfolgte mittels des Programmes MultiGauge, welches die Intensitäten in einem markierten Bereich misst. Dabei wurde für die KCC2-Detektionen ein bezüglich der Fläche gleich bleibender Bereich gewählt. Für die Ladekontrolle (Tubulin) wurde ebenso verfahren. Die für KCC2 ermittelten Werte wurden auf Tubulin bezogen umgerechnet und die behandelten Zellen auf die unbehandelte Kontrolle als 100 % normiert (Abb. 3.13B). Weder der Immunoblot selbst (Abb. 3.13A) noch die daran anschließende Quantifizierung (Abb. 3.13B) ergaben Hinweise auf eine Abnahme der KCC2-Menge nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Applikation. Die immunzytochemische Analyse der subzellulären Lokalisation von KCC2 nach Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigte keine sichtbaren Unterschiede zur unbehandel-



**Abb. 3.13: Untersuchung der Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf KCC2 in HEK293 Zellen.**

HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen wurden nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf das Expressionslevel von KCC2, sowie auf Vitalität und Verteilung untersucht. **A** HEK293<sup>KCC2</sup> Zellen wurden für 1 h mit 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt und die KCC2-Abundanz mittels Immunoblot quantifiziert. Als Referenz diente dabei das endogen in HEK293 Zellen exprimierte Tubulin. **B** Die Auswertung des Immunoblots erfolgte mit dem Analyseprogramm MultiGauge. Die KCC2-positiven Banden wurden hinsichtlich ihrer Intensitäten vermessen und auf die Intensität der Tubulinbanden normiert. Es ließen sich keine Unterschiede im Expressionslevel feststellen. Dargestellt sind die auf unbehandelte Zellen (100 %) normierten Mittelwerte ± Standardabweichung. n=3, p > 0,05, Student's *t*Test. **C** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (60x Öljektiv) der KCC2-IR nach 1-stündiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Applikation (rechts) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (links). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung von HEK293<sup>KCC2</sup> Zellen (rechts) gab keine Hinweise auf eine Veränderung der subzellulären Verteilung von KCC2; bei beiden Bedingungen ist eine starke KCC2-IR im Inneren der Zelle (Asterixe) und in den plasmamembranösen Bereichen (Pfeil) detektierbar. Größenstandard: 10 μm.

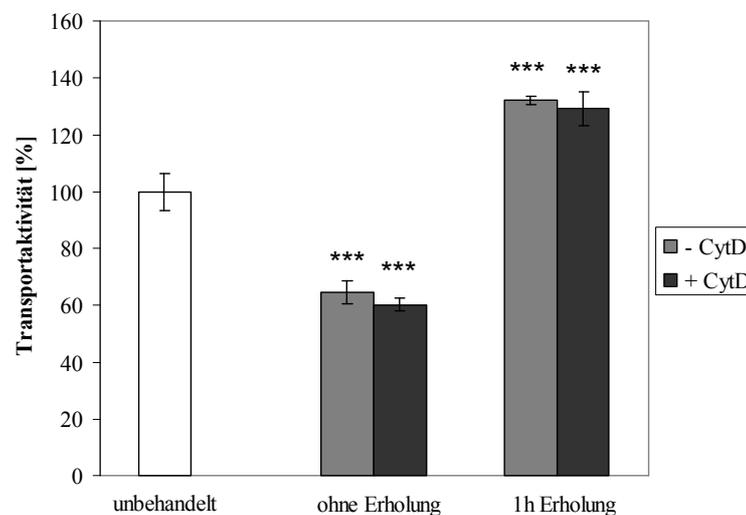
ten Kontrolle (Abb. 3.13C). In beiden Fällen war sowohl eine KCC2-IR im Bereich der Plasmamembran (Pfeile) als auch im Inneren der Zelle (Asterixe) detektierbar.

Die Beobachtungen aus den immunzytochemischen Analysen gaben Anlass zu der Vermutung, dass es sich bei dem durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten Effekt auf KCC2 nicht um Endozytose handeln könnte. KCC2 wird in HEK293-Zellen Clathrin-abhängig endozytiert (Zhao et al. 2008). Da die Dynamik des Aktin-Cytoskeletts essentiell für die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME; clathrin-mediated endocytosis) in Säugerzellen ist (Yarar et al. 2005), sollte eine Destabilisierung desselben zum Erliegen der CME führen. Daher wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37 °C mit 2 μM Cytochalasin D (CytD), einem Aktin-destabilisierenden Agens, präinkubiert. Um die Wirksamkeit von CytD zu überprüfen wurden die Zellen im Anschluss an die Behandlung unter einem Lichtmikroskop auf morphologische Veränderungen untersucht. Die behandelten Zellen zeigten eine für CytD-Behandlungen typische abgerundete

Morphologie (Schmidt et al. 1996) (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung wie bereits oben erläutert durchgeführt und die Transportaktivität von KCC2 über  $^{86}\text{Rb}^+$ -Fluxmessungen ermittelt.

In Abbildung 3.14 sind die auf unbehandelte Zellen (100 %) normierten Transportaktivitäten dargestellt. Wie schon bei den vorangegangenen Messungen gezeigt (vgl. Abb. 3.12A) ist direkt nach der Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ohne Erholung) eine Abnahme der KCC2-Transportaktivität zu beobachten. Nach einer einstündigen Erholungszeit erfolgte abermals ein Anstieg in der Transportaktivität (hellgraue Balken). Der durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierte Effekt auf die Transportaktivität von KCC2 ließ sich durch Behandlung mit Cytochalasin D (dunkelgraue Balken) nicht unterbinden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem Effekt von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf KCC2 wahrscheinlich nicht um eine erhöhte Endozytoserate des Transporters handelt.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  einen reduzierenden Effekt auf die KCC2-Transportaktivität hat. Diese Reduktion ist konzentrationsabhängig und reversibel. Dabei geht der Effekt offenbar nicht mit einer Veränderung der KCC2-Proteinmenge oder der Endozytoserate einher.



**Abb. 3.14: Auswirkung von Cytochalasin D auf den durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierten Effekt auf KCC2.**

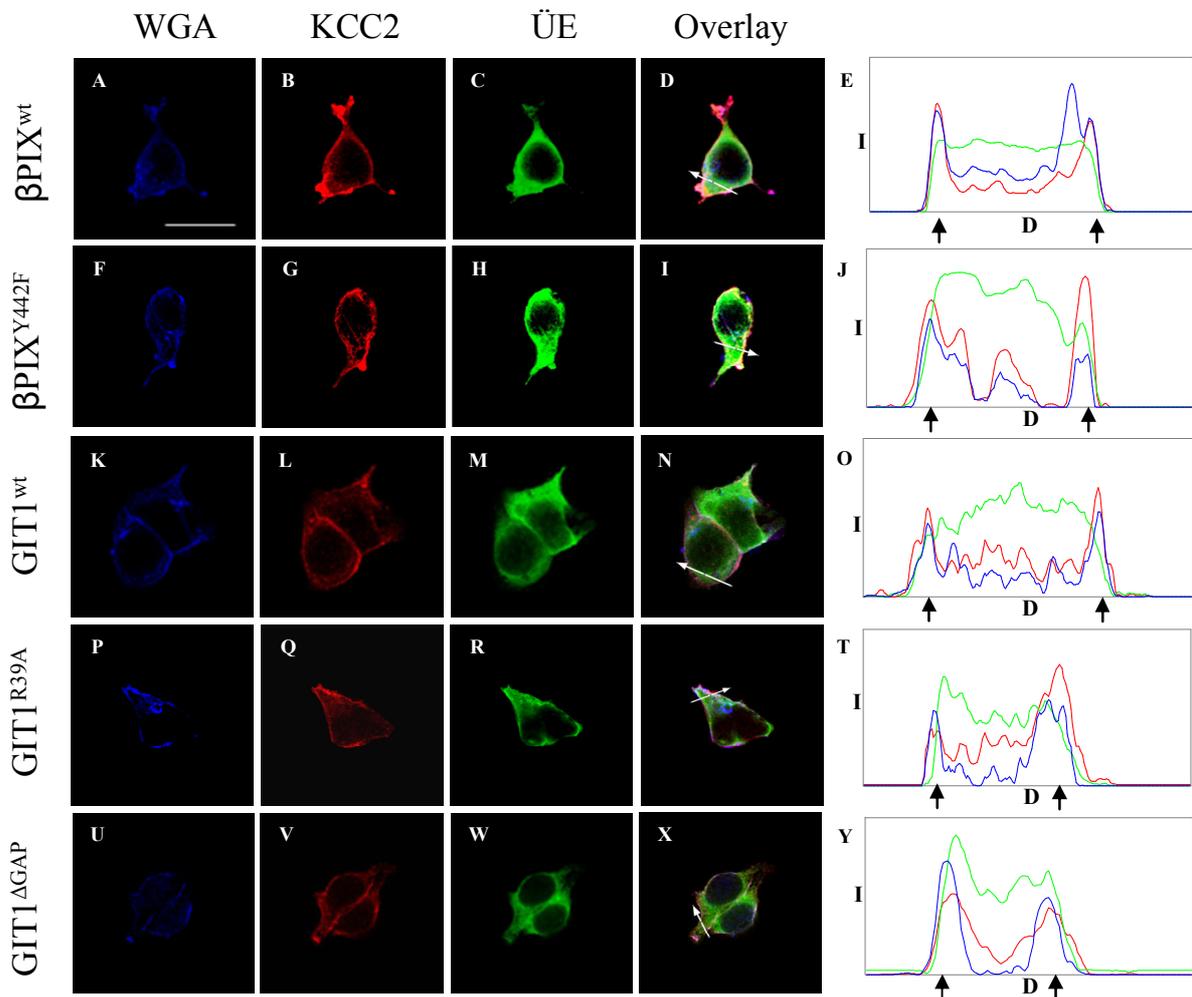
HEK293<sup>KCC2</sup> Zellen wurden zunächst für 15 Minuten mit Cytochalasin D (CytD) vorinkubiert und dann für 1 h mit 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt. Anschließend wurde entweder direkt (ohne Erholung) oder nach einstündiger Erholungsdauer (in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -freiem Medium oder Puffer) die  $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme bestimmt. Zwischen den mit CytD-behandelten (dunkelgraue Balken) und -unbehandelten Zellen (hellgraue Balken) konnte bezüglich des Effekts von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Transportaktivität von KCC2 kein Unterschied detektiert werden. Die ermittelten Werte sind auf unbehandelte HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen (weißer Balken) als 100% normiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.  $n \geq 6$  ( $p \leq 0,001$ , \*\*\*, Student's *t*Test)

### ***3.9 Einfluss der Überexpression von $\beta$ PIX und GIT1 auf die Oberflächenexpression von KCC2***

Unter Kapitel 3.7 wurde bereits gezeigt, dass die Transportaktivität von KCC2 unter Einfluss der partiell GEF-defizienten  $\beta$ PIX- und der GAP-inaktiven GIT1-Mutanten um  $\sim 30\%$  absinkt. Um einen Hinweis zu bekommen, ob die Mutanten das Trafficking von KCC2 beeinflussen, wurde die Oberflächenexpression von KCC2 unter Überexpression der genannten Proteine sowie Mock-Transfektionen als Kontrolle ermittelt. Die Bestimmung der Oberflächenexpression erfolgte nach einer von Solé et al. (2009) beschriebenen Methode. Dieser Ansatz beruht darauf, dass Weizenkeimagglutinin (WGA, Wheat germ agglutinin) an die Zuckerreste von Membranglykoproteinen bindet und daher in nicht permeabilisierten Zellen für eine Markierung der Zelloberfläche benutzt werden kann. Durch eine quantitative Kollokalisationsanalyse zwischen Membranmarker und der IR des Transmembranproteins (hier: KCC2) in konfokalen Bildern lässt sich dann die relative Oberflächenexpression ermitteln. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Oberflächenbiotinylierung besteht darin, dass die transfizierten Zellen gezielt analysiert werden können. Dementsprechend unterliegt die mikroskopische Analyse keinen Schwankungen, welche aus Unterschieden in der Transfektions-effizienz resultieren. Ein weiterer Vorteil dieser Analyse liegt darin, dass neben der Oberflächenexpression auch Unterschiede im Verteilungsmuster (z.B. Clusterbildung gegenüber diffuser Verteilung) untersucht werden können.

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression wurden die mit  $\beta$ PIX- oder GIT1-Konstrukten transfizierten HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen zunächst mit AlexaFluor633-markiertem Weizenkeimagglutinin (WGA, Wheat germ agglutinin) gefärbt. Im Anschluss daran wurden die Zellen fixiert und einer immunzytochemischen Färbung unterzogen. Da sowohl  $\beta$ PIX als auch GIT1 endogen in HEK293-Zellen exprimiert werden, waren die Antikörper, welche für den Nachweis der Überexpression benutzt wurden, gegen die Tags der jeweiligen Proteine gerichtet (vgl. Tabelle 2.1). Für die Färbung des stabil exprimierten KCC2 wurde, abhängig von der Spezies, aus welcher der andere in der Doppelfärbung benutzte AK stammte, entweder ein monoklonaler (KCC2 N/12, Neuromab) oder ein polyklonaler AK (anti-cKCC2, Upstate) verwendet. Die sekundären Antikörper wurden so gewählt, dass sie bezüglich Anregungs- und Emissionswellenlänge einen möglichst großen Abstand zueinander und zu dem verwendeten WGA-Label aufwiesen (KCC2 – AlexaFluor568, PIX/GIT – Alexa Fluor 488, WGA – AlexaFluor633). Das WGA-Signal wurde der besseren Unterscheidbarkeit halber im Anschluss an die konfokale Mikroskopie digital blau gefärbt. In Abbildung 3.15 sind die Einzelkanalaufnahmen sowie die Überlagerungsdarstellungen der mit  $\beta$ PIX- oder GIT1-Konstrukten transfizierten Zellen gezeigt. In den Einzelkanalaufnahmen ist die WGA-Färbung in blau

plasmamembranständig sichtbar (Abb. 3.15A,F,K,P,U). Die KCC2-IR (Abb. 3.15B,G,L,Q,V) lag verstärkt in plasmamembranösen und angrenzenden Bereichen vor und zeigte intrazellulär



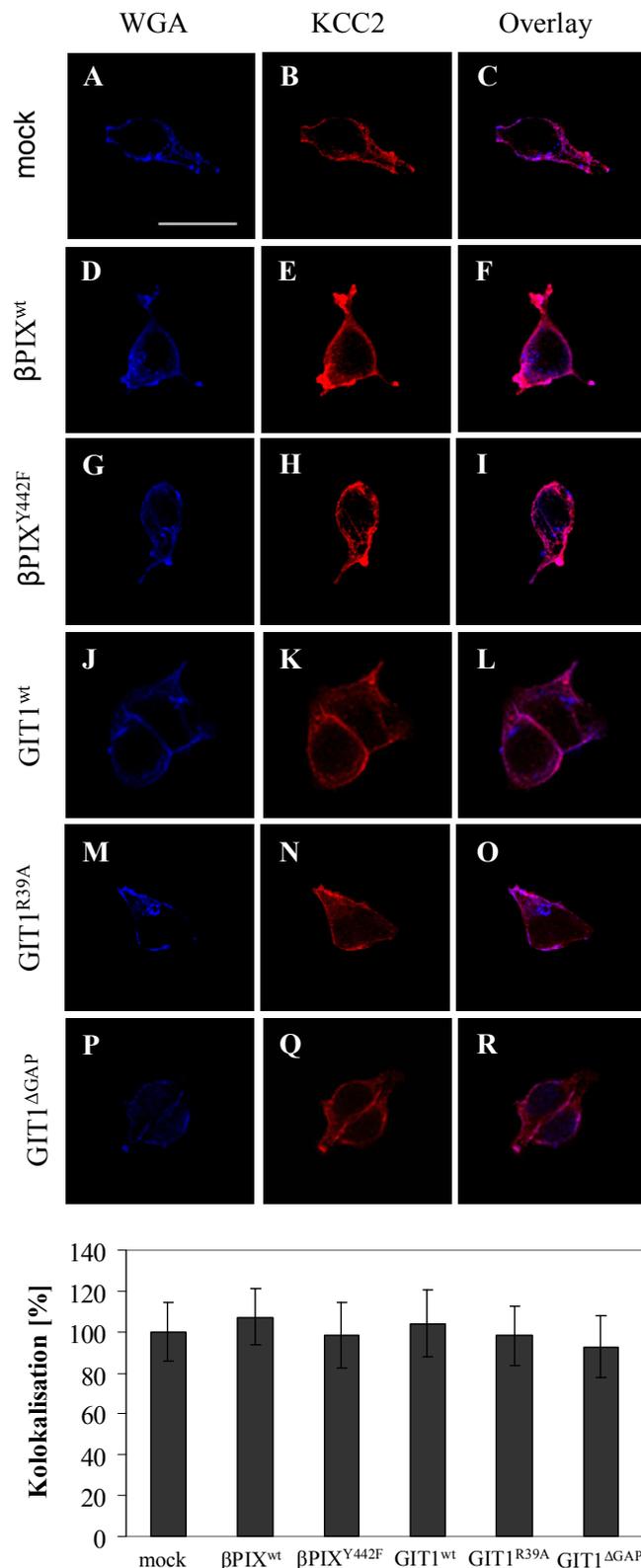
**Abb. 3.15: Untersuchung der Verteilung von KCC2 nach Überexpression von  $\beta$ PIX und GIT1 sowie ihrer Mutanten in HEK293-Zellen.**

Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von transfizierten HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen. Die überexprimierten (ÜE) Proteine ( $\beta$ PIX<sup>wt</sup> (C),  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> (H), GIT1<sup>wt</sup> (M), GIT1<sup>R39A</sup> (R) oder GIT1<sup>ΔGAP</sup> (W)) sind in grün und das stabil exprimierte KCC2 (B,G,L,Q,V) in rot dargestellt. Darüber hinaus sind Pixel-Analysen der dargestellten Einzelzellen gezeigt (E,J,O,T,Y). **A,F,K,P,U** 48 h nach der Transfektion vor der Immunfärbung wurden die Oberflächen der Zellen für mit AlexaFluor633-markiertem WGA markiert. Das WGA-Label der Oberfläche wurde der besseren Unterscheidbarkeit halber nach der konfokalen Mikroskopie digital blau gefärbt. **B,G,L,Q,V** Die unterschiedlich transfizierten Zellen weisen bezüglich ihrer KCC2-Verteilung subjektiv betrachtet keine Unterschiede auf; es ist sowohl plasmamembranständiges als auch intrazellulär lokalisiertes KCC2 nachweisbar. **D,I,N,S,X** In der Überlagerungsdarstellung sind die Kolokalisationen von KCC2 mit WGA in magenta, mit dem grünen Kanal (heterolog exprimierte Proteine) in gelb und die Signale aller drei Kanäle in der Überlagerung in weiß sichtbar. Die Kolokalisation zwischen KCC2 und WGA dient dem Nachweis der Oberflächenexpression und deutet bei allen Überexpressionen auf eine Vergleichbarkeit in der Oberflächenexpression von KCC2 hin. **E,J,O,T,Y** Auch die Plotdarstellungen der Intensitätsverteilung (Ordinate: I - Intensität; Abszisse: D - Distanz [Pixel]) in den verschiedenen Kanälen entlang der weißen Pfeile in der Überlagerungsdarstellung deuten auf eine Kolokalisation von KCC2 und WGA in der Plasmamembran (schwarze Pfeile) bei allen dargestellten Zellen hin. Die Kolokalisation zwischen KCC2 und den überexprimierten Proteinen erstreckt sich von plasmamembranösen und angrenzenden in die intrazellulären Bereiche. Größenstandard in A: 25  $\mu$ m

nur moderate Signale. Die Signale, welche auf die Abundanz der überexprimierten (ÜE) Proteine hinwiesen (Abb. 3.15C,H,M,R,W), zeigten in allen Fällen eine diffuse Verteilung in der gesamten Zelle, wobei der Zellkern ausgespart blieb. In den Überlagerungsdarstellungen aller drei Kanäle (Abb. 3.15D,I,N,S,X) waren die Kolokalisationen von WGA und KCC2 in magenta, die von KCC2 und  $\beta$ PIX- bzw. GIT1-Konstrukten in gelb und die aller drei Kanäle in weiß sichtbar. Dabei beschränkten sich die magentafarbenen Signale weitgehend auf die äußeren plasmamembranösen Bereiche, während weiße Signale vereinzelt plasmamembranös und gehäuft in den nahen subplasmamembranösen Bereichen zu finden waren. Kolokalisationen zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX oder GIT1 sowie ihren Mutanten sind durch intrazellulär vorliegende vereinzelt Gelbfärbungen angedeutet. Die Kolokalisation zwischen KCC2 und WGA bzw.  $\beta$ PIX/GIT1 wird zu einem späteren Zeitpunkt noch detaillierter erläutert. Zur grafischen Darstellung der Verteilung der Fluoreszenzsignale wurden für einzelne Zellen Plotdarstellungen angefertigt (Abb. 3.15E,J,O,T,Y). In diesen Graphen sind die Intensitätsverteilungen der einzelnen Kanäle entlang der in den Überlagerungsdarstellungen (Abb. 3.15D,I,N,S,X) eingefügten weißen Pfeile gezeigt. Die Plotdarstellungen deuteten bei allen Transfektionen eine verstärkte plasmamembranständige Abundanz von KCC2 (rote Kurve) an (vgl. schwarze Pfeile in Abb. 3.15E,J,O,T,Y). Die überexprimierten Proteine werden durch die grünen Kurven in den Plots symbolisiert. Es zeigte sich, dass zwischen den Wildtypen und ihren Mutanten in den gezeigten Zellen augenscheinlich kein Verteilungsunterschied vorlag. Sowohl das heterolog exprimierte  $\beta$ PIX als auch seine bezüglich Cdc42 GEF-defiziente Mutante  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> lagen den Plotdarstellungen (Abb. 3.15E,J) zufolge plasmamembranständig, subplasmamembranös und auch intrazellulär vor. Zwischen GIT1<sup>wt</sup> und den GAP-defizienten GIT1-Mutanten war durch subjektive Betrachtung zunächst kein Verteilungsunterschied erkennbar. Auch diese Proteine lagen sowohl plasmamembranös, als auch in plasmamembrannahen und intrazellulären Bereichen vor (Abb. 3.15O,T,Y).

Durch die Analyse der Überlagerung von KCC2 und WGA sollten mögliche Veränderungen in der KCC2-Oberflächenexpression determiniert werden. In Abbildung 3.16D-R sind die in Abbildung 3.15 bereits gezeigten Zellen um die Überexpressionsfluoreszenz reduziert im Vergleich zu Mock-Transfektionen (Abb. 3.16A-C) dargestellt. Das zur Färbung der Membran verwendete WGA ist weiterhin in blau dargestellt (Abb. 3.16A,D,G,J,M,P). Bezüglich der KCC2-IR lassen sich zwischen den Mock-Transfektionen (Abb. 3.16B) und den  $\beta$ PIX bzw. GIT1 überexprimierenden Zellen (Abb. 3.16E,H,K,N,Q) keine augenscheinlichen Unterschiede feststellen. In den Überlagerungsdarstellungen (Abb. 3.16C,F,I,L,O,R) sind plasmamembranständig deutliche magentafarbene Signale sichtbar, welche auf eine Überlappung

zwischen der WGA-Färbung und der KCC2-IR hinweisen. Die Ko-Färbung scheint bei allen dargestellten Zellen ähnlichen Ausmaßes zu sein. Im intrazellulären Bereich sind vereinzelte blaue und rote Signale detektierbar, welche allerdings nahezu keine Überlappung aufweisen. Zur Absicherung des subjektiven Eindruckes wurde die Kolokalisation von KCC2 und WGA



**Abb. 3.16: Quantifizierung der Veränderung der membranständigen Lokalisation von KCC2 unter Einfluss von  $\beta$ PIX und GIT1 sowie ihrer Mutanten in HEK293 Zellen über die Kolokalisation mit WGA.**

Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von transfizierten HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen (A-R) und die Quantifizierung der KCC2-WGA-Kolokalisation (S). 48 h nach der Transfektion vor der Immunfärbung wurden die Oberflächen der Zellen für mit AlexaFluor633-markiertem WGA markiert (A,D,G,J,M,P). Das WGA-Label der Oberfläche wurde der besseren Unterscheidbarkeit halber nach der konfokalen Mikroskopie digital blau gefärbt. Das stabil exprimierte KCC2 (B,E,H,K,N,Q) ist in rot dargestellt. Die unterschiedlich transfizierten Zellen weisen bezüglich ihrer KCC2-Verteilung objektiv betrachtet keine Unterschiede im Vergleich zu der mock-transfizierten Zelle (A-C) auf. In allen gezeigten Zellen ist die Kolokalisation mit WGA in magenta sichtbar und auf die plasmamembranständigen sowie nahe subplasmamembranöse Bereiche begrenzt. Größenstandard in A: 25  $\mu$ m (A-R). Zusätzlich zu der bildlichen Auswertung wurde eine Quantifizierung der KCC2-WGA-Kolokalisation mittels des OBCOL-Plugins bei ImageJ vorgenommen (S). Diese Auswertung ließ ebenfalls keine Veränderungen in der in der Relation  $KCC2_{\text{kolokalisiert}}/KCC2_{\text{gesamt}}$  bei den verschiedenen Transfektionen erkennen. Die dargestellten Werte sind auf mock-Transfektionen als 100 % normiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.  $n \geq 20$ .

mittels des ImageJ-Plugins OBCOL durchgeführt. Mit dieser Software können Kolokalisationsanalysen durchgeführt werden, welche auf der Abundanz von Pixeln in bestimmten Strukturen basieren. Für diese Art der Analyse wurden zunächst einzelne Zellen aus den unbearbeiteten Originalbildern beider Kanalaufnahmen herausgeschnitten und auf einen schwarzen Hintergrund transferiert. Das Hintergrundrauschen wurde herausgefiltert und über den ermittelten Schwellenwert der Cut-off gesetzt. Anschließend wurde die Kolokalisations-Funktion gestartet. Über diese werden die kolokalisiert und einzeln vorliegenden Pixel in tabellarischer Form angezeigt (für eine detailliertere Beschreibung der Vorgehensweise vgl. Kapitel 2.9.3). Die KCC2-Pixel, welche mit WGA kolokalisierten, wurden zur Gesamtzahl KCC2-Pixel in Relation gesetzt (vgl. Formel 1). Diese Relationen wurden anschließend auf die Ergebnisse der Mock-Transfektionen als 100 % normiert und als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung in Abbildung 3.16S dargestellt. Dabei wurde pro Transfektion ein Minimum von 20 Zellen analysiert. Bezüglich der KCC2-Oberflächenexpression war zwischen den mock-transfizierten und den  $\beta$ PIX- bzw. GIT1-positiven Zellen kein signifikanter Unterschied feststellbar ( $p > 0,5$  in allen Fällen).

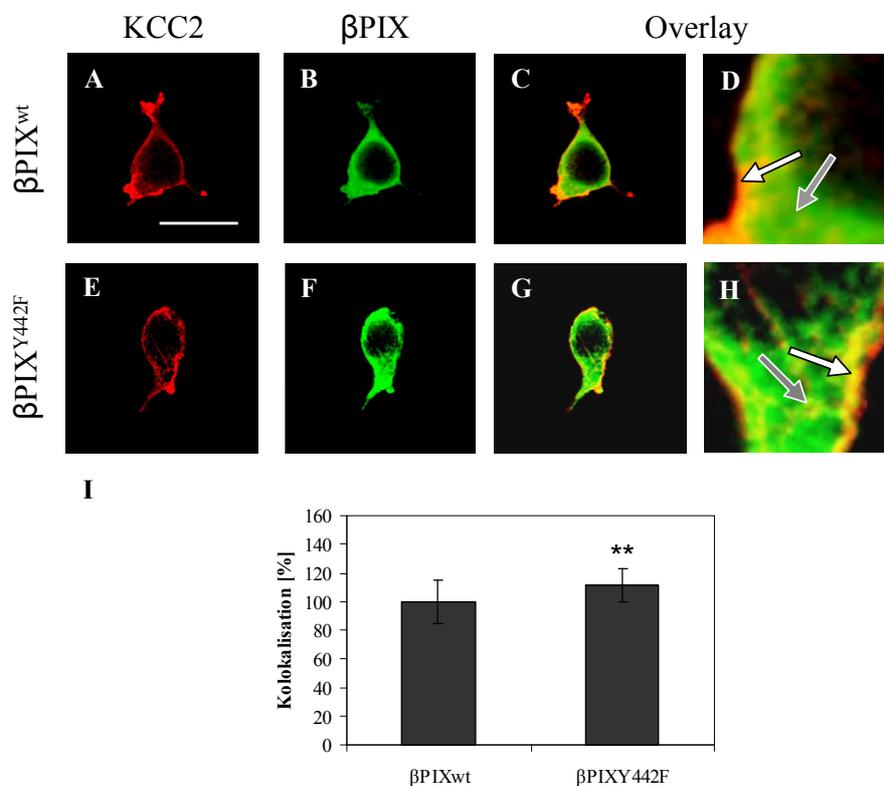
Dies bedeutet zusammengenommen, dass der unter Kapitel 3.7 beschriebene Rückgang in der KCC2-Transportaktivität offenbar nicht auf eine verringerte Oberflächenexpression von KCC2 unter Einfluss von  $\beta$ PIX, GIT1 oder ihren Mutanten zurückzuführen ist.

### ***3.10 Quantitative Analyse der Kolokalisation von KCC2 und $\beta$ PIX sowie GIT1***

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einer Cdc42-GEF-defizienten  $\beta$ PIX-Mutante ( $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup>) die Transportaktivität von KCC2 reduziert. Dasselbe konnte bei heterolog exprimierten Arf6-GAP-defizienten GIT1-Mutanten (GIT1<sup>R39A</sup>, GIT1 <sup>$\Delta$ GAP</sup>) festgestellt werden (vgl. Kapitel 3.7). Erste Untersuchungsergebnisse bezüglich der Regulation deuteten darauf hin, dass das Expressionsniveau von KCC2 augenscheinlich nicht beeinflusst wird (vgl. Kapitel 3.7). Auch die Oberflächenexpression von KCC2 wird durch die Überexpression dieser Mutanten offenbar nicht beeinträchtigt (vgl. Kapitel 3.10). Dementsprechend ist es wahrscheinlicher, dass  $\beta$ PIX und GIT1 im verwendeten Zellmodell Einfluss auf die Transportkinetik nehmen. Dies könnte über eine sterische Inhibition vonstatten gehen. In diesem Fall wäre eine erhöhte Kolokalisation zwischen KCC2 und den  $\beta$ PIX- bzw. GIT1-Mutanten an der Plasmamembran zu erwarten (Yaspelkis et al. 2009). Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurden die Kolokalisationen zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX bzw. GIT1 sowie ihren Mutanten quantifiziert.

### 3.10.1 Einfluss des Tyrosins an der Stelle 442 von $\beta$ PIX auf die Kolokalisation von KCC2 und $\beta$ PIX

Die Kolokalisation zwischen KCC2 und überexprimiertem  $\beta$ PIX<sup>wt</sup> bzw.  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen konnte unter Kapitel 3.10 bereits gezeigt werden. Allerdings ließ die Art der Auswertung keinen Schluss auf die Quantität der Kolokalisation zu. Um festzustellen, ob und inwiefern sich die Kolokalisation von KCC2 und  $\beta$ PIX<sup>wt</sup> von der zwischen dem Transporter und der Mutante ( $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup>) unterscheidet, wurden die in Abbildung 3.15 erstmals gezeigten Zellen um die Fluoreszenz des WGA-Labels reduziert analysiert. Wie bereits festgestellt, wies die KCC2-IR unter Einfluss von  $\beta$ PIX<sup>wt</sup> und  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> ähnliche Verteilungsmuster auf (Abb. 3.17A,E). In beiden Fällen konnten rote Fluoreszenzen verstärkt in plas-



**Abb. 3.17: Quantifizierung der Kolokalisation von KCC2 mit  $\beta$ PIX<sup>wt</sup> und  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup>.**

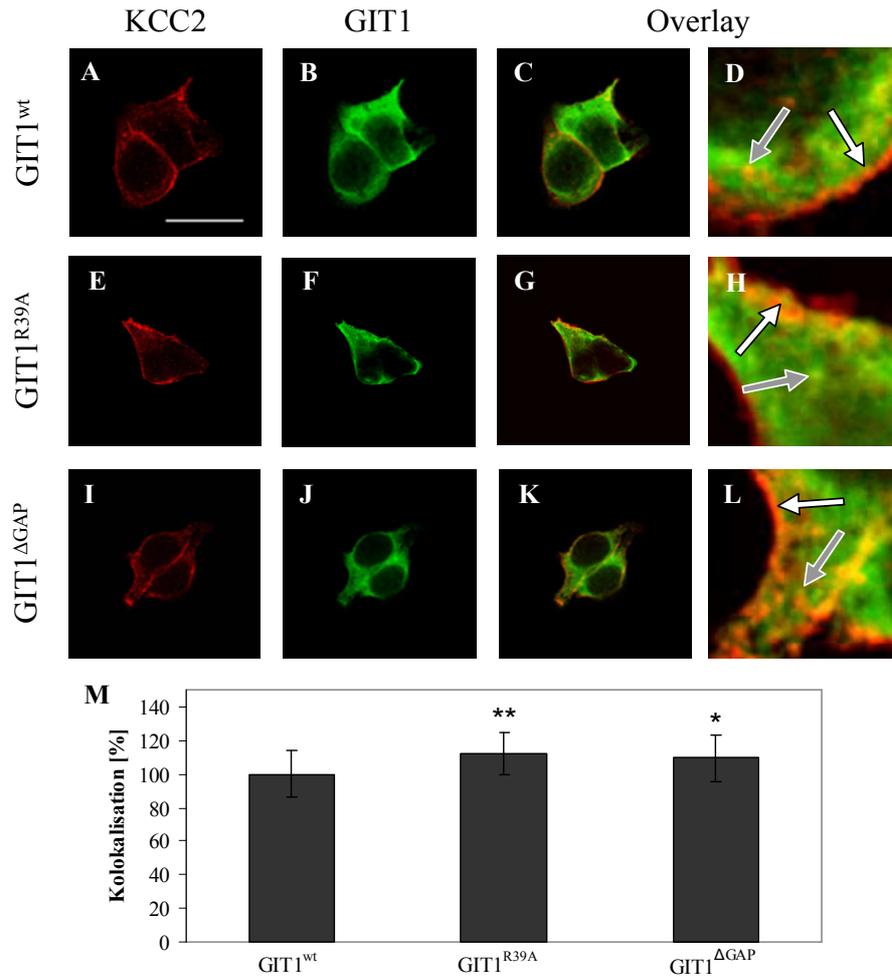
Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von transfizierten HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen (A-H) und die Quantifizierung des KCC2- $\beta$ PIX-Overlays (I). **A-H** Das stabil exprimierte KCC2 (A und E) wurde über Bindung eines KCC2-Antikörpers von Millipore detektiert und ist in rot abgebildet. Die heterolog exprimierten Proteine  $\beta$ PIX<sup>wt</sup> (B) und  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> (F), das keine GEF-Aktivität gegenüber Cdc42 mehr besitzt, wurden über einen Myc-Antikörper nachgewiesen und sind in grün dargestellt. Die Kolokalisation zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX<sup>wt</sup> (C,D) sowie  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> (G,H) erstreckt sich von plasmamembranösen bis subplasmamembranösen (weißer Pfeil in D und H) Bereichen bis in die intrazellulären (grauer Pfeil in D und H) Regionen. Dabei liegen die intrazellulär kolokalisierten Proteine in geclusteter Form vor. Größenstandard in A: 25  $\mu$ m (A-C,E-G), 5  $\mu$ m (D,H). **I** Die Quantifizierung mittels des ImageJ-Tools OBCOL ergab eine signifikante Erhöhung der Kolokalisation zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> um 10 % verglichen mit der Kolokalisation zwischen KCC2 und dem Wildtyp von  $\beta$ PIX (G). Die dargestellten Werte sind auf  $\beta$ PIX<sup>wt</sup>-Transfektionen als 100 % normiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. n  $\geq$  20. (p  $\leq$  0,01, \*\*, Student's *t*Test).

mamembranösen und den direkt angrenzenden Bereichen und schwächer in intrazellulären Regionen detektiert werden. Dabei blieb der Zellkern von der IR ausgespart. Auch die Verteilungsmuster der  $\beta$ PIX<sup>wt</sup>- und  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup>-IR (Abb. 3.17B,F) wiesen augenscheinlich keine Unterschiede auf. Die Fluoreszenzen beider Proteine erstreckten sich diffus über das gesamte Cytosol bis in die plasmamembranösen Bereiche der Zelle. Auch diese IR wurden nicht im Zellkern detektiert. Die Betrachtung der Überlagerungsdarstellungen (Abb. 3.17C,G) ließ in beiden Fällen plasmamembranöse Gelbfärbungen erkennen, welche den Rückschluss auf eine Kolokalisation zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX<sup>wt</sup> bzw.  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> zuließen. Für einen detaillierteren Einblick in die subzelluläre Kolokalisation wurden einzelne Bereiche der Zellen 5-fach vergrößert gezeigt (Abb. 3.17D,H). Bei beiden Überexpressionen konnten Kolokalisationen zwischen den beiden Proteinen in erster Linie in plasmamembrannahen Bereichen (weiße Pfeile D und H) detektiert werden. Intrazellulär lag die Gelbfärbung in geclusteter Form (graue Pfeile in D und H) in einem geringeren Maße vor. Da anhand der Abbildungen keine Aussage über mögliche quantitative Unterschiede bezüglich der Kolokalisation getroffen werden konnten, wurde eine OBCOL-Analyse (wie bereits unter 2.9.3 beschrieben) durchgeführt. Pro Transfektion wurde ein Minimum von 20 Zellen quantifiziert. Die relative Kolokalisation zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> wurde auf die zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX<sup>wt</sup> als 100 % normiert. In Abbildung 3.17I sind die normierten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Analyse ergab, dass die Kolokalisation zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX nach Mutation des Tyrosinrestes an der Stelle 442 um etwa 10 % anstieg (KCC2 +  $\beta$ PIX<sup>wt</sup>:  $100 \pm 15,2$  %; KCC2 +  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup>:  $111,1 \pm 11,8$  %). Diese Differenz bezüglich der Kolokalisation erwies sich als hoch signifikant (Student's *t*Test;  $p = 0,003$ ). Anhand der Betrachtung der immunzytochemischen Aufnahmen ließ sich jedoch nicht feststellen, ob die verstärkte Kolokalisation intrazellulär oder in plasmamembranösen Bereichen vorliegt. Allerdings wäre es bei einer derart geringen Differenz bezüglich der Kolokalisation auch möglich, dass die Mutante in höherem Maße exprimiert wird. In dem Fall wäre die Kolokalisation für den beobachteten Effekt nicht aussagekräftig.

### 3.10.2 Einfluss der GAP-Aktivität von GIT1 auf die Kolokalisation zwischen KCC2 und GIT1

Die Mutation bzw. Deletion der ArfGAP-Domäne von GIT1 übte einen ähnlichen Effekt auf die Transportaktivität von KCC2 aus wie die  $\beta$ PIX-Mutante. Daher wurden auch die GIT1-Konstrukte auf ihre Kolokalisation mit KCC2 überprüft. Für diese Untersuchung wurde die WGA-Färbung außer Acht gelassen. Die in Abbildung 3.18 unter A, E und I dargestellten

KCC2-IR zeigen keine Unterschiede bezüglich ihres Verteilungsmusters. Sowohl unter Überexpression von GIT1<sup>wt</sup> als auch nach heterologer Expression der ArfGAP-defizienten Mutanten (GIT1<sup>R39A</sup>, GIT1<sup>ΔGAP</sup>) war eine starke KCC2-IR in den plasmamembranösen und eine schwächere IR in den intrazellulären Bereichen detektierbar. Der Zellkern war dabei immer frei von Signal. Die GIT1-IR erstreckten sich über den gesamten intrazellulären Bereich der Zelle (vgl. Abb. 3.18B,F,J). Dabei wiesen sie zumeist eine diffuse Verteilung auf. Der Zellkern zeigte mitunter vereinzelte IR, war aber im Allgemeinen frei von Signalen. In den Über-



**Abb. 3.18: Quantifizierung der Kollokalisation von KCC2 mit GIT1<sup>wt</sup> und ArfGAP-defizienten GIT1-Mutanten.**

Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von transfizierten HEK293<sup>KCC2</sup> Zellen (A-I) und die Quantifizierung der Kollokalisation zwischen KCC2 und den GIT1-Konstrukten (M). A-L Die überexprimierten GIT1-Proteine GIT1<sup>wt</sup> (B) sowie GIT1<sup>R39A</sup> (F) und GIT1<sup>ΔGAP</sup> (J), welche bezüglich Arf6 keine GAP-Aktivität mehr aufweisen, sind in grün und das stabil exprimierte KCC2 (A,E und I) in rot dargestellt. Die Kollokalisation zwischen KCC2 und GIT1<sup>wt</sup> (C,D), GIT1<sup>R39A</sup> (G,H) oder GIT1<sup>ΔGAP</sup> (K,L) erstreckt sich von plasmamembranösen und angrenzenden Bereichen (weißer Pfeil in D,H und L) bis in die intrazellulären (grauer Pfeil in D,H und L) Regionen. Dabei liegen die intrazellulär kollokalisierten Proteine in geclusterter Form vor. Größenstandard in A: 25 μm (A-C,E-G,I-K), 5 μm (D,H,L). M Die Quantifizierung mittels des ImageJ-Tools OBCOL ergab eine signifikante Erhöhung der Kollokalisation zwischen KCC2 und GIT1<sup>R39A</sup> sowie auch GIT1<sup>ΔGAP</sup> um 10 % verglichen mit der Kollokalisation zwischen KCC2 und dem Wildtyp von GIT1. Die dargestellten Werte sind auf GIT1<sup>wt</sup>-Transfektionen als 100% normiert. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. n ≥ 20. (p ≤ 0,05, \*, p ≤ 0,01, \*\*, Student's *t*Test).

lagerungsdarstellungen waren vereinzelte intrazelluläre und plasmamembranöse Gelbfärbungen zu erkennen (vgl. Abb. 3.18C,G,K), welche in der Vergrößerung deutlicher zutage traten (Abb. 3.18D,H,L). Die Kolokalisationen erstreckten sich in erster Linie auf plasmamembranöse und subplasmamembranöse Bereiche (weiße Pfeile in D,H und L) und waren in geringerem Maße in Form intrazellulärer Cluster detektierbar (graue Pfeile in D,H und L). Auch in diesem Fall wurde ein Mindestmaß von 20 Zellen pro Transfektion über OBCOL analysiert. Die Vorgehensweise entsprach dabei der unter Kapitel 2.9.3 beschriebenen. Die relativen Kolokalisationen zwischen KCC2 und den ArfGAP-defizienten Mutanten ( $GIT1^{R39A}$ ,  $GIT1^{\Delta GAP}$ ) wurde auf die zwischen KCC2 und  $GIT1^{wt}$  als 100 % normiert. In Abbildung 3.18M sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aufgeführt. Es zeigte sich, dass die Kolokalisation nach Mutation der ArfGAP-Domäne ebenfalls um etwa 10 % ( $GIT1^{R39A}$ :  $112,5 \pm 12,6$  %;  $GIT1^{\Delta GAP}$ :  $109,5 \pm 13,9$  %) im Vergleich zum Wildtyp ( $100 \pm 13,7$  %) zunahm. Der Student's *t*Test zeigte an, dass diese Abweichungen signifikant ( $GIT1^{\Delta GAP}$ :  $p = 0,03$ ) bis hoch signifikant ( $GIT1^{R39A}$ :  $p = 0,002$ ) waren. Auch in diesem Fall ließ sich nicht ausschließen, dass die Unterschiede in der quantitativen Kolokalisation aus Differenzen im Expressionslevel zwischen Wildtyp und Mutanten herrührten.

### **3.11 Analyse $\beta$ PIX-bindedefizienter KCC2-Mutanten**

Punktmutationen im  ${}_{673}QLLV_{676}$ -Motiv an KCC2 führten im Y2H-System zu einem Erliegen der Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX (vgl. Kapitel 1.2). Durch Aktivitätsmessungen und immunzytochemische Analysen sollten diese Mutanten in HEK293-Zellen weitergehend charakterisiert werden. Dazu wurden zielgerichtete Mutagenesen auf einem full-length-KCC2 durchgeführt, welches in einem eukaryotischen Expressionsvektor vorlag (Lanski 2009). Da die  $KCC2^{V676A}$ -Mutante bis zum Ende der vorliegenden Arbeit nicht fertig gestellt werden konnte, wurden die im Folgenden beschriebenen Analysen nur mit den übrigen drei Mutanten ( $KCC2^{Q673A}$ ,  $KCC2^{L674A}$ ,  $KCC2^{L675A}$ ) im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt.

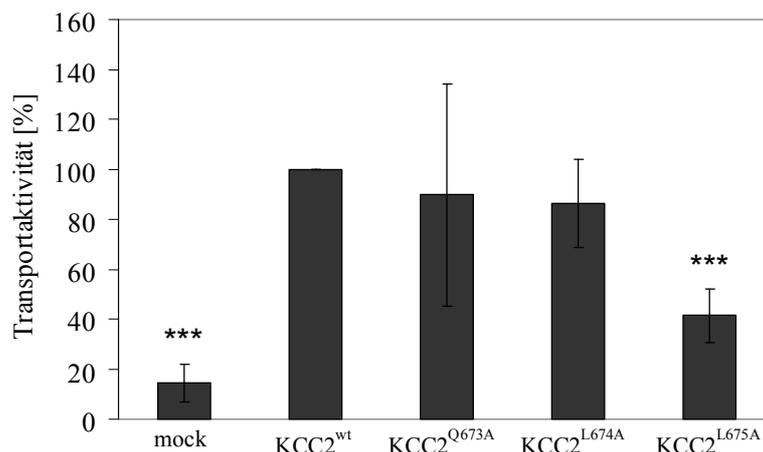
#### **3.11.1 Einfluss von Alanin-Mutationen im $\beta$ PIX-Bindemotiv auf die Transportaktivität von KCC2**

Um feststellen zu können, ob und inwiefern der im Y2H-System gezeigte Rückgang der Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX durch Einzelmutationen im Bindemotiv einen Einfluss auf die Transportaktivität von KCC2 hat, wurden Fluxmessungen durchgeführt.

Die KCC2-Mutanten wurden heterolog in HEK293-Zellen exprimiert. Als Kontrollen dienten mock-transfizierte Zellen und solche, in denen der Wildtyp von KCC2 überexprimiert wurde.

Die gemessenen Aktivitäten der Mutanten und der Mock-Transfektion wurden auf die Transportaktivität des Wildtyps (100 %) normiert.

In Abbildung 3.19 sind die Mittelwerte aus jeweils mindestens 12 Einzelmessungen und die daraus resultierenden Standardabweichungen grafisch dargestellt. Der Vergleich zwischen dem  $KCC2^{wt}$  und der  $KCC2^{Q673A}$ - sowie der  $KCC2^{L674A}$ -Mutante ließ keine signifikanten Unterschiede in der Transportaktivität erkennen ( $p > 0,05$ ). Der einzige Aktivitätsverlust war bei der  $KCC2^{L675A}$ -Mutante zu verzeichnen. Der Flux dieser Mutante war um nahezu 60 % ( $41,4 \pm 10,6$  % des Wildtyps) reduziert und die Reduktion erwies sich als höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ). Alle Mutanten zeigten eine höchst signifikante ( $p \leq 0,001$ ) Erhöhung der Transportaktivität gegenüber der basalen Transportaktivität in mock-transfizierten Zellen (mock:  $14,3 \pm 7,6$  % des Wildtyps).



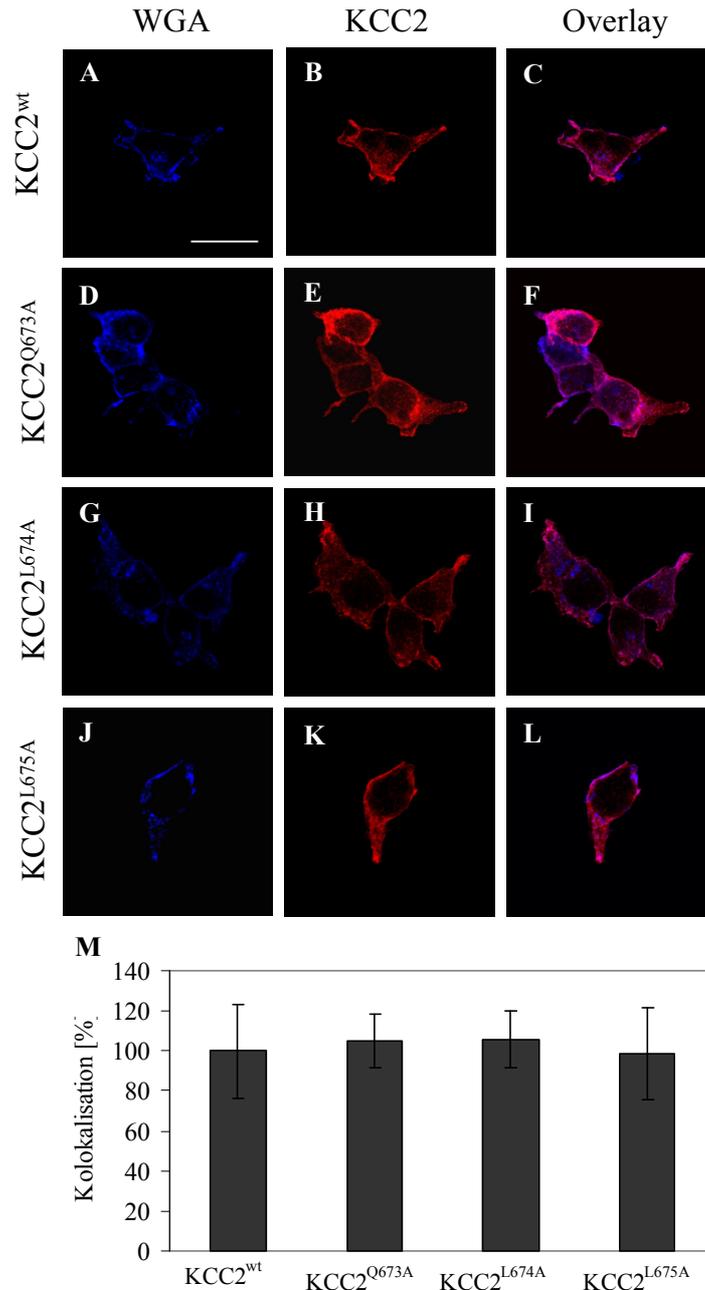
**Abb. 3. 19: Transportaktivität von  $\beta$ PIX-bindedefizienten KCC2-Mutanten.**

HEK293-Zellen wurden mit pcDNA3.1 oder  $KCC2^{wt}$  beziehungsweise KCC2-Punktmutanten transfiziert und die Transportaktivität mittels  $^{86}\text{Rb}^+$ -Messungen ermittelt. Die ermittelten Werte sind auf die  $KCC2^{wt}$  Transfektion in HEK293-Zellen als 100 % normiert. Nach Transfektion von  $KCC2^{wt}$  erhöhte sich die in mock-transfizierten HEK293-Zellen gemessene basale  $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme um das 7-fache. Während die  $KCC2^{Q673A}$ - und die  $KCC2^{L674A}$ -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp keine signifikante Veränderung in der Transportaktivität zeigten, von  $KCC2^{L675A}$  um fast 60 % ( $41,4 \pm 10,6$  %) reduziert. Vermessen wurden jeweils 3 technische Replikate pro unabhängiges Experiment, von denen mindestens 3 durchgeführt wurden. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. ( $p \leq 0,05$ , \*\*,  $p \leq 0,001$ , \*\*\*, Student's *t*Test)

### 3.11.2 Einfluss von Alanin-Mutationen im $\beta$ PIX-Bindemotiv auf die subzelluläre Lokalisation von KCC2

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der Transportaktivität der KCC2-Mutanten auf Veränderungen in der Oberflächenexpression zurückzuführen sind, wurden immunzytochemische Analysen durchgeführt. Die mit dem KCC2<sup>wt</sup> oder den Mutanten transfizierten Zellen wurden zunächst mit einem AlexaFluor633-markiertem WGA markiert. Im Anschluss an die darauf folgende Fixierung wurden die Zellen einer immunzytochemischen Färbung unterzogen. Dabei wurde das überexprimierte KCC2 (Wildtyp und Mutanten) über einen monoklonalen AK (N1/12, Neuromab) in Kombination mit einem sekundären AlexaFluor568-AK nachgewiesen. Die in Abbildung 3.20A-L gezeigten Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop erstellt. Die membranständige WGA-Markierung (Abb. 3.20A,D,G,J) wurde zur besseren Unterscheidbarkeit im Anschluss an die konfokale Mikroskopie digital blau gefärbt. Die in rot dargestellte KCC2-IR (Abb. 3.20B,E,H,K) zeigt bei allen KCC2-Mutanten (E,H,K) eine dem Wildtyp (B) vergleichbare Verteilung. In allen Fällen ist sowohl plasmamembranös als auch intrazellulär eine KCC2-IR zu beobachten. In den Überlagerungsdarstellungen (Abb. 3.20C,F,I,L) ist die Kollokalisierung zwischen der KCC2-IR und dem WGA-Label in magenta sichtbar. Die intrazellulären KCC2-Signale sind weiterhin in rot zu sehen. Subjektiv betrachtet lassen sich bezüglich der Quantität der Kollokalisierung keine Unterschiede feststellen. Um den subjektiven Eindruck bezüglich der Kollokalisierung zu verifizieren, wurde eine OBCOL-Analyse (vgl. Kapitel 3.10) durchgeführt. Pro Transfektion wurde ein Minimum von 20 Zellen quantifiziert. Die relative Kollokalisierung zwischen den KCC2-Mutanten und WGA wurde auf die zwischen KCC2<sup>wt</sup> und WGA als 100% normiert. In Abbildung 3.20M sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierungen grafisch dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ( $p > 0,05$ ). Dies deutet darauf hin, dass der Rückgang in der Transportaktivität der KCC2<sup>L674A</sup>-Mutante nicht auf eine Verringerung der Oberflächenexpression zurückzuführen ist.

Zusammengenommen zeigten die Analysen der Punktmutanten, dass nur die Mutation des AS-Restes L675 zu einer Reduktion der Transportaktivität führt. Diese geht jedoch nicht mit einer veränderten Oberflächenexpression der Mutante einher.



**Abb. 3.20: Quantifizierung der membranständigen Lokalisation von KCC2 und seinen Mutanten in HEK293 Zellen über die Kolokalisation mit WGA.**

Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von transfizierten HEK293 Zellen (A-L) und die Quantifizierung der KCC2-WGA-Kolokalisation (M). 48 h nach der Transfektion vor der Immunfärbung wurden die Oberflächen der Zellen für mit AlexaFluor633-markiertem WGA gelabelt (A,D,G,J). Das WGA-Label der Oberfläche wurde der besseren Unterscheidbarkeit halber nach der konfokalen Mikroskopie digital blau gefärbt. Das überexprimierte KCC2 (B,E,H,K) ist rot dargestellt. Die KCC2-Punktmutanten (E,H,K) weisen bezüglich ihrer Verteilung subjektiv betrachtet keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (B) auf. In allen gezeigten Zellen ist die Kolokalisation mit WGA (C,F,I,L) in magenta sichtbar und auf die plasmamembranständigen sowie plasmamembrannahahe Bereiche begrenzt. Skala: 25  $\mu$ m. Zusätzlich zu der bildlichen Auswertung wurde eine Quantifizierung der KCC2-WGA-Kolokalisation mittels des OBCOL-Plugins bei ImageJ vorgenommen (S). Diese Auswertung ließ ebenfalls keine Veränderungen in der Relation  $KCC2_{\text{kolokalisiert}}/KCC2_{\text{gesamt}}$  bei den verschiedenen Transfektionen erkennen. Die dargestellten Werte sind auf mock-Transfektionen als 100 % normiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.  $n \geq 20$ .

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Interaktion zwischen dem neuronalen  $K^+Cl^-$ -Kotransporters KCC2 und dem GEF-Protein  $\beta$ PIX zu charakterisieren. Dazu wurden die Kollokalisierung von KCC2 und  $\beta$ PIX zunächst immunhistochemisch analysiert. Basierend auf diesen Daten wurden funktionelle Untersuchungen zur Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX durchgeführt. Schließlich wurde anhand der generierten und unter Berücksichtigung von Literaturdaten ein Modell zum Einfluss von  $\beta$ PIX auf KCC2 entwickelt.

### *4.1 Entwicklungsabhängige Veränderungen in der KCC2-Verteilung zwischen P15 und P30*

Durch seine Rolle in der inhibitorischen Neurotransmission (vgl. Kapitel 1.1.1) ist der  $K^+Cl^-$ -Kotransporter KCC2 in der Nähe inhibitorischer Synapsen lokalisiert (Williams et al. 1999; Báldi et al. 2010). Doch auch im Bereich dendritischer Dornen, welche einen Großteil der exzitatorischen Synapsen im ZNS beherbergen, ist KCC2 abundant (Gulyás et al. 2001; Ludwig et al. 2003; Li et al. 2007). Das KCC2-Vorkommen in diesen Bereichen ist jedoch weniger seiner Transportfunktion, als vielmehr seiner Rolle als morphogenem Faktor und Ankerprotein zuzuschreiben (Li et al. 2007; Gauvain et al. 2011; vgl. auch Kapitel 1.1.2).

Ein Großteil der Veränderungen bezüglich der Verteilung von KCC2 im Verlauf der Entwicklung geht mit dem D/H-Wechsel und der Entstehung synaptischer Verbindungen (inhibitorischer Synapsen durch den D/H-Wechsel und exzitatorischer Synapsen im Zuge der Dornenmorphogenese) einher (Rivera et al. 1999; Li et al. 2007; vgl. auch Kapitel 1.1 und 1.1.1). Dabei ist der D/H-Wechsel in den meisten Bereichen des ZNS am Ende der zweiten Postnatalwoche abgeschlossen (Rivera et al. 2005). Die Genese dendritischer Dornen hingegen dauert bis über die dritte Postnatalwoche hinaus an (Bourne and Harris 2008). So liegt am Ende der dritten Postnatalwoche im Hippocampus eine Dornendichte vor, welche noch um fast 20 % geringer ist als im adulten Stadium (Kirov et al. 2004).

#### **4.1.1 Veränderungen in der KCC2-Verteilung zwischen P15 und P30 im Hippocampus**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigten nur geringfügige Veränderungen in der KCC2-Verteilung zwischen P15 und P30. Diese gehen offenbar mit einer bis nach P15 andauernden Neuritogenese und Synaptogenese einher.

In allen Bereichen des Hippocampus zeigt KCC2 sowohl bei P15 als auch bei P30 eine in erster Linie plasmamembranständige Abundanz (Lu et al. 1999; Gulyás et al. 2001; Báldi et al. 2010; vgl. Abb. 3.2 und 3.3). Dabei weisen die molekularen Bereiche eine durchweg höhere KCC2-IR auf als die granulären (Báldi et al. 2010; vgl. Abb. 3.1A und D). In den granulären Bereichen liegt KCC2 stark an der Plasmamembran und nur geringfügig intrazellulär vor (Gulyás et al. 2001; Chamma et al. 2012; vgl. Abb. 3.2 und 3.3). Zwischen P15 und P30 sind in diesen Bereichen augenscheinlich keine Veränderungen auszumachen (Abb. 3.2 und 3.3 jew. A,D). Dies korreliert mit Befunden von Rivera et al. (1999) die darauf hindeuten, dass der D/H-Wechsel im Hippocampus bereits vor P15 abgeschlossen ist.

Die Veränderungen zwischen den beiden examinieren Altersstadien manifestieren sich in erster Linie im Str. moleculare des DG. Diese sind auch in den von Gulyás et al. (2001) gezeigten Abbildungen ersichtlich, wurden jedoch nicht weiter diskutiert. In diesem Bereich scheint die KCC2-IR zwischen P15 und P30 weiterhin zuzunehmen. In Mäusen werden 15 % der Körnerzellen erst nach P15 generiert (Angevine 1965; Bayer 1980). Die Dendriten der granulären Zellen werden in die Molekularschicht des Gyrus dentatus ausgesendet, wo sie den entorhinalen Eingang empfangen (Fricke and Cowan 1977). Dementsprechend ist von einer Zunahme der Dendritendichte in diesem Bereich auszugehen. Darüber hinaus weist das Str. moleculare im Gegensatz zu den übrigen molekularen Bereichen des Rattenhippocampus, in denen die Dornenentwicklung bei P5 (Str. lacunosum moleculare) bzw. P10 (Str. radiatum und oriens) einsetzt, erst zu einem späteren Zeitpunkt eine Dornenentwicklung auf (Haschke et al. 1980). Dies deutet zusammengenommen darauf hin, dass die Zunahme der IR in diesem Bereich mit der Dendritogenese und Dornenentwicklung korreliert. Zur weiterführenden Untersuchung dieser Annahme könnten Doppelfärbungen mit KCC2 und einem Dendriten-(MAP2) und einem Marker für exzitatorische Postsynapsen (PSD95) herangezogen werden. Im Falle eines Zusammenhanges zwischen KCC2-Expression und Synapto- bzw. Dendritogenese müsste die KCC2-IR in den MAP2- sowie auch in den PSD95-positiven Bereichen bei fortschreitender Entwicklung zunehmen.

Zusammengefasst zeigen die immunhistochemischen Daten zu KCC2 im Hippocampus, dass sich die Verteilung dieses Proteins zwischen P15 und P30 nur in den dendritischen Bereichen verändert. Dabei korrelieren die Veränderungen in diesem Zeitraum mit der Bildung neuer Zellen und schließlich neuer exzitatorischer Synapsen. Dies stimmt mit bereits publizierten Daten zu KCC2 überein, welche KCC2 zum einen als Marker für neuronale Reifung (Rivera et al. 1999; Mikawa et al. 2002; Stein et al. 2004) und zum anderen als bifunktional im Bereich dendritischer Dornen beschreiben (Li et al. 2007; Gauvain et al. 2011).

#### 4.1.2 Veränderungen in der KCC2-Verteilung zwischen P15 und P30 im Cerebellum

Die Veränderungen in der KCC2-Verteilung im Cerebellum zwischen P15 und P30, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit detektiert wurden, sind sowohl in den granulären als auch in den molekularen Bereichen detektierbar. In dieser Hirnregion scheinen die Veränderungen ebenfalls mit der fortschreitenden Dendrito- und Synaptogenese zu korrelieren. Jedoch sind in diesem Bereich dabei auch Auswirkungen auf die KCC2-IR in der Purkinjezellschicht erkennbar.

Während bei P15-Tieren die KCC2-IR in erster Linie an der Plasmamembran der Purkinjezellsomata vorliegt, wird die KCC2-IR in diesem Bereich bei P30 schlechter abgrenzbar (vgl. Abb. 3.3J und 3.3J). Ähnliche Vorgänge im Verlauf der Reifung von Purkinjezellen wurden von Simat et al. (2007) gezeigt. Ihre entwicklungsabhängigen Untersuchungen an P15- und P20-Tieren deuteten auf eine Herunterregulation von KCC2 im Bereich der Purkinjezellsomata hin. Arata et al. (2010) führten die Veränderungen in der KCC2-IR in den somatischen Membranen der Purkinjezellen auf eine Umverteilung in die in der Molekularschicht lokalisierten dendritischen Bereiche zurück. Die Reifung der Dendritenbäume der Purkinjezellen ist bei P15 noch nicht abgeschlossen (Kaneko et al. 2011). In frühen Postnatalstadien liegen die Dendritenbäume der Purkinjezellen multiplanar bezüglich der Sagittalebene vor (Kaneko et al. 2011). Zwischen den Postnataltagen 18 und 25 werden die in andere Ebenen projizierenden Dendriten abgebaut, so dass die Dendritenbäume der Purkinjezellen im Adultstadium eine fast ausschließlich monoplanare Ausdehnung aufweisen (Kaneko et al. 2011). Die Remodellierung wird vermutlich maßgeblich durch transiente Kontakte mit multiplen Kletterfasern gesteuert. Diese werden aktivitätsabhängig abgebaut oder gestärkt, so dass nach Abschluss des Verfeinerungsprozesses eine monoplanare Purkinjezelle von einer Kletterfaser (über ein oder mehrere synaptische Kontakte) innerviert wird (Hashimoto et al. 2009; Kaneko et al. 2011). Erste Untersuchungen an KCC2 in diesem Zusammenhang deuten darauf hin, dass KCC2 eine Kontrollfunktion in der aktivitätsabhängigen Verschaltung der Purkinjezellen mit den Kletterfasern zukommt (Arata et al. 2010). Im Anschluss an die Verfeinerungsprozesse wachsen die Purkinjezellen zu ihrer endgültigen Größe aus (Kaneko et al. 2011; Abb. 3.3J). Die punktuellen Abundanzen von KCC2 entlang der Dendritenbäume wurden von Williams et al. (1999) auf die Lokalisation von KCC2 in der Nähe inhibitorischer Synapsen zurückgeführt. KCC2 übernimmt jedoch in hippocampalen dendritischen Dornen verschiedene Funktionen (Li et al. 2007; Gouvain et al. 2011; vgl. Kapitel 1.1.2). Daher ist es in diesem Zusammenhang wahrscheinlicher, dass das punktuelle Färbemuster nicht ausschließlich auf die KCC2-Abundanz an inhibitorischen Synapsen zurückzuführen ist, sondern auch aus der An-

häufung von KCC2 in dendritischen Dornen resultiert. Dafür spricht auch, dass die synaptischen Verschaltungen zwischen Purkinjezellen und Kletterfasern erregend sind (Silver et al. 1998). Diese Aussage könnte durch Untersuchungen an primären cerebellaren Kulturen aus KCC2-knockout-Tieren verifiziert werden. Wenn KCC2 bezüglich der Reifung dendritischer Dornen im Cerebellum die gleiche Funktion übernimmt wie in denen des Hippocampus' wären vermehrt filopodienartige Ausläufer zu detektieren. Darüber hinaus wäre die Morphologie der Dornen durch heterologe Expression von (transportinaktivem) KCC2 widerherstellbar (vgl. Li et al. 2007).

Alles in allem sind auch im Cerebellum entwicklungsabhängige Veränderungen der KCC2-Verteilung ersichtlich, welche mit der Dornenmorphogenese korrelieren. Die Veränderung der KCC2-IR im Bereich der Purkinjezellsomata zwischen P15 und P30 scheint aus einer Umverteilung von KCC2 in die Dendriten zu resultieren. In diesen Ausläufern wird eine Rolle von KCC2 in der entwicklungsabhängigen Stabilisierung synaptischer Kontakte vermutet (Arata et al. 2010).

#### ***4.2 Entwicklungsabhängige Veränderungen in der $\beta$ PIX-Verteilung zwischen P15 und P30***

Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegen über die Verteilungsmuster von  $\beta$ PIX im Gehirn in früheren postnatalen Stadien keine publizierten Daten vor. Entwicklungsabhängige Untersuchungen am Gesamtgehirn im Western Blot deuten jedoch darauf hin, dass  $\beta$ PIX im Verlauf der Entwicklung herunterreguliert wird (Park et al. 2003). Kollokalisationsstudien mit einem Gliazellmarker lieferten Hinweise, dass  $\beta$ PIX in Hippocampus und Cortex in erster Linie neuronal exprimiert wird. In hippocampalen Kulturen konnte gezeigt werden, dass sich die  $\beta$ PIX-IR über Somata und Dendriten bis in die Axone neuronaler Zellen erstreckt (Park et al. 2003; Leinenweber 2006). Dies steht im Einklang mit den für  $\beta$ PIX beschriebenen Funktionen bezüglich der Neuritogenese (Manser et al. 1998; Feng et al. 2006; Za et al. 2006) und der Dornenmorphogenese (Menon et al. 2010, vgl. Kapitel 1.2.1).

##### **4.2.1 Veränderungen in der $\beta$ PIX-Verteilung zwischen P15 und P30 im Hippocampus**

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Veränderungen in der  $\beta$ PIX-IR im Hippocampus korrelieren mit den bereits beschriebenen Funktionen dieses Proteins im Neuritenwachstum und in der Dornenmorphogenese. Dabei manifestieren sich die Veränderungen in erster Linie in den molekularen Schichten.

In den somatischen Regionen weist  $\beta$ PIX eine starke intrazelluläre Abundanz auf, welche augenscheinlich bis an die Plasmamembranen heranreicht. Die IR erstreckt sich außerdem über die in das Str. moleculare projizierenden Dendriten der CA1- und CA3-Region sowie die Molekularschicht des Gyrus dentatus' (vgl. Abb. 3B,E,H und Park et al. 2003). Über die beschriebene  $\beta$ PIX-IR in Axonen, welche in primären Kulturen gezeigt wurde (Park et al. 2003), kann keine Aussage getroffen werden. Um dies in Schnitten zeigen zu können, wäre eine Ko-färbung mit einem axonalen Marker (z. B. Neurofilament-H) sinnvoll. Die  $\beta$ PIX-Abundanz in den dendritischen Bereichen stellt sich größtenteils diffus dar (vgl. Abb.3.2 und 3.3 jew. B,E,H). Dies wurde bereits in dissoziierten hippocampalen Kulturen gezeigt und ist auf die Lokalisation von  $\beta$ PIX in Prä- und Postsynapsen zurückzuführen (Park et al. 2003; Sun and Bamji 2011).

Die detektierbaren Unterschiede in den granulären Schichten zwischen P15 und P30, welche in Kapitel 3.3 beschrieben wurden, gehen augenscheinlich nicht mit einer veränderten  $\beta$ PIX-Verteilung in den Somata einher. Deutlichere Veränderungen sind hingegen in den molekularen Schichten zu erkennen. Unter der Neuropilfärbung in jüngeren Tieren sind die Dendriten, welche in diesem Bereich lokalisiert sind, schlechter abgrenzbar als im adulten Stadium. Die Veränderung in der  $\beta$ PIX-IR könnte einerseits auf eine Hochregulation von  $\beta$ PIX in den apikalen Dendriten der Pyramidalzellen zurückzuführen sein. Eine augenscheinliche Hochregulation von  $\beta$ PIX in diesen Zellen über DIV20 hinaus wurde bereits in der dissoziierten hippocampalen Kultur gezeigt (Leinenweber 2006). Andererseits ist auch ein Rückgang der  $\beta$ PIX-IR im Neuropil möglich. Dies würde mit der von Park et al. (2003) beschriebenen Herunterregulation der  $\beta$ PIX-Expression im Gesamtgehirn korrelieren. Immunoblotanalysen vom Hippocampus könnten Aufschluss darüber geben, ob dieser Bereich des Gehirns im Bezug auf die Veränderung der  $\beta$ PIX-Expression einen Sonderstatus einnimmt. Bei einer Abnahme der  $\beta$ PIX-Abundanz im Hippocampus könnten die Veränderungen in der  $\beta$ PIX-Verteilung zum einen auf einen Rückgang der Dendritendichte zurückzuführen sein. Dies wäre mittels einer  $\beta$ PIX-MAP2-Doppelfärbung überprüfbar. Zum anderen liegen bei P15 etwa 50 % der dendritischen Dornen im Hippocampus in Form filopodienartiger Ausläufer vor (Kirov et al. 2004). Auf Grund der Rolle von  $\beta$ PIX im Neuritenwachstum (Shin et al. 2002) ist die Abundanz dieses Proteins in den Wachstumszonen dieser Strukturen denkbar. Darüber hinaus ist  $\beta$ PIX an der Ausbildung der Morphologie dendritischer Dornen sowie an der Reifung der exzitatorischen Synapsen beteiligt (Calabrese et al. 2006; Saneyoshi et al. 2008). Daher ist es denkbar, dass  $\beta$ PIX nach Abschluss der Dornenmorphogenese herunterreguliert wird. Die beschriebenen Veränderungen zwischen P15 und P30 sind besonders deutlich im Str. lucidum der CA3-

Region erkennbar. In diesem Bereich liegen die synaptischen Kontakte zwischen den Dendriten der Pyramidalzellen der CA3-Region und den aus dem Gyrus dentatus projizierenden Moosfasern (Axone der granulären Zellen des Gyrus dentatus') vor (Qin et al. 2001; Chang et al. 2009). Im Verlauf der Entwicklung dieser synaptischen Kontakte bilden sich an den Dendriten der Pyramidalzellen große PSD95-positive Strukturen (Qin et al. 2001). Zur Verifizierung der Hypothese, dass das Färbemuster bei P15 auf die Entwicklung synaptischer Verbindungen in diesem Bereich zurückzuführen ist, wären Doppelfärbungen mit anti- $\beta$ PIX und Antikörpern gegen Synaptophysin (Präsynapsen) bzw. PSD95 (Postsynapsen) nötig.

Insgesamt deuten die Befunde zur  $\beta$ PIX-Verteilung im Hippocampus darauf hin, dass sich die Verteilung dieses Proteins nach P15 ausschließlich in den molekularen Bereichen verändert. Dabei korrelieren die Veränderungen in der  $\beta$ PIX-IR mit seinen Rollen bezüglich der Entwicklung exzitatorischer Synapsen und der Dornenmorphogenese (Park et al. 2003; Calabrese et al. 2006). Ob allerdings die beobachteten Umverteilungen tatsächlich ausschließlich auf diese entwicklungsabhängigen Vorgänge zurückzuführen sind, konnte im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht erschlossen werden.

#### **4.2.2 Veränderungen in der $\beta$ PIX-Verteilung zwischen P15 und P30 im Cerebellum**

Im Cerebellum finden zwischen den untersuchten Altersstadien Veränderungen bezüglich der  $\beta$ PIX-Verteilung statt, welche in räumlicher und zeitlicher Hinsicht mit seinen Rollen bezüglich der Migration sowie der Dornenmorphogenese und Synaptogenese korrelieren.

Die Analysen der  $\beta$ PIX-Verteilung im Cerebellum von Mäusen zeigten eine starke  $\beta$ PIX-IR in den Somata der Purkinjezellen (vgl. Abb. 3.3K). In der Molekularschicht ist  $\beta$ PIX in adulten Tieren in erster Linie in den Dendriten der Purkinjezellen detektierbar (vgl. Abb. 3.3K; Park et al. 2003). Darüber hinaus zeigte sich in diesem Bereich eine punktuelle  $\beta$ PIX-Abundanz, welche zum Teil entlang dort lokalisierter Neuriten verläuft. Die  $\beta$ PIX-positiven Neuriten stellen vermutlich zum einen die Dendriten der Stern- und Korbzellen dar. Dies könnte durch Doppelfärbungen mit einem MAP2-AK verifiziert werden. Zum anderen projizieren die Axone der Körnerzellen durch die Purkinjezellschicht in diesen Bereich. Diese Strukturen verlaufen radial durch die Molekularschicht und teilen sich in zueinander parallel verlaufende Fasern („Parallelfasern“), deren Ausrichtung der des Foliums entspricht (Greenstein and Greenstein 2000). Die Abundanz von  $\beta$ PIX in Neuriten und Somata der Körnerzellen wurde in primären Kulturen gezeigt (Audebert et al. 2004). Dennoch konnte nicht klar dargelegt werden, ob sich die Expression von  $\beta$ PIX in diesen Zelltypen auf Dendriten beschränkt oder

auch auf die Axone der Körnerzellen erstreckt. Dies könnte in Schnitten über Doppelfärbungen mit einem Neurofilament-H-AK untersucht werden.

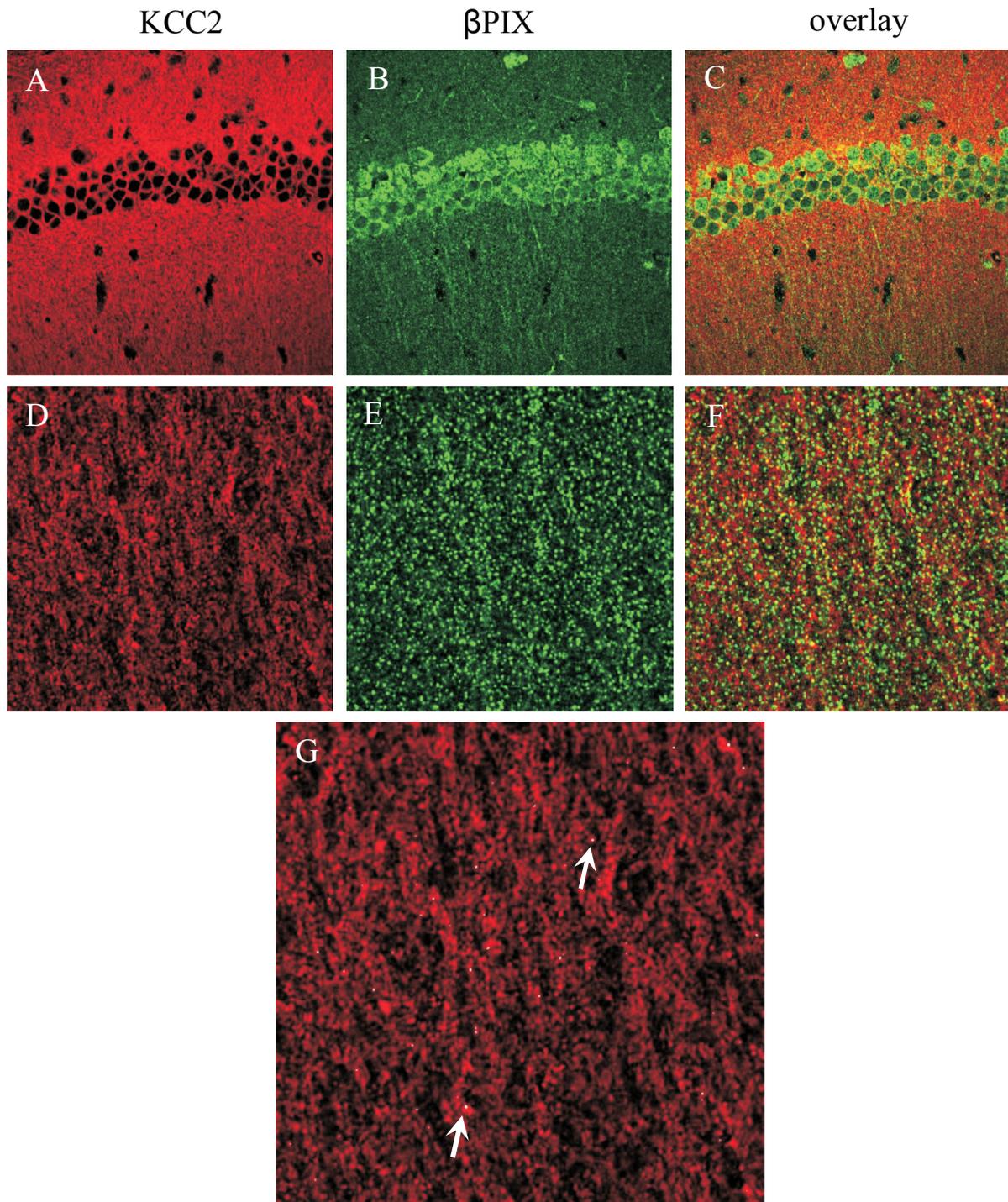
Im Cerebellum 15 Tage alter Mäuse ist eine starke  $\beta$ PIX-IR in den Somata der Purkinjezellen detektierbar. Im plasmamembrannahen Bereich der Somata liegt  $\beta$ PIX in diesem Altersstadium zum Teil in stark immunreaktiven Clustern vor, welche bei P30 in dieser Form nicht sichtbar sind. Ähnliche Beobachtungen machten Castejón und Kollegen bei der Betrachtung der Verteilungsmuster synaptischer Marker (PSD95 und Syn-I) im Verlauf der Entwicklung. Sie führten diese Veränderungen des Verteilungsmusters auf die Eliminierung der transienten synaptischen Kontakte zwischen Purkinjezellsomata und aufsteigenden Kletterfasern zurück (Castejon et al. 2004). Im fließenden Übergang bilden sich GABAerge synaptische Kontakte zwischen den Purkinjezellsomata und den Axonen der Korbzellen. Die glutamergen Synapsen zwischen den Purkinjezellen und den Kletterfasern werden bis P15 fast vollständig in die dendritischen Bereiche der Purkinjezellen umgelagert (Hashimoto et al. 2009; Ichikawa et al. 2011). Dabei weist ein Purkinjezeldendrit zunächst multiple synaptische Kontakte zu ein oder mehreren Kletterfasern auf. Ein Teil dieser Synapsen wird im Verlauf von Verfeinerungsprozessen bis P21 abgebaut (Kaneko et al. 2011). Der Rückgang der Synapsendichte zwischen P15 und P30 stellt eine Erklärungsmöglichkeit für die veränderte Neuropilfärbung für  $\beta$ PIX zwischen diesen beiden Altersstadien dar. Um diese Hypothese weiterführend untersuchen zu können, wären entwicklungsabhängige Kollokalisationsstudien zwischen  $\beta$ PIX und den Synapsenmarkern PSD95 und Syn-I sinnvoll. Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in der Migration neuronaler Zellen zwischen P15 und P30. Die Migration der inhibitorischen Interneurone der Molekularschicht ist erst um P20 abgeschlossen (Takayama and Inoue 2006; Simat et al. 2007) und auch die innere Körnerschicht (inner granular layer - IGL) ist bei P15 noch nicht vollständig ausgebildet. Die in diesem Bereich lokalisierten Körnerzellen werden bis zum Beginn der dritten Postnatalwoche in den lateralsten Bereichen der Molekularschicht (external granular layer - EGL) gebildet (Altman 1972b). Entwicklungsabhängige *in situ*-Hybridisierungsexperimente zeigten die Abundanz von  $\beta$ PIX-mRNA in der EGL und auch in der IGL. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde eine Korrelation zwischen der  $\beta$ PIX-Expression und der neuronalen Migration beschrieben (Kim et al. 2000; Kim et al. 2001). Da  $\beta$ PIX an der Migration neuronaler Zellen beteiligt ist (Mayhew et al. 2007) ist es möglich, dass die diffuse  $\beta$ PIX-IR in der Molekularschicht bei P15 zum Teil auf migrierende Neurone zurückzuführen ist.

Die Veränderung der  $\beta$ PIX-Verteilung in den betrachteten Bereichen des Cerebellums korreliert zeitlich mit der Genese dendritischer Dornen und Synapsen. Darüber hinaus weist die

Molekularschicht zwischen den beiden betrachteten Altersstadien Veränderungen bezüglich der  $\beta$ PIX-IR auf, welche mit der Migration unreifer Körnerzellen in Zusammenhang stehen könnten. Eine Diskrepanz zum Hippocampus ergibt sich bei den entwicklungsabhängigen Verteilungsmustern in den somatischen Bereichen. Während diese im Hippocampus zwischen P15 und P30 augenscheinlich stabil bleiben, gibt es in den Purkinjezellen des Cerebellums Veränderungen, welche mit einem Wechsel der synaptischen Verschaltungen von inhibitorisch zu erregend in diesem Bereich korrelieren.

### ***4.3 KCC2 und $\beta$ PIX liegen in den Somata neuronaler Zellen kolokalisiert vor***

In den voranstehenden Punkten wurde diskutiert, dass sowohl KCC2 als auch  $\beta$ PIX Funktionen bezüglich der Entwicklung dendritischer Dornen übernehmen. Die Daten zeigen, dass zwischen P15 und P30 bezüglich der IR beider Proteine Veränderungen stattfinden, die in den molekularen Schichten mit der Entwicklung dendritischer Dornen korrelieren. Ob und inwiefern dabei beide Proteine in der Dornenmorphogenese interagieren, konnte im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Im Rahmen einer Kollaboration wurden die Schnitte zur weiterführenden Analyse zu A. Ludwig an die Universität von Helsinki gesendet. Die aus dieser Zusammenarbeit resultierenden Daten für 30 Tage alte Tiere wurden von Frau Dr. Ludwig freundlicherweise zur Verfügung gestellt (vgl. Abb. 4.1). Die Kolokalisation zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX ist in Form kleiner weißer Punkte sichtbar (weiße Pfeile in Abb. 4.1). Im Bereich der Dendriten ist in diesem Altersstadium nur eine äußerst geringe Überlappung der IR von KCC2 und  $\beta$ PIX ersichtlich. Die Kolokalisationsbereiche scheinen sich dabei auf dendritische Dornen zu beschränken (pers. Mitteilung von Dr. A. Ludwig). Ob es sich bei diesen Bereichen um postsynaptische Dichten handelt, ist aus der Abbildung nicht ersichtlich und bedarf weiterer Untersuchungen. Dafür könnten einerseits Markerproteine für postsynaptische Dichten (z. B. PSD95) Verwendung finden. Darüber hinaus könnten auch elektronenmikroskopische Untersuchungen Aufschluss über den Ort der Kolokalisation geben. Nichtsdestoweniger deuten diese geringfügigen Kolokalisationen von KCC2 und  $\beta$ PIX im Adultstadium in den molekularen Bereichen an, dass die beiden untersuchten Proteine nach Abschluss der Dornenmorphogenese größtenteils unabhängig voneinander agieren. Ob die Kolokalisation in diesen Bereichen mit einer Interaktion einhergeht, bleibt abzuwarten. Im Hinblick auf den Aspekt der Dornenentwicklung wäre es sicherlich interessant, die Untersuchungen auf jüngere Altersstadien auszudehnen. Dadurch könnten gegebenenfalls Veränderungen in der Kolokalisation in diesen Bereichen detektiert werden. Diese könnten Hinweise auf eine



**Abb. 4. 1: Analyse der Kolokalisation von KCC2 und βPIX im Str. radiatum der CA1-Region** (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. A. Ludwig)

**A-C** 63x-Vergrößerungen der IR von KCC2 (A) und βPIX (B) sowie der Überlagerungsdarstellung (C) in der CA1-Region. **D-F** Bildausschnitte aus dem Str. radiatum unter 63 x-Vergrößerung mit einem digitalen 6x-Zoom. Dargestellt ist in rot (D) die KCC2- und in grün (E) die βPIX-IR sowie die Überlagerung beider Kanäle (F). **G** Auswertung der Kolokalisation mittels einer Bildanalysesoftware. Die Kolokalisation beider IR ist Form kleiner weißer Spots (weiße Pfeile in G) sichtbar und beschränkt sich auf die Bereiche dendritischer Dornen.

mögliche Interaktion bezüglich der Dornenmorphogenese liefern.

Alternativ besteht die Möglichkeit, dass  $\beta$ PIX in die Regulation der KCC2-Transportaktivität involviert ist. Dabei könnte  $\beta$ PIX entweder die Oberflächenexpression oder die Transportkinetik von KCC2 beeinflussen. In beiden Fällen wäre eine Kollokalisierung im Bereich der somatischen Plasmamembranen zu erwarten. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Kollokalisierung von KCC2 und  $\beta$ PIX in den somatischen Bereichen weitergehend untersucht. Die intensitätsunabhängige Bildanalyse deutete in allen dargestellten somatischen Bereichen des Hippocampus' (Str. radiatum der CA1- und CA3-Region, Str. granulare des Gyrus dentatus') auf Kollokalisierungen im Bereich der Plasmamembranen sowie auch in den angrenzenden Arealen hin (vgl. Abb. 3.4A-L). Ebenso wie die Verteilungen von KCC2 und  $\beta$ PIX für sich betrachtet wiesen auch die Kollokalisationsmuster zwischen P15 und P30 im Hippocampus augenscheinlich keine Veränderungen auf. Im Cerebellum war die Überlappung zwischen den beiden IR an den Plasmamembranen und in angrenzenden Bereichen bei beiden Altersstadien detektierbar. In den intrazellulären Bereichen der Purkinjezellen waren bei P15 die kollokaliserten IR in klar abgegrenzten Bereichen zu erkennen. Die intrazellulär lokalisierten Überlappungsbereiche zerstreuten sich bis P30 zu einem eher diffusen Muster (vgl. Abb. 3.4M-P). Es ist möglich, dass es sich bei den klar abgegrenzten Strukturen, welche in den Purkinjezellsomata bei P15 eine Kollokalisierung aufweisen, um Stationen im biosynthetisch-sekretorischen Weg handelt. Um dies näher zu beleuchten, müssten jedoch Tripelfärbungen mit Markern dieser Kompartimente (Golgi, ER,...) durchgeführt werden.

Der D/H-Wechsel, welcher aus der durch KCC2 verminderten intrazellulären Cl<sup>-</sup>-Konzentration resultiert (Rivera et al. 1999; Ganguly et al. 2001; Mikawa et al. 2002), wird in den Pyramidalzellen des Hippocampus im Verlauf der zweiten Postnatalwoche vollzogen (Stein et al. 2004; Chudotvorova et al. 2005; Rivera et al. 2005). In den Purkinjezellen des Rattencerebellums findet der Wechsel zwischen depolarisierender und hyperpolarisierender Antwort auf Bindung der inhibitorischen Neurotransmitter GABA und Glyzin statt, sobald die Zellen ihre finale Lokalisation erreicht haben. Eilers et al. 2001 determinierten diesen Zeitpunkt des D/H-Wechsels in Purkinjezellen von Ratten auf ~P6. Khirug et al. (2010) zeigten, dass bereits im frühen postnatalen Rattenhippocampus der KCC2-Gehalt für den D/H-Wechsel ausreichend ist. Dabei liegt KCC2 in diesem Altersstadium vornehmlich intrazellulär vor. Durch einen einzelnen pharmakologisch induzierten epileptischen Anfall kann ein für den D/H-Wechsel angemessen hoher KCC2-Anteil in den Bereich der Plasmamembran verschoben werden (Khirug et al. 2010). Auf Grund der verschiedenen Rollen von  $\beta$ PIX im Trafficking transmembraner Proteine ist eine Funktion in diesem Zusammenhang nicht auszu-

schließen. Immunhistochemische Untersuchungen der KCC2- $\beta$ PIX-Kolokalisation in jüngeren Tieren könnte Hinweise auf eine Beteiligung von  $\beta$ PIX an diesem Mechanismus liefern. Weitere Hinweise für eine entwicklungsabhängige Regulation der KCC2-Transportaktivität durch  $\beta$ PIX könnten vergleichende Untersuchungen der Kolokalisation zwischen dem frühen postnatalen und adulten Stadium in den neuronalen Zellen des auditorischen Hirnstammes erbringen. In diesen Zellen liegt KCC2 in frühen Stadien der Entwicklung in einem membranständigen, jedoch inaktiven Zustand vor (Balakrishnan et al. 2003; Blaesse et al. 2006; Blaesse et al. 2009).

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass  $\beta$ PIX und KCC2 in der postnatalen Entwicklung nach P15 im Bereich der somatischen Plasmamembranen einer Vielzahl neuronaler Zellen kolokalisiert vorliegen. Aus diesem Grund stellt  $\beta$ PIX einen Kandidaten für die posttranslationale Modifikation der KCC2-Transportaktivität dar. Die Kolokalisation in dendritischen Dornen hingegen stellt sich im adulten Stadium sehr gering dar. Ein entwicklungsabhängiger Zusammenhang in der Dornenentwicklung kann dabei nicht ausgeschlossen werden. Dennoch wurden die weiterführenden Analysen basierend auf der Kolokalisation von KCC2 und  $\beta$ PIX in den somatischen Bereichen durchgeführt.

#### ***4.4 Veränderung der KCC2-Transportaktivität unter Einfluss von $\beta$ PIX und seinen Interaktionspartnern***

Zur Analyse der Wirkung von  $\beta$ PIX auf die Transportaktivität von KCC2, wurde  $\beta$ PIX allein oder gemeinsam mit verschiedenen Interaktionspartnern in HEK293-Zellen überexprimiert. Obgleich HEK293-Zellen, da sie endogen kein KCC2 exprimieren (Payne 1997), ein artifizielles System für KCC2 darstellen, ist die Funktionalität dieses transmembranen Transporters nach heterologer Expression in diesen Zellen sehr gut beschrieben (Payne 1997). Auf den Daten von Payne aufbauend wurden in HEK293-Zellen bereits verschiedene funktionelle Analysen an heterolog exprimiertem KCC2 durchgeführt (Inoue et al. 2004, Lee et al. 2007, Zhao et al. 2008; Hartmann et al. 2010; Lee et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden für die KCC2-Aktivitätsmessungen stabil mit KCC2 transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Diese wurden zunächst auf Verwendbarkeit untersucht. Im Rahmen der Voruntersuchungen konnte die stabile Expression sowie auch korrekte Lokalisation des Transporters nachgewiesen werden. Transportaktivitätsmessungen unter Einfluss eines KCC2-Inhibitors bestätigten die Funktionalität des Transporters unter den gewählten Bedingungen (vgl. Kapitel 3.5).

#### 4.4.1 Die Überexpression der Wildtypen von $\beta$ PIX und PAK3 hat keinen Einfluss auf die Transportaktivität von KCC2

Auf Grund seiner bislang beschriebenen Funktionen ist es wahrscheinlich, dass  $\beta$ PIX keinen direkten Einfluss auf KCC2 nimmt.  $\beta$ PIX aktiviert in seiner Funktion als GEF-Protein kleine GTPasen (Manser et al. 1998; Loo et al. 2004; Hoefen and Berk 2006). Durch seine hohe Anzahl an Bindestellen wirkt es darüber hinaus als Ankerprotein (Garcia-Mata and Burrige 2007). Diese beiden Eigenschaften ermöglichen es  $\beta$ PIX, zielgerichtete Signalprozesse in Gang zu setzen. Ein vielfach genannter Interaktionspartner ist dabei die Serin/Threonin-Kinase PAK (Manser et al. 1998; Kim et al. 2000; Brown et al. 2002; Webb et al. 2006; Hoefen and Berk 2006; Mayhew et al. 2007; Valdes et al. 2011). PAK gehört zu der Familie der Ste20 Serin/Threonin-Kinasen, zu denen auch die Kinasen SPAK und OSR-1 zählen (Delpire and Gagnon 2008). Die Kinaseaktivitäten von SPAK und OSR-1 führen zur Inaktivierung von KCC2 (vgl. Kapitel 1.1.3; Rinehart et al. 2011). Aufgrund der verwandtschaftlichen Beziehung zwischen SPAK, OSR-1 und PAK wäre eine ähnliche Funktion von PAK unter Regulation von  $\beta$ PIX gegenüber KCC2 prinzipiell denkbar. Die KCC2-Transportaktivität bleibt jedoch bei Überexpression von  $\beta$ PIX bzw. PAK3 oder einer Kombination beider unverändert (Abb. 3.6). Die einfachste Erklärung für das Ausbleiben eines Effektes ist, dass der mögliche Einfluss von  $\beta$ PIX auf KCC2 von der Interaktion mit PAK unabhängig ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die endogene Expression beider Proteine in HEK293-Zellen unter den gewählten Bedingungen schon zur maximal möglichen Aktivierung der Transportaktivität ausreicht. Ähnlich verhält es sich mit dem Einfluss von SPAK auf die Aktivität von NKCC1. Unter maximal aktivierenden Bedingungen konnte kein statistisch signifikanter Effekt durch die Überexpression von SPAK detektiert werden. Der Einfluss von SPAK auf die Transportaktivität von NKCC1 wurde erst bei mittleren aktivierenden Bedingungen bzw. unter Überexpression einer dominant-negativen Mutante ersichtlich (Dowd and Forbush 2003).

OSR-1 und SPAK werden endogen in HEK293-Zellen exprimiert (Chen et al. 2004; Richardson et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass OSR-1 als Reaktion auf osmotischen Stress PAK1 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung hat zur Folge, dass PAK1 nicht mehr über Cdc42 zur Autophosphorylierung stimuliert werden kann (Chen et al. 2004). Dies könnte bedeuten, dass überexprimiertes PAK inaktiv vorliegt. Darauf deuten auch Befunde von Manser et al. (1997) hin. Diese besagen, dass in Säugerzellen überexprimiertes  $\alpha$ PAK (Homolog zu PAK1) zu einem Großteil inaktiv vorliegt. Dieses Problem könnte durch die Verwendung einer konstant aktiven Mutante umgangen werden.

Zusammengenommen zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass die Überexpression der Wildtypen von  $\beta$ PIX und PAK3 die KCC2-Transportaktivität in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen nicht verändert. Um einen Einfluss von PAK auf KCC2 vollständig ausschließen zu können, wären weitere Experimente notwendig. Dazu gehören beispielsweise Transportaktivitätsmessungen unter mittleren aktivierenden Bedingungen. Im Falle einer aktivierenden Wirkung von PAK auf KCC2 könnte die Überexpression von PAK unter diesen Bedingungen zu einem Anstieg der KCC2-Transportaktivität führen. Darüber hinaus könnte der Einsatz einer siRNA (short interfering RNA) gegen PAK oder auch der Einsatz einer dominant-negativen PAK-Mutante Hinweise auf eine mögliche aktivierende Wirkung von PAK auf KCC2 geben. Des Weiteren sind Untersuchungen in anderen Zelllinien sicherlich sinnvoll, da Effekte sich auch zelltypabhängig manifestieren können (Lahuna et al. 2005). Dafür würde sich auch die Verwendung primärer Kulturen anbieten, da diese Untersuchungen im realen Proteinkontext ermöglichen. Der Effekt von  $\beta$ PIX auf die Transportaktivität von KCC2 wird in den nachfolgenden Abschnitten noch eingehender beleuchtet.

#### **4.4.2 Die Überexpression von $\beta$ PIX- und GIT1-Mutanten wirkt sich negativ auf die KCC2-Transportaktivität in HEK293-Zellen aus**

Ein weiterer Interaktionspartner von  $\beta$ PIX ist das ArfGAP-Protein GIT1. Beide Proteine liegen gemeinsam in großen oligomeren Komplexen vor. Diese Komplexe können sowohl intrazellulär als auch plasmamembranständig lokalisiert sein oder in Form so genannter Fokal-komplexe auftreten (Hoefen and Berk 2006). Innerhalb dieser oligomeren Komplexe liegen zahlreiche Kinasen vor (Woods and Couchman 1992; Turner et al. 1999; Zamir and Geiger 2001; Zhang et al. 2003; Wozniak et al. 2004) Die bislang beschriebenen Mechanismen zur Regulation der KCC2-Transportaktivität werden in erster Linie durch Kinasen und Phosphatasen bewerkstelligt (Blaesse et al. 2009; Rinehart et al. 2011). Obgleich es sich bei  $\beta$ PIX und GIT1 nicht um Kinasen handelt, sind sie über kleine p21-GTPasen zur Regulation von Kinaseaktivitäten befähigt (Manser et al. 1998; Feng et al. 2002; Hoefen and Berk 2006; Jones and Katan 2007; Sun and Bamji 2011). Darüber könnten sie den Phosphorylierungsstatus von KCC2 beeinflussen. Durch die Veränderung des KCC2-Phosphorylierungsstatus' kann dabei sowohl die Oberflächenexpression als auch die Transportkinetik von KCC2 reguliert werden (vgl. Kapitel 1.1.3).

KCC2-Transportaktivitätsmessungen in HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen zeigten, dass die Überexpression der Wildtypen von  $\beta$ PIX und GIT1 alleine oder in Kombination keine Veränderungen herbeiführten (Abb. 3.7). Auch in diesem Fall lässt sich ein Effekt beider Wildtypen unter anderen

als den gewählten Bedingungen nicht ausschließen. Hinzu kommt, dass die Überexpression funktionsgestörter Mutanten ( $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup>, GIT1<sup>R39A</sup>, GIT1 <sup>$\Delta$ GAP</sup>) einen negativen regulatorischen Effekt auf KCC2 ausübten. Der durch die  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup>-Mutante ausgelöste Effekt konnte durch die Kotransfektion mit dem Wildtyp von GIT1 unterbunden werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass beide Proteine am gleichen Mechanismus zur Regulation der KCC2-Transportaktivität (Trafficking oder Kinetik) beteiligt sind.

#### ***4.4.2.1 $\beta$ PIX und GIT1 haben in HEK293-Zellen keinen Einfluss auf das Trafficking von KCC2***

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verfolgten Hypothese zur Regulation der Oberflächenexpression von KCC2 durch  $\beta$ PIX und GIT1 lagen verschiedene Literaturdaten zugrunde. Lee et al. publizierten 2007, dass die Aktivität von PKC sich stabilisierend auf die Oberflächenlokalisierung von KCC2 auswirkt. Dadurch übt PKC einen aktivierenden Einfluss auf die KCC2-Transportaktivität aus. Aufgrund der oben genannten Funktionen von  $\beta$ PIX und GIT1 war es also denkbar, dass die beiden Proteine über die Regulation von Kinasen einen Einfluss auf die Oberflächenexpression und im Zuge dessen auf die Transportaktivität von KCC2 nehmen könnten. Neben der Regulation der Oberflächenexpression über Veränderung des Phosphorylierungsstatus' von KCC2 könnten GIT1 und  $\beta$ PIX auch ohne Beeinflussung des KCC2-Phosphorylierungsstatus' in das Trafficking von KCC2 involviert sein. Feng et al. zeigten 2006, dass die Mutation von  $\beta$ PIX an der Stelle Y442 die Endozytoserate des EGFR erhöht. Experimente von Lahuna et al. (2005) in HEK293-Zellen konnten  $\beta$ PIX und GIT1 eine Rolle beim Trafficking des Thyrotropinrezeptors (TSHR - thyroid stimulating hormone receptor) nachweisen. Während dabei die Überexpression von  $\beta$ PIX<sup>wt</sup> keinen Effekt ausübte, führte die Reduktion der  $\beta$ PIX-Expression durch eine siRNA zum Erliegen des TSHR-Rücktransports zur Plasmamembran. Darüber hinaus konnte im Zusammenhang mit dem Transferrin-Rezeptor (TfR) gezeigt werden, dass die Überexpression einer ArfGAP-negativen GIT1-Mutante zur Akkumulation dieses Proteins in endosomalen Strukturen führt. Dadurch wird der Rücktransport des Rezeptors zur Plasmamembran unterbunden (Za et al. 2006). Zudem wurde in HEK293-Zellen ein für die konstitutive Endozytose von KCC2 essentielles Di-Leucinmotiv identifiziert (<sub>657</sub>LLXXEE<sub>662</sub>) (Zhao et al. 2008). Dieses liegt nahe dem Bindemotiv für  $\beta$ PIX in KCC2 (<sub>673</sub>QLLV<sub>676</sub>). Auf Grund der großen räumlichen Nähe wäre es demnach denkbar, dass  $\beta$ PIX eine regulatorische Funktion bezüglich der Clathrin-vermittelten Endozytose von KCC2 in HEK293-Zellen übernimmt. Diese könnte auf eine sterische Veränderung der Konformation des C-Terminus' durch die Bindung von  $\beta$ PIX zurückzuführen sein.

Daher wurde der Einfluss von  $\beta$ PIX und GIT1 auf die subzelluläre Verteilung von KCC2 untersucht. Die Daten der vorliegenden Arbeit deuteten jedoch darauf hin, dass der Rückgang der KCC2-Transportaktivität unter Überexpression der  $\beta$ PIX- und GIT1-Mutanten nicht mit einer verringerten Oberflächenexpression einhergeht (Abb. 3.15 und 3.16). Auch ein verstärkter Abbau des Transporters konnte als Ursache für den verminderten Rubidiumtransport ausgeschlossen werden (Abb. 3.8). Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss von  $\beta$ PIX und GIT1 auf die Transportaktivität von KCC2 eher kinetischer Natur ist. Um eine Veränderung der subzellulären Lokalisation von KCC2 unter Überexpression der  $\beta$ PIX- und GIT1-Mutanten in HEK293-Zellen endgültig auszuschließen, könnten quantitative immunzytochemische Kollokalisationsstudien mit endosomalen Markern (z. B. Rab11) zur weiterführenden Analyse herangezogen werden. Diese sollte bei einer kinetischen Regulation von KCC2 durch  $\beta$ PIX und GIT1 unverändert bleiben.

#### ***4.4.2.2 $\beta$ PIX und GIT1 scheinen die Regulation der Transportkinetik von KCC2 involviert zu sein***

Für die Regulation der Transportkinetik von KCC2 im vorliegenden Zusammenhang gibt es ebenfalls zwei Möglichkeiten. Die erste Möglichkeit beinhaltet eine sterische Regulation von KCC2 durch  $\beta$ PIX. Für diese Möglichkeit gibt es eine Reihe von Indizien. Es wurde gezeigt, dass  $\beta$ PIX an den C-Terminus von KCC2 bindet (Guillemin 2006). Die korrekte Faltung dieses Bereiches ist für die Transportaktivität von KCC2 essentiell (Strange et al. 2000). Unter Überexpression von  $\beta$ PIX<sup>wt</sup> bleibt die Transportaktivität von KCC2 unverändert und sinkt unter Einfluss von  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> (Abb.3.7). Es wäre daher denkbar, dass der Wildtyp von  $\beta$ PIX nach Phosphorylierung am Y442 den C-Terminus von KCC2 in einer die Transportaktivität begünstigenden Konformation hält. Dabei könnte die Interaktion in Abhängigkeit von endogenem GIT1 erfolgen. Ob allerdings dabei die Funktion von GIT1 oder eher die Interaktion zwischen  $\beta$ PIX und GIT1 eine Rolle spielt, bleibt zunächst offen. Der Wildtyp von  $\beta$ PIX und die Mutante kompetieren um die Bindung an GIT1. Dabei weist die  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup>-Mutante eine verstärkte Interaktion mit GIT1 auf (Feng et al. 2010), wodurch die Interaktion zwischen endogenem  $\beta$ PIX und GIT1 inhibiert wird. Dies könnte zur Schwächung der KCC2- $\beta$ PIX-Interaktion führen, welche eine Reduktion der KCC2-Transportaktivität zur Folge hätte. Der Rückgang der KCC2-Transportaktivität unter Überexpression der GIT1-Mutanten (Abb. 3.7) könnte einerseits bedeuten, dass die GAP-Aktivität von GIT1 in die sterische Regulation von KCC2 involviert ist. Andererseits wurde im Rahmen vorangegangener Untersuchungen gezeigt, dass derartige Mutationen an GIT1 zu einer verstärkten Lokalisierung von GIT1 ge-

meinsam mit  $\beta$ PIX und PAK in endosomalen Rab11-positiven Strukturen führen (Di Cesare et al. 2000; Matafora et al. 2001; Paris et al. 2002; Randazzo et al. 2007). Durch die Rekrutierung von  $\beta$ PIX an endosomalen Strukturen wäre die Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX auf Grund der räumlichen Trennung verringert. In beiden Fällen könnte daraus eine Faltung des C-Terminus von KCC2 resultieren, durch die schließlich die Transportaktivität inhibiert würde. Die Überexpression von GIT1<sup>wt</sup> gemeinsam mit  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> führte zur Wiederherstellung der Transportaktivität. Dies könnte bedeuten, dass auf Grund der verstärkten Interaktion zwischen der  $\beta$ PIX-Mutante und GIT1 (Feng et al. 2006) die Mutante abgefangen wird und aus diesem Grund ein Effekt ausbleibt.

Um die Möglichkeit der sterischen Regulation von KCC2 durch  $\beta$ PIX näher zu untersuchen, wären vergleichende biochemische Interaktionsstudien (CoIPs bzw. GST-Pulldowns) hilfreich. Dabei könnte zunächst der Einfluss der Phosphorylierung von  $\beta$ PIX auf die Interaktion mit KCC2 untersucht werden. Dafür könnten verschiedene  $\beta$ PIX-Mutanten verwendet werden. Dafür bietet sich die in der vorliegenden Arbeit verwendete nicht phosphorylierbare Mutante ( $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup>) an. Diese könnte mit einem pseudophosphorylierten  $\beta$ PIX ( $\beta$ PIX<sup>Y442D</sup>) verglichen werden. Letztere könnte nach der vorangehend beschriebenen Hypothese eine verstärkte Interaktion mit KCC2 aufweisen und zu einer erhöhten Transportaktivität führen. Im Zuge derartiger Untersuchungen könnten darüber hinaus siRNAs herangezogen werden. Die Herunterregulation von  $\beta$ PIX über eine siRNA sollte bei Zutreffen der Hypothese mit einem Rückgang der KCC2-Transportaktivität einhergehen. Außerdem könnte die Rolle von GIT1 über einen Knockdown betrachtet werden. Im Fall einer essentiellen Rolle von GIT1 für die Interaktion von  $\beta$ PIX mit KCC2 würde die Interaktion des GEF-Proteins mit dem Transporter durch Herunterregulation von GIT1 vermindert. Dies sollte ebenfalls einen reduzierenden Effekt auf die KCC2-Transportaktivität ausüben.

Die zweite Möglichkeit der kinetischen Regulation von KCC2 über  $\beta$ PIX und GIT1 könnte über eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus' von KCC2 erfolgen. In Fokalkomplexen liegen verschiedene Kinasen, beispielsweise Src, FAK (focal adhesion kinase) oder PAK vor (Wozniak et al. 2004). Durch die Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX könnten sich diese Kinasen in räumlicher Nähe zu KCC2 befinden. Daher stellen sie Kandidaten für die kinetische Regulation von KCC2 durch  $\beta$ PIX und GIT1 dar.

Die an der Stelle Y442 dephosphorylierende Mutation an  $\beta$ PIX führt zu einem Verlust der GEF-Aktivität gegenüber Cdc42 (Feng et al. 2006). Der Rückgang in der KCC2-Transportaktivität bei Überexpression dieser Mutante deutet darauf hin, dass die GEF-Aktivität von  $\beta$ PIX und damit einhergehend die Aktivierung von Cdc42 für die Transport-

funktion von KCC2 essentiell sein könnte. Zu den Effektorproteinen von Cdc42 gehören neben verschiedenen Gerüstproteinen auch eine große Anzahl an Kinasen wie beispielsweise MEKK (MAP Kinase Kinase Kinase) 1 und 4 oder PAK1-4 (Bishop and Hall 2000). Durch  $\beta$ PIX aktiviertes Cdc42 rekrutiert PAK an  $\beta$ PIX/GIT1-Komplexen. Dadurch wird PAK zur Autophosphorylierung stimuliert (Hofmann et al. 2004). GDP-gebundenes Cdc42 hingegen weist eine geringe Bindungsaffinität gegenüber PAK auf (Buchwald et al. 2001). Dies führt zur verminderten Aktivierung von PAK (Kepner et al. 2011). Daher ist es denkbar, dass die Regulation der KCC2-Transportaktivität durch  $\beta$ PIX über PAK abläuft. Dafür spricht auch, dass die zusätzliche Überexpression von GIT1 den Effekt von  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> vermindert. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von GIT1 unabhängig von  $\beta$ PIX- und Cdc42-Bindung zu einer Aktivierung von PAK führen kann (Loo et al. 2004). Daher könnte der verminderte Effekt der  $\beta$ PIX-Mutante nach Überexpression von GIT1 auf eine Aktivierung von PAK durch GIT1 zurückzuführen sein. Die Aktivierung von PAK über den  $\beta$ PIX/GIT1/Cdc42-Komplex bzw. GIT1 alleine könnte dann entweder direkt oder über die Aktivierung anderer Kinasen zur Phosphorylierung von KCC2 führen. Daraus könnte eine Stimulation der KCC2-Transportaktivität resultieren. Bezüglich der Lokalisation der ArfGAP-defizienten Mutanten wurde mehrfach das Auftreten großer GIT1-positiver endosomaler Strukturen beschrieben. Dies führte zu einer verminderten peripheren GIT1-Abundanz (Matafora et al. 2001; Za et al. 2006; Hoefen and Berk 2006). GAP-defizientes GIT1 rekrutiert darüber hinaus  $\beta$ PIX an endosomalen Strukturen (Di Cesare et al. 2000; Matafora et al. 2001; Paris et al. 2002; Randazzo et al. 2007) und auch die Dimerisierungsfähigkeit von GIT1 wird durch Mutationen der GAP-Domäne nicht beeinflusst (Paris et al. 2003). Dementsprechend ist es denkbar, dass aufgrund der GIT1- und  $\beta$ PIX-Misslokalisierung eine lokale Aktivierung von PAK im Bereich des C-Terminus von KCC2 nicht stattfinden kann. Dies hätte bei einer Aktivierung von KCC2 durch die Kinaseaktivität von PAK einen Rückgang der Transportaktivität zur Folge.

Fasst man diese Vermutungen zusammen ergibt sich folgendes vereinfachtes Szenario: In HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen ist der endogene  $\beta$ PIX/GIT1-Gehalt ausreichend, um KCC2 unter den gewählten Bedingungen voll zu aktivieren. Aus diesem Grund hat die Überexpression der Wildtypen von  $\beta$ PIX und GIT1 keinen Einfluss. Die Überexpression von  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup> führt zu einer verringerten Cdc42-Aktivierung und infolgedessen zu vermehrt inaktivem PAK. Einen ähnlichen Effekt haben die GIT1-Mutanten. Der Auslöser in diesem Fall ist jedoch eine Umverteilung von GIT1 und  $\beta$ PIX in endosomale Strukturen. Die Überexpression von GIT1 hat auf die KCC2-Transportaktivität einen aktivierenden Einfluss, sofern die Aktivierung über

den  $\beta$ PIX-Weg gestört ist. Dies ist der Fähigkeit von GIT1 zur direkten Aktivierung von PAK zuzuschreiben.

Zur Verifizierung dieser Aussagen könnten weiterführende KCC2-Aktivitätsmessungen unter Überexpression von dominant-negativen Cdc42- und PAK-Mutanten herangezogen werden. Diese sollten bei Zutreffen der Hypothese ebenfalls die KCC2-Transportaktivität inhibieren. Die im vorliegenden Abschnitt aufgestellte Hypothese zur kinetischen Regulation der KCC2-Transportaktivität über eine Phosphorylierung wird unter Punkt 4.6 in einen zellulären Kontext gebracht.

#### ***4.5 Einzelmutationen im $\beta$ PIX-Bindemotiv an KCC2 wirken sich negativ auf die Transportaktivität jedoch nicht auf die Oberflächenexpression aus***

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von Einzelmutationen im QLLV-Motiv auf die Transportaktivität des Kotransporters in HEK293-Zellen untersucht. Dafür wurden full-length-KCC2-Konstrukte verwendet, die einzelne Alanin-Mutationen in dem  ${}_{673}\text{QLL}_{675}$ -Bindemotiv tragen (die  $\text{KCC2}^{\text{V676A}}$ -Mutante lag für diese Arbeit nicht vor). Während die  $\text{KCC2}^{\text{Q673A}}$ - und  ${}^{\text{L674A}}$ -Mutanten keine Veränderungen bezüglich der Transportaktivität aufwiesen, führte die Alaninmutation an der Stelle Leu-675 zu einer starken Reduktion der Transportaktivität (Abb. 3.19). Nach Abschluss der vorliegenden Arbeit konnte über Thalliummessungen gezeigt werden, dass auch die V676A-Mutation an KCC2 keinen Einfluss auf die Transportaktivität ausübte (Döding et al. 2012). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine wiesen untereinander keine Unterschiede in der Oberflächenexpression auf (Abb. 3.20M). Diese Daten lassen mehrere Schlussfolgerungen zu. Es wäre denkbar, dass die Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX für die KCC2-Transportaktivität nicht essentiell ist. In diesem Fall wäre die verringerte Rubidiumaufnahme über die  $\text{KCC2}^{\text{L675A}}$ -Mutante möglicherweise auf Veränderungen in der C-terminalen Faltung zurückzuführen. Die Bedeutung der C-terminalen Konformation wurde bereits von der Gruppe um Delpire gezeigt (Strange et al. 2000). Dabei führte der Austausch eines Tyrosinrestes an der Stelle 1087 gegen eine geladene Aminosäure (Aspartat oder Arginin) zu einer starken Reduktion der Transportaktivität unter isotonischen und hypotonischen Bedingungen. Der Austausch gegen eine ungeladene Aminosäure hingegen hatte nur geringfügige Auswirkungen auf die KCC2-Aktivität. Obgleich der Austausch von Leucin gegen Alanin, wie in dem vorliegenden Fall vorgenommen, nur geringfügige Veränderungen mit sich bringen sollte ist eine Veränderung der Konformation dennoch nicht vollständig auszuschließen. Perez et al. (2011) publizierten kürzlich Daten, in denen ein

Austausch von Glyzin gegen Alanin im Na<sup>+</sup>/Betain-Symporter BetP die osmo-abhängige Aktivierung dieses Transporters veränderte.

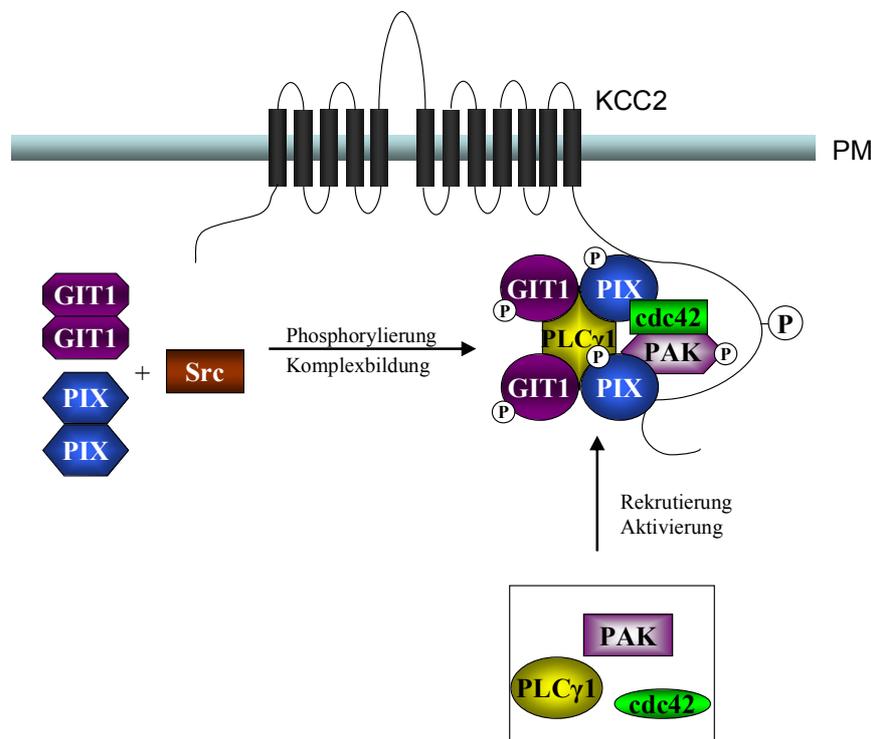
Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Bindung von  $\beta$ PIX an KCC2 den Kotransport aktiviert. Dies würde bedeuten, dass in HEK293-Zellen nicht jede einzelne Aminosäure des QLLV-Motivs für die  $\beta$ PIX-Bindung essentiell ist. Da die Alaninmutationen in den übrigen drei Aminosäuren des QLLV-Bindemotivs (Gln-673, Leu-674, Val-676 (Döding et al. 2012)) keine veränderte Transportaktivität aufweisen ist dies durchaus möglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus zeitlichen Gründen keine Analysen bezüglich der Interaktionen zwischen diesen KCC2-Mutanten und  $\beta$ PIX durchgeführt. Daher lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob die Interaktion zwischen den beiden Proteinen im verwendeten Expressionssystem durch diese Einzelmutationen tatsächlich unterbunden wird. Dennoch stehen diese Vermutungen im Gegensatz zu den im Y2H-System generierten Daten, welche dieser Arbeit zu Grunde liegen. Allerdings stellt das Y2H-System ein artifizielles System zur Analyse von Interaktionen dar. Die Nachweise erfolgen über die Funktionalität eines Transkriptionsfaktors, sind also im Kern der Hefezelle angesiedelt. Transmembrane Proteine, wie auch KCC2, werden grundsätzlich in Form von Deletionskonstrukten verwendet. Dabei werden die transmembranen Bereiche deletiert. Diese Modifikationen des Transporters und die fehlende Abundanz von für die Faltung notwendigen Chaperonen können eine Fehlfaltung des betreffenden Proteins begünstigen. Dies könnte Interaktionen zwischen zwei Proteinen induzieren, welche in der Form *in vivo* nicht vorkommen. Es wäre auch möglich, dass die Einzelmutationen, welche im Y2H-System die Interaktion nahezu vollständig zusammenbrechen ließen, bei korrekter Faltung keine Auswirkungen auf die Interaktion hätten. Dabei könnte die zweite Bindestelle von  $\beta$ PIX an KCC2 (Guillemin 2006) bei Einzelmutationen im QLLV-Bindemotiv eine stabilisierende Wirkung auf die Interaktion ausüben. Daher wäre es durchaus interessant, die zweite Interaktionsdomäne weiter einzugrenzen und sich die Auswirkung von Mehrfachmutationen in beiden Bindemotiven auf die Transportaktivität von KCC2 anzuschauen. Des Weiteren sind Interaktionsstudien wie GST-Pulldowns für zukünftige Experimente und Interpretationen unverzichtbar. Durch derartige Studien könnte gezeigt werden, ob die Einzelmutationen tatsächlich Auswirkungen auf die Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX haben.

#### **4.6 Erstellung eines möglichen Modells für den Einfluss von $\beta$ PIX und GIT1 auf die Transportaktivität von KCC2**

Die an der Regulation der KCC2-Transportaktivität mutmaßlich beteiligten Proteine  $\beta$ PIX und GIT1 sind in eine Vielzahl von Signalprozessen involviert. Allerdings ist die Regulation

der Aktivität eines Transportproteins bislang nicht beschrieben worden. Der Erstellung des im Folgenden vorgestellten Modells liegt ein Abgleich von KCC2- und  $\beta$ PIX-Effektoren zugrunde. Kelsch et al. zeigten 2001, dass die Src-Kinase in dissoziierten hippocampalen Kulturen eine aktivierende Wirkung auf die KCC2-Transportaktivität ausübt. Diese Kinase ist auch als Aktivator der GEF-Aktivität von  $\beta$ PIX gegenüber Cdc42 beschrieben worden (Feng et al. 2010). Daher ist es denkbar, dass die Aktivierung der KCC2-Transportaktivität durch die Src über  $\beta$ PIX abläuft. Zur Erstellung des Modells habe ich weiterhin die endogene Expression aller mutmaßlich an der Regulation von KCC2 in HEK293-Zellen beteiligten Proteine an Hand von Literaturdaten verifiziert.

Eine direkte Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX wurde zunächst im Hefe-2-Hybridsystem und anschließend über GST-Pulldowns in HEK293-Zellen nachgewiesen (Guillemin 2006). Über diese Interaktion könnte der C-Terminus von KCC2 indirekt auch mit anderen potentiellen Regulatorproteinen, wie beispielsweise PAK oder GIT1, interagieren. Die  $\beta$ PIX<sup>Y442F</sup>-Mutante zeigt keine GEF-Aktivität gegenüber Cdc42 (Feng et al. 2006). Allerdings hat die eingefügte Mutation keinen Einfluss auf die Aktivierung von Rac1 (Feng et al. 2006) welches,

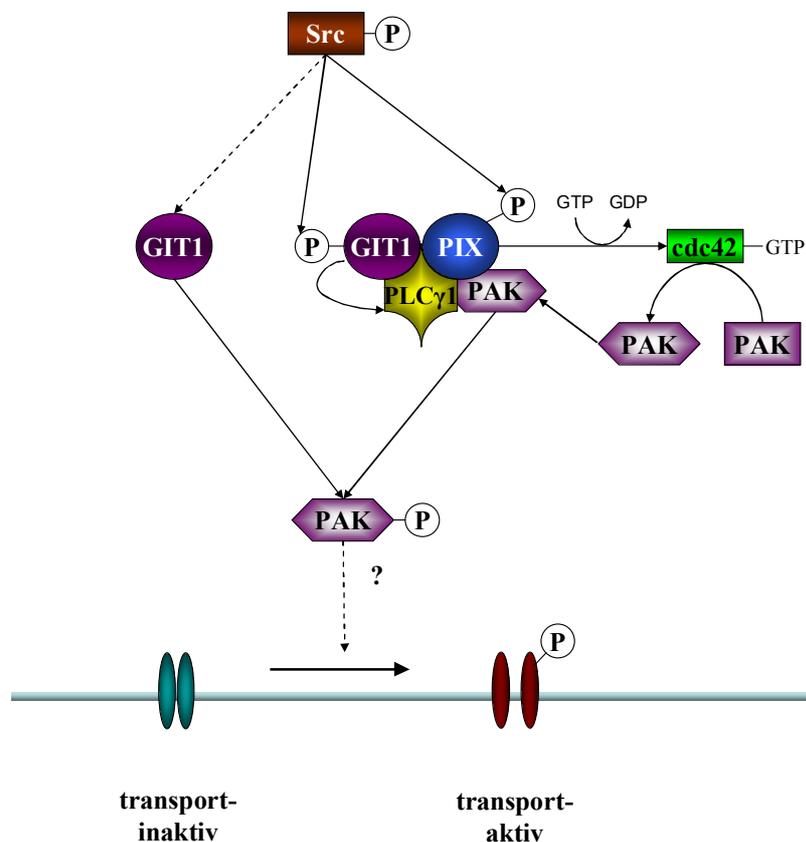


**Abb. 4.2: Modell für die Wirkung von  $\beta$ PIX- und GIT1-Komplexen auf KCC2.**

Im C-Terminus von KCC2 liegen zwei Bereiche für die Interaktion von  $\beta$ PIX. Diese befinden sich zwischen den AS 673 – 676 und 1072 – 1108. Zwischen diesen Bereichen liegt eine putative Phosphorylierungsstelle für PAK an KCC2. Eine Komplexbildung zwischen  $\beta$ PIX, GIT1 und der PLC $\gamma$  führt zur Aktivierung von Cdc42. Die Aktivität dieser GTPase führt zur Rekrutierung von PAK und schließlich zu dessen Autophosphorylierung. Im phosphorylierten Zustand könnte PAK zur Phosphorylierung von KCC2 führen.

ebenso wie Cdc42 (Wang et al. 2002), endogen in HEK293-Zellen vorliegt (Ueyama et al. 2006). Dies legt den Schluss nahe, dass der Einfluss, den  $\beta$ PIX auf die KCC2-Transportaktivität ausübt, Rac1-unabhängig abläuft. Die GEF-Aktivität von  $\beta$ PIX gegenüber Cdc42 wird durch die Aktivität der Src-Tyrosinkinase stimuliert, welche  $\beta$ PIX am Y442 phosphoryliert (Feng et al. 2010). Die zelluläre (regulierbare) Form dieser Tyrosinkinase (c-Src) wird endogen in HEK293-Zellen exprimiert (Gomes et al. 2008). Darüber hinaus phosphoryliert die Src-Kinase GIT1 und fördert so die Lokalisation der PLC $\gamma$  (Phospholipase C $\gamma$ ) an  $\beta$ PIX-GIT1-Komplexen (Wang et al. 2010). Jones and Katan zeigten 2007, dass für die Aktivierung kleiner GTPasen in Fibroblasten und Endothelzellen die Komplexbildung zwischen  $\beta$ PIX, GIT1 und der PLC $\gamma$  essentiell ist. Die Herunterregulation jedes dieser drei Proteine mittels einer siRNA führte zum Erliegen der GTPase-Aktivität (Jones and Katan 2007). Die Aktivierung von Cdc42 induziert die Autophosphorylierung von endogenem PAK. Mittels der GPS 2.1 - (Group-based Prediction System Version 2.1) Software wurde die Proteinsequenz des heterolog exprimierten KCC2-Proteins (rnKCC2b) auf Phosphorylierungsstellen untersucht. Dabei wurde eine putative PAK-Phosphorylierungsstelle an der Stelle 1022 vorhergesagt. Diese Phosphorylierungsstelle wurde im Rahmen massenspektrometrischer Analysen mit Maushirnproben bestätigt (pers. Mitteilung Dr. J. Schindler) und befindet sich zwischen den beiden für die Bindung von  $\beta$ PIX essentiellen Sequenzen. Da  $\beta$ PIX und GIT1 mit ihren Bindungspartner in Form von Multimeren vorliegen (Hoefen and Berk 2006) ist es möglich, dass beide Bindestellen involviert sind. Durch die Bindung der Multimere wäre eine Konformationsänderung im C-Terminus möglich, welcher das Serin an der Stelle 1022 für eine Phosphorylierung durch PAK zugänglich macht (Abb. 4.2). Der Mechanismus der  $\beta$ PIX-unabhängigen Aktivierung von KCC2 durch GIT1 kann nicht abschließend geklärt werden. Es ist weder bekannt, welcher Aktivierungsmechanismus in die PAK-Phosphorylierung involviert ist noch welche anderen Proteine dabei beteiligt sind. Dennoch konnte gezeigt werden, dass für die Aktivierung von PAK durch GIT1 dessen N-terminal lokalisierte ArfGAP-Domäne essentiell ist (Loo et al. 2004). Daher ist es wahrscheinlich, dass die GIT1-abhängige PAK-Aktivierung über zwischengeschaltete GIT1-Effektoren erfolgt. Für die Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX ergibt sich zusammenfassend ein Modell, in dem über  $\beta$ PIX hinaus noch die Src-Kinase, GIT1, die PLC $\gamma$ , Cdc42 und PAK in die Regulation der KCC2-Transportaktivität involviert sind (Abb. 4.3). Nach diesem Modell werden  $\beta$ PIX und GIT1 durch die Src-Kinase phosphoryliert. Dies führt zur Assemblierung von  $\beta$ PIX, GIT1 und PLC $\gamma$  und zur Aktivierung von Cdc42 (Wang et al. 2010). Durch die Aktivität von Cdc42 wird vermehrt PAK an die Komplexe gebunden. Dadurch wird die Autophosphorylie-

rung dieser Kinase induziert (Loo et al. 2004), welche in diesem aktiven Zustand möglicherweise KCC2 durch eine Phosphorylierung an der Stelle S1022 aktiviert (Abb. 4.3). Diese Signalkaskade bedarf allerdings eingehender Untersuchungen. Zum einen sind zur Erschließung der Zusammenhänge sicherlich Experimente sinnvoll, in denen einzelne Komponenten der Signalkaskade über siRNAs bzw. pharmakologisch moduliert werden. Zum anderen bietet sich auch die Verwendung dominant negativer Mutanten an. Neben diesen funktionellen Analysen wären auch Interaktionsstudien wie Pulldowns oder CoIPs interessant, welche Einblick in die genaue Komplexzusammensetzung geben könnten. Darüber hinaus könnten Analysen in primären hippocampalen Kulturen Hinweise darauf liefern, inwiefern der Einfluss von  $\beta$ PIX und GIT1 auf KCC2 in Neuronen eine Rolle spielt.



**Abb. 4.3: Modell zur Regulation der KCC2-Transportaktivität über Src-abhängige Effektoren in HEK293-Zellen.**

Die phosphorylierte Src stimuliert die Assemblierung von  $\beta$ PIX-GIT1-PLC $\gamma$ -Komplexen durch die Phosphorylierung von GIT1. Die Komplexbildung und die Phosphorylierung von  $\beta$ PIX durch Src an Tyr-422 führen zur Aktivierung von Cdc42. Dadurch wird die Kinase PAK an den Komplexen rekrutiert. Dies führt bei einer hohen lokalen PAK-Abundanz zu einer Autophosphorylierung von PAK, wodurch dieses KCC2 am Ser1022 phosphoryliert und damit aktivieren könnte. Gestrichelte Linien deuten an, dass der dargestellte Aktivierungsmechanismus im gezeigten Zusammenhang noch unklar ist.

In dissoziierten hippocampalen Neuronen liegt der  $K^+Cl^-$ -Kotransporter KCC2 zunächst inaktiv vor. Im Verlauf der Reifung der Neurone erlangt KCC2 seine Transportaktivität. Dieser Prozess kann durch die Stimulation von IGF-1-Rezeptoren beschleunigt werden. Kelsch et al. publizierten in diesem Zusammenhang eine zusätzlich aktivierende Wirkung von Src auf die Transportaktivität von KCC2 (Kelsch et al. 2001). Dadurch wurde Src zum Kandidaten für die KCC2-Aktivierung, welcher den entwicklungsabhängigen D/H-Wechsel in dissoziierten hippocampalen Neuronen induziert. Der exakte Mechanismus wurde dabei nicht erschlossen. Es besteht also die Möglichkeit, dass die Wirkung der Src-Kinase in diesem Zusammenhang über die Regulation des PIX/GIT-Komplexes abläuft. Dies ließe sich möglicherweise auch auf die Vorgänge im Superioren Olivenkomplex (SOC) übertragen. Dort konnte gezeigt werden, dass KCC2 posttranslational aktiviert wird. Durch eine Kombination biochemischer, immunhistochemischer und elektrophysiologischer Experimente wurde gezeigt, dass KCC2 zwar in unreifen Neuronen mit einem finalen Expressionslevel und auch in der Plasmamembran lokalisiert vorliegt, jedoch zunächst transportinaktiv ist (Balakrishnan et al. 2003; Blaesse et al. 2006). Auch in diesem Zusammenhang ist der Mechanismus noch nicht abschließend geklärt. In Hirnstammschnitten adulter Tiere konnte jedoch, ähnlich wie im Hippocampus, eine Kollokalisierung zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX beobachtet werden. In diesen Neuronen scheint sich die Kollokalisierung in den Bereichen der Plasmamembran submembranösen Bereichen zu manifestieren (pers. Mitteilung Dr. J. Schindler). Vergleichende immunhistochemische Färbungen in jungen und adulten Tieren könnten Hinweise auf eine Beteiligung von  $\beta$ PIX in diesem Zusammenhang geben.

#### ***4.7 Die Behandlung von HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen mit Wasserstoffperoxid hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von KCC2***

Die Gruppe um Nabekura veröffentlichte 2007 Daten zur Auswirkung von oxidativem Stress auf die Oberflächenexpression von KCC2 in primären hippocampalen Kulturen. Dieser führt zunächst zu einer verringerten Oberflächenexpression. Eine längere Applikation von  $H_2O_2$  führt zu einer Reduktion der KCC2-Proteinmenge (Wake et al. 2007). In Schaferythrozyten hingegen führt die  $H_2O_2$ -Behandlung zu einer Aktivierung des  $K^+Cl^-$ -Kotransports (Bize and Dunham 1995). In beiden Fällen waren die Effekte auf die Stimulation einer Phosphatase zurückzuführen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von  $H_2O_2$  auf die Transportaktivität von KCC2 in HEK293-Zellen untersucht. Der anhand der veränderten Transportaktivität sichtbare Effekt schien transientser Natur zu sein. Nach einer einstündigen Applikation von

300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  war die Transportaktivität stark abgesunken. Im Anschluss an eine einstündige Erholungszeit in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -freier Umgebung lag die Transportaktivität sogar über der bei unbehandelten Zellen gemessenen. Basierend auf den Erkenntnissen von Wake et al. (2007) schien die Vermutung einer erhöhten Endozytoserate zunächst logisch. Diese würde den Steady-State-Zustand, in dem die Einbau- und Endozytoserate im Gleichgewicht sind (Rivera et al. 2004) zunächst zugunsten der Endozytoserate verändern. Daraus würde dann ein Absinken der Transportaktivität resultieren. Der erhöhte Anstieg der Transportaktivität nach einer einstündigen Erholungszeit wäre demnach auf eine Verschiebung in Richtung der Einbaurrate zurückzuführen, welche sich nach einem „Overshoot“ wieder auf ein Normalniveau einpendelt. Darüber hinaus hatte die Kurzzeitbehandlung keinen Einfluss auf das Proteinlevel. Dies geht ebenfalls konform mit den Daten der Gruppe um Nabekura, welche einen verstärkten Proteinabbau erst nach einer mehr als 3-stündigen Behandlungsdauer zeigten. Betrachtungen von immunzytochemischen Färbungen ließen jedoch keine Unterschiede bezüglich der subzellulären KCC2-Verteilung erkennen (vgl. Abb. 3.13C). Die Behandlung mit CytD deutete schließlich darauf hin, dass es sich bei dem beobachteten Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um Endozytose handelt. Es ist möglich, dass der endozytotische Effekt von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zelltypspezifisch ist. In primären hippocampalen Kulturen scheint die erhöhte Endozytoserate von KCC2 nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung mit einer Verminderung der Tyrosinphosphorylierung einherzugehen. Dies könnte sowohl auf die verminderte Aktivität einer Tyrosinkinase als auch auf eine erhöhte Tyrosinphosphataseaktivität zurückzuführen sein. Die Daten von Wake deuteten jedoch darauf hin, dass in primären hippocampalen Kulturen sowohl die Tyrosinphosphorylierung als auch die Tyrosindepheosphorylierung von KCC2 durch Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beeinflusst wird. Dabei dominiert der Einfluss auf die Phosphatase, so dass letztendlich die Endozytoserate überwiegt. Der Effekt der erhöhten Kinaseaktivität zeigt sich dabei erst unter Blockade der Phosphatase (Wake et al. 2007). In HEK293<sup>KCC2</sup>-Zellen scheint  $\text{H}_2\text{O}_2$  keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression zu haben. Dementsprechend ist eher von einer Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Transportkinetik von KCC2 auszugehen. Diese wird unter anderem durch die Aktivität verschiedener Kinasen und Phosphatasen bewerkstelligt (vgl. Kapitel 1.1.3; Gagnon et al. 2006; Wake et al. 2007; Lee et al. 2007; Rinehart et al. 2011; Arion and Lewis 2011). Dabei führen die bisher beschriebenen Tyrosinphosphorylierungen zur Aktivierung von KCC2 (Vale et al. 2005; Blaesse et al. 2009). Die Aktivitäten von Serin/Threonin-Kinasen wurden bislang eher als inhibitorisch beschrieben (Rinehart et al. 2011), obgleich PKC in dieser Gruppe eine prominente Ausnahme darstellt (Lee et al. 2007). Basierend auf den Daten in primären Kulturen wäre in HEK293-Zellen ein Aktivierungsmuster

denkbar, bei dem  $H_2O_2$  die Aktivitäten antagonistisch wirkender Kinasen und Phosphatasen reguliert. Dabei überwiegt der die Transportaktivität inhibierende Effekt, so dass es zu einem Rückgang der KCC2-Aktivität kommt (Abb. 3.12a). Da die durch  $H_2O_2$  ausgelösten Effekte bei Verwendung niedriger Dosen im Allgemeinen reversibel sind (Denu and Tanner 1998), führt die einstündige Erholungszeit in  $H_2O_2$ -freier Umgebung zum Rückgang der Inhibition. Währenddessen steigt die Transportaktivität auf einen Wert über Normalmaß an. Dies könnte bedeuten, dass der Aktivator nach ‚Ausschalten‘ des Inhibitors eine erhöhte Aktivität aufweist bzw. verzögert auf die Entfernung von  $H_2O_2$  reagiert. Um festzustellen, ob die beschriebene Wirkung von  $H_2O_2$  tatsächlich auf Veränderungen im Phosphorylierungsstatus von KCC2 zurückzuführen ist, wäre die Verwendung phosphospezifischer Antikörper sinnvoll. Dadurch könnten Veränderungen im Phosphorylierungsstatus charakterisiert werden. Darüber hinaus wären Untersuchungen unter der Verwendung spezifischer Phosphatase- und Kinaseinhibitoren, z.B. Calyculin A (Serin/Threonin-Kinaseinhibitor), Genistein (Tyrosinkinaseinhibitor) oder Natriumvanadat (Tyrosinphosphataseinhibitor) geeignet. Finale Experimente könnten dann die Verwendung entsprechender Phosphomutanten miteinbeziehen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass im Verlauf der vorliegenden Arbeit zwei putative Mechanismen zur Regulation der KCC2-Transportkinetik in HEK293-Zellen erschlossen wurden. Der erste Mechanismus wird offenbar über die Komplexbildung von  $\beta$ PIX und GIT1 bewerkstelligt. Dadurch könnte die Transportkinetik von KCC2 einerseits sterisch reguliert werden. Andererseits könnte die Komplexbildung zur Aktivierung der Kinase PAK führen. Diese Kinase ist putativ zur Phosphorylierung von KCC2 befähigt. Daher könnte auch die Veränderung des Phosphorylierungsstatus‘ von KCC2 durch PAK eine Veränderung der Transportkinetik herbeiführen. Der zweite Mechanismus scheint über durch  $H_2O_2$  regulierte Kinasen und/oder Phosphatasen zu erfolgen. Dabei ist allerdings unklar, ob die Inaktivierung aus der Übertragung oder Entfernung eines Phosphatrestes hervorgeht. Ob diese Mechanismen auf die *in vivo*-Regulation von KCC2 anwendbar sind, werden weitere Experimente zeigen.

## 5 Zusammenfassungen

### 5.1 Zusammenfassung

Der  $K^+Cl^-$ -Kotransporter KCC2 ist der primäre  $Cl^-$ -Auswärtstransporter in Neuronen. Dementsprechend spielt seine Transportaktivität eine wichtige Rolle in der neuronalen  $Cl^-$ -Homöostase und für die inhibitorische Wirkung der Neurotransmitter GABA und Glyzin. Unabhängig von seiner Transportfunktion ist KCC2 zudem als morphogener Faktor an der Reifung dendritischer Dornen beteiligt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Interaktion zwischen KCC2 und seinem putativen Interaktionspartner  $\beta$ PIX. Dieses GEF-Protein wurde im Y2H-System als Interaktionspartner von KCC2 identifiziert. Auf Grund der bislang beschriebenen Eigenschaften von  $\beta$ PIX wurden dabei zunächst zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen: Da  $\beta$ PIX, ebenso wie KCC2, eine Rolle in der Morphogenese dendritischer Dornen übernimmt, war eine gemeinsame Funktion beider Proteine bei der Reifung dieser Strukturen denkbar. Darüber hinaus ist  $\beta$ PIX in verschiedene Mechanismen involviert, im Zuge derer die Oberflächenexpression transmembraner Proteine moduliert wird. Des Weiteren moduliert  $\beta$ PIX über die Aktivierung kleiner GTPasen Kinaseaktivitäten. Die KCC2-Transportaktivität wird posttranslational über seine Oberflächenexpression und über seinen Phosphorylierungsstatus reguliert. Daher lag die zweite Möglichkeit der Funktionalität der Interaktion in einer regulatorischen Rolle von  $\beta$ PIX bezüglich der KCC2-Transportaktivität. Immunhistochemische Analysen deuteten auf eine Kollokalisierung von KCC2 und  $\beta$ PIX in plasmamembranösen Bereichen der Somata in Hippocampus und Cerebellum hin. In dendritischen Dornen hingegen waren im Adultstadium nur wenige Überlappungsbereiche detektierbar. Im HEK293-Zellsystem wurden daraufhin die Auswirkungen von  $\beta$ PIX und seinem Interaktionspartner GIT1 auf die Transportaktivität von KCC2 ermittelt. Während die Überexpression der Wildtypen beider Proteine keine Veränderungen herbeiführte, induzierte die heterologe Expression einer GEF-defiziente  $\beta$ PIX-Mutante und GAP-negative GIT1-Mutanten einen Rückgang in der Transportaktivität um 30 %. Analysen der KCC2-Oberflächenexpression zeigten keine Veränderungen in der KCC2-Verteilung nach Überexpression der  $\beta$ PIX- und GIT1-Mutanten. Daher ergab sich ein Modell, in dem  $\beta$ PIX gemeinsam mit GIT1 die KCC2-Transportkinetik reguliert. Ob dabei allerdings eine sterische Inhibition oder eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von KCC2 über die Kinaseaktivität von PAK ursächlich für die Wirkung sind, konnte im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig geklärt werden.

Zusätzlich zur Analyse der Interaktion zwischen KCC2 und  $\beta$ PIX sollte ein KCC2-Endozytosemodell in HEK293-Zellen entwickelt werden. Dieses basierte auf der endozytotischen Wirkung von  $H_2O_2$  in primären hippocampalen Kulturen. Der Rückgang der KCC2-Transportaktivität ließ zunächst eine Veränderung der Oberflächenexpression vermuten. Weiterführende Analysen zeigten jedoch, dass  $H_2O_2$  in HEK293-Zellen eher die Transportkinetik von KCC2 moduliert.

## 5.2 Summary

The  $K^+Cl^-$ -Cotransporter KCC2 is the major  $Cl^-$ -outward transporter in neuronal cells. Consequently, its transport activity plays an essential role in neuronal  $Cl^-$ -homeostasis and determines the inhibitory action of GABA and glycine. Independent from its transport function, KCC2 overtakes a function as morphogenic factor in the development of dendritic spines. The current thesis deals with the characterization of the interaction between KCC2 and its putative interaction partner  $\beta$ PIX. This GEF-protein was found to interact with KCC2 during a Y2H-screen. According to the functions of  $\beta$ PIX, firstly two possibilities were examined: Like KCC2,  $\beta$ PIX also overtakes a regulatory role in dendritic spine development. Therefore, a common role of both proteins in morphogenesis of these structures was considered. Furthermore,  $\beta$ PIX is involved in several mechanisms modulating surface expression of transmembranous proteins. Additionally,  $\beta$ PIX modulates kinase activities via the stimulation of small GTPases. KCC2s transport activity is posttranslationally modulated via changes in surface expression or in status of phosphorylation. Thus, the second possibility for the functionality of KCC2- $\beta$ PIX interaction was the regulation of KCC2-transport activity by  $\beta$ PIX. Immunohistochemical analyses indicated a colocalization of KCC2 and  $\beta$ PIX along somatic plasmamembranes in hippocampus and cerebellum. In dendritic spines of adult hippocampus just little colocalization was detected. Therefore, the effect of  $\beta$ PIX on KCC2 transport activity was determined in HEK293 cells. While the transport activity of KCC2 remained unaffected by overexpression of  $\beta$ PIX and its interaction partner GIT1, the heterologous expression of a GEF-deficient  $\beta$ PIX-mutant and GAP-deficient GIT1-mutants induced a decrease in transport activity by 30 %. This led to a model which includes  $\beta$ PIX and GIT1 as regulators of KCC2 transport kinetics. Whether the effects of  $\beta$ PIX and GIT1 on KCC2 are based on a sterical obstruction or changes in phosphorylation status of KCC2 is not known.

In addition to the analysis of KCC2- $\beta$ PIX-interaction, a model for endocytosis of KCC2 in HEK293 cells was planned to be developed. The model was based on the endocytotic effect of  $H_2O_2$  in primary hippocampal cells. The decrease in KCC2 transport activity after  $H_2O_2$

treatment lead suggested a reduction of KCC2 surface expression. Further investigations led to the conclusion of a rather kinetic effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on KCC2 in HEK293 cells.

## 6 Literatur

- Altman, A. (1972b). "Postnatal development of the cerebellar cortex in the Rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer." J. Comp. Neurol. **145**: 353-398.
- Altman, J. (1982). "Morphological Development of the Rat Cerebellum and Some of Its Mechanisms." Experimental Brain Research **6**: 8-49.
- Angevine, J. B. (1965). "Time of neuronal origin in the hippocampal region." Exp. Neurol. **2**: 1-70.
- Arata, A., Okabe, A., Takayama, C., Fukuda, A. and Ito, M. (2010). Correlated expression of the neuron-specific potassium chloride cotransporter 2 (KCC2) in the neonatal cerebellum and inferior olive. FENS. Amsterdam.
- Arion, D. and Lewis, D. A. (2011). "Altered expression of regulators of the cortical chloride transporters NKCC1 and KCC2 in schizophrenia." Archives of general psychiatry **68**(1): 21-31.
- Audebert, S., Navarro, C., Nourry, C., Chasserot-Golaz, S., Lecine, P., Bellaiche, Y., Dupont, J. L., Premont, R. T., Sempere, C., Strub, J. M., Van Dorsselaer, A., Vitale, N. and Borg, J. P. (2004). "Mammalian Scribble forms a tight complex with the betaPIX exchange factor." Current biology : CB **14**(11): 987-995.
- Balakrishnan, V., Becker, M., Löhrike, S., Nothwang, H. G., Güresir, E. and Friauf, E. (2003). "Expression and Funtion of Chloride Transporters during Development of Inhibitory Neurotransmission in the Auditory Brainstem." The Journal of Neuroscience **23**(10): 4134-4145.
- Báldi, R., Varga, C. and Tamas, G. (2010). "Differential distribution of KCC2 along the axo-somato-dendritic axis of hippocampal principal cells." The European journal of neuroscience **32**(8): 1319-1325.
- Baratti-Elbaz, C., Ghinea, N., Lahuna, O., Loosfelt, H., Pichon, C. and Milgrom, E. (1999). "Internalization and recycling pathways of the thyrotropin receptor." Mol Endocrinol **13**: 1751-1765.
- Bayer, S. A. (1980). "Development of the Hippocampal Region in the Rat I. Neurogenesis Examined With 3H-Thymidine Autoradiography." Journal of Comparative Neurology **190**: 87-114.
- Baynton, K. J., Bewtra, J. K., Biswas, N. and Taylor, K. E. (1994). "Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation." Biochim Biophys Acta. **1206**(2): 272-278.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R. and Gaiarsa, J. L. (1989). "Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurons." J. Physiol. **416**(303-325).
- Bishop, A. L. and Hall, A. (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem. J. **348**: 241-255.

- Bize, I. and Dunham, P. B. (1995). "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activated red blood cell K-Cl cotransport via stimulation of a phosphatase." American Physiological Society **0363-6143**(95): C849-C855.
- Blaesse, P., Airaksinen, M. S., Rivera, C. and Kaila, K. (2009). "Cation-chloride cotransporters and neuronal function." Neuron **61**(6): 820-838.
- Blaesse, P., Guillemain, I., Schindler, J., Schweizer, M., Delpire, E., Khiroug, L., Friauf, E. and Nothwang, H. G. (2006). "Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **26**(41): 10407-10419.
- Botrugno, O. A., Paris, S., Za, L., Gualdoni, S., Cattaneo, A., Bachi, A. and de Curtis, I. (2006). "Characterization of the endogenous GIT1-betaPIX complex, and identification of its association to membranes." European journal of cell biology **85**(1): 35-46.
- Bourne, J. N. and Harris, K. M. (2008). "Balancing Structure and Function at Hippocampal Dendritic Spines." Annu. Rev. Neurosci. **31**: 47-67.
- Bradford, M. M. (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." Analytical Biochemistry **72**: 248-254.
- Brown, M. C., West, K. A. and Turner, C. E. (2002). "Paxillin-dependent paxillin kinase linker and p21-activated kinase localization to focal adhesions involves a multistep activation pathway." Molecular biology of the cell **13**(5): 1550-1565.
- Buchwald, G., Hostinova, E., Rudolph, M. G., Kraemer, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Scheffzek, K. and Wittinghofer, A. (2001). "Conformational switch and role of phosphorylation in PAK activation." Mol Cell Biol **21**(15): 5179-5189.
- Calabrese, B., Wilson, M. S. and Halpain, S. (2006). "Development and regulation of dendritic spine synapses." Physiology (Bethesda) **21**: 38-47.
- Castejon, O. J., Fuller, L. and Dailey, M. E. (2004). "Localization of synapsin-I and PSD-95 in developing postnatal rat cerebellar cortex." Brain research. Developmental brain research **151**(1-2): 25-32.
- Chamma, I., Chevy, Q., Poncer, J. C. and Levi, S. (2012). "Role of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission." Frontiers in cellular neuroscience **6**: 5.
- Chang, L. R., Liu, J. P., Zhang, N., Wang, Y. J., Gao, X. L. and Wu, Y. (2009). "Different expression of NR2B and PSD-95 in rat hippocampal subregions during postnatal development." Microscopy research and technique **72**(7): 517-524.
- Chen, W., Yazicioglu, M. and Cobb, M. H. (2004). "Characterization of OSR1, a member of the mammalian Ste20p/germinal center kinase subfamily." The Journal of biological chemistry **279**(12): 11129-11136.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J. L. and Ben-Ari, Y. (1991). "GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life." Trends in neurosciences **14**(515-519).

- Chudotvorova, I., Ivanov, A., Rama, S., Hubner, C. A., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y. and Medina, I. (2005). "Early expression of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expression of functional GABA synapses." The Journal of physiology **566**(Pt 3): 671-679.
- Clayton, G. H., Owens, G. C., Wolff, J. S. and Smith, R. L. (1998). "Ontogeny of cation-Cl-cotransporter expression in rat neocortex." Developmental brain research **109**: 281-292.
- Cottrell, E. C., Campbell, R. E., Han, S. K. and Herbison, A. E. (2006). "Postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin-releasing hormone neurons." Endocrinology **147**(8): 3652-3661.
- Crosby, S. D., Veile, R. A., Doniskeller, H., Baraban, J. M., Bhat, R. V., Simburger, K. S. and Milbrandt, J. (1992). "Neural-Specific Expression, Genomic Structure, and Chromosomal Localization of the Gene Encoding the Zinc-Finger Transcription Factor Ngfi-C." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**: 4739-4743.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E. and Schmid, S. L. (1994). "Induction of Mutant Dynamin Specifically Blocks Endocytic Coated Vesicle Formation." The Journal of cell biology **127**(4): 915-934.
- de Los Heros, P., Kahle, K. T., Rinehart, J., Bobadilla, N. A., Vazquez, N., San Cristobal, P., Mount, D. B., Lifton, R. P., Hebert, S. C. and Gamba, G. (2006). "WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**: 1976-1981.
- DeFazio, R. A., Keros, S., Quick, M. W. and Hablitz, J. J. (2000). "Potassium-Coupled Chloride Cotransport Controls Intracellular Chloride in Rat Neocortical Pyramidal Neurons." The Journal of Neuroscience **20**(21): 8069-8076.
- Delpire, E. and Gagnon, K. B. (2008). "SPAK and OSR1: STE20 kinases involved in the regulation of ion homeostasis and volume control in mammalian cells." The Biochemical journal **409**(2): 321-331.
- Denu, J. M. and Tanner, K. G. (1998). "Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation." Biochemistry **37**: 5633-5643.
- Di Cesare, A., Paris, S., Albertinazzi, C., Dariozzi, S., Andersen, J., Mann, M., Longhi, R. and de Curtis, I. (2000). "p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin." Nature cell biology **2**: 521-530.
- Döding, A., Hartmann, A. M., Beyer, T. and Nothwang, H. G. (2012). "KCC2 transport activity requires the highly conserved L(6)(7)(5) in the C-terminal beta1 strand." Biochemical and biophysical research communications **420**(3): 492-497.
- Dowd, B. F. and Forbush, B. (2003). "PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1)." The Journal of biological chemistry **278**(30): 27347-27353.

- Dzhala, V. I., Talos, D. M., Sdrulla, D. A., Brumback, A. C., Mathews, G. C., Benke, T. A., Delpire, E., Jensen, F. E. and Staley, K. J. (2005). "NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain." Nature medicine **11**(11): 1205-1213.
- Eilers, J., Plant, T. D., Marandi, N. and Konnerth, A. (2001). "GABA-mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in developing rat cerebellar Purkinje neurones." Journal of Physiology **536**(2): 429-437.
- Feng, Q., Albeck, J. G., Cerione, R. A. and Yang, W. (2002). "Regulation of the Cool/Pix proteins: key binding partners of the Cdc42/Rac targets, the p21-activated kinases." The Journal of biological chemistry **277**(7): 5644-5650.
- Feng, Q., Baird, D., Peng, X., Wang, J., Ly, T., Guan, J. L. and Cerione, R. A. (2006). "Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth." Nature cell biology **8**(9): 945-956.
- Feng, Q., Baird, D., Yoo, S., Antonyak, M. and Cerione, R. A. (2010). "Phosphorylation of the cool-1/beta-Pix protein serves as a regulatory signal for the migration and invasive activity of Src-transformed cells." The Journal of biological chemistry **285**(24): 18806-18816.
- Fiumelli, H., Cancedda, L. and Poo, M. M. (2005). "Modulation of GABAergic transmission by activity via postsynaptic Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of KCC2 function." Neuron **48**(5): 773-786.
- Fricke, R. and Cowan, W. M. (1977). "An autoradiographic study of the development of the entorhinal and commissural afferents to the dentate gyrus of the rat." J. Comp. Neurol. **173**: 231-250.
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A. and Ikehara, Y. (1988). "Brefeldin A Causes Disassembly of the Golgi Complex and Accumulation of Secretory Proteins in the Endoplasmic Reticulum." The Journal of biological chemistry **263**(34): 18545-18552.
- Gagnon, K. B. E., England, R. and Delpire, E. (2006). "Volume sensitivity of cation-Cl<sup>-</sup> cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4." American journal of physiology. Cell physiology **290**: 10.
- Gamba, G. (2005). "WNK lies upstream of kinases involved in regulation of ion transporters." The Biochemical journal **391**(Pt 1): e1-3.
- Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T. and Poo, M. (2001). "GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition." Cell **105**(521-532).
- Garcia-Mata, R. and Burridge, K. (2007). "Catching a GEF by its tail." Trends in cell biology **17**(1): 36-43.
- Gauvain, G., Chamma, I., Chevy, Q., Cabezas, C., Irinopoulou, T., Bodrug, N., Carnaud, C., Lévi, S. and Poncer, J. C. (2011). "The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines." PNAS **108**(37): 15474-15479.

- Gomes, P., Saito, T., Del Corso, C., Abderrahmane, A., Eghbali, M., Toro, L. and Stefani, E. (2008). "Identification of a functional interaction between Kv4.3 channels and c-Src tyrosine kinase." Biochimica et biophysica acta **1783**(10): 1884-1892.
- Gonzalez-Islas, C., Chub, N. and Wenner, P. (2009). "NKCC1 and AE3 appear to accumulate chloride in embryonic motoneurons." Journal of neurophysiology **101**(2): 507-518.
- Graumann, W. and Sasse, D. (2005). Compact Lehrbuch Anatomie 4.
- Greenstein, B. and Greenstein, A. (2000). Color Atlas of Neuroscience; Neuroanatomy and Neurophysiology, Georg Thieme Verlag.
- Guillemin, I. (2006). Molekulare Analyse der Aktivierung des Kalium-Chlorid-Cotransporters KCC2 in reifenden Neuronen. Tierphysiologie, TU Kaiserslautern.
- Gülden, M., Jess, A., Kammann, J., Maser, E. and Seibert, H. (2010). "Cytotoxic potency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time." Free radical biology & medicine **49**(8): 1298-1305.
- Gulyás, A. I., Sík, A., Payne, J. A., Kaila, K. and Freund, T. F. (2001). "The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus." European Journal of Neuroscience **13**: 2205-2217.
- Harris, K. M., Jensen, F. E. and Tsao, B. (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.
- Hartmann, A. M., Blaesse, P., Kranz, T., Wenz, M., Schindler, J., Kaila, K., Friauf, E. and Nothwang, H. G. (2009). "Opposite effect of membrane raft perturbation on transport activity of KCC2 and NKCC1." Journal of neurochemistry **111**(2): 321-331.
- Hartmann, A. M., Wenz, M., Mercado, A., Storger, C., Mount, D. B., Friauf, E. and Nothwang, H. G. (2010). "Differences in the large extracellular loop between the K(+)-Cl(-) cotransporters KCC2 and KCC4." The Journal of biological chemistry **285**(31): 23994-24002.
- Haschke, A., Mende, W. and Minkwitz, H. G. (1980). "Development of dendrite structures on CA 1 hippocampal pyramidal neurons of rat dependent on their stratification with and without non-specific experimental influence." Z Mikrosk Anat Forsch **94**(4): 593-622.
- Hashimoto, K., Ichikawa, R., Kitamura, K., Watanabe, M. and Kano, M. (2009). "Translocation of a "winner" climbing fiber to the Purkinje cell dendrite and subsequent elimination of "losers" from the soma in developing cerebellum." Neuron **63**(1): 106-118.
- Helms, J. B. and Rothman, J. E. (1992). "Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF." Nature **360**: 352-354.
- Hoefen, R. J. and Berk, B. C. (2006). "The multifunctional GIT family of proteins." Journal of cell science **119**(8): 1469-1475.

- Hofmann, C., Shepelev, M. and Chernoff, J. (2004). "The genetics of PAK." Journal of cell science **117**: 4343-4354.
- Hübner, C. A., Lorke, D. E. and Hermans-Borgmeyer, I. (2001a). "Expression of the Na-K-2Cl-cotransporter NKCC1 during mouse development." Mech. Dev. **102**: 267-269.
- Hübner, C. A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K. and Jentsch, T. J. (2001a). "Disruption of KCC2 Reveals an Essential Role of K-Cl Cotransport Already in Early Synaptic Inhibition." Neuron **30**: 515-524.
- Ichikawa, R., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Konno, K., Hashimoto, K., Tatsumi, H., Inoue, Y., Kano, M. and Watanabe, M. (2011). "Developmental Switching of Perisomatic Innervation from Climbing Fibers to Basket Cell Fibers in Cerebellar Purkinje Cells." The Journal of Neuroscience **31**(47): 16916-16927.
- Inoue, K., Ueno, S. and Fukuda, A. (2004). "Interaction of neuron-specific K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-cotransporter, KCC2, with brain-type creatine kinase." FEBS Letters **564**: 131-135.
- Inoue, K., Yamada, J., Ueno, S. and Fukuda, A. (2006). "Brain-type creatine kinase activates neuronspecific K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2." Journal of neurochemistry **96**: 598-608.
- Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A. and Sorkin, A. (2003). "Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits." Molecular biology of the cell **14**(3): 858-870.
- Jones, N. P. and Katan, M. (2007). "Role of phospholipase Cgamma1 in cell spreading requires association with a beta-Pix/GIT1-containing complex, leading to activation of Cdc42 and Rac1." Mol Cell Biol **27**(16): 5790-5805.
- Kahle, K. T., Rinehart, J., Ring, A., Gimenez, I., Gamba, G., Hebert, S. C. and Lifton, R. P. (2006). "WNK Protein Kinases Modulate Cellular Cl-Flux by Altering the Phosphorylation State of the Na-K-Cl and K-Cl Cotransporters." Physiology (Bethesda.) **21**: 326-335.
- Kaila, K. (1994). "Ionic basics of GABA(A) receptor channel function in the nervous system." Prog. Neurobiol. **42**: 489-537.
- Kaneko, M., Yamaguchi, K., Eiraku, M., Sato, M., Takata, N., Kiyohara, Y., Mishina, M., Hirase, H., Hashikawa, T. and Kengaku, M. (2011). "Remodeling of monopolar Purkinje cell dendrites during cerebellar circuit formation." PloS one **6**(5): e20108.
- Kelsch, W., Hormuzdi, S., Straube, E., Lewen, A., Monyer, H. and Misgeld, U. (2001). "Insulin-Like Growth Factor 1 and a Cytosolic Tyrosine Kinase Activate Chloride Outward Transport during Maturation of Hippocampal Neurons." The Journal of Neuroscience **21**(21): 8339-8347.
- Kepner, E., Yoder, S. M., Oh, E., Kalwat, M. A., Wang, Z., Quilliam, L. A. and Thurmond, D. C. (2011). "Cool-1/ $\beta$ PIX functions as a guanine nucleotide exchange factor of Cdc42 to regulate insulin secretion." Am J Physiol Endocrinol Metab **301**: E1072-E1080.
- Khirug, S., Ahmad, F., Puskarjov, M., Afzalov, R., Kaila, K. and Blaesse, P. (2010). "A single seizure episode leads to rapid functional activation of KCC2 in the neonatal rat

hippocampus." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **30**(36): 12028-12035.

Khirug, S., Huttu, K., Ludwig, A., Smirnov, S., Voipio, J., Rivera, C., Kaila, K. and Khiroug, L. (2005). "Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices." The European journal of neuroscience **21**: 899-904.

Kim, S., Kim, T., Lee, D., Park, S. H., Kim, H. and Park, D. (2000). "Molecular cloning of neuronally expressed mouse betaPix isoforms." Biochemical and biophysical research communications **272**(3): 721-725.

Kim, S., Lee, S. H. and Park, D. (2001). "Leucine zipper-mediated homodimerization of the p21-activated kinase-interacting factor, beta Pix. Implication for a role in cytoskeletal reorganization." The Journal of biological chemistry **276**(14): 10581-10584.

Kirov, S. A., Goddard, C. A. and Harris, K. M. (2004). "Age-dependence in the homeostatic upregulation of hippocampal dendritic spine number during blocked synaptic transmission." Neuropharmacology **47**(5): 640-648.

Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J. (1992). "Brefeldin A: Insights into the Control of Membrane Traffic and Organelle Structure." The Journal of cell biology **116**(5): 1071-1080.

Koch, T., Widera, A., Bartzsch, K., Schulz, S., Brandenburg, L. O., Wundrack, N., Beyer, A., Grecksch, G. and Holtt, V. (2005). "Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance." Molecular pharmacology **67**(1): 280-287.

Koh, C. G., Manser, E., Zhao, Z. S., Ng, C. P. and Lim, L. (2001). "Beta1PIX, the PAK-interacting exchange factor, requires localization via a coiled-coil region to promote microvillus-like structures and membrane ruffles." Journal of cell science **114**: 4239-4251.

Koh, S. and Loy, R. (1989). "Localization and Development of Nerve Growth Factor-Sensitive Rat Basal Forebrain Neurons and Their Afferent Projections to Hippocampus and Neocortex." The Journal of Neuroscience **9**(9): 2999-3018.

Lahuna, O., Quellari, M., Achard, C., Navarro, C., Vitale, N., Borg, J. P. and Misrahi, M. (2005). "Thyrotropin receptor trafficking relies on the hScrib-βPIX-GIT1-ARF6 pathway." The EMBO journal **24**: 1364-1374.

Lee, H., Chen, C. X., Liu, Y. J., Aizenman, E. and Kandler, K. (2005). "KCC2 expression in immature rat cortical neurons is sufficient to switch the polarity of GABA responses." The European journal of neuroscience **21**: 2593-2599.

Lee, H. H., Jurd, R. and Moss, S. J. (2010). "Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2." Molecular and cellular neurosciences **45**(2): 173-179.

Lee, H. H., Walker, J. A., Williams, J. R., Goodier, R. J., Payne, J. A. and Moss, S. J. (2007). "Direct protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and

activity of the potassium chloride cotransporter KCC2." The Journal of biological chemistry **282**(41): 29777-29784.

Leinenweber, A. (2006). Immunzytochemische Analyse des K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Kotransporters 2 und putativer Interaktionspartner in der primären hippocampalen Zellkultur. Tierphysiologie, TU Kaiserslautern.

Lenski, S. (2009). Analyse der Interaktion von Mutanten des Kaliumchlorid-Cotransporters KCC2 mit dem Guaninnukleotid-Austauscher  $\beta$ -PIX. Neurogenetik, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

Li, H., Khirug, S., Cai, C., Ludwig, A., Blaesse, P., Kolikova, J., Afzalov, R., Coleman, S. K., Lauri, S., Airaksinen, M. S., Keinanen, K., Khiroug, L., Saarma, M., Kaila, K. and Rivera, C. (2007). "KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development." Neuron **56**(6): 1019-1033.

Li, Q., Harraz, M. M., Zhou, W., Zhang, L. N., Ding, W., Zhang, Y., Eggleston, T., Yeaman, C., Banfi, B. and Engelhardt, J. F. (2006). "Nox2 and Rac1 regulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent recruitment of TRAF6 to endosomal interleukin-1 receptor complexes." Mol Cell Biol **26**(1): 140-154.

Loo, T. H., Ng, Y. W., Lim, L. and Manser, E. (2004). "GIT1 Activates p21-Activated Kinase through a Mechanism Independent of p21 Binding." Molecular and Cellular Biology **24**(9): 3849-3859.

Loo, T. W., Bartlett, M. C. and Clarke, D. M. (2008). "Correctors promote folding of the CFTR in the endoplasmic reticulum." The Biochemical journal **413**(1): 29-36.

Lu, M., Karadsheh, M. and Delpire, E. (1999). "Developmental Regulation of the Neuronal-Specific Isoform of K-Cl Cotransporter KCC2 in Postnatal Rat Brains." J Neurobiology **39**: 558-568.

Ludwig, A., Li, H., Saarma, M., Kaila, K. and Rivera, C. (2003). "Developmental up-regulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission." Eur. J. Neurosci. **18**: 3199-3206.

Malecki, J., Wiedlocha, A., Wesche, J. and Olsnes, S. (2002). "Vesicle transmembrane potential is required for translocation to the cytosol of externally added FGF-1." The EMBO journal **21**(17): 4480.

Manser, E., Huang, H. Y., Chen, X. Q., Dong, J. M., Leung, T. and Lim, L. (1997). "Expression of Constitutively Active  $\alpha$ -PAK Reveals Effects of the Kinase on Actin and Focal Complexes." Molecular and Cellular Biology **17**(3): 1129-1143.

Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. and Lim, L. (1998). "PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors." Mol Cell **1**: 183-192.

Matafora, V., Paris, S., Dariozzi, S. and de Curtis, I. (2001). "Molecular mechanisms regulating the subcellular localization of p95-APP1 between the endosomal recycling

compartment and sites of actin organization at the cell surface." Journal of cell science **114**: 4509-4520.

Mayhew, M. W., Jeffery, E. D., Sherman, N. E., Nelson, K., Polefrone, J. M., Pratt, S. J., Shabanowitz, J., Parsons, J. T., Fox, J. W., Hunt, D. F. and Horwitz, A. F. (2007). "Identification of phosphorylation sites in  $\beta$ PIX and PAK1." Journal of cell science **120**: 3911-3918.

Menon, P., Deane, R., Sagare, A., Lane, S. M., Zarcone, T. J., O'Dell, M. R., Yan, C., Zlokovic, B. V. and Berk, B. C. (2010). "Impaired spine formation and learning in GPCR kinase 2 interacting protein-1 (GIT1) knockout mice." Brain research **1317**: 218-226.

Mercado, A., Broumand, V., Zandi-Nejad, K., Enck, A. H. and Mount, D. B. (2006). "A C-terminal domain in KCC2 confers constitutive K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport." The Journal of biological chemistry **281**(2): 1016-1026.

Meyer, M. Z., Deliot, N., Chasserot-Golaz, S., Premont, R. T., Bader, M. F. and Vitale, N. (2006). "Regulation of neuroendocrine exocytosis by the ARF6 GTPase-activating protein GIT1." The Journal of biological chemistry **281**(12): 7919-7926.

Mikawa, S., Wang, C., Shu, F., Wang, T., Fukada, A. and Sato, K. (2002). "Developmental changes in KCC2, KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum." Developmental brain research **136**: 93-100.

Mount, D. B., Delpire, E., Gamba, G., Hall, A. E., Poch, E., Hoover, R. S. J. and Herbert, S. C. (1998). "The Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters." The Journal of Experimental Biology **201**: 2091-2102.

Obata, K., Oide, M. and Tanaka, H. (1978). "Excitatory and inhibitory actions of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture." Brain Res. **144**: 179-184.

Paris, S., Longhi, R., Santambrogio, P. and De Curtis, I. (2003). "Leucine-zipper-mediated homo- and hetero-dimerization of GIT family p95-ARF GTPase- activating protein, PIX-, paxillin-interacting proteins 1 and 2." Biochem. J. **372**: 391-398.

Paris, S., Za, L., Sporchia, B. and de Curtis, I. (2002). "Analysis of the subcellular distribution of avian p95-APP2, an ARF-GAP orthologous to mammalian paxillin kinase linker." Int. J. Biochem. Cell Biol. **34**: 826-837.

Park, E., Na, M., Choi, J., Kim, S., Lee, J. R., Yoon, J., Park, D., Sheng, M. and Kim, E. (2003). "The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42." The Journal of biological chemistry **278**(21): 19220-19229.

Payne, J. A. (1997). "Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> regulation." American journal of physiology. Cell physiology **273**: C1516-C1525.

Payne, J. A., Rivera, C., Voipio, J. and Kaila, K. (2003). "Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma." Trends in neurosciences **26**: 199-206.

- Payne, J. A., Stevenson, T. J. and Donaldson, L. F. (1996). "Molecular Characterization of a Putative K-Cl Cotransporter in Rat Brain." The Journal of biological chemistry **271**(27): 16245-16252.
- Perez, C., Koshy, C., Ressler, S., Nicklisch, S., Kramer, R. and Ziegler, C. (2011). "Substrate specificity and ion coupling in the Na<sup>+</sup>/betaine symporter BetP." The EMBO journal **30**(7): 1221-1229.
- Pfeffer, C. K., Stein, V., Keating, D. J., Maier, H., Rinke, I., Rudhard, Y., Hentschke, M., Rune, G. M., Jentsch, T. J. and Hubner, C. A. (2009). "NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early hippocampal development." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **29**(11): 3419-3430.
- Pheng, L. H., Dumont, Y., Fournier, A., Chabot, J. G., Beaudet, A. and Quirion, R. (2003). "Agonist- and antagonist-induced sequestration/internalization of neuropeptide Y Y1 receptors in HEK293 cells." British journal of pharmacology **139**(4): 695-704.
- Piechotta, K., Lu, J. and Delpire, E. (2002). "Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1)." The Journal of biological chemistry **277**(52): 50812-50819.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L. and Mullins, R. D. (2000). "Biophysics of actin filament dynamics in nonmuscle cells." Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct. **29**: 545-576.
- Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J. L. R., Pitcher, J. A., Patton, W. A., Moss, J., Vaughan, M. and Lefkowitz, R. J. (1998). "β<sub>2</sub>-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein."
- Premont, R. T., Perry, S. J., Schmalzigaug, R., Roseman, J. T., Xing, Y. and Claing, A. (2004). "The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors." Cellular signalling **16**(9): 1001-1011.
- Qin, L., Marrs, G. S., McKim, R. and Dailey, M. E. (2001). "Hippocampal Mossy Fibers Induce Assembly and Clustering of PSD95-Containing Postsynaptic Densities Independent of Glutamate Receptor Activation." The Journal of comparative neurology **440**: 284-298.
- Randazzo, P. A., Inoue, H. and Bharti, S. (2007). "Arf GAPs as regulators of the actin cytoskeleton." Biology of the Cell **99**(10): 583-600.
- Richardson, C., Sakamoto, K., De Los Heros, P., Deak, M., Campbell, D. G., Prescott, A. R. and Alessi, D. R. (2011). "Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways." Journal of cell science **124**: 799-900.
- Rinehart, J., Maksimova, Y. D., Tanis, J. E., Stone, K. L., Hodson, C. A., Zhang, J., Risinger, M., Pan, W., Wu, D., Colangelo, C. M., Forbush, B., Joiner, C. H., Gulcicek, E. E., Gallagher, P. G. and Lifton, R. P. (2009). "Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity." Cell **138**(3): 525-536.

- Rinehart, J., Vazquez, N., Kahle, K. T., Hodson, C. A., Ring, A. M., Gulcicek, E. E., Louvi, A., Bobadilla, N. A., Gamba, G. and Lifton, R. P. (2011). "WNK2 kinase is a novel regulator of essential neuronal cation-chloride cotransporters." The Journal of biological chemistry **286**(34): 30171-30180.
- Rivera, C., Voipio, J. and Kaila, K. (2005). "Two developmental switches in GABAergic signalling: the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII." The Journal of physiology **562**(Pt 1): 27-36.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvoori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M. and Kaila, K. (1999). "The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation." Nature **397**: 251-255.
- Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipila, S., Payne, J. A., Minichiello, L., Saarma, M. and Kaila, K. (2004). "Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **24**(19): 4683-4691.
- Rosa, P., Mantovani, S., Rosboch, R. and Huttner, W. B. (1992). "Monensin and Brefeldin A Differentially Affect the Phosphorylation and Sulfation of Secretory Proteins."
- Roselli, S., Moutkine, I., Gribouval, O., Benmerah, A. and Antignac, C. (2004). "Plasma Membrane Targeting of Podocin Through the Classical Exocytic Pathway: Effect of NPHS2 Mutations." Traffic **5**(1): 37-44.
- Rosenberger, G. and Kutsche, K. (2006). "AlphaPIX and betaPIX and their role in focal adhesion formation." European journal of cell biology **85**(3-4): 265-274.
- Saneyoshi, T., Wayman, G., Fortin, D., Davare, M., Hoshi, N., Nozaki, N., Natsume, T. and Soderling, T. R. (2008). "Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex." Neuron **57**(1): 94-107.
- Schmidt, M., Rumenapp, U., Bienek, C. and Keller, J. (1996). "Inhibition of Receptor Signaling to Phospholipase D by Clostridium difficile Toxin B." The Journal of biological chemistry **271**(5): 2422-2426.
- Schmidt, M. H., Husnjak, K., Szymkiewicz, I., Haglund, K. and Dikic, I. (2006). "Cbl escapes Cdc42-mediated inhibition by downregulation of the adaptor molecule betaPix." Oncogene **25**(21): 3071-3078.
- Shen, L., Liang, F., Walensky, L. D. and Huganir, R. L. (2000). "Regulation of AMPA Receptor GluR1 Subunit Surface Expression by a 4.1N-Linked Actin Cytoskeletal Association." The Journal of Neuroscience **20**(21): 7932-7940.
- Shin, E. Y., Shin, K. S., Lee, C. S., Woo, K. N., Quan, S. H., Soung, N. K., Kim, Y. G., Cha, C. I., Kim, S. R., Park, D., Bokoch, G. M. and Kim, E. G. (2002). "Phosphorylation of p85 beta PIX, a Rac/Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor, via the Ras/ERK/PAK2 pathway is required for basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth." The Journal of biological chemistry **277**(46): 44417-44430.

- Shin, E. Y., Woo, K. N., Lee, C. S., Koo, S. H., Kim, Y. G., Kim, W. J., Bae, C. D., Chang, S. I. and Kim, E. G. (2004). "Basic fibroblast growth factor stimulates activation of Rac1 through a p85 betaPIX phosphorylation-dependent pathway." J. Biol. Chem. **279**: 1994-2004.
- Silver, R. A., Momiyama, A. and Cull-Candy, S. G. (1998). "Locus of frequency-dependent depression identified with multiple-probability fluctuation analysis at rat climbing fibre—Purkinje cell synapses." Journal of Physiology **510**(3): 881-902.
- Simat, M., Ambrosetti, L., Lardi-Studler, B. and Fritschy, J. M. (2007). "GABAergic synaptogenesis marks the onset of differentiation of basket and stellate cells in mouse cerebellum." The European journal of neuroscience **26**(8): 2239-2256.
- Singh, S. P., McDonald, D., Hope, T. J. and Prabhakar, B. S. (2004). "Upon thyrotropin binding the thyrotropin receptor is internalized and localized to endosome." Endocrinology **145**: 1003-1010.
- Sipilä, S. T., Schuchmann, S., Voipio, J., Yamada, J. and Kaila, K. (2006). "The cation-chloride cotransporter NKCC1 promotes sharp waves in the neonatal rat hippocampus." The Journal of physiology **573**(Pt 3): 765-773.
- Solé, L., Roura-Ferrer, M., Pérez-Verdaguer, M., Oliveras, A., Calvo, M., Fernández-Fernández, M. J. and Felipe, A. (2009). "KCNE4 suppresses Kv1.3 currents by modulating trafficking, surface expression and channel gating." Journal of cell science **122**(20): 3738-3748.
- Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Jentsch, T. J. and Hubner, C. A. (2004). "Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride." The Journal of comparative neurology **468**(1): 57-64.
- Strange, K., Singer, T. D., Morrison, R. and Delpire, E. (2000). "Dependence of KCC2 K-Cl cotransporter activity on a conserved carboxy terminus tyrosine residue." American journal of physiology. Cell physiology **279**: C860-C867.
- Succol, F., Fiumelli, H., Benfenati, F., Cancedda, L. and Barberis, A. (2012). "Intracellular chloride concentration influences the GABAA receptor subunit composition." Nature communications **3**: 738.
- Sun, Y. and Bamji, S. X. (2011). "beta-Pix modulates actin-mediated recruitment of synaptic vesicles to synapses." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **31**(47): 17123-17133.
- Szczepanowska, J. (2009). "Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements." Acta Biochemica Polonica **56**(2): 225-234.
- Takayama, C. and Inoue, Y. (2006). "Developmental localization of potassium chloride cotransporter 2 in granule cells of the early postnatal mouse cerebellum with special reference to the synapse formation." Neuroscience **143**(3): 757-767.
- Takayama, C. and Inoue, Y. (2007). "Developmental localization of potassium chloride cotransporter 2(KCC2) in the Purkinje cells of embryonic mouse cerebellum." Neuroscience research **57**(2): 322-325.

- Tamamaki, N. (1999). "Development of afferent fiber lamination in the infrapyramidal blade of the rat dentate gyrus." J. Comp. Neurol. **411**: 257-266.
- Tan, H., Ren, R. R., Xiong, Z. Q. and Wang, Y. W. (2009). "Effects of ketamine and midazolam on morphology of dendritic spines in hippocampal CA1 region of neonatal mice." Chinese Medical Journal **122**(4): 455-459.
- Titz, S., Hans, M., Kelsch, W., Lewen, A., Swandulla, D. and Misgeld, U. (2003). "Hyperpolarizing inhibition develops without trophic support by GABA in cultured rat midbrain neurons." The Journal of physiology **550**: 719-730.
- Turner, C. E., Brown, M. C., Perrotta, J. A., Riedy, M. C., Nikolopoulos, S. N., McDonald, A. R., Bagrodia, S., Thomas, S. and Leventhal, P. S. (1999). "Paxillin LD4 Motif Binds PAK and PIX through a Novel 95-kD Ankyrin Repeat, ARF-GAP Protein: A Role in Cytoskeletal Remodeling." The Journal of Cell Biology **145**(4): 851-863.
- Ueyama, T., Geiszt, M. and Leto, T. L. (2006). "Involvement of Rac1 in Activation of Multicomponent Nox1- and Nox3-Based NADPH-Oxidases." Molecular and Cellular Biology **26**(6): 2160-2174.
- Uvarov, P., Ludwig, A., Markkanen, M., Pruunsild, P., Kaila, K., Delpire, E., Timmusk, T., Rivera, C. and Airaksinen, M. S. (2007). "A novel N-terminal isoform of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2." The Journal of biological chemistry **282**(42): 30570-30576.
- Uvarov, P., Ludwig, A., Markkanen, M., Rivera, C. and Airaksinen, M. S. (2006). "Upregulation of the neuron-specific K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter expression by transcription factor early growth response 4." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **26**(52): 13463-13473.
- Valdes, J. L., Tang, J., McDermott, M. I., Kuo, J. C., Zimmerman, S. P., Wincovitch, S. M., Waterman, C. M., Milgram, S. L. and Playford, M. P. (2011). "Sorting nexin 27 protein regulates trafficking of a p21-activated kinase (PAK) interacting exchange factor (beta-Pix)-G protein-coupled receptor kinase interacting protein (GIT) complex via a PDZ domain interaction." The Journal of biological chemistry **286**(45): 39403-39416.
- Vale, C., Caminos, E., Martinez-Galan, J. R. and Juiz, J. M. (2005). "Expression and developmental regulation of the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 in the cochlear nucleus." Hear. Res. **206**: 107-115.
- von Zastrow, M. and Kobilka, B. K. (1994). "Antagonist-dependent and -independent Steps in the Mechanism of Adrenergic Receptor Internalization." The Journal of biological chemistry **269**(28): 18448-18452.
- Wake, H., Watanabe, M., Moorhouse, A. J., Kanematsu, T., Horibe, S., Matsukawa, N., Asai, K., Ojika, K., Hirata, M. and Nabekura, J. (2007). "Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress result in functional downregulation." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **27**(7): 1642-1650.
- Walensky, L. D., Blackshaw, S., Liao, D., Watkins, C. C., Weier, H. U., Parra, M., Haganir, R. L., Conboy, J. G., Mohandas, N. and Snyder, S. H. (1999). "A novel neuron-enriched

homolog of the erythrocyte membrane cytoskeletal protein 4.1." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **19**(15): 6457-6467.

Wang, C., Shimizu-Okabe, C., Watanabe, K., Okabe, A., Matsuzaki, H., Ogawa, T., Mori, N., Fukuda, A. and Sato, K. (2002). "Developmental changes in KCC1, KCC2 and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain." Developmental brain research **139**: 59-66.

Wang, D., Sai, J., Carter, G., Sachpatzidis, A., Lolis, E. and Richmond, A. (2002). "PAK1 Kinase Is Required for CXCL1-Induced Chemotaxis†." Biochemistry **41**(22): 7100-7107.

Wang, G., Hernandez, R., Weninger, K. and Brown, D. T. (2007). "Infection of cells by Sindbis virus at low temperature." Virology **362**: 461-467.

Wang, J., Yin, G., Menon, P., Pang, J., Smolock, E. M., Yan, C. and Berk, B. C. (2010). "Phosphorylation of G protein-coupled receptor kinase 2-interacting protein 1 tyrosine 392 is required for phospholipase C-gamma activation and podosome formation in vascular smooth muscle cells." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **30**(10): 1976-1982.

Ward, R. E., IV, Schweizer, L., Lamb, R. S. and Fehon, R. G. (2001). "The Protein 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin (FERM) Domain of Drosophila Coracle, a Cytoplasmic Component of the Septate Junction, Provides Functions Essential for Embryonic Development and Imaginal Cell Proliferation." Genetics **159**: 10.

Watanabe, M., Wake, H., Moorhouse, A. J. and Nabekura, J. (2009). "Clustering of neuronal K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporters in lipid rafts by tyrosine phosphorylation." The Journal of biological chemistry **284**(41): 27980-27988.

Webb, D. J., Mayhew, M. W., Kovalenko, M., Schroeder, M. J., Jeffery, E. D., Whitmore, L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Horwitz, A. F. (2006). "Identification of phosphorylation sites in GIT1." Journal of cell science **119**(Pt 14): 2847-2850.

Wenz, M. (2008). Funktionelle Analyse von molekularen und zellulären Mechanismen zur Regulation der KCC2 Transportaktivität. Tierphysiologie, TU Kaiserslautern.

Whittemore, E. R., Loo, D. T., Watt, J. A. and Cotman, C. W. (1995). "A detailed analysis of Hydrogen Peroxide-induced cell death in primary neuronal culture." Neuroscience **67**(4): 921-932.

Williams, J. R. and Payne, J. A. (2004). "Cation transport by the neuronal K<sup>(+)</sup>-Cl<sup>(-)</sup> cotransporter KCC2: thermodynamics and kinetics of alternate transport modes." American journal of physiology. Cell physiology **287**(4): C919-931.

Williams, J. R., Sharp, J. W., Kumari, V. G., Wilson, M. S. and Payne, J. A. (1999). "The Neuron-specific K-Cl Cotransporter, KCC2." The Journal of biological chemistry **274**(April 30): 12656-12664.

Woo, N. S., Lu, J. M., England, R., McClellan, R., Dufour, S., Mount, D. B., Deutch, A. Y., Lovinger, D. M. and Delpire, E. (2002). "Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene." Hippocampus **12**: 258-268.

- Woodcroft, B. J., Hammond, L., Stow, J. L. and Hamilton, N. A. (2009). "Automated organelle-based colocalization in whole-cell imaging." Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology **75**(11): 941-950.
- Woods, A. and Couchman, J. R. (1992). "Protein kinase C involvement in focal adhesion formation." Journal of cell science **101**: 277-290.
- Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L. and Keely, P. J. (2004). "Focal adhesion regulation of cell behavior." Biochimica et biophysica acta **1692**(2-3): 103-119.
- Yamada, J., Okabe, A., Toyoda, H., Kilb, W., Luhmann, H. J. and Fukuda, A. (2004). "Cl<sup>-</sup> uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1." The Journal of physiology **557**(Pt 3): 829-841.
- Yarar, D., Waterman, C. M. and Schmid, S. L. (2005). "A Dynamic Actin Cytoskeleton Functions at Multiple Stages of Clathrin-mediated Endocytosis." Molecular biology of the cell **16**: 964-975.
- Yaspelkis, B. B., Kvasha, I. A. and Figueroa, T. F. (2009). "High-fat feeding increases insulin receptor and IRS-1 coimmunoprecipitation with SOCS-3, IKK  $\alpha$ /  $\beta$  phosphorylation and decreases PI-3 kinase activity in muscle." Am J Physiol Regul Integr Physiol **296**: R1709-R1715.
- Yeo, M., Berglund, K., Augustine, G. and Liedtke, W. (2009). "Novel repression of Kcc2 transcription by REST-RE-1 controls developmental switch in neuronal chloride." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **29**(46): 14652-14662.
- Za, L., Albertinazzi, C., Paris, S., Gagliani, M., Tacchetti, C. and De Curtis, I. (2006). " $\beta$ PIX controls cell motility and neurite extension by regulating the distribution of GIT1." Journal of cell science **119**: 2654-2666.
- Zamir, E. and Geiger, B. (2001). "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions." Journal of cell science **114**: 3583-3590.
- Zapatka, M. (2008). Molekulare Charakterisierung der Interaktionen des Kalium-Chlorid-Kotransporters KCC2 mit verschiedenen Proteinen. Neurogenetik, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
- Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H. and Horwitz, A. F. (2003). "Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1." The Journal of cell biology **161**(1): 131-142.
- Zhang, W., Chu, X., Tong, Q., Cheung, J. Y., Conrad, K., Masker, K. and Miller, B. A. (2003). "A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death." The Journal of biological chemistry **278**(18): 16222-16229.
- Zhao, B., Wong, A. Y., Murshid, A., Bowie, D., Presley, J. F. and Bedford, F. K. (2008). "Identification of a novel di-leucine motif mediating K(+)/Cl(-) cotransporter KCC2 constitutive endocytosis." Cellular signalling **20**(10): 1769-1779.

Zhao, Z. S., Manser, E., Loo, T. H. and Lim, L. (2000). "Coupling of PAK-Interacting Exchange Factor PIX to GIT1 Promotes Focal Complex Disassembly." Molecular and Cellular Biology **20**(17): 6354-6363.

Zhu, L., Lovinger, D. and Delpire, E. (2005). "Cortical neurons lacking KCC2 expression show impaired regulation of intracellular chloride." Journal of neurophysiology **93**(3): 1557-1568.

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AP-2	Clathrin-bindendes Adapter-Protein 2
Arf	ADP-ribosylation factor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinocinsäure
BfA	Brefeldin A
BSA	Kälberserumalbumin
CA	Cornu ammonis
CAMK	Calmodulin-abhängige Kinase
CAMKK	Calmodulin-abhängige Kinase Kinase
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma
CCC	Kationen-Chlorid-Kotransporter
Cdc42	Cell division control protein 42
CKB	Creatinkinase B
[Cl] <sub>i</sub>	intrazelluläre Chloridkonzentration
CME	Clathrin-mediated endocytosis
c-Src	cellular Src
CTD	C-Terminus (C-terminal domain)
CytD	Cytochalasin D
D/H-Wechsel	Depolarisation-Hyperpolarisations-Wechsel
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DDM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
DG	Gyrus dentatus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonaltag
EGF	epidermal growth factor
EGL	external granular layer
Egr4	early growth response 4
FAK	focal adhesion kinase
FCS	fötales Kälberserum
FERM	Protein 4.1 (four.one); Ezrin; Radixin; Moesin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure (Gamma-Aminobutyric acid)
GAP	GTPase activating protein
GBD	GIT-Bindedomäne
GEF	Guaninnukleotid-Austauscher (guanine nucleotide exchange factor)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GIT	G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactor
GluR1	Glutamat-Rezeptor Untereinheit 1

gr	Str. granulare des Cerebellums
GTP	Guaninnukleotidtriphosphat
h	Hilus des Gyrus dentatus'
HA	Hämagglutinin
HEK	human embryonic kidney (menschliche embryonale Nierenzellen)
HEK293 <sup>KCC2</sup>	stabil KCC2 exprimierende HEK293-Zelllinie
IAA	Iodactetamid
IB	Immunoblot
ICC	Immuncytochemie
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IGL	inner granular layer
IHC	Immunhistochemie
IR	Immunreaktivität
ISO	Isotonisch
KCC2	K <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> -Kotransporter 2 (K <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> -Cotransporter 2)
KCC2 <sup>-/-</sup>	KCC2-knockout
KCC2 <sup>+/+</sup>	KCC2-Wildtyp
KCC3	K <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> -Kotransporter 3 (K <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> -Cotransporter 3)
LB	Luria Bertani
lm	Str. lacunosum moleculare des Hippocampus'
m	Str. moleculare des Hippocampus'
MEKK	MAP Kinase Kinase Kinase
mEPSC	miniature postsynaptic current
mo	Stratum moleculare des Cerebellums
mRNA	messenger RNA
NKCC1	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> 2Cl <sup>-</sup> -Kotransporter 1 (Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> 2Cl <sup>-</sup> -Cotransporter 1)
NKCC2	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> 2Cl <sup>-</sup> -Kotransporter 2 (Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> 2Cl <sup>-</sup> -Cotransporter 2)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDG	N-methyl-D-Glucamin
OBCOL	Organelle-based Colocalisation
OSR-1	oxidative stress-responsive kinase 1
P	Postnataltag
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAK	p21 activated kinase
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd
PIX	PAK-interacting exchange factor
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLL	Poly-L-Lysin
PSD	Postsynaptische Dichte
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	Str. radiatum des Hippocampus'
RE	repressor element

---

REST	restrictive element-1 silencing factor
rn	rattus norvegicus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sg	Str. ganglionare des Cerebellums (auch: Purkinjezellschicht)
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
sl	Str. lucidum des Hippocampus
so	Str. oriens des Hippocampus'
SPAK	Ste20-related praline alanine rich kinase
Src	Sarcoma
Str.	Stratum
TBS	Tris-gepufferte Saline
TfR	Transferrin-Rezeptor
TGN	trans-golgi network
TM	Transmembran
TSHR	thyroid stimulating hormone receptor
UV	Ultraviolett
WGA	Weizenkeimagglutinin
WNK	with no lysine (K)
wt	Wildtyp
Y2H	Hefe-2-Hybrid (Yeast-2-hybrid)

# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten:

Name: Annika Döding  
Geburtstag:  
Geburtsort: Lübbecke  
Nationalität: deutsch  
Familienstand:

## Schulische Ausbildung:

**1988 – 1992**            **Grundschule in Frotheim**  
**1992 – 2001**            **Söderblom-Gymnasium Espelkamp**  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Hochschulausbildung:

**10/01 – 09/02**            **Lehramtsstudium an der Universität Osnabrück**  
Mathematik und Anglistik, LA Gym

**10/02 – 08/05**            **Bachelorstudium an der Universität Osnabrück**  
Thema der Bachelorarbeit:  
,Einfluss pflanzlicher und bakterieller Wirkstoffe auf die V-ATPase von *Manduca sexta*'  
Abschluss: Bachelor of Science, Biologie der Zellen

**10/05 – 06/07**            **Masterstudium an der Universität Osnabrück**  
Abschluss: Master of Science, Biologie der Zellen  
Thema der Masterarbeit:  
'Preparation of fusion constructs with photoactivatable GFP in order to analyze the functional organization and intracellular dynamics of the kinase anchoring protein gravin'

**11/07 - 04/11**            **Promotion an der Universität Oldenburg**  
AG Neurogenetik unter der Leitung von Prof. Dr. Hans Gerd Nothwang

**01/12 - heute**            **Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena**

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einer Reihe von Leuten bedanken, die mich während meiner Doktorandenzeit begleitet und unterstützt haben:

Zunächst danke ich Prof. Dr. Hans Gerd Nothwang für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie der benötigten Materialien. Darüber hinaus danke ich ihm für die Möglichkeit der Diskussion meines Projektes in großen und kleinen Runden. Danke, dass deine Tür immer offen stand.

Darüber hinaus geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. K.-W. Koch für die Übernahme des Zweitgutachtens und an Frau Prof. Dr. C. Richter-Landsberg als Vorsitzende der Prüfungskommission.

Ein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. G. Wittstock, der freundlicherweise das LSM seiner AG für konfokale Aufnahmen zur Verfügung gestellt hat. Danke auch an seine Mitarbeiter, die bei Problemen mit dem Gerät immer zur Stelle waren.

Vielen Dank auch an meine „alten“ Kollegen für das nette Laborklima und ihre Hilfsbereitschaft sowie immer neue Impulse und Vorschläge im Rahmen der Labmeetings und auch kleinerer Diskussionsrunden. Leider würde es den Rahmen sprengen, euch alle namentlich zu nennen.

Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle unsere TAs Martina Reents, die mich puncto Zellkultur technisch unterstützt und bei den Etablierungen immer Diskussionsbereitschaft gezeigt hat, und Jasmin Schröder, welche mir insbesondere in der Endphase meiner Laborzeit immer wieder verschiedene Sachen abgenommen hat.

Ein herzlicher Dank geht auch an Dr. Jens Schindler dafür, dass er die Aspekte meiner Arbeit immer wieder kritisch mit mir diskutiert hat. Auch für seine Hilfestellungen im Bezug auf methodische Fragen ein großes Dankeschön.

Darüber hinaus möchte ich mit Mariel Zapatka und Anne Ripperger zwei Ehemaligen danken, die mir inzwischen gute Freunde geworden sind und sich immer Zeit für mich genommen haben ganz egal, wie voll ihr eigener Zeitplan war.

Danke auch an die Kollegen aus den AGs Koch und Richter-Landsberg für die kleineren und größeren Flurgespräche und -diskussionen. Es hat Spaß gemacht, sich mit euch den Flur zu teilen.

Zum Schluss gilt mein größter Dank den wichtigsten Personen in meinem Leben: meinen Eltern und meinen Schwestern. Danke, dass ihr immer für mich da wart. Ihr habt euch immer Zeit für mich genommen und mich immer wieder aufgebaut und mich gestärkt. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft!