

**Rolle der N-terminalen Domänen (NTDs) bei der  
Assemblierung und Funktion von  
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren**

Vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur  
Erlangung des akademischen Grades  
eines Doctor rerum naturalium  
genehmigte Dissertation

von  
Dipl-Biol. Ivana Mesic  
aus Sarajevo

Berichterstatter (1. Referent): PD. Dr. Bodo Laube  
Berichterstatter (2. Referent): Prof. Dr. Ralf Galuske

Datum der Einreichung: 24. August 2009  
Datum der Disputation: 27. November 2009

Darmstadt 2010  
(D17)



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	7
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1 Glutamat-aktivierte Rezeptoren.....	10
1.2 Klassifizierung von NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren.....	11
1.3 Die modulare Struktur von iGluRs.....	13
1.4 NMDA-Rezeptoren.....	15
1.4.1 Grundlegende Eigenschaften von 'konventionellen' NR1/NR2-NMDA-Rezeptoren.....	15
1.4.2 Rolle der NR3-Untereinheit in NMDA-Rezeptoren.....	16
1.5 Aktivierungsmechanismus von NMDA-Rezeptoren.....	17
1.5.1 Modell der Aktivierung von NR1/NR2-Rezeptoren.....	17
1.5.2 Aktivierungsmechanismus des 'exzitatorischen Glyzin-Rezeptors'.....	18
1.5.3 Rolle der N-terminalen Domänen (NTDs) bei der Assemblierung und Regulation der NMDA-Rezeptorfunktion.....	20
1.5.4 Zeitliches und räumliches Expressionsmuster von NMDA-Rezeptoren.....	21
1.5.5 Physiologische und pathophysiologische Relevanz der NMDA-Rezeptoren.....	22
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	25
<b>2 Material.....</b>	<b>26</b>
2.1 Verwendetes Expressionssystem.....	26
2.2 DNA-Konstrukte.....	26
2.2.1 NR1-Untereinheit.....	26
2.2.2 NR2A-Untereinheit.....	27
2.2.3 NR3A-Untereinheit.....	27
2.2.4 NR3B-Untereinheit.....	27
2.3 Enzyme.....	28
2.3.1 Restriktionsendonukleasen.....	28

---

2.3.2	Sonstige Enzyme .....	28
2.4	Marker .....	28
2.4.1	DNA-Längenstandards .....	28
2.4.2	Proteinstandards .....	29
2.5	Kits .....	29
2.6	Puffer und Lösungen .....	29
2.7	Chemikalien.....	31
2.8	Geräte .....	32
2.9	Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	32
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>33</b>
3.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue-Kultur.....	33
3.2	Herstellung elektrokompetenter Zellen .....	33
3.3	Transformation .....	33
3.4	Plasmid-DNA Isolierung aus <i>E. coli</i> Kulturen mittels Qiagen-Kits.....	34
3.5	Minipräparation.....	34
3.6	Maxipräparation.....	34
3.7	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	35
3.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	36
3.8.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	36
3.8.2	Konzentrationsbestimmung mittels Ethidiumbromid- Agarosegelen.....	36
3.9	Entsalzen von DNA-Proben.....	37
3.10	Behandlung der DNA mit Restriktionsenzymen.....	37

---

3.11 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion .....	38
3.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	38
3.13 Dephosphorylierung von DNA-Termini .....	39
3.14 Ligation von DNA-Fragmenten .....	39
3.15 Polymerase Kettenreaktion (engl.: Polymerase chain reaction - PCR) .....	40
3.16 PCR-Mutagenese .....	40
3.17 Sequenzierung .....	42
3.18 Die <i>in vitro</i> Transkription .....	43
3.19 Elektrophysiologische Methoden .....	44
3.19.1 <i>Xenopus laevis</i> als Oozytenexpressionssystem .....	44
3.19.2 Haltung der Frösche .....	45
3.19.3 Oozytenentnahme .....	45
3.19.4 Präparation von Oozyten .....	46
3.19.5 Herstellung von Injektionskapillaren .....	46
3.19.6 Injektion der cRNA in Oozyten .....	46
3.19.7 Aufbau des Mess-Standes .....	47
3.19.8 Herstellung von Ableitelektroden .....	48
3.19.9 Chlorierung von Silberelektroden .....	48
3.19.10 Theoretischer Hintergrund der Zwei-Elektroden Spannungsklemme (engl. two-electrode voltage-clamp) .....	49
3.19.11 Die Voltage Clamp-Messung .....	50
3.19.12 Aufnahme von Dosiswirkungskurven der Agonisten Glyzin bei wt, partiell und vollständig NTD-deletierten NR1/NR3- NMDA-Rezeptoren .....	50
3.19.13 Aufnahme der Glyzin-vermittelten und der relativen Zn <sup>2+</sup> - und D-Serin-induzierten Rezeptorströme von wt, partiell und vollständig NTD-deletierten NR1/NR3-Rezeptoren .....	51
3.19.14 Aufnahme der Zn <sup>2+</sup> -Potenzierung von Glyzin-induzierten NR1/NR3-Rezeptorströmen .....	51
3.19.15 Aufnahme der MDL- und Zn <sup>2+</sup> /MDL-Potenzierung von Glyzin- vermittelten NR1/NR3-Rezeptorantworten .....	51
3.19.16 Aufnahme der Strom-Spannungsbeziehungen von NR2- enthaltenden NMDA-Rezeptoren .....	51
3.19.17 Auswertung der Dosiswirkungskurven von Glyzin bzw. Glyzin/Glutamat .....	52
3.19.18 Statistische Analyse .....	52

3.20 Biochemische Methoden .....	52
3.20.1 Metabolische Markierung .....	53
3.20.2 Markierung von Zell-Oberfläche-exprimierten Proteinen mit dem Cy5-NHS-Ester .....	53
3.20.3 Aufreinigung von 6xHistidin-markierten Proteinen aus <i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	54
3.20.4 Analyse des N-Glykosylierungsverhaltens von Proteinen .....	56
3.20.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	57
3.20.6 Blaue native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) .....	59
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
4.1 Native affinitätschromatographische Aufreinigung von NR1/NR2A- und NR1/NR3A-Rezeptorkomplexen anhand der Hexahistidyl-Markierung unter verschiedenen Bedingungen .....	61
4.2 Rolle der NTDs bei der Assemblierung von NR1/NR3A-Rezeptoren ...	64
4.2.1 Oligomerisierung und Stöchiometrie von NR1/NR3A-NMDA-Rezeptoren .....	64
4.2.2 Proteinexpressions-Stabilität von einzelnexprimierten NR1- und NR3-Untereinheiten .....	67
4.2.3 Effekte der Prävention der Ausbildung von NR1-Disulfidbrücken ..	68
4.2.4 Auswirkung der NR1-NTD-Deletion auf die Assemblierung und Funktion von NR1/NR3A-Rezeptoren .....	71
4.2.5 Die Effizienz der NR1/NR3A-Rezeptorassemblierung und der Zelloberflächen-Insertion sind nicht durch NTDs bedingt.....	72
4.3 NTDs determinieren die Funktion von NR1/NR3-Rezeptoren .....	74
4.3.1 Die Entfernung der NTDs der NR1/NR3A-Untereinheiten resultiert in funktionellen, hoch effizienten Glyzin-aktivierbaren NMDA-Rezeptoren.....	74
4.3.2 NTD-Entfernung von NR1- und NR3B-Untereinheiten bewirkt, ähnlich den NR1/NR3A-Rezeptoren, die Erhöhung Glyzin-hervorgerufener NR1/NR3B-Rezeptorströme .....	75
4.3.3 Rolle der NTDs bei der Potenzierung durch den NR1-LBD-Antagonisten MDL und der Desensibilisierung von NR1/NR3A-Rezeptoren .....	77
4.3.4 Differentielle Effekte der NTD-Entfernung auf die maximal-induzierbaren NR1/NR3A-Rezeptorströme durch Zn <sup>2+</sup> und D-Serin.....	80
4.4 Triheteromere NR1/NR3A/NR3B-NMDA-Rezeptoren .....	82
4.4.1 Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung von NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren.....	82
4.4.2 Wirkung von NR1-Glyzinbindetaschen Antagonisten sowie Zn <sup>2+</sup> auf Glyzin-induzierte NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme.....	84

4.4.3	Geringe agonistische und modulatorische Wirkung von $Zn^{2+}$ auf Glyzin-induzierte NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme .....	86
4.4.4	Funktionelle und biochemische Analyse von NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren .....	88
4.4.5	Die NTD-Deletion bedingt eine Verringerung der Desensibilisierung von triheteromeren NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren .....	91
4.4.6	Die Auswirkung der NTD-Deletion auf die MDL- und MDL/ $Zn^{2+}$ -Potenzierung Glyzin-aktivierter NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme .....	92
4.4.7	Die potenzierende und agonistische Wirkung von $Zn^{2+}$ bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren nach der NTD-Deletion.....	93
4.4.8	Einfluss der Mutation der NR1-LBD bzw. NR3A-LBD auf Glyzin-vermittelte NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme und die Modulation durch MDL und $Zn^{2+}$ .....	95
4.5	Triheteromere NR1/NR2A/NR3A-NMDA-Rezeptoren .....	98
4.5.1	Ko-Assoziation von NR1-, NR2A- und NR3A-Untereinheiten in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	98
4.5.2	Die Überexpression von NR3A-Untereinheiten bedingt einen größeren Anteil von $Mg^{2+}$ -insensitiveren triheteromeren NR1/NR2A/NR3A-Rezeptoren in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	100
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>104</b>
5.1	Rolle der NTDs bei der Assemblierung von NMDA-Rezeptoren .....	105
5.1.1	Modellvorstellung für die Assemblierung von NMDA-Rezeptoren .....	106
5.1.2	Schlussfolgerung mit Ausblick .....	108
5.2	Einfluss der NTDs auf die NR1/NR3-Rezeptorfunktion .....	109
5.2.1	Die NTDs determinieren die NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoreffizienz über das Ausmaß der NR1-LBD-vermittelten Auto-Inhibition.....	109
5.2.2	Mechanistische Modellvorstellung der Regulation der NR1/NR3-Rezeptoreffizienz durch die NTDs .....	110
5.2.3	Partieller Agonismus von D-Serin bei NR1/NR3A-Rezeptoren und Einfluss der NTD-Deletion.....	113
5.2.4	Unterschiedlicher Einfluss der NTDs auf die $Zn^{2+}$ -Aktivierung von NR1/NR3A-Rezeptoren im Vergleich zu Glyzin .....	114
5.3	Vergleich der Rolle der NTDs von NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren .....	115
5.4	Regulatorische Rolle der NTDs bei der NMDA-Rezeptorfunktion .....	117
5.5	Funktionelle Charakterisierung von triheteromeren	

---

NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren .....	118
5.5.1 Die Aufhebung der NR1-LBD-vermittelten Auto-Inhibition bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren und die Rolle der NTDs.....	118
5.5.2 $Zn^{2+}$ ist ein hoch-affiner allosterischer Inhibitor von Glyzin-induzierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströmen.....	120
5.5.3 Agonistische Wirkung von $Zn^{2+}$ bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren .....	122
5.6 Isolation von triheteromeren NR1/NR2A/NR3A-NMDA-Rezeptoren in rekombinanten Systemen .....	123
5.7 Desensitisierung von NMDA-Rezeptoren und Rolle der NTDs.....	124
5.8 Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Einheiten im NMDA-Rezeptor .....	125
5.9 Schlussfolgerungen mit Ausblick.....	129
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>7 Originalarbeiten.....</b>	<b>140</b>
7.1 Publikation 1 .....	140
7.2 Publikation 2.....	140
7.3 Publikation 3.....	140
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>141</b>

## Zusammenfassung

*N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDARs) gehören zusammen mit den non-NMDA-Rezeptoren (AMPA- und Kainat-Rezeptoren) zu der Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluRs). NMDARs sind wichtig für die Weiterleitung von exzitatorischen Signalen zwischen Neuronen, Prozesse wie Lernen und Gedächtnisbildung sowie die Pathophysiologie von neurologischen Erkrankungen. Das gemeinsame Merkmal der iGluRs ist ihr modularer Aufbau, wobei die jeweiligen Domänen eine vergleichbare Struktur sowie Funktion zu besitzen scheinen. Für die extrazellulär angeordneten N-terminalen Domänen (NTDs) wird angenommen, dass sie bei allen iGluRs die Determinanten der Assemblierung sind und bei den NMDARs zusätzlich die Modulation der Rezeptorfunktion bedingen. Der tetramere NMDAR ist aus homologen NR1-, NR2A-D- und NR3A-B-Untereinheiten aufgebaut. Der sogenannte 'konventionelle' NMDAR setzt sich aus den Glyzin-bindenden NR1- und Glutamat-bindenden NR2-Untereinheiten zusammen. Die Ligandenbindungsdomänen (LBDs) dieser Untereinheiten bilden zweiblättrige Strukturen aus, welche in einer 'Rücken-an-Rücken'-Konformation angeordnet sind. Dadurch entstehen intermolekulare Wechselwirkungen im NR1/NR2-Hetero-Dimer, deren Stabilität das Ausmaß der NMDAR-Aktivierung und der Desensibilisierung bestimmt. Auf Grund dessen wird das Hetero-Dimer als die funktionelle Einheit im Rezeptor angesehen. Beim NR1/NR3-Rezeptor, welcher durch Glyzin allein aktivierbar ist, bewirkt die Ligandierung der NR3-LBD die Aktivierung des Rezeptors. Die anschließende Ligandierung der NR1-LBD führt dagegen zur Inaktivierung, d.h. zur Auto-Inhibition des NR1/NR3-Rezeptors, deren Determinanten noch unbekannt sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle der NTDs bei der Assemblierung, Stöchiometrie und Funktion von NMDARs zu untersuchen. Für die biochemische Analyse dieser Fragestellung wurden die NMDARs rekombinant in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und mit [<sup>35</sup>S]-Methionin bzw. Cy5 markiert. Anschließend folgte die Affinitätschromatographische Aufreinigung über die Hexahistidyl-Markierung von einer der exprimierten Untereinheiten sowie die Analyse anhand der blau-nativen- und der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt

werden, dass bei NMDARs die NTD-Deletion keine Auswirkung auf die Assemblierung, die Stöchiometrie oder die Zelloberflächen-Expression hatte. Zusammenfassend sind, im Unterschied zu den non-NMDARs, bei NMDARs die NTDs nicht für die Ausbildung funktioneller Rezeptoren notwendig.

Die funktionelle Analyse der Glyzin-vermittelten Rezeptorströme von Wildtyp- und NTD-deletierten NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren anhand der Zwei-Elektroden Spannungsklemme zeigte, dass die NTD-Deletion zur Aufhebung der NR1-LBD-vermittelten Auto-Inhibition führt. Somit bestimmen die NTDs das Ausmaß der Rezeptoreffizienz. Dieser Befund korreliert mit der Verringerung der Rezeptordesensibilisierung bei NR1/NR3A-Rezeptoren. Für das Auftreten beider Effekte war schon die selektive NR3-NTD-Deletion ausreichend.

NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren zeichnen sich durch große Glyzin-induzierte Rezeptorströme auf, die nicht auto-inhibiert werden. Im Einklang damit, hatte die NTD-Deletion keine Auswirkung auf die Rezeptoreffizienz. Die Aufhebung der Auto-Inhibition bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren und das Vorhandensein dieser bei NR1/NR3A- bzw. NR1/NR3B-Rezeptoren können auf Unterschiede in den Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Einheiten zurückgeführt werden. Anders als bei NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren, agiert bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren  $Zn^{2+}$  als ein hoch-affiner allosterischer Inhibitor von Glyzin-induzierten Strömen. Die Mutation der NR1-Glyzinbindetasche bedingt zwar ein geringeres Ausmaß der  $Zn^{2+}$ -Inhibition, jedoch nicht deren Aufhebung. Somit besitzt  $Zn^{2+}$  mindestens eine weitere Bindestelle im NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor.

Die hier erhaltenen Daten zeigen auf, dass es andere Determinanten für die NMDAR-Assemblierung als die NTDs geben muss und diese sich somit in den verbleibenden NMDAR-Domänen befinden. Die Erkenntnisse über die NTD-bedingte Modulation der NR1/NR3-NMDA-Rezeptorfunktion können bei zukünftigen Studien als ein Mittel dienen, diese Rezeptoren *in vivo*, z.B. durch den Einsatz von spezifischen Proteasen, zu detektieren. Das Wissen der Eigenschaften von funktionellen Einheiten kann für die Aufklärung der vermeintlich konträr agierenden Hetero-Dimere in NR1/NR2/NR3-Rezeptoren, die bereits *in vivo* detektiert wurden, von großer Bedeutung sein.

## Einleitung

Das Gehirn des Menschen ist in der Lage komplexe Vorgänge, wie z.B. Sprache, Lernen oder Gedächtnisbildung zu ermöglichen. Die Grundlage dafür bilden die Wahrnehmung, Übertragung und Verarbeitung von Informationen, welche vor allem über spezialisierte Zellen, die Nervenzellen, erfolgen. Die Signalübertragung findet sowohl innerhalb der Nervenzellen, über Änderungen und Weiterleitung von Membranpotentialen, den Aktionspotentialen (APs) statt, als auch an speziellen Kontaktstellen zwischen den Nervenzellen, welche als Synapsen bezeichnet werden. Diese Signalübertragung zwischen den Nervenzellen kann über eine direkte elektrische Verbindung ablaufen, welche zwar sehr schnell, doch eher stereotypisch ist und eine einfache Erregung (Depolarisation) der Postsynapse bewirkt.

Die wichtigste und viel komplexere Form der Kommunikation zwischen den Nervenzellen stellt die Signalübertragung zwischen der Prä- und Postsynapse ('chemische Synapse') dar. Hierbei bewirkt das präsynaptische, elektrische Signal die Freisetzung von chemischen Botenstoffen, den Transmittern, welche durch den synaptischen Spalt diffundieren und an postsynaptisch lokalisierte Rezeptormoleküle binden. Diese Rezeptoren sind Membran-durchspannende Proteine, welche in der Lage sind durch ihre extrazelluläre Domäne, die Transmitter zu binden. Abhängig von der Art des Transmitters und der Art des postsynaptischen Rezeptors kann nachfolgend eine biochemische Reaktion ausgelöst werden, z.B. eine De- oder Hyperpolarisation (Hemmung) des Membranpotentials der Zelle.

Gemäß der biochemischen Reaktion, die durch den Transmitter in der Postsynapse ausgelöst wird, können die postsynaptischen Rezeptoren in zwei Klassen aufgeteilt werden. Die erste Klasse bilden die ionotropen Rezeptoren. Diese Ionenkanäle haben zwei wichtige Eigenschaften: 1) die Ligandenbindung bewirkt die Konformationsänderung des Rezeptors und 2) sie bedingen die Durchlässigkeit für spezifische Ionen der ansonsten impermeablen Zellmembran. Als Folge davon kommt es in Abhängigkeit der intra- und extrazellulären Ionenverteilung zu einer De- oder zu einer Hyperpolarisation des postsynaptischen Membranpotentials und somit der Umwandlung des

chemischen in ein elektrisches Signal. Es gibt drei Familien von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen: 1) Glutamat-gesteuerte Rezeptoren, 2) Cys-loop Rezeptoren und 3) P2X-Rezeptoren.

Die zweite Klasse der Liganden-gesteuerten postsynaptischen Rezeptorproteine bilden die metabotropen Rezeptoren (mGluRs), oder auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren genannt. Die Aktivierung dieser Proteine ruft meistens die Induktion von intrazellulären metabolischen Signalkaskaden hervor, welche so genannte *second messenger* und Proteinkinasen involvieren und vor allem für länger anhaltende molekulare Prozesse zuständig sind, aber auch als eines der Ziele die Aktivierung von Ionenkanälen beinhalten können.

## 1.1 Glutamat-aktivierte Rezeptoren

Der wichtigste Transmitter der exzitatorischen Erregungsübertragung zwischen Nervenzellen ist Glutamat. Die präsynaptische Ausschüttung von Glutamat führt zur Aktivierung von postsynaptisch-lokalisierten Rezeptoren, die hauptsächlich in ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren eingeteilt werden. Die ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluRs) sind vor allem für die schnelle exzitatorische Signalübertragung im zentralen Nervensystem verantwortlich (Watkins and Evans, 1981; Mayer and Westbrook, 1987; Collingridge and Lester, 1989) und unterliegen Prozessen, welche zu Änderungen der Synapsenstärke beitragen (Maren and Baudry, 1995; Asztely and Gustafsson, 1996).

Die Familie der iGluRs setzt sich im Wesentlichen aus drei Subfamilien zusammen: *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-,  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure (AMPA)- und Kainat-Rezeptoren, wobei die zwei Letzteren auch als non-NMDA-Rezeptoren zusammengefasst werden (Dingledine et al., 1999). Diese Rezeptoren wurden durch klassische pharmakologische Methoden identifiziert und nach den für sie jeweils spezifischen synthetischen Agonisten (NMDA und AMPA) bzw. natürlich vorkommenden, jedoch nicht im Gehirn gefundenen, Toxinen (Kainat) benannt (Watkins and Jane, 2006). Für alle bisher identifizierten iGluRs wird angenommen, dass sie tetramere Strukturen bilden (Armstrong et al., 1998; Laube et al., 1998; Ayalon and Stern-Bach, 2001; Furukawa et al., 2005).

## 1.2 Klassifizierung von NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren (NMDARs) sind durch sieben Gene kodiert (NR1, NR2A-D und NR3A-B; Abb.1.1) (Dingledine et al., 1999; Cull-Candy et al., 2001). Durch alternatives Spleißen der NR1-mRNA können acht verschiedene Varianten dieses Gens entstehen (NR1-1a-NR1-4b) (Monyer et al., 1994). Die NMDA-Rezeptoren bilden selektiv heteromultimere Komplexe (Dingledine et al., 1999), wobei die so genannten 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren aus zwei obligatorischen NR1- und zwei NR2-Untereinheiten zu bestehen scheinen (Laube et al., 1998; Rosenmund et al., 1998; Furukawa et al., 2005). NR1/NR2-Rezeptoren leiten zusätzlich zu Kalium- und Natrium-Ionen vor allem Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Ionen (Mayer and Westbrook, 1987; Burnashev et al., 1995). Neben dem Beitrag bei der Depolarisation der Postsynapse und der Weiterleitung der exzitatorischen Signalübertragung dient  $\text{Ca}^{2+}$  vor allem als ein sogenannter *second messenger* von intrazellulären Signalkaskaden, welche die Grundlage für Prozesse wie Lernen oder Gedächtnis bilden (Collingridge and Bliss, 1995; Yashiro and Philpot, 2008). Neben NR1/NR2-Rezeptoren, wurden auch Rezeptoren gefunden, welche sich aus NR1- und NR3-Untereinheiten zusammensetzen (Chatterton et al., 2002). Bisher wurden diese NR1/NR3A- oder NR1/NR3B-Rezeptoren nur *in vitro* funktionell untersucht (Chatterton et al., 2002).

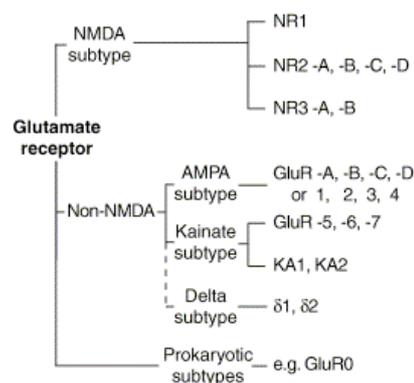
Zusätzlich zu diesen 'di-heteromeren' Rezeptoren wurden auch NMDA-Rezeptoren detektiert, welche mehr als nur zwei Arten von Untereinheiten enthalten. So wurden z.B. Rezeptoren, bestehend aus NR1-, NR2- und NR3-Untereinheiten (Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995; Das et al., 1998; Nishi et al., 2001; Perez-Otano et al., 2001) bzw. NR1/NR2A/NR2B-Untereinheiten *in vivo* detektiert (Sheng et al., 1994; Didier et al., 1995; Chazot and Stephenson, 1997; Luo et al., 1997; Hatton and Paoletti, 2005). Rezeptoren, die aus NR1- und zwei Arten von NR3-Untereinheiten bestehen, NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren, konnten bisher nur *in vitro* erfasst werden (Smothers and Woodward, 2007). Für die NR3-enthaltenden NMDA-Rezeptoren wurde gezeigt, dass sich deren Kanaleigenschaften von denen der NR1/NR2-NMDA-Rezeptoren unterscheiden (mehr in Kapitel 1.3.2). Alle NMDA-Rezeptoren, welche sich aus drei verschiedenen Arten von

Untereinheiten zusammensetzen wurden als triheteromere NMDA-Rezeptoren definiert (Hatton and Paoletti, 2005) und werden im Folgenden derart benannt.

Die non-NMDA-Rezeptoren umfassen vier AMPA-, GluR1-4, und fünf Kainat-Rezeptor-Untereinheiten, GluR5-7, KA1, KA2 (Hollmann and Heinemann, 1994) (Abb. 1.1). Diese zwei iGluR-Subfamilien besitzen einige Unterschiede im Vergleich zu NMDA-Rezeptoren: 1) sie sind nicht-selektive Kationenkanäle und besitzen nur eine bedingte  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität, 2) sie können sowohl homo- als auch heteromultimere Strukturen bilden und, 3) sie sind vor allem für die schnelle Komponente der exzitatorischen Erregungsübertragung verantwortlich.

Neben den iGluRs wurden die iGluR-ähnlichen Delta-Rezeptoren (Glu $\delta$ 1 und 2; Abb. 1.1) identifiziert (Lomeli et al., 1993). Für diese so genannten 'Waisen-Rezeptoren' konnte bisher noch kein spezifischer Ligand gefunden und außerdem eine Ionenkanal-Funktionalität nur unter pathophysiologischen Bedingungen detektiert werden (Zuo et al., 1997).

Die GluR0-Untereinheiten stellen eine Verbindung zwischen dem prokaryotischen  $\text{K}^+$ -Kanal und den iGluRs dar (Chen et al., 1999; Kuner et al., 2003) (Abb. 1.1).

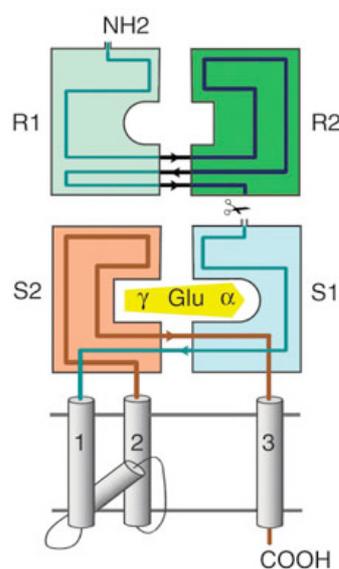


aus Wollmuth und Sobolevsky,  
TRENDS in Neuroscience, 2004

**Abb. 1.1:** Darstellung der phylogenetischen Beziehungen in der Familie der iGluRs. Jede iGluR-Subfamilie besitzt voneinander unterschiedliche Untereinheiten, welche von verschiedenen Genprodukten stammen. Die Assemblierung der Untereinheiten ist Subfamilien-spezifisch. NMDA-Rezeptoren sind obligate Heteromultimere, NR1- und NR2-Untereinheiten assemblieren zu funktionellen Rezeptoren *in vivo*. NR3- bilden mit NR1-Untereinheiten *in vitro* funktionelle Kanäle, assemblieren *in vivo* aber mit NR1- und NR2-Untereinheiten zu Rezeptorkanälen. AMPA- und Kainat Rezeptoruntereinheiten bilden funktionelle homo- oder heteromere Ionenkanäle. Die Mannigfaltigkeit der Rezeptoren wird außerdem durch RNA-Editieren und alternatives Spleißen der jeweiligen Untereinheiten gesteigert. Der Delta-Subtyp ist ein „Waisen-Rezeptor“ und fungiert als Ionenkanal nur unter pathologischen Bedingungen. Der prokaryotische GluR0-Rezeptor stellt eine mögliche Verbindung zwischen  $\text{K}^+$ - und iGlu-Rezeptoren dar.

### 1.3 Die modulare Struktur von iGluRs

Das gemeinsame Merkmal der iGluRs ist ihr modularer Aufbau (Dingledine et al., 1999; Wollmuth and Sobolevsky, 2004; Mayer, 2006) (Abb. 1.2). So besitzen alle iGluR-Untereinheiten die extrazellulär angeordneten 1) N-terminalen Domänen (NTDs) und 2) S1S2-Liganden-Bindungsdomänen (LBDs), 3) drei membrandurchspannende Domänen (TM1, TM3 und TM4) und Wiedereintrittsschleifen (M2), welche die Ionenkanalpore auskleiden, sowie 4) C-terminale Domänen (CTD) (Dingledine et al., 1999).



aus Kumar *et al.*, Nature  
Structural & Molecular Biology, 2009

**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung der modularen Struktur einer Untereinheit der ionotropen Glutamat-Rezeptoren, mit der extrazellulären R1/R2-N-terminalen Domänen und S1S2-Ligandenbindungsdomäne, dem Ionenkanalbereich mit drei membrandurchspannenden Elementen, sowie einer Wiedereintrittsschleife und einer intrazellulären C-terminalen Domäne.

Die NTDs und LBDs zeigen Sequenzhomologien zu zwei periplasmatischen, bakteriellen Proteinen (Nakanishi et al., 1990; O'Hara et al., 1993). Die NTDs sind strukturverwandt mit dem Leucin-Isoleucin-Valin-bindenden Protein (LIVBP) und können unter anderem für die Assemblierung (Ayalon and Stern-Bach, 2001; Matsuda et al., 2005) bzw. allosterische Hemmung durch  $Zn^{2+}$  von bestimmten iGluR-Subtypen verantwortlich sein (Paoletti et al., 1997; Herin and Aizenman, 2004). So, wie die LBDs, sind auch die NTDs in der Lage zweiblättrige Strukturen auszubilden, welche in einer 'Rücken-an-Rücken'-

Konformation angeordnet zu sein scheinen (Jin et al., 2009; Kumar et al., 2009).

Die LBDs sind homolog zu dem Glutamin-bindenden Protein (QBP) und bilden eine zweiblättrige Struktur, wobei eine der Domänen, S1, unterhalb der NTD und die S2-Domäne durch die Schleife zwischen den M3- und M4-Domänen ausgebildet wird (Dingledine et al., 1999). Nach Binden des Agonisten zwischen den S1S2-Domänen, schließen diese in einem Venus-Fliegenfallenartigen Mechanismus und bewirken nachfolgend die Öffnung des Ionenkanals (Armstrong and Gouaux, 2000; Furukawa and Gouaux, 2003; Furukawa et al., 2005). Dabei fungiert Glutamat als Agonist von den NMDA-NR2- (Laube et al., 1997) und allen AMPA- sowie Kainat-Rezeptor-Untereinheiten (Dingledine et al., 1999). NR1- und NR3-Untereinheiten können Glyzin (Kuryatov et al., 1994; Hirai et al., 1996; Yao and Mayer, 2006) bzw. D-Serin binden (Mothet et al., 2000; Yao and Mayer, 2006).

Die Porenregion der Wiedereintrittsschleife zeigt ähnliche strukturelle Eigenschaften wie die Kanalpore von prokaryotischen  $K^+$ -Kanälen (Wo and Oswald, 1995; Wood et al., 1995). Diese ist in allen iGluRs hochkonserviert und bestimmt die Permeationseigenschaften der jeweiligen Untereinheiten (Verdoorn et al., 1991; Burnashev et al., 1992; Kuner et al., 1996).

Die intrazellulär lokalisierte CTD interagiert mit postsynaptischen Proteinen, welche die Lokalisation des Rezeptors determinieren können (Bolton et al., 2000).

Die modulare Struktur sowie die Strukturverwandtschaft zu anderen Proteinen unterstützen die Annahme der 'Genes-in-Pieces-Hypothese', die annimmt, dass die iGluRs durch die Fusion von verschiedenen, bakteriellen und prokaryotischen, Genen entstanden sind (Gilbert, 1978). Die Hypothese wurde durch die Entdeckung des prokaryotischen Glutamat-Kanals (GluR0) unterstützt, welcher gemeinsame Eigenschaften mit Glutamat- und  $K^+$ -Ionenkanälen teilt und damit das 'fehlende evolutionäre Glied' darstellen könnte (Chen et al., 1999).

Der einzigartige Aufbau der iGluRs unter den Liganden-gesteuerten Ionenkanälen bietet die Möglichkeit, die jeweiligen 'Module' separat voneinander zu untersuchen. So konnten sowohl die LBDs als auch die NTDs

als lösliche Konstrukte in Bakterien exprimiert und deren Struktur und Funktion untersucht werden (Armstrong et al., 1998; Armstrong and Gouaux, 2000; Furukawa et al., 2005; Yao and Mayer, 2006; Jin et al., 2009; Kumar et al., 2009). Zum anderen findet die Ligandenbindung innerhalb einer Untereinheit statt. Dies vereinfacht die Untersuchungen der dafür verantwortlichen Domänen gegenüber anderen ionotropen Rezeptoren, wie z.B. dem n-Acetylcholin-Rezeptor, wo der Ligand zwischen zwei Untereinheiten bindet (Oswald and Changeux, 1982). Jedoch ist bisher noch nicht im Detail geklärt, wie die einzelnen Module miteinander wechselwirken und die Aktivierung des Ionenkanals bewirken bzw. beeinflussen können.

## **1.4 NMDA-Rezeptoren**

### **1.4.1 Grundlegende Eigenschaften von 'konventionellen' NR1/NR2-NMDA-Rezeptoren**

NMDA-Rezeptoren, welche sich aus NR1- und NR2-Untereinheiten zusammensetzen, besitzen einzigartige Eigenschaften, die sie von anderen Mitgliedern der iGluRs unterscheiden. Für die effiziente Aktivierung des Ionenkanals ist das Binden von zwei unterschiedlichen Agonisten, vom präsynaptisch freigesetzten Glutamat und vom extrazellulär vorkommenden Glyzin bzw. aus Astrozyten und Gliazellen freigesetzten D-Serin, notwendig (Johnson and Ascher, 1987; Mothet et al., 2000; Oliet and Mothet, 2006; Panatier et al., 2006; Oliet and Mothet, 2009). Bei negativen Membranpotentialen (-70 bis -90 mV) und somit beim Membranruhepotential der Nervenzellen sind NR1/NR2-Rezeptoren durch  $Mg^{2+}$ -Ionen blockiert, welche in der Kanalpore des Rezeptors binden können (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Erst durch die Vor-Depolarisation der postsynaptischen Membran durch ko-lokalisierte AMPA- und Kainat-Rezeptoren sowie die Bindung der zwei Agonisten kann der NR1/NR2-spezifische  $Mg^{2+}$ -Block aufgehoben werden (Dingledine et al., 1999). Aufgrund dieser Besonderheiten wurde den 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren die Rolle der 'Koinzidenz-Detektoren' zugeschrieben (Dingledine et al., 1999).

### 1.4.2 Rolle der NR3-Untereinheit in NMDA-Rezeptoren

Die NR3-Untereinheiten wurden als letztes kloniert und aufgrund der höchsten Sequenzidentität zu NR1- und NR2-Untereinheiten (~20 %) in die Familie der NMDA-Rezeptoren aufgenommen (Sucher et al., 1995; Ciabarra et al., 1995; Nishi et al., 2001). Ähnlich den NR1-, binden auch die NR3-Untereinheiten Glyzin und D-Serin (Yao und Mayer, 2006). Die rekombinante Expression von NR1- und NR3-Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten generierte NR1/NR3-NMDA-Rezeptoren, deren Stöchiometrie noch nicht geklärt ist. Im Gegensatz zu 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren, weisen NR1/NR3-Rezeptoren, nach Expression in *Xenopus laevis* Oozyten, kleine und schnell desensitisierende Rezeptorströme auf (Chatterton et al., 2002, Madry et al., 2007b; Awobuluyi et al., 2007). Da diese aufgrund des Fehlens einer Glutamat-bindenden Untereinheit durch Glyzin allein aktiviert werden können, wurden sie auch als 'exzitatorische Glyzinrezeptoren' betitelt (Chatterton et al., 2002).

Neben Glyzin wurde kürzlich mit dem zweiwertigen Metallion  $Zn^{2+}$ , welches üblicherweise die allosterische Inhibition von NR1/NR2-Rezeptoren vermittelt (Paoletti et al., 1997; Herin and Aizenman, 2004; Madry et al., 2007a), ein weiterer Agonist von NR1/NR3A-Rezeptoren identifiziert. Demnach verursacht hier die  $Zn^{2+}$ -Bindung an die NR1-Untereinheit, die Aktivierung des Rezeptors (Madry et al., 2008). Des Weiteren potenziert  $Zn^{2+}$  im mikromolaren Konzentrationsbereich, Glyzin-induzierte NR1/NR3A-Rezeptorströme (Madry et al., 2008).

Im Unterschied zu Glyzin wurde für D-Serin vorgeschlagen, dass es eine inhibitorische Rolle bei der Glyzin-vermittelten NR1/NR3-Aktivierung und keine agonistische Aktivität besitzt (Chatterton et al., 2002).

Triheteromere NMDA-Rezeptoren, welche NR3-Untereinheiten enthalten, wurden sowohl *in vivo* (Sucher et al., 1995; Das et al., 1998; Perez-Otano et al., 2001) als auch *in vitro* an *Xenopus laevis* Oozyten und in HEK-293-Zellen elektrophysiologisch untersucht (Perez-Otano et al., 2001; Chatterton et al., 2002; Matsuda et al., 2002; Smothers and Woodward, 2007). Diese NMDA-Rezeptoren sind, im Gegensatz zu NR1/NR2-Rezeptoren, relativ  $Ca^{2+}$ -impermeabel und resistent gegen den spannungsabhängigen  $Mg^{2+}$ -Block

(Sucher et al., 1995; Nishi et al., 2001; Perez-Otano et al., 2001). Diese unterschiedlichen Rezeptoreigenschaften von triheteromeren gegenüber 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren wurden vor allem Unterschieden in der Proteinsequenz in der Kanalregion zugeschrieben. Im Einklang mit den letztgenannten Aussagen, wurde in Mäusen, welche keine NR3-Untereinheit enthalten, ein erhöhter NMDAR-Strom und außerdem eine erhöhte Dichte von Dendritendornen detektiert (Das et al., 1998). Dies impliziert eine regulatorische Funktion von NR3-Untereinheiten im NR1/NR2/NR3-Rezeptorkomplex, um derart einem exzessiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom vorzubeugen. Die Frage, wie diese drei unterschiedlichen NMDA-Rezeptor-Untereinheiten im NR1/NR2/NR3-Rezeptor wechselwirken und welche Unterschiede im Aktivierungsmechanismus gegenüber NR1/NR2- bzw. NR1/NR3-Rezeptoren herrschen, bleibt jedoch noch zu klären. Die funktionelle Analyse von diesen triheteromeren Rezeptoren in rekombinanten Systemen gestaltet sich jedoch schwierig, da aufgrund von fehlenden spezifischen Agonisten oder Antagonisten, eine Trennung von NR1/NR2-, NR1/NR3- und NR1/NR2/NR3-Rezeptorströmen bisher nicht erreicht werden konnte.

Eine initiale funktionelle Analyse von triheteromeren NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren ist zwar in HEK-293-Zellen erfolgt und hat gezeigt, dass auch diese Rezeptoren, so wie NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren, durch Glyzin alleine aktivierbar sind (Smothers and Woodward, 2007). Weitergehende Untersuchungen dieser Rezeptorklasse müssen jedoch folgen.

## **1.5 Aktivierungsmechanismus von NMDA-Rezeptoren**

### **1.5.1 Modell der Aktivierung von NR1/NR2-Rezeptoren**

Unsere Kenntnis des Aktivierungsmechanismus von NMDA-Rezeptoren basiert größtenteils auf der Kristallstruktur von AMPA- (Armstrong and Gouaux, 2000; Hogner et al., 2002; Armstrong et al., 2003; Jin et al., 2003) und NR1/NR2-NMDAR-Subdomänen (Furukawa and Gouaux, 2003; Furukawa et al., 2005). So bilden die S1S2- (bzw. D1D2-) LBDs eine zweiblättrige Struktur aus, wobei gezeigt wurde, dass die S1-Domänen von NR1- und NR2-Untereinheiten in einer 'Rücken-an-Rücken'-Anordnung vorliegen (Furukawa and Gouaux, 2003;

Furukawa et al., 2005). Derart können sie starke intermolekulare Wechselwirkungen ausbilden, deren Stabilität vermeintlich das Ausmaß der Rezeptoraktivierung bestimmt (Sun et al., 2002; Horning and Mayer, 2004). Nach Binden der Agonisten schließen die NR1/NR2-S2-Domänen muschelartig, was eine Zugkraft auf die Transmembrandomänen ausübt und derart die Öffnung des Ionenkanals bewirkt (Armstrong and Gouaux, 2000; Furukawa and Gouaux, 2003; Mayer et al., 2006). Durch das Schließen der S1-Domänen kommt es jedoch zur Destabilisierung der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den S1-LBDs (Sun et al., 2002). Dies würde den Rezeptor in den sogenannten desensitisierten Zustand treiben, bei dem die Liganden noch gebunden sind, der Ionenkanal aber in einer geschlossenen Konformation vorliegt (Sun et al., 2002; Furukawa et al., 2005). Somit lässt sich das NR1/NR2-Hetero-Dimer, in Anlehnung an die an non-NMDA-Rezeptoren gemachten Beobachtungen (Sun et al., 2002), als die funktionelle Einheit im 'konventionellen' NMDA-Rezeptor darstellen (Furukawa et al., 2005).

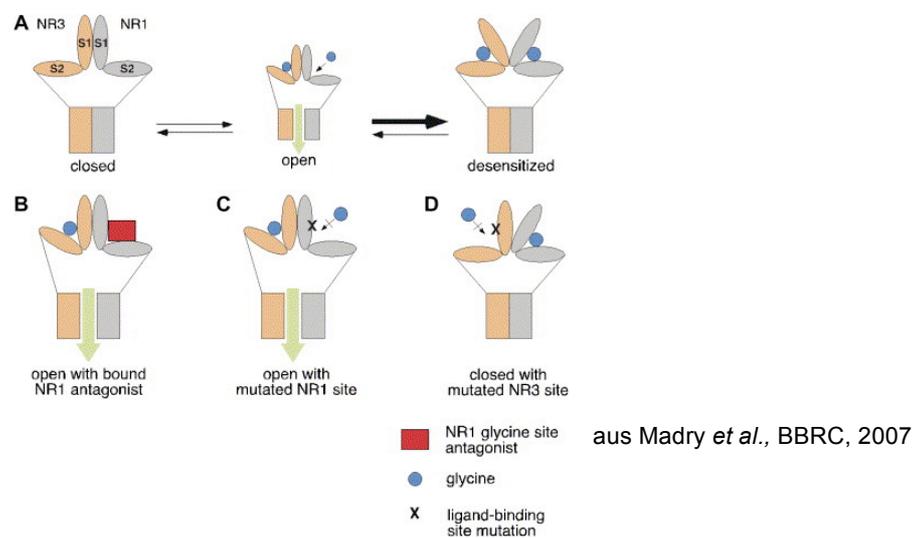
Diese Befunde wurden an NR1/NR2-Rezeptoren erhoben. Für Rezeptorkomplexe bestehend aus NR1/NR3-Untereinheiten wurde ein Modell der Rezeptoraktivierung vorgeschlagen, welches Unterschiede zu dem von NR1/NR2-NMDA-Rezeptoren aufweist (Madry et al., 2007b). Im Folgenden wird die gegenwärtige Vorstellung des Mechanismus der NR1/NR3-Rezeptoraktivierung näher erläutert.

### **1.5.2 Aktivierungsmechanismus des 'exzitatorischen Glyzin-Rezeptors'**

Kürzlich wurde von Madry et al. (2007) für die Aktivierung von NR1/NR3-Rezeptoren ein Modell der differentiellen Einflüsse der NR1- und NR3-LBDs vorgeschlagen. Dieses Modell beruht auf den Beobachtungen, dass die Bindung von Antagonisten an die NR1-Glyzinbindetasche bzw. die Mutation dieser Domäne zu großen Glyzin-vermittelten NR1/NR3-Rezeptorströmen führt. Im Gegensatz dazu bewirkte die Antagonisierung der NR3-Glyzinbindetasche die Verhinderung von Glyzin-induzierten NR1/NR3-Rezeptorströmen. Bindungsstudien mit löslichen LBDs von NR1- und NR3-Untereinheiten haben gezeigt, dass Glyzin mit einer etwa 650-fach höheren Affinität an die NR3- im Vergleich zur NR1-Untereinheit bindet (Ivanovic et al., 1998; Yao and Mayer,

2006). Die unterschiedlichen Glyzin-Affinitäten implizieren eine sequentielle Besetzung von NR1- und NR3-LBDs (Madry et al., 2007b).

Basierend auf diesen Annahmen und der gegenwärtigen Modellvorstellung der Ligandenbindung und Aktivierung von ionotropen Glutamatrezeptoren (Mayer, 2006), wurde ein Modell zur NR1/NR3-Rezeptoraktivierung vorgeschlagen (Abb. 1.3; Madry et al., 2007b). Demnach bewirkt das Binden von Glyzin an die höher-affine NR3-LBD das Schließen dieser Domäne und die Öffnung des NR1/NR3-Rezeptorkanals, ohne eine zusätzliche Ligandierung der NR1-LBD (Madry et al., 2007b). Die nachfolgende Bindung von Glyzin an die nieder-affine NR1-LBD führt durch die Schließung dieser Domäne zur Schwächung der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den NR1-NR3-LBDs, zur Desensibilisierung des Rezeptors und somit zur Schließung des Kanals. Im Einklang damit potenziert das Antagonisieren der NR1-LBD die kleinen und schnell desensibilisierenden NR1/NR3-Rezeptorströme. Dies resultierte in der Annahme, dass die NR1-Untereinheit eine auto-inhibitorische Funktion bei der NR1/NR3-Rezeptor-Aktivierung besitzt (Madry et al., 2007b).



**Abb. 1.3:** Schematisches Modell der NR1/NR3-Rezeptorzustände. A) Das Reaktionsschema der NR1/NR3-Kanalöffnung stellt die hetero-dimere Anordnung der NR1- (grau) und NR3-LBDs (orange) dar. Die sequentielle Besetzung der hoch- bzw. nieder-affinen NR3- bzw. NR1-LBDs resultiert in der Öffnung des Kanals (Mitte) sowie in der nachfolgenden Desensibilisierung des Rezeptors (rechts). (B-D) Differentielle Effekte der Antagonisierung von Mutationen in der NR1- bzw. NR3-LBD auf die Kanalöffnung. B) Die Glyzinbindung an die NR3-LBD, in Gegenwart von NR1-Antagonisten, führt zu nicht-desensibilisierenden Rezeptorströmen. C) Mutationen, welche die Glyzin-Bindung an die NR1-LBD beeinträchtigen, führen zur Öffnung des Ionenkanals ohne Desensibilisierung. D) Im Gegensatz dazu führt die Mutation der NR3-LBD zu einem inaktiven oder desensibilisierten Rezeptor. Für die Klarheit sind nur zwei Untereinheiten des Rezeptors gezeigt.

### 1.5.3 Rolle der N-terminalen Domänen (NTDs) bei der Assemblierung und Regulation der NMDA-Rezeptorfunktion

In Anlehnung an die Befunde bei non-NMDA-Rezeptoren (Kuusinen et al., 1999; Ayalon and Stern-Bach, 2001; Matsuda et al., 2005), wurde bei 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren angenommen, dass die NTDs, die Rezeptorassemblierung vermitteln (Meddows et al., 2001; Papadakis et al., 2004). So sollte zunächst eine Homodimerisierung der NR1- bzw. der NR2-Untereinheit stattfinden, welche bei NR1-Untereinheiten über Cystein-vermittelte Disulfidbrücken determiniert würde (Meddows et al., 2001; Papadakis et al., 2004). Die anschließende Zusammenlagerung der NR1- und NR2-Homo-Dimere würde die tetramere NMDA-Rezeptorstruktur komplettieren. Im Gegensatz dazu wurde durch andere Studien gezeigt, dass trotz NR2-NTD-Deletion, funktionelle NMDA-Rezeptoren gebildet werden (Fayyazuddin et al., 2000; Hu and Zheng, 2005). Zwei weitere Befunde stellen die bisherige Modellvorstellung der NMDA-Rezeptorassemblierung in Frage: 1) das Hetero-Dimer ist die funktionelle Einheit im NMDA-Rezeptor (Furukawa et al., 2005), 2) die Assemblierung von drei verschiedenen, z.B. NR1-, NR2- und NR3-Untereinheiten zu tetrameren Rezeptorkomplexen favorisiert einen anderen initialen Assemblierungsschritt als die NTD-vermittelte Homo-Dimerisierung. Somit scheint die Funktion der NTDs bei der Assemblierung von NMDA-Rezeptoren noch ungeklärt.

Die Rolle der NTDs bei der Modulation von Glyzin/Glutamat-vermittelten NR1/NR2-Rezeptorströmen ist dagegen besser untersucht. Ein bereits bekannter Ligand der NTDs ist  $Zn^{2+}$ , welches endogen vorkommt und aus den präsynaptischen Endigungen freigesetzt wird (Frederickson et al., 2000). Es kommt vor allem in den Regionen des Neokortex, Hippokampus, Striatum und der Amygdala vor (Perez-Clausell and Danscher, 1985; Frederickson, 1989; Frederickson et al., 2000; Valente et al., 2002; Danscher and Stoltenberg, 2005). Im Unterschied zum  $Mg^{2+}$ -Block der NMDA-Rezeptor-Kanalregion (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984), vermittelt  $Zn^{2+}$  die allosterische Inhibition der Aktivität von 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren über das Binden an die NTDs von NR2-Untereinheiten (Paoletti et al., 1997; Herin and Aizenman, 2004). Nach dem kürzlich vorgeschlagenen Modell von Gielen et al.

(2009), welches auf Mutagenese-Studien basiert, oszillieren die zweiblättrigen NTDs der NR2-Untereinheit zwischen einer offenen und einer geschlossenen Konformation. Das Binden eines Agonisten, z.B.  $Zn^{2+}$ , würde die geschlossene Konformation der NTDs, ähnlich den LBDs, stabilisieren und derart eine Schwächung der LBD-Wechselwirkungen sowie die Schließung des Ionenkanals verursachen (Gielen et al., 2009). Das bedeutet, dass die NTDs die Öffnungswahrscheinlichkeit und somit die NR1/NR2-Rezeptoreffizienz regulieren. Dieses Modell wird durch die Kristallstrukturen der NTDs von non-NMDA-Rezeptoren unterstützt (Jin et al., 2009; Kumar et al., 2009). Lösliche NTD-Konstrukte von GluR2- bzw. GluR6-Untereinheiten haben gezeigt, dass diese Domänen dimerisieren können (Jin et al., 2009; Kumar et al., 2009). Zudem wurde auch bei mGluRs, deren Glutamat-Bindungsdomäne strukturhomolog zu den bakteriellen LIVBPs und NTDs der iGluRs ist, gefunden, dass sie dimere Strukturen ausbilden (Kunishima et al., 2000).

#### **1.5.4 Zeitliches und räumliches Expressionsmuster von NMDA-Rezeptoren**

*In situ*-Studien von NMDA-Rezeptor-mRNAs haben gezeigt, dass bei der ZNS-Entwicklung von Nagern die NR1-Untereinheiten in allen Phasen der Entwicklung und annähernd allen Hirnregionen exprimiert wird (Monyer et al., 1994). Dies unterstützt die Bedeutung der Rolle von NR1-Untereinheiten für die Ausbildung von funktionellen NMDA-Rezeptoren (Paoletti and Neyton, 2007). Die Untersuchung der NR2-Untereinheiten zeigt dagegen, dass die verschiedenen Subtypen unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen (Monyer et al., 1994). In vielen Prinzipalneuronen werden die mRNAs von NR2B- und NR2D-Untereinheiten bereits pränatal exprimiert (Monyer et al., 1994; Kohr, 2006). Die Expression der mRNAs von NR2A- und NR2C-Untereinheiten wird jedoch erst in den perinatalen Phasen detektiert (Monyer et al., 1994). Auch im adulten Gehirn weisen die verschiedenen NR2-Untereinheiten differentielle Expressionsmuster auf. Während die NR2A ubiquitär exprimiert wird, ist die NR2B auf das Vorderhirn beschränkt und die NR2C im hohen Maße im Kleinhirn angereichert. Die höchste Expression der NR2D-mRNA, welche hauptsächlich im Mittelhirn vorkommt, wird in der

pränatalen Phase erreicht und nimmt im adulten Stadium stufenweise ab (Monyer et al., 1994; Kohr, 2006).

Die mRNA der NR3A-Untereinheit kann vor allem im sich entwickelnden ZNS detektiert werden, was eine zentrale Rolle der NR3A während dieser Phase andeutet (Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995; Perez-Otano et al., 2001). In pränatalen Stadien wird sie im Hippokampus, Rückenmark, Thalamus, Hypothalamus und im Hirnstamm exprimiert (Sucher et al., 1995). Bis zu 14 Tage postnatal wird noch ein hohes Expressionsniveau der NR3A detektiert, welches nachfolgend sukzessive abnimmt (Sucher et al., 1995). Im adulten Stadium kann eine ausgeprägte Expression der NR3A-mRNA nur im Thalamus, in der Amygdala und dem lateralen olfaktorischen Nukleus sowie der Retina von Nagern beobachtet werden (Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995; Sucher et al., 2003). Kürzlich erschienene Studien haben jedoch aufgezeigt, dass es zwischen Nagern und Primaten Unterschiede im Expressionsmuster der NR3A-Untereinheit gibt (Cavara and Hollmann, 2008). In Primaten wird die NR3A-mRNA sowohl im fötalen als auch im adulten Stadium ubiquitär exprimiert, einschließlich Hippokampus, Amygdala, Thalamus, Hypothalamus, Neokortex sowie Kleinhirn (Cavara and Hollmann, 2008). Die Expression der NR3B-Untereinheit ist größtenteils auf die somatischen Motorneuronen des Hirnstamms und das Rückenmark beschränkt (Nishi et al., 2001).

### **1.5.5 Physiologische und pathophysiologische Relevanz der NMDA-Rezeptoren**

Unter den iGluRs nehmen die NMDA-Rezeptoren aufgrund ihrer Eigenschaften eine besondere Stellung ein (Dingledine et al., 1999). Zum einen, weil sie als 'Koinzidenz-Detektoren' dienen (Dingledine et al., 1999) und zum anderen, weil sie eine zentrale Rolle bei der Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration spielen, welches nicht nur der Depolarisation der Postsynapse dient, sondern diverse intrazelluläre biochemische Kaskaden in Gang setzen kann (Collingridge and Bliss, 1995; Yashiro and Philpot, 2008). So trägt die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und der damit verbundene  $Ca^{2+}$ -Influx während der Entwicklung des Nervensystems entscheidend zur Stabilisierung der synaptischen Kontakte bei (Nakanishi and Okazawa, 2006). NMDA-

Rezeptoren sind weiterhin wichtige Determinanten von synaptischer Plastizität (Long-term potentiation, LTP bzw. Long-term depression, LTD), welche unter anderem die Grundlage für wichtige Prozesse, wie Lernen oder Gedächtnisbildung darstellt (Collingridge and Bliss, 1995; Yashiro and Philpot, 2008).

NMDA-Rezeptoren tragen nicht nur zur LTP oder LTD bei, sondern spielen auch eine große Rolle bei der Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. der Parkinson- und Alzheimer-Krankheit sowie der Erbkrankheit Chorea Huntington (Dingledine et al., 1999). Diese Erkrankungen wurden vor allem auf eine Übererregung der glutamatergen Transmission zurückgeführt. Der daraus resultierende exzessive  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Postsynapse, welcher größtenteils von NMDA-Rezeptoren getragen wird, ist wesentlich für das Absterben von Neuronen verantwortlich. Somit würden NMDA-Rezeptor-Antagonisten, wie z.B. das D-AP5, für welches gezeigt wurde, dass es neuroprotektive Eigenschaften besitzt, bei der Regulation des Ausmaßes der NMDAR-Aktivierung eine große Rolle spielen. Die Aufhebung der NMDAR-Hyperfunktion scheint auch bei akuten neurologischen Störungen, wie z. B. Ischämie-bedingtem Hirninfarkt, von Bedeutung zu sein (Dingledine et al., 1999). So wurde bei Hirnschlag-Patienten die Behandlung mit spezifischen Proteasen, welche die Auflösung von Blutgerinnseln vermitteln, als eine mögliche Therapie zur Beseitigung der Ischämie im zellulären Gewebe angewandt (Qureshi, 1996). Jedoch wurde auch kürzlich gezeigt, dass solche Proteasen, wie z.B. tPA (tissue Plasminogen activator) oder Plasmin, das Katalyseprodukt von tPA, auch eine Potenzierung von NMDAR-Strömen bewirken. Die daraus folgende Hyperfunktion von NMDA-Rezeptoren würde somit kontraproduktiv wirken und nicht tragbare Konsequenzen für die Therapie von Hirnschlagpatienten nach sich ziehen (Yuan et al., 2009). Jedoch ist nicht nur die Hyper-, sondern auch die Hypofunktion von NMDA-Rezeptoren die Grundlage für die Pathophysiologie von Hirnkrankheiten (Dingledine et al., 1999). So wurde gezeigt, dass eine verringerte NMDA-Rezeptoraktivierung oder die Anwendung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten zu Symptomen der Schizophrenie beiträgt (Dingledine et al., 1999). Diese psychologische Erkrankung wird aber auch mit einer Störung des Gleichgewichts von bestimmten Dopamin Rezeptor-Subtypen in Zusammenhang gebracht, welche

möglicherweise durch eine fehlende Interaktion von NMDA- und Dopamin-Rezeptoren hervorgerufen wird (Scott and Aperia, 2009). Zum Beispiel könnte indirekt über eine Beseitigung der Unterfunktion von NMDA-Rezeptoren durch Substanzen, welche die Rezeptoreffizienz erhöhen, die schizophrene Symptomatik behandelt werden.

Somit ist es von großer Bedeutung, die Regulation der NMDA-Rezeptorfunktion zu untersuchen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können für Behandlung der Pathophysiologie von diversen neurologischen und degenerativen Erkrankungen eingesetzt werden.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle der NTDs bei der Assemblierung und Funktion von NMDA-Rezeptoren. Dazu sollte das Oligomerisierungsverhalten von Wildtyp (wt) bzw. NTD-mutierten und –deletierten NR1- sowie wt-NR3A-Untereinheiten unter nativen und reduzierenden bzw. denaturierenden Bedingungen anhand der blau-nativen und der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert werden. Zusätzlich sollte die spezifische Zelloberflächenexpression der NR1/NR3-Rezeptorkomplexe anhand von Zell-impermeablen Farbstoffen detektiert werden. Zur differentiellen elektrophysiologischen Analyse sollte die Konsequenz der partiellen und vollständigen NTD-Deletion auf Agonisten-vermittelte NR1/NR3-Rezeptorströme untersucht werden.

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung von zwei Klassen von triheteromeren NMDA-Rezeptoren, nämlich NR1/NR3A/NR3B- und NR1/NR2/NR3-Rezeptoren, unter Anwendung von elektrophysiologischen und biochemischen Methoden. Bei der erstgenannten Rezeptorklasse sollte vor allem die funktionelle Charakterisierung dieser Rezeptoren im Vordergrund stehen. Dabei sollte vergleichend zu den NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren, die Rezeptoreffizienz durch Glyzin und  $Zn^{2+}$  und die  $Zn^{2+}$ -vermittelte Modulation von Agonisten-induzierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströmen erfolgen. Bei den triheteromeren NR1/NR2/NR3-Rezeptoren sollte als Grundlage für zukünftige Studien untersucht werden, ob eine spezifische Isolation dieser Rezeptorkomplexe anhand von biochemischen und pharmakologischen Methoden in *Xenopus laevis* Oozyten möglich ist.

## Material

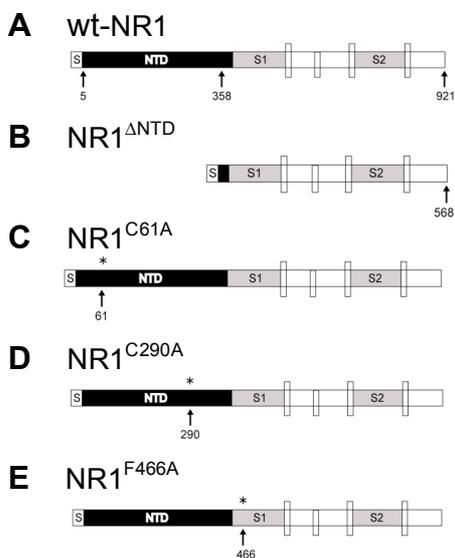
### 1.7 Verwendetes Expressionssystem

- *Xenopus laevis* Oozyten

### 1.8 DNA-Konstrukte

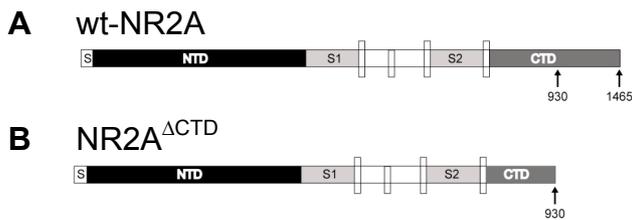
Die wt-NR1- und wt-NR2A-Konstrukte wurden von Dr. Seeburg (Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg) erhalten, wobei die NR2A-Konstrukte in den *Xenopus laevis* Oozyten Vektor pNKS2 subkloniert wurden. Die wt-NR3A-Konstrukte wurden nach Erhalt von Dr. Woodward (Medical University of South Carolina, Charleston, Carolina) in den pNKS2-Vektor subkloniert. Das NR3B-Konstrukt im Oozyten-Vektor pJC42 wurde von Dr. Zhang (Burnham Institute La Jolla, CA) geliefert. In den Abbildungen 2.1-2.4 sind die verwendeten DNA-Konstrukte schematisch dargestellt.

#### 1.8.1 NR1-Untereinheit



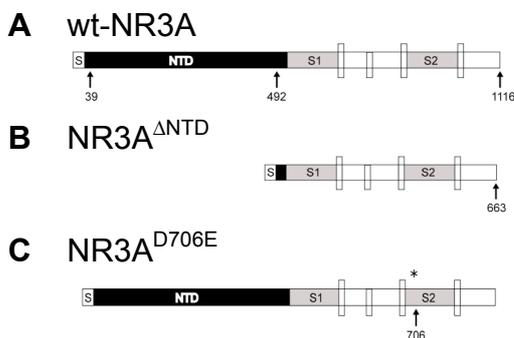
**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung von wt und mutierten NR1-Konstrukten. Wt- (A) und NTD-deletierte NR1-Untereinheiten: NR1<sup>ΔNTD</sup>- (B); NR1<sup>C61A</sup>- (C) und NR1<sup>C290A</sup>-Untereinheiten (D) stellen Mutationen in der NTD dar. NR1<sup>F466A</sup>-Untereinheit (E) ist eine Mutation in der NR1-Glyzinbindetasche. S, Signalpeptid; S1 und S2, LBDs; Hydrophobe intramembrane Segmente sind durch vertikale Boxen, NTDs schwarz, dargestellt. Für die biochemische Untersuchung der wt-NR1- und NR1<sup>ΔNTD</sup>-Untereinheiten, sowie der unten aufgeführten Konstrukten wurden 6xHistidin- bzw. nicht-markierte Konstrukte verwendet. Für die biochemische Untersuchung der NR1<sup>C61A</sup>- und NR1<sup>C290A</sup>-Untereinheiten wurden nur 6xHistidin-markierte Konstrukte angewandt. Die Histidin-kodierenden Bereiche wurden C-terminal direkt vor das Stop-Codon eingefügt.

### 1.8.2 NR2A-Untereinheit



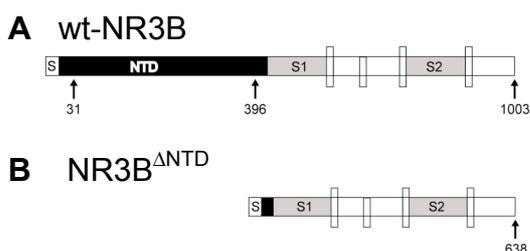
**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung von wt und mutierten NR2A-Konstrukten. Wt- (A) und CTD-deletierte NR2A-Untereinheiten: NR2A<sup>ΔCTD</sup> (B). S, Signalpeptid; S1 und S2, LBDs; Hydrophobe intramembrane Segmente sind durch vertikale Boxen, NTDs schwarz und CTDs dunkel grau, dargestellt.

### 1.8.3 NR3A-Untereinheit



**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung von wt und mutierten NR3A-Konstrukten. Wt- (A) und NTD-deletierte NR3A-Untereinheiten: NR3A<sup>ΔNTD</sup>- (B); NR3A<sup>D706E</sup>-Untereinheit (C) stellt eine Mutation in der NR3A-S2-LBD dar. S, Signalpeptid; S1 und S2, LBDs; Hydrophobe intramembrane Segmente sind durch vertikale Boxen, NTDs schwarz, dargestellt. Für die biochemische Untersuchung der NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Untereinheiten wurden nur nicht-markierte Konstrukte verwendet.

### 1.8.4 NR3B-Untereinheit



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung von wt und mutierten NR3B-Konstrukten. Wt- (A) und NTD-deletierte NR3B-Untereinheiten: NR3B<sup>ΔNTD</sup>- (B); S, Signalpeptid; S1 und S2, LBDs; Hydrophobe intramembrane Segmente sind durch vertikale Boxen, NTDs schwarz, dargestellt. Für die biochemische Untersuchung der NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Untereinheiten wurden nur nicht-markierte Konstrukte verwendet.

## 1.9 Enzyme

### 1.9.1 Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonuklease *Not* I wurde für die Linearisierung der NMDA-Rezeptor-Konstrukte verwendet. Die Subklonierung der NR3A-Untereinheit erfolgte über *Bam*H I- und *Sma* I-Schnittstellen. *Nhe* I- und *Xho* I-Schnittstellen wurden für die NR2A-Subklonierung in den pNKS2-Vektor angewandt. Mit den Enzymen *Nsi* I bzw. *Dra* I wurden jeweils die Ursprungsvektoren in Fragmente geschnitten, um derart eine Fragmentgrößen-Interferenz mit den zu klonierenden NMDA-Rezeptor-Fragmenten zu vermeiden. *Eco*R I wurde für das Entfernen der NR2A-CTD benutzt.

Die Schnittstellen sind durch Pfeile angezeigt.

Restriktions- endonukleasen	Erkennungssequenz	Konzentration	Puffer	Firma
<i>Not</i> I	5`GC↓GGCCGC3`	10 U/μl	H	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Nhe</i> I	5`G↓CTAGC	10 U/μl	M	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Bam</i> H I	G↓GATCC	10 U/μl	M	Boehringer- Ingelheim
<i>Sma</i> I	CCC↓GGG	10 U/μl	A	NEB, Frankfurt/M
<i>Eco</i> R I	G↓AATTC	10 U/μl	H	
<i>Xho</i> I	C↓TCGAG	10 U/μl	H	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Dra</i> I	TTT↓AAA	10 U/μl	A	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Nsi</i> I	A↓TGCAT	10 U/μl	M	NEB, Frankfurt/M

### 1.9.2 Sonstige Enzyme

Enzym	Konzentration	Firma
Kollagenase Typ II	0,5 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sp6 RNA-Polymerase	50 U/μl	Ambion
Endoglykosidase H	500 U/ml	NEB, Frankfurt/Main
PNGase F	500 U/ml	NEB, Frankfurt/Main

## 1.10 Marker

### 1.10.1 DNA-Längenstandards

Der 10 kb DNA-Längenstandard (Eurogentec, Seraing, Belgien) enthält folgende Fragmente (in kb): 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2.

### 1.10.2 Proteinstandards

Für SDS-Page wurde der SeeBlue Plus2 Proteinstandard von Invitrogen (Karlsruhe) benutzt.

Für BN-Page wurde der HMW Native Marker von Amersham Biosciences (Freiburg), bzw. der Biorat Precision Blue Native Marker verwendet.

### 1.11 Kits

Kit	Firma
QuickChange®Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
mCAP®RNA Capping Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Ambion mMessage mMachine®	Ambion, Huntington, UK
Ligation Kit	Qiagen, Hilden
QIAexpressionist Purification of 6xHis-tagged proteins	Qiagen, Hilden

### 1.12 Puffer und Lösungen

#### Bakterienkultur

LB-Medium	0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Tryptone, 1 % (w/v) NaCl
LB-Agar	0,5 % (w/v) Hefe-Extrykt, 1 % (w/v) Tryptone, 1 % (w/v) NaCl, 1,5 % (w/v) Agar

#### Molekularbiologie

Ampicillin-Stocklösung	100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
DEPC-H <sub>2</sub> O	1 % (v/v)
EDTA 500 mM	18,61 g
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml
Kanamycin-Stocklösung	10 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
Na-Acetat*2H <sub>2</sub> O	18,61 g/100 ml, pH 8,0
Probenpuffer (Agarose-GE 6x)	15 % Ficoli 400, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylene Cyanol FF
SDS	10 % (w/v)
TAE 50x	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA(pH 8)
TBE 10x	108 g Tris, 15,5 ml Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8)
TE	10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8)
Tetracyclin-Stocklösung	50 mg/ml in 70 % Ethanol
Tris-HCl 1 M	60,57 g/500 ml, pH 7,4
1,5 M	90,855 g/500 ml, pH 8,8
0,5 M	30,285 g/500 ml, pH 6,8

#### Elektrophysiologie

1xND96-Lösung	96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM HEPES pH 7,4
Ringer-Lösung	115 mM NaCl, 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7,2
Ca <sup>2+</sup> -freie Ringer-Lösung	96 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM HEPES pH 7,2
Glyzin-Stocklösung	100 mM in ddH <sub>2</sub> O
Glutamat-Stocklösung	100 mM in ddH <sub>2</sub> O

Zn <sup>2+</sup> -Stocklösung	100 mM in HCl
D-Serin-Stocklösung	100 mM in ddH <sub>2</sub> O
MDL-29951-Stocklösung	10 mM in ddH <sub>2</sub> O
Tricin-Stocklösung	1 M in ddH <sub>2</sub> O

### Biochemie

6-Aminocapronsäure-Stocklösung 1,5M	19,68 g/100 ml
Bindungspuffer	Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0),
n-Dodecyl-β-D-Maltosid	0,5 % (w/v)
Cy5-NHS-Ester-Markierlösung	96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM HEPES pH 8,5
DTT 2 M	308,4 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
Elutionspuffer	20 mM Tris (pH 7,4), 0,5 % (w/v) n-Dodecyl-β-D- Maltosid, 10 mM EDTA, 100 mM Imidazol (pH 8,0)
Homogenisierungs- und Waschpuffer	Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0), 0,1 % (w/v) n-Dodecyl- β-D-Maltosid
Imidazolösung 1 M	3,4 g in 50 ml H <sub>2</sub> O, pH 8.0
Methionin 10 mM	
Na-Phosphat Dihydrat- Lösung 1 M	44,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O in 250 ml H <sub>2</sub> O
Na-Dihydrogen-Phosphat- Monohydrat-Lösung 1 M	34,5 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O in 250 ml H <sub>2</sub> O
Na-Phosphat-Puffer	46,6 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M, 3,4 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M, auf 500 ml 0,1 M, pH 8,0 mit H <sub>2</sub> O auffüllen
NP-40-Stocklösung 10 %	
Octylglucopyranosid 10 %	
SDS	10 % (w/v)

### SDS-PAGE

SDS-Laufpuffer 1x	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer 5x	300 mM Tris-HCl, 5 % SDS, 50 % Glycerin, 100 mM DTT, 0,1 % Bromphenolblau
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8
Acrylamid	SDS-Page: 40 %, (29:1) Acrylamid 38,67 %, 1,33 %
Bisacrylamid	BN-Page: 30 % (37,5:1) Acrylamid 29,2 %, 0,8 %
Saccharoselösung 40 % (v/v)	40 g in 100 ml H <sub>2</sub> O lösen
Glycerol	100 % (v/v) 50 % (v/v)
Coomassielösung	0,124 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 7 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Ethanol
Entfärbelösung	7 % (v/v) Essigsäure
Fixierlösung	10 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Methanol

### BN-PAGE

Kathodenpuffer	50 mM Tricin, 15 mM Bistris, pH 7.0; vor Gebrauch auf 0,005 % (w/v) Serva Blue G einstellen
Anodenpuffer	50 mM Bistris, mit HCl auf pH 7.0 einstellen
Gelpuffer 3x	1,5 M 6-Aminocapronat, 150 mM Bistris, pH 7,0
BN-Probenpuffer 5x	100 mM 6-Aminocapronat, 50 % (v/v) Glycerol, 1 % (w/v) Coomassie G

### Radioaktivität

[<sup>35</sup>S]Methionin, Hartmann Analytik (Braunschweig) und Amersham Biosciences (Freiburg).

## 1.13 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Bacto-Agar	Bacton Dickinson, Le Pont de Claix, France
Bistris	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cy5-NHS-Ester	Amersham Bisciences
DEPC	Roth, Karlsruhe
dNTP	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Dodecylmaltosid	Calbiochem, Darmstadt
D(+)-Saccharose	AppliChem, Darmstadt
D-Serin	Sigma-Aldrich-Steinheim
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol abs.	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt
Ficoll 400	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd	Riedel-de-Haën, Seelze, Niederlande
Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	AppliChem, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	AppliChem, Darmstadt
MDL-29951	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methionin	AppliChem, Darmstadt
MMS-22	
(Ethyl-3-aminobenzoate methanesulfonate)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat SDS	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat Dihydrat	Riedel-de-Haën, Seelze, Niederlande
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37 %	Riedel-de-Haën, Seelze, Niederlande
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
SDS	Merck, Darmstadt
Tetracyclin	AppliChem, Darmstadt
Tricin	AppliChem, Darmstadt
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Urethan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylene Cyanol FF	Serva, Heidelberg
Zink	Merck, Darmstadt

## 1.14 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage A120S	Sartorius, Göttingen
Autoklav Vaculab S3000	MMM GmbH, München
Binokular Leica Wild M3Z	Leica, Wetzlar
Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia
Gene Pulser	BioRad, München
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
Inkubator Typ BE800	Memmert
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA-Labortechnik, Staufen
Mikromanipulator MD4	Bachofer, Reutlingen
Mikroschmiede MF-83	Bachofer, Reutlingen
pH-Meter Beckmann DU 530	Beckmann Instruments, USA
Photometer NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific
Schüttler S25	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Speedvac	Fischer Laborbedarf
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Typhoon Scanner 9400	Amersham, Biosciences
Überkopf Mischer Reax 2	VWR
UV-Tisch Gel Doc	BioRad, München
Verstärker	
-Vorverstärker HS-2A	
-Differentialverstärker	
-Digitalumwandler	Axon Instruments, Gene Clamp 500 B
Vortex Reax 2000	Heidolph
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	
-Biofuge 15	Heraeus, Hanau
-Omnifuge 2.0RS	
-Sorvall RC5C	Du Pont Instruments, Wilmington, USA
Zentrifugenrotoren Sorvall GSA	Du Pont Instruments, Wilmington, USA
Zweikanalschreiber W & W 340	Scientific Instruments, Schweiz
Zweistufen-Vertikalelektroden-Puller	Beckmann Instruments, USA

## 1.15 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Einmalskalpelle Cutfix®	B.Braun, Melsungen
Elektrodenkapillaren aus Borosilikatglas	WPI, Berlin
Elektroporationsküvetten 2 mm	Eurogentec, Seraing, Belgien
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen 35.2070, 35-2059	Becton Dickinson, NJ, USA
10 µl Glaskapillaren	Brand
Handschuhe Rotiprotect Vinyl, Latex	Roth, Karlsruhe
Injektionskapillaren aus Borosilikatglas	Hilgenberg, Malsfeld
Pasteurpipetten	John Poulton LTD, Barking, England
PCR-Reaktionsgefäße MicroAmp®	PE Biosystems, Foster City, USA
Petrischalen	Greiner Labortechnik, Kremsmünster
Plastikpipetten 5, 10, 25 ml	Nunc, Wiesbaden
Spritzen Omnifix® 5, 10, 15 ml	B.Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,2 und 0,45 µm	Sartorius AG, Göttingen
Kodak® BioMax MR Film, MR-1, Size: 5 in. x 7 in	Kodak
Kodak® BioMax MS Film, MS-1, Size: 5 in. x 7 in	Kodak

Software	Hersteller
Clampex Version 9	
Clampit	
KaleidaGraph™ 3.51	Synergy Software

## Methoden

### 1.16 Anzucht von *Escherichia coli* XL1-Blue-Kultur

Eine bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagerte Dauerkultur von *E. coli* XL1-Blue wurde auf Eis aufgetaut. Davon wurden ca.  $30\ \mu\text{l}$  auf einer tetracyclinhaltigen ( $50\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) LB-Festmediumplatte ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Kolonie gepickt und in  $10\ \text{ml}$  LB-Medium ( $50\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Tetracyclin) überführt. Nach 'über Nacht Schütteln' bei  $37^{\circ}\text{C}$  und  $300\ \text{rpm}$  wurde die so gewonnene Vorkultur weiter für die Anzucht elektrokompenter Zellen verwendet.

### 1.17 Herstellung elektrokompenter Zellen

$1\ \text{l}$  LB-Medium (Raumtemperatur, RT) wurde mit  $10\ \text{ml}$  einer *E. coli* XL1-Blue Übernacht-Kultur angeimpft und dann unter Schütteln ( $300\ \text{rpm}$ ) bei  $37^{\circ}\text{C}$  bis zu einer optischen Dichte von  $0,5$  bis  $0,8$  bei  $600\ \text{nm}$  (OD 600) inkubiert. Die Bakterienkultur wurde innerhalb von  $1/2$  bis  $1$  Stunde auf Eis auf  $4^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und danach bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $6000\ \text{rpm}$  für  $8$  Minuten zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Die folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Es wurden vorgekühlte, sterile Lösungen verwendet. Das Pellet wurde mit  $1\ \text{l}$  eiskaltem dideionisiertem Wasser ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ; Aqua dest.) gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Danach wurde wieder der Überstand verworfen. Das Pellet wurde schließlich mit  $500\ \text{ml}$  eiskaltem Aqua dest. und  $20\ \text{ml}$   $10\ \%$  Glycerin (v/v) gewaschen. Nach jedem Waschschritt wurde wie zuvor zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet langsam in  $2\ \text{ml}$   $10\ \%$  Glycerol (v/v) resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension aliquotiert ( $50\ \mu\text{l}$ -Aliquots) und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 1.18 Transformation

Bei dieser Methode wird die Bakterienmembran elektrokompenter Zellen durch einen Elektropuls durchlässig gemacht, so dass die DNA aus dem Medium in die Zellen aufgenommen werden kann. Die  $50\ \mu\text{l}$ -Aliquots kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in vorgekühlte Elektroküvetten überführt und mit  $1-3\ \mu\text{l}$  Plasmid-DNA (ca.  $50\ \text{ng}$ ) mittels Pipettieren vermischt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser bei  $2,5\ \text{kV}$ ,  $25\ \mu\text{F}$  und  $200$

Ohm für 3-4 Sekunden. Danach wurden die elektroporierten Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500  $\mu$ l frischem antibiotikumfreiem LB-Medium überführt und für 1/2 bis 1 h bei 37°C im Roller inkubiert. Anschließend wurden 50-100  $\mu$ l auf eine ampicillinhaltige (100  $\mu$ g/ml) bzw. eine kanamycinhaltige (50  $\mu$ g/ml) LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **1.19 Plasmid-DNA Isolierung aus *E. coli* Kulturen mittels Qiagen-Kits**

Für die Plasmidpräparation und die Analyse von klonierten DNA Konstrukten wurden sowohl das Qiaprep Spin Miniprep als auch das Qiagen Midi/Maxi Kit der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt.

### **1.20 Minipräparation**

Mit dieser Methode können kleine Plasmidmengen in relativ kurzer Zeit nach folgendem Protokoll isoliert werden: 5 ml einer Übernachtskultur in antibiotikumhaltigem LB-Medium wurden durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellen wurden anschließend einer alkalischen Lyse unterzogen. Nach dem Vorgang der Neutralisation, bei dem DNA und Proteine ausfallen, erfolgte das Abzentrifugieren dieser Komponenten. Der Überstand wurde auf eine DEAE-Anionenaustauscher-Säule aufgetragen, womit alle störenden Komponenten, wie RNA oder Proteine mit einem Puffer mittleren Salzgehalts von der Säule gewaschen wurden. Die Elution der DNA erfolgte mit einem Puffer hohen Salzgehalts. Die Präzipitation wurde mit Isopropanol durchgeführt.

### **1.21 Maxipräparation**

Um größere Plasmidmengen zu isolieren wurde nach folgendem Protokoll verfahren: 100 ml einer Übernachtskultur wurden 10 Minuten bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet dann der alkalischen Lyse unterzogen, d.h. es wurde zunächst in 10 ml Puffer 1 (siehe Material) durch mehrmaliges hoch- und runterpipettieren resuspendiert. Nach der Zugabe des lysierenden Puffers 2 wurde die Lösung vorsichtig gemischt und für maximal 5 Minuten bei RT inkubiert. Nun wurden 10 ml des neutralisierenden Puffers 3 zugegeben und es folgte eine Inkubation von 20

Minuten auf Eis und eine nachfolgende Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C und 10000 rpm. Der klare Überstand wurde in Qiagen-tips 500 überführt, welche zuvor mit 10 ml Puffer QBT gewaschen wurden. Die nun an die Säulen gebundene DNA wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und danach mit 15 ml Puffer QF eluiert. Anschließend folgte die Präzipitation der DNA mit 10,5 ml Isopropanol und die Zentrifugation für 30 Minuten bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen, für 10 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde für ca. 30 Minuten luftgetrocknet und in TE-Puffer, pH 8.0 bzw. ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### **1.22 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Durch Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente im Bereich von 0,1 bis 20 kb aufgetrennt werden. Die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten hängt von der Agarosekonzentration im Gel ab. Dafür wurden in der vorliegenden Arbeit 0,7 bis 1 % (w/v) Gele verwendet, die lineare doppelsträngige DNA-Fragmente im Größenbereich von 0,8-10 kb auftrennen. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die entsprechende Menge Agarosepulver in TAE- oder TBE-Puffer aufgekocht, bis diese vollständig gelöst ist und keine Schlierenbildung mehr zu sehen ist. Nachdem die Agaroselösung auf ca. 60°C abgekühlt war, wurde das Gel auf einer Glasplatte, an der ein Kamm befestigt war, gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Kamm gezogen und das Gel in eine Elektrophoresekammer, welche den Laufpuffer enthält, gelegt. Nun wurde das Gel mit 5 µl eines entsprechenden Markers sowie mit DNA-Proben beladen, welche mit 1/6 des DNA-Ladepuffers versetzt wurden. Der Ladepuffer enthält Referenzfarbstoffe, die das Absinken der DNA in die Geltaschen erleichtert. Die Gelelektrophorese erfolgte nach Anlegen der Spannung (ca. 10 V/cm) für 1-2 Stunden bei RT. Um die nun aufgetrennten Banden anzufärben, wurde das Gel für ca. 10 bis 15 Minuten in einer wässrigen Lösung inkubiert, welche 0,5 µg/ml des mit der DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid enthielt. Die Detektion und das Fotografieren erfolgten unter UV-Licht (254 oder 302 nm).

## 1.23 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

### 1.23.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Nach dem Gesetz von Lambert-Beer, bei dem zwischen der Absorption ( $E$ ) und der Konzentration ( $c$ ) einer Probe ein Zusammenhang hergestellt wurde, gilt:

$$E = \ln I/I_0 = -\epsilon \cdot c \cdot d$$

**Gleichung 3.1:** Gesetz von Lambert-Beer.  $I$ : Intensität der Strahlung nach Durchtritt der Probe;  $I_0$ : Intensität der eingestrahlten Strahlung;  $\epsilon$ : molarer Absorptionskoeffizient (in  $\text{cm}^2/\text{mol}$ );  $d$ : Küvettenlänge (in cm);  $c$ : Konzentration der absorbierenden Moleküle (in  $\text{mol/l}$ ).

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $E_{260}$ ) gemessen. Zur Bestimmung der OD von Bakterienkulturen wurde die Absorption bei 600 nm ( $E_{600}$ ) gemessen. Die Messung der Nukleinsäuren, welche 1:50 oder 1:100 verdünnt wurden, erfolgte in Quarzküvetten. Für die Konzentration reiner Nukleinsäuren und Bakterienkulturen gelten:

1  $E_{260}$ -Einheit  $\approx$  50  $\mu\text{g}$  doppelsträngiger DNA/ml

1  $E_{260}$ -Einheit  $\approx$  40  $\mu\text{g}$  einzelsträngiger DNA/ml

1  $E_{600}$ -Einheit  $\approx$   $8 \cdot 10^8$  Zellen/ml

Der Reinheitsgrad von DNA bzw. RNA wurde zusätzlich durch die Messung der Absorption bei 280 nm im Vergleich zum Lösungsmittel bestimmt. Bei Nukleinsäuren, die keine Verunreinigung durch Proteine zeigen, sollte der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  bei DNA-Lösungen ca. 1,8-2,0 und bei RNA-Lösungen  $> 2,0$  betragen.

Alternativ dazu erfolgte die photometrische Bestimmung anhand des Spektrophotometers NanoDrop ND-1000.

### 1.23.2 Konzentrationsbestimmung mittels Ethidiumbromid-Agarosegelen

Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid kann sich aufgrund seiner planaren Struktur zwischen die Basen von Nukleinsäurelösungen anlagern. Nach Bestrahlung mit UV-Licht emittieren die Ethidiumbromid-Moleküle Fluoreszenzstrahlung, welche durch die Wechselwirkung mit den Basen im

Vergleich zum freien EtBr in der Intensität erhöht ist. Da die Intensität der Fluoreszenzstrahlung proportional zur Gesamtmenge an DNA ist, wird eine Quantifizierung der DNA durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der DNA-Banden im Agarosegel mit den Banden eines Markers mit bekannter DNA-Konzentration ermöglicht. Das bedeutet, dass man die Intensitäten der Banden vergleicht und dann die Menge an DNA in der zu interessierenden Bande abschätzt.

### 1.24 Entsalzen von DNA-Proben

Da ein hoher Salz-Gehalt in einer DNA-Lösung die Transformation von elektrokompenten Zellen mittels Elektroporation erschweren könnte, wurde die DNA-Lösung mittels in H<sub>2</sub>O gelöster, auspolymerisierter Agarose (1 %, w/v) entsalzt.

### 1.25 Behandlung der DNA mit Restriktionsenzymen

Die Behandlung mit den Restriktionsenzymen wurde nach den Standardvorschriften (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Bei den Versuchen wurden Restriktionsenzyme des Typs II verwendet, bei denen die Erkennungsstelle gleichzeitig die Schnittstelle darstellt. Die für die Reaktion benötigte Menge wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Units Enzym}/\mu\text{g DNA} = \frac{L(\lambda) * S(P)}{L(P) * S(\lambda)}$$

**Gleichung 3.2:** Berechnung der Enzymeinheiten pro eingesetzte DNA-Menge in  $\mu\text{g}$ .  $L(\lambda)$ : Länge des Phagengenoms  $\lambda$  in Basenpaaren;  $L(P)$ : Länge der zu verdauenden DNA bzw. des Plasmids in Basenpaaren;  $S(\lambda)$ : Anzahl der Enzymschnittstellen in der zu verdauenden DNA bzw. Plasmid;  $S(P)$ : Anzahl der Enzymschnittstellen im  $\lambda$ -Phagengenom.

Bei der Behandlung mit den Restriktionsenzymen wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen beachtet. Dabei betrug die Dauer des Verdaus 1-12 Stunden, bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Darauf folgte eine Inaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 65°C.

### **1.26 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion**

Diese Standardmethode dient zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Dabei wurden bis zu 10  $\mu\text{g}$  entsprechender DNA linearisiert, und es wurde das dreifache Volumen von 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) zur Nukleinsäurelösung hinzugefügt. Daraufhin folgte die Zugabe von 0,15-fachem Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2). Anschließend wurde zur Probe das gleiche Volumen einer 25:24:1 (v/v) Mischung von Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol zugegeben. Der Probeninhalt wurde gut gemischt und für 2 Minuten bei RT und 13000 rpm zentrifugiert, um die Phasentrennung zu beschleunigen. Als nächstes wurde der Großteil der oberen wässrigen Lösung abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Um das restliche Phenol aus der Lösung zu entfernen, wurde das gleiche Volumen Chloroform hinzugegeben, die Lösung gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde wieder entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nun folgte eine Isopropanolfällung. Dabei wurde das gleiche Volumen Isopropanol zur Nukleinsäurelösung pipettiert, gründlich gemischt und für mindestens 30 Minuten, bzw. bis zu 12 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde die Probe für 30 Minuten, bei 15000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 15 Minuten, bei 15000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes wurde das Pellet für ca. 30 Minuten getrocknet und anschließend in RNase-freiem, deionisiertem Wasser aufgenommen.

### **1.27 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Diese Methode wird dazu verwendet, um ein mit Restriktionsenzymen behandeltes DNA-Fragment zu isolieren und in den gewünschten Vektor einzubauen. Dazu wurden ca. 2  $\mu\text{g}$  DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt. Die Fragmente wurden dann mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Das Fragment wurde bei langwelligem UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht. Die gewünschte Bande wurde nun mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein vorher gewogenes Eppendorfgefäß überführt. Die im Gelstück enthaltene DNA wurde mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) extrahiert. Zu

dem Gelstück wurde das dreifache Volumen (w/v) des Puffers QG gegeben und für 10 Minuten bei ca. 50°C inkubiert, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nach Hinzufügen von einem Volumen Isopropanol (erhöht die Ausbeute an DNA-Fragmenten) wurde das Gemisch auf die im Kit vorhandenen XY-Säulen gegeben. Die Säulen wurden für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Nachdem die Probe mit Puffer PE gewaschen wurde, folgte eine erneute Zentrifugation der Proben, wobei der PE-Puffer danach verworfen wurde. Die DNA wurde mit 30  $\mu$ l EB-Puffer eluiert und anschließend die Konzentration der DNA bestimmt.

### 1.28 Dephosphorylierung von DNA-Termini

Die Selbstligation geöffneter Plasmide nach einem Restriktionsverdau ist eine Ursache für das Hochwachsen von Bakterien, die nur den Leervektor, nicht aber das gewünschte Konstrukt enthalten. Um dies zu vermeiden, erfolgte die Entfernung der 5`-Phosphatgruppe an den DNA-Enden des Vektors mithilfe einer Phosphatase. Dazu wurde ca. 500 ng DNA aus dem präparativen Verdau mit 1  $\mu$ l CIP-Puffer, 2  $\mu$ g DNA und 2 U/ml Phosphatase (CIP) zusammen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran folgte eine Inaktivierung der Phosphatase für 15 Minuten bei 65°C.

### 1.29 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Vermehrung in Bakterien müssen DNA-Fragmente in zirkuläre Klonierungsvektoren ligiert werden. Dabei wird das zu klonierende Fragment in einem molaren Überschuss zum Vektorfragment eingesetzt. Die Ligation der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des DNA Ligations Kits durchgeführt. Zuerst folgte die Bestimmung der Konzentration des einzufügenden Fragments und des Vektorfragments durch Vergleich der Intensitäten der entsprechenden Banden und Marker im Agarosegel. Die für die Ligation eingesetzten Mengen der Fragmente wurden nach folgender Formel, bei standardmäßig 25 ng Vektorfragment und mindestens 5-fachem Überschuss der einzufügenden DNA, bestimmt:

$$[\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 125 [\text{ng}] * \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]]$$

**Gleichung 3.3:** Berechnung der cDNA-Mengen in ng.

Ligations-Reaktionsansatz:

2  $\mu$ l 10x Ligationspuffer

> 25 ng Vektor

> 250 ng Insert-DNA

2  $\mu$ l T4-DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ l)

ad 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.

Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 16°C oder 1 h bei RT. Anschließend folgte eine 15-minütige Hitzeinaktivierung der DNA-Ligase bei 65°C und die Elektroporation von 2-4  $\mu$ l des Ligationsansatzes in XL1-Blue kompetenten Zellen.

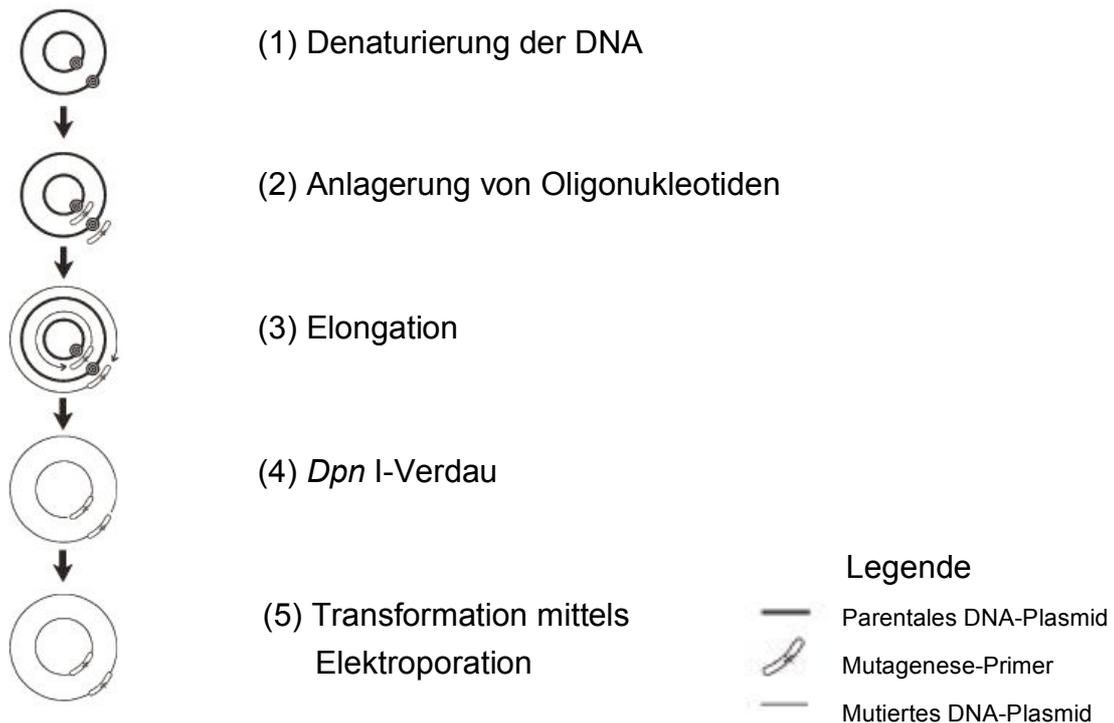
### **1.30 Polymerase Kettenreaktion (engl.: Polymerase chain reaction - PCR)**

Die PCR ist eine Methode, die eine schnelle Amplifizierung von Nukleinsäuren *in vitro* ermöglicht. Hierbei wird bei einer hohen Temperatur die doppelsträngige DNA denaturiert. Folgende Substanzen wurden verwendet: zwei Oligonukleotidprimer, welche komplementär zum amplifizierenden DNA-Bereich sind und diesen flankieren, Desoynukleosidtriphosphate (dNTP) und eine hitzebeständige DNA-Polymerase werden mit der DNA inkubiert. Die Primer enthalten ein freies 3'-OH-Ende und dienen als Initiationspunkt für die PCR. In dem elektronisch gesteuerten Thermocycler werden die dafür benötigten Reaktionsbedingungen, d.h. die Denaturierungs-, Primer-Anlagerungs- und die Elongationstemperatur in Dauer und zeitlicher Abfolge (Zyklus) vom Benutzer zuvor festgelegt. Da jeder neu geschaffene DNA-Strang wiederum als Vorlage bei dem nächstfolgenden Zyklus dient, wird so im Verlauf von mehreren Zyklen der DNA-Bereich zwischen den zwei Oligonukleotidprimern exponentiell vervielfältigt. Die PCR wurde in dieser Arbeit zum Einführen von spezifischen Mutationen ins wt-Plasmid verwendet.

### **1.31 PCR-Mutagenese**

Zur Einführung von Mutationen in wt-Plasmide wurde das QuikChange®XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Dabei war das verwendete Enzym die *Pfu Turbo*® DNA-Polymerase. Diese stammt aus dem

hyperthermophilen Archeon *Pyrococcus furiosus* und ist in der Lage beide Stränge zu amplifizieren, besitzt eine 5'3'-Polymeraseaktivität sowie eine 5'3'-Exonukleaseaktivität, welche als Korrekturaktivität dient. Sie ist zudem wesentlich hitzestabiler als die häufig verwendete *Taq*-Polymerase. Die verwendeten Oligonukleotide enthielten eine Länge von 19-60 Basenpaare und wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert. Die folgende Abbildung stellt das Prinzip des PCR-Mutagenese-Kits dar:



**Abb. 3.1:** Überblick über das Prinzip des Quickchange®XL Site-Directed Mutagenesis Kits (entnommen aus der Arbeitsanleitung des Kits (Stratagene).

Zunächst findet die hitzeabhängige Denaturierung der DNA statt (1). Danach folgt die Anlagerung der Oligonukleotidprimer mit der gewünschten Mutation an die Zielsequenz (2). Anschließend erfolgt die Elongation der Primer durch die *Pfu Turbo*® DNA-Polymerase (3). Die Behandlung des PCR-Produkts mit *Dpn* I soll verhindern, dass bei der anschließenden Transformation, der wt-Vektor kointransformiert wird. Dieses Enzym erkennt nur die methylierte wt-DNA (4). Anschließend wird das *Dpn* I-behandelte, mutierte Plasmid mit Hilfe der Elektroporation in XL1-Blue Zellen eingeführt (5). Für die PCR-Mutagenese wurden folgende Mengen eingesetzt:

Mutagenese-Reaktion:

5  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer

1  $\mu$ l (50 ng) dsDNA-Plasmid

0,5  $\mu$ l (125 ng) sense Primer

0,5  $\mu$ l (125 ng) antisense Primer

0,5  $\mu$ l dNTP-Mix

1,5  $\mu$ l Quick Solution

ad 25  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

0,5  $\mu$ l *Pfu Turbo*<sup>®</sup> DNA-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)

Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem Protokoll durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer	Reaktion
1	95	30 Sekunden	Initiale Denaturierung
20	95	30 Sekunden	DNA-Denaturierung
20	57	1 Minute	Primer-Anlagerung
20	68	15 Minuten	DNA-Elongation

Um das Auftreten von Haarnadelstrukturen bei der PCR zu vermeiden, welches das Erhalten von PCR-Produkten verhindern könnte, wurde auch das folgende Protokoll verwendet, bei dem höhere Primer-Anlagerungstemperaturen, sowie eine längere Dauer der DNA-Denaturierung eingestellt wurden:

Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer	Reaktion
1	95	1 Minute	Initiale Denaturierung
20	95	1 Minute	DNA-Denaturierung
20	60	1 Minute	Primer-Anlagerung
20	68	15 Minuten	DNA-Elongation

### 1.32 Sequenzierung

Zur Überprüfung von zielgerichteten Mutationen in den Zielsequenzen wurden Oligonukleotide gestaltet, welche 20-25 Basenpaare lang sind, ein G oder C an den Termini besitzen und etwa 100-150 Basenpaare von der zu überprüfenden Region der cDNA-Sequenz spezifisch binden. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg.

### 1.33 Die *in vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription erfolgte nach dem mMessage mMachine® Protokoll (Ambion). Dabei enthält die cRNA eine 5'-Capstruktur [m7G(5')ppp(5')G]. Ambions mMessage mMachine® Kit ist ideal für Routinesynthese von cRNA, welche durch Mikroinjektion in Oozyten eingeführt wird und eine erhöhte Stabilität bzw. Translationseffizienz *in vivo* gewährleistet.

Es wurde darauf geachtet, dass bei der Arbeit stets Handschuhe getragen und Nuklease-freie Lösungen verwendet werden, da ansonsten die RNA-Degradierung verursacht würde. Die Glasplatte und der Kamm für die Gelelektrophorese wurden für ca. 30-60 Minuten in 10 % SDS-Lösung inkubiert und anschließend mit DEPC-haltigem Wasser gespült. Da die Transkription von zirkulären Plasmiden in extrem langen, heterogenen RNA-Tanskripten resultieren würde, wurden 10 µg des DNA-Plasmids vor der RNA-Synthese nach der Poly-A-Sequenz mit 10 U/µl des Enzyms *Not I* über Nacht linearisiert. Es folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 15 Minuten bei 65°C. Anschließend wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft, ob die Linearisierung vollständig gewesen war. Zur Beseitigung von Proteinresten, RNasen und anderen Enzymen folgte eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion. Nach der Isopropanol-Fällung und dem Waschen mit 70 % Ethanol wurde das Pellet in 11 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Da der verwendete Vektor eine Sp6-Promotorregion enthält, wurde entsprechend eine Sp6-RNA-Polymerase verwendet.

Ansatz für die cRNA-Synthese:

- 1) ad 25 µl Nuklease-freies ddH<sub>2</sub>O
- 2) 10 µl NTP/CAP
- 3) 2 µl 10x Reaktionspuffer
- 4) 1 µl DNA (1-2 µg/µl)
- 5) 2 µl Enzym-Mix

Alle Komponenten außer 10xReaktionspuffer (RT) wurden auf Eis aufbewahrt. Nach Zusammenfügen, wurden die Proben für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Enzyms DNase I für 15 Minuten bei 37°C verdaut. Nun folgte die Präzipitation durch Zugabe von 30 µl einer

Lithium-Chlorid-Lösung und 30  $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser und die anschließende Inkubation dieser bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für mindestens 30 Minuten. Die RNA wurde nachfolgend für 20 Minuten, bei 15000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml Nuklease-freiem 70 % Ethanol gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes, wurde die RNA in 11  $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Ihre Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 1.34 Elektrophysiologische Methoden

### 1.34.1 *Xenopus laevis* als Oozytenexpressionssystem

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* gehört zur Familie der Pipidae. Dorsal weist der Frosch eine hell- bis dunkelgraue Färbung und grünliche Flecke auf, während er ventral weiß bzw. hellgelb ist. An den Hinterbeinen befinden sich zwischen den Krallen starke Schwimmhäute sowie die vier 'Finger' an den Vorderbeinen, welche bei der Futtersuche und beim Fressen eingesetzt werden. Das vollkommen aquatisch lebende Tier besitzt keine Zunge, welche sonst zum Futterfang bei Fröschen verwendet wird (Abb. 3.2).

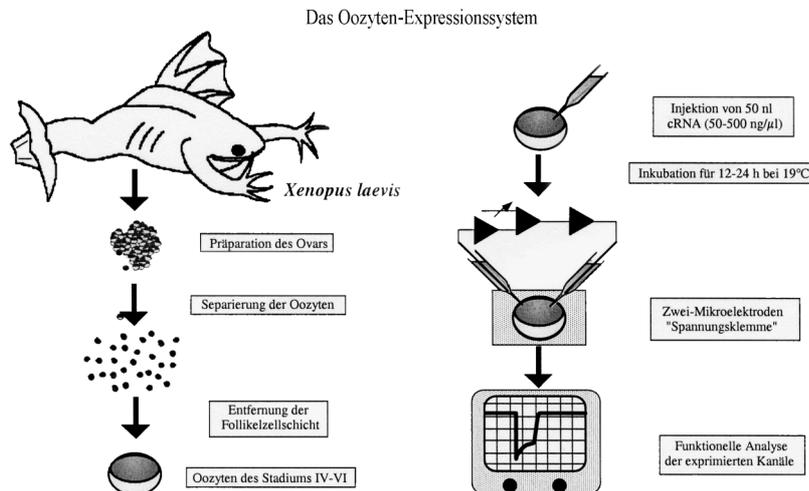


Abb. 3.2: *Xenopus laevis*-Weibchen (Quelle: <http://www.xenopus.com/2frogs.jpg>).

In dieser Arbeit wurden Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem für den NMDA-Rezeptor verwendet. Die Oozyten sind die Vorläufer von Eizellen und durchlaufen sechs Entwicklungsstadien (I-VI), wobei nur Oozyten in den Stadien V und VI für elektrophysiologische Untersuchungen relevant sind. Diese Zellen sind mit einem Durchmesser von 1-1,2 mm im Stadium V und 1-1,4 mm im Stadium VI relativ groß. Da die Oozyten selbst kaum Ionenkanäle und Liganden-gesteuerte Rezeptoren enthalten, sind sie also ein ideales

Expressionssystem für Oberflächenkanäle. Außerdem erfolgt die Expression von fremder cRNA unproblematisch.

Im Folgenden wird die Verwendung der Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem dargestellt (Abb. 3.3) und die wichtigsten Schritte anschließend genauer erklärt.



**Abb. 3.3:** Das Oozyten-Expressionssystem

### 1.34.2 Haltung der Frösche

Die Weibchen im Alter von 2-4 Jahren wurden in großen Aquarien (200 l) in Gruppen von bis zu 15 Fröschen gehalten, wobei frisch- von nicht-operierten Fröschen getrennt gehalten wurden. Diese wurden in einem getrennten Raum von Umweltreizen ferngehalten. Der Tag/Nachtrhythmus (16/18 h) wurde über die Lichtautomatik geregelt und das 20°C warme Wasser ständig über einen Aktivkohlefilter aufbereitet. Die Fütterung erfolgte 2-3 mal wöchentlich mit einem Spezialfutter (Altromin), wobei währenddessen die Wasseraufbereitung für einige Stunden gestoppt wurde.

### 1.34.3 Oozytenentnahme

Der Frosch wurde für ca. 10-15 Minuten in einer 0,1 % (w/v) Tricain-Lösung pH 7,4 narkotisiert und danach auf das Eis platziert. Es wurde ein ca. 1 cm langer Schnitt auf der Oberseite des Bauchs durch die Haut- und etwas versetzt dazu durch die Muskelschicht ausgeführt. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass die jeweils zusammengenähten Muskulatur- und Hautschicht nicht

übereinander liegen. Ein Teil des Ovars wurde entnommen und in Gentamycin-haltiges ND96 1x überführt. Anschließend wurden zunächst die Muskulatur- und dann die Hautschicht mit 2-3 Stichen zugenäht. Der Frosch wurde danach für ca. 1 h in frischem Wasser bis zum Aufwachen aufbewahrt und anschließend zurück in das Aquarium gebracht.

#### **1.34.4 Präparation von Oozyten**

Das frisch entnommene Oozyten-Ovar wurde durch die Inkubation mit einer, in antibiotikumhaltigen 1xND96 gelösten, Kollagenase, Typ IIA (0,25 mg/ml; aus *Clostridium histolyticum*) über Nacht bzw. bei einer höheren Konzentration (1 mg/ml) für 2-3 h vereinzelt. Da sich die Oozyten umgebende Follikelzelle bei der Messung als hinderlich erweisen könnte, weil sich der applizierte Ligand anreichern und Messergebnisse verfälschen könnte, wurden diese am Anfang durch Waschen in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Frosch-Ringerlösung entfernt. Unterm Binokular wurden dann geeignete Oozyten für die spätere Injektion von cRNA herausgesucht. Auf folgende Merkmale wurde geachtet: gleichmäßige Färbung des animalen und vegetativen Pols, eine klare Trennung zwischen den beiden Polen, sowie keine Anzeichen eines Austretens des Zellkerns. Bis zur Injektion wurden die Oozyten bei 4-10°C aufbewahrt.

#### **1.34.5 Herstellung von Injektionskapillaren**

Die Injektionskapillaren wurden aus Borosilikatglas (1,8 mm Außendurchmesser, Hilgenberg) mit dem Zweistufen-Vertikalelektroden-Puller mit zwei verschiedenen Abstandhaltern hergestellt. Der Durchmesser der Kapillarenspitze wurde unterm Mikroskop nachgeprüft und bei Bedarf auf 6-10  $\mu\text{m}$  korrigiert.

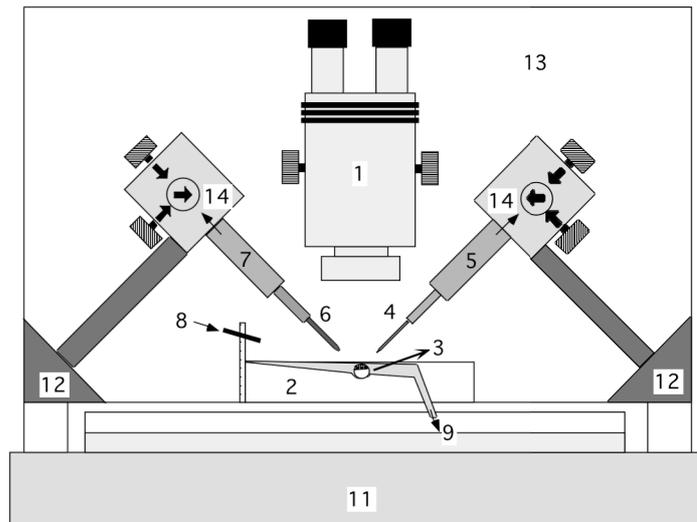
#### **1.34.6 Injektion der cRNA in Oozyten**

Bei der Arbeit mit RNA ist es wichtig stets Handschuhe zu tragen, sowie die RNA während der Injektion auf Eis zu halten. Die Injektion der cRNA erfolgte mit Hilfe eines Mikromanipulators und eines Binokulars. Die Injektionskapillare wurde zunächst mit Immersionsöl luftblasenfrei gefüllt. Diese wird dann über einen Metalldorn des Injektionsapparates gesteckt. Durch das Ausfahren des Metalldorns wird dann ein definiertes Volumen an Immersionsöl durch die

Kapillarenspitze verdrängt. Damit soll die Injektion einer definierten Menge an aufgesaugter RNA erreicht werden. Um zunächst das Aufsaugen der cRNA zu gewährleisten, wurde diese in einen Nuklease-freien Deckel eines 1,5 ml Eppendorf-Gefäßes pipettiert. Anschließend wurde die Kapillare mit Hilfe des Mikromanipulators in den RNA-Tropfen platziert, und die Flüssigkeit wurde durch Anlegen eines Unterdrucks aufgesaugt. Nun wurde die bereits ausgesuchten Oozyten in einer Plexiglasrinne aufgereiht, die Kapillare wurde in die Oozyten eingestochen und durch Anlegen eines Überdrucks wurden je Oozyte 50 nl einer 0,5-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  konzentrierten cRNA-Lösung injiziert. Somit betrug der Gehalt an injizierter RNA 25-100 ng je Oozyte. Für eine elektrophysiologische Untersuchung wurden die Oozyten anschließend 70-96 h bei 19°C inkubiert. Für eine biochemische Untersuchung mittels eines nativen bzw. SDS-Gels folgten zunächst eine radioaktive Markierung der Oozyten von 12-48 h und danach die Inkubation in einer nicht-radioaktiven 10 mM Methionin-Lösung.

#### **1.34.7 Aufbau des Mess-Standes**

Der Mess-Stand befand sich auf einem gedämpften Labortisch aus Marmor, welcher von einem Faraday-Käfig aus Aluminium umgeben war. Teil der Apparatur waren zwei, in drei Raumrichtungen bewegliche, Mikromanipulatoren und dazugehörige Halterungen, ein Binokular mit Beleuchtung, eine Plexiglasableitkammer (Eigenbau) mit Lösungs-Ab- und Zulauf, drei Silber/Silberchloridelektroden, d.h. eine Spannungs-, eine Strom- und eine Referenzelektrode, außerdem zwei Vorverstärker, und zwar HS-2A, sowohl für die Spannungselektrode als auch für die Stromelektrode (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** Schematische Darstellung des Mess-Standes für die elektrophysiologischen Messungen. Die Nummern in der Abbildung bezeichnen: 1 Binokular; 2 Plaxiglasableitkammer; 3 Referenzelektrode; 4 Spannelektrode; 5 Vorverstärker HS-2A mit Ausgang zum Verstärker Gene Clamp 500 B; 6 Stromelektrode; 7 Vorverstärker HS-2A mit Ausgang zum Verstärker Gene Clamp 500 B; 8 Zulauf der Badperfusion; Abfluss der Badperfusion mit Auffangbehälter; 10 luftgefülltes Schwingungsdämpfungssystem; 11 Labortisch aus Marmor; 12 Säulen und Halterungen zur Befestigung der Mikromanipulatoren; 13 Farady-Käfig aus Aluminium; 14 mechanische Mikromanipulatoren beweglich in alle drei Raumrichtungen.

### 1.34.8 Herstellung von Ableitelektroden

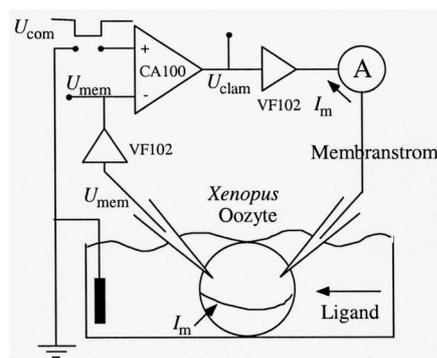
Die Elektroden wurden mittels dem Zweistufen-Vertikalelektroden-Puller aus Borosilikatkapillaren (1,2 mm Außendurchmesser, WPI) hergestellt. Der Durchmesser der Kapillarenspitze wurde unterm Mikroskop überprüft und bei Bedarf auf  $2\ \mu\text{m}$  abgebrochen. Die Kapillaren wurden zur Hälfte mit einer 3 M Kaliumchlorid-Lösung luftblasenfrei gefüllt und für die Messung an die Mikromanipulatoren befestigt.

### 1.34.9 Chlorierung von Silberelektroden

Die Elektrodendrähte wurden zunächst mit Schleifpapier abgeschmirgelt und anschließend elektrolytisch zu Silberchlorid in einer 0,1 N Salzsäurelösung oxidiert. Dazu wurde der Elektrodendraht an die Anode (+) einer 1,5 V Batterie geschaltet, wobei ein zweiter Silberdraht als Kathode (-) diente. Nach 1-3 Minuten bildete sich eine dunkle Silberchloridschicht um den Elektrodendraht.

### 1.34.10 Theoretischer Hintergrund der Zwei-Elektroden Spannungsklemme (engl. two-electrode voltage-clamp)

Diese Methode beruht auf einer Rückkopplungsmethode, bei der vom Vorverstärker eine bekannte Kommandospannung  $U_{com}$  erzeugt und nun der zur Aufrechterhaltung dieser Spannung benötigte Strom gemessen wird. Dazu werden insgesamt drei Silber/Silberchlorid-Elektroden verwendet, wobei sich davon zwei in der Zelle (Strom- und Spannungselektrode) befinden und eine im Bad (Referenzelektrode), die neben der Oozyte platziert ist (Abb. 3.5). Die Spannungselektrode misst passiv das über der Zellmembran anliegende Potential, während die Stromelektrode durch Stromzufuhr das Membranpotential  $U_{mem}$  aktiv reguliert. Das Signal von der Spannungselektrode gelangt über den Vorverstärker HS-2A („headstage“) zum Verstärker Gene Clamp 500 B. Von dort wird über einen Digitalumwandler das analoge Eingangssignal in ein digitales umgewandelt. Nun wird die Kommandospannung  $U_{com}$  mit dem vorliegenden Membranpotential  $U_{mem}$  und im Falle einer Abweichung dieser beiden Werte eine Klemmspannung  $U_{clam}$  angelegt. Die Klemmspannung  $U_{clam}$  wird im Verstärker Gene Clamp 500B in ein entsprechendes Stromsignal  $I_m$  übersetzt und danach über den Vorverstärker HS-2A zur Stromelektrode geleitet.



**Abb. 3.5:** Schematische Darstellung des Schaltbildes des Voltage-Clamp-Experimentes. Das aktuelle Membranpotential der Zelle ( $U_{mem}$ ) wird über den Vorverstärker in den Verstärker Gene Clamp 500 B signalisiert. Dieser vergleicht das gemessene Potential mit dem Kommandopotential ( $U_{com}$ ) und erzeugt eine Klemmspannung ( $U_{clam}$ ), die in den entsprechenden Strom ( $I_m$ ) umgewandelt wird. Am Ausgang kann die Spannung als korrespondierendes Stromsignal abgefangen werden.

Die gemessenen Signale wurden durch die Verwendung der Software Clampex Version 9.2 aufgezeichnet und mit dem Programm Clampfit 9.2 analysiert. Die Übertragung der Einzelstromantworten erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4.0b (GraphPad Software, CA, USA).

#### **1.34.11 Die Voltage Clamp-Messung**

Die Oozyte wurde bei der Durchführung des Experiments in die dafür vorgesehene Vertiefung einer Plexiglaskammer platziert. Mittels der Mikromanipulatoren wurden dann die Spannungs- und die Stromelektrode in die Zelloberfläche eingestochen, danach die Spülung mit der Ringer-Lösung angeschaltet und das Haltepotential von  $-70$  mV angelegt.

#### **1.34.12 Aufnahme von Dosiswirkungskurven der Agonisten Glyzin bei wt, partiell und vollständig NTD-deletierten NR1/NR3-NMDA-Rezeptoren**

Pro Oozyte wurden Dosiswirkungskurven aufgenommen, wobei die applizierten Lösungen nicht-aktivierende bis sättigende Konzentrationen umfassten. Zur Aufnahme der Dosiswirkungskurven wurden  $300 \mu\text{l}$  der entsprechend konzentrierten Agonisten-Lösungen manuell mit der Pipette innerhalb von 3-5 Sekunden appliziert. Während der Applikation wurde die Spülung mit Frosch-Ringer ausgeschaltet und nach beginnendem Abklingen des Signals eingeschaltet. Die Dauer der Spülung zwischen den jeweiligen Applikationen betrug je nach Konzentration der Lösung 1,5-3 Minuten. Zu Anfang wurden die Agonisten mehrmals in ihrer sättigenden Konzentration zugegeben, um die Stabilität der Antworten zu überprüfen. Danach wurden nacheinander aufsteigende Agonisten-Lösungen appliziert.

Um die Desensitisierung der NMDA-Rezeptoren zu messen, wurden die Stromantworten bei sättigenden Konzentrationen des jeweiligen Agonisten aufgenommen, bis ein Gleichgewichts-Plateau ( $I_{\text{Gleichgewicht}}$ ) erreicht worden ist.

### **1.34.13 Aufnahme der Glyzin-vermittelten und der relativen $Zn^{2+}$ - und D-Serin-induzierten Rezeptorströme von wt, partiell und vollständig NTD-deletierten NR1/NR3-Rezeptoren**

Die Rezeptorströme, welche durch sättigende  $Zn^{2+}$ - oder D-Serin-Konzentrationen (1 mM) hervorgerufen worden waren, wurden in Relation zu den Glyzin-induzierten Rezeptorströmen der gleichen Oozyte gesetzt. Die Applikation bzw. das Auswaschen der Agonisten-Lösungen erfolgte wie unter 3.18.12 beschrieben.

### **1.34.14 Aufnahme der $Zn^{2+}$ -Potenzierung von Glyzin-induzierten NR1/NR3-Rezeptorströmen**

Wie bei Paoletti und Kollegen (1997) beschrieben, wurden im nanomolaren Konzentrationsbereich (1-300 nM) die  $Zn^{2+}$ -Lösungen mit Tricin (10 mM) gepuffert. Zur Aufnahme der modulierenden Wirkung von  $Zn^{2+}$  auf Glyzin-vermittelte NR1/NR3-Rezeptorantworten erfolgte in Gegenwart von sättigenden Glyzin- (100  $\mu$ M) die Applikation von aufsteigenden  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen (0,001-300  $\mu$ M). Dabei wurde zunächst die  $Zn^{2+}$ -Lösung vor und nach 2-3 Sekunden mit die  $Zn^{2+}$ /Glyzin-Lösung appliziert. Die Applikation bzw. das Auswaschen der Agonisten-Lösungen erfolgte, wie unter 3.18.12 beschrieben.

### **1.34.15 Aufnahme der MDL- und $Zn^{2+}$ /MDL-Potenzierung von Glyzin-vermittelten NR1/NR3-Rezeptorantworten**

Zur Aufnahme der modulierenden Wirkung von MDL- und  $Zn^{2+}$ /MDL-Modulation auf Glyzin-induzierte (100  $\mu$ M) NR1/NR3-Rezeptorantworten erfolgte in Gegenwart von 0,2  $\mu$ M MDL bzw. 100  $\mu$ M  $Zn^{2+}$ /0,2  $\mu$ M MDL. Die erhaltenen Rezeptorströme wurden in Bezug zum Rezeptorstrom bei 100  $\mu$ M Glyzin gesetzt und derart der Grad der Potenzierung ermittelt.

### **1.34.16 Aufnahme der Strom-Spannungsbeziehungen von NR2-enthaltenden NMDA-Rezeptoren**

Die Aufnahme der Strom-Spannung(I-V)-Beziehungen erfolgte zwischen -90 mV und +30 mV bei sättigenden Glutamat/Glyzin-Lösungen (100  $\mu$ M/10  $\mu$ M) in An- oder Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  (1 mM). Es wurden die Maximalströme sowie das Verhältnis des Einwärtsstroms bei -90 mV und des Auswärtsstroms bei +30 mV in Relation gesetzt, d.h. der Rektifizierungskoeffizient bei  $I_{30mV}/I_{-90mV}$

ermittelt. Der Rektifizierungskoeffizient stellt ein Maß für das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein einer linearen I-V-Beziehung dar. Je höher der Rektifizierungskoeffizient, desto stärker die Inwärtsrektifizierung, d.h. ein Nicht-Vorhandensein einer linearen I-V-Beziehung bei hohen negativen Potentialen.

#### **1.34.17 Auswertung der Dosiswirkungskurven von Glyzin bzw. Glyzin/Glutamat**

Für die Auswertung wurde das Programm KaleidaGraph 3.51 (Synergy Software, Reading, USA) angewandt. Zunächst wurde die Stromantwort auf den Maximalstrom normiert und nun gegen den Logarithmus der Agonistenkonzentration aufgetragen. Die Bestimmungen der halbmaximalen Sättigung des Rezeptors durch den Agonisten ( $EC_{50}$ -Wert) und des Kooperativitätsfaktors  $n$  (Hill-Koeffizient) erfolgten durch die Anpassung der Dosiswirkungskurven anhand Michaelis-Menten-Gleichung.

#### **1.34.18 Statistische Analyse**

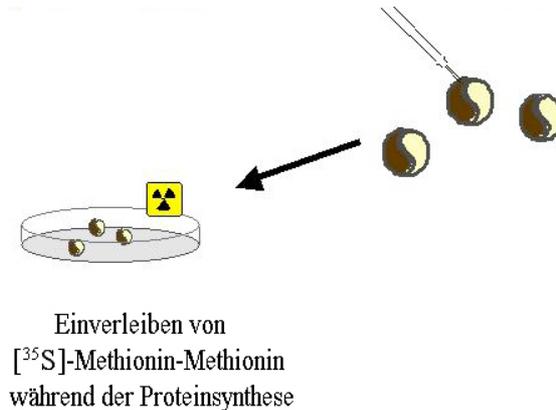
Die statistische Daten-Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.0b. Hierbei wurde von der Gaußschen Normalverteilung der Daten ausgegangen. Zunächst wurden der Mittelwert der Daten, sowie die Standardabweichung und der Standardfehler bestimmt. Zur Berechnung der Signifikanzen wurden der gepaarte oder ungepaarte Student's t-Test sowie der one-way ANOVA-Test angewandt ( $p < 0,05$ (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*)).

### **1.35 Biochemische Methoden**

Zur differentiellen Detektion von intrazellulären Proteinen wurde die metabolische Markierung mit [ $^{35}S$ ]-Methionin gewählt. Für die Zell-Oberfläche-exprimierten Proteine wurde die Cy5-NHS-Ester-Markierung durchgeführt. Die metabolische Markierung hat gegenüber Antikörper-Färbungen den Vorteil, dass alle Proteine, welche Methionine in ihrer Polypeptidsequenz besitzen und somit auch die rekombinant exprimierten Untereinheiten, detektiert werden können. Die spezifische Isolierung erfolgte dann anhand der Aufreinigung über die Hexahistidyl-Markierung (6xHistidin) von einem im Rezeptorkomplex inkorporierten Untereinheiten-Typ.

### 1.35.1 Metabolische Markierung

Nachdem zunächst 50 nl (25 ng/Oozyte) der entsprechenden cRNA in Oozyten injiziert wurden, erfolgte die Inkubation über Nacht bei 19°C in [<sup>35</sup>S]-Methionin haltigem ND96, wobei ~0,4 MBq/Oozyte 8-12 Oozyten/Ansatz eingesetzt wurden. Der Vorgang der metabolischen Markierung ist in Abbildung 3.6 dargestellt:



**Abb. 3.6:** Metabolische Markierung der injizierten Oozyten mit [<sup>35</sup>S]-Methionin, veranschaulicht dargestellt.

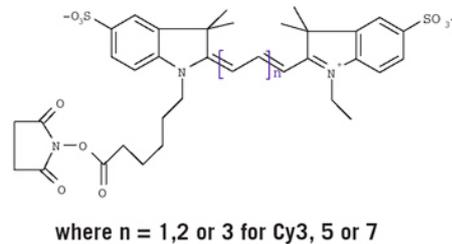
Nach 24 h wurde die Markierung der Oozyten gestoppt, indem sie mit einer nicht-radioaktiven 10 mM Methionin-Lösung gewaschen und danach in dieser für weitere 2-3 Tage, erneut bei 19°C, inkubiert wurden.

### 1.35.2 Markierung von Zell-Oberfläche-exprimierten Proteinen mit dem Cy5-NHS-Ester

#### Theoretischer Hintergrund der Markierung mit dem Cy5-NHS-Ester

Die Markierung der Zell-Oberfläche-exprimierten Proteine erfolgte über eine Acylierung des Cy5-NHS-Esters (Abb. 3.7) mit der ε-Aminogruppe von exponierten Lysin-Resten. Die Markierung von Proteinen erfolgt generell in wässrigen Lösungen, was auch den Nachteil mit sich bringt, dass die Hydrolyse des NHS-Esters beschleunigt wird. Die Rate der Hydrolyse kann über eine Erhöhung des pH-Werts der Lösung erfolgen (pH 7-9). Für die Markierungsreaktion können z.B. Phosphat-, Bicarbonat/Carbonat- und Borat-Pufferlösungen verwendet werden. Vor allen Dingen sollten die Pufferlösungen keine Quelle für primäre oder sekundäre Amine, wie z.B. Tris, enthalten, da diese mit der Markierungsreaktion konkurrieren würde. Bei den Markierungsreaktionen in dieser Arbeit erfolgte die Inkubation im 1xND96-

Medium bzw. Natrium-Phosphatpuffer (s. Kapitel 2.6.4), pH 8,5. Für beide Puffer-Lösungen wurden vergleichende Ergebnisse erhalten.



Entnommen aus dem GE  
Healthcare Liefersciences  
Handbuch

**Abb. 3.7:** Monofunktionale Cy-Farbstoffe. Bei den, in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde der Cy5-Farbstoff angewandt.

Die Wellenlängen der Extinktion bzw. der Emission des in dieser Studie verwendeten Cy5-Farbstoffes betragen 649 nm bzw. 670 nm.

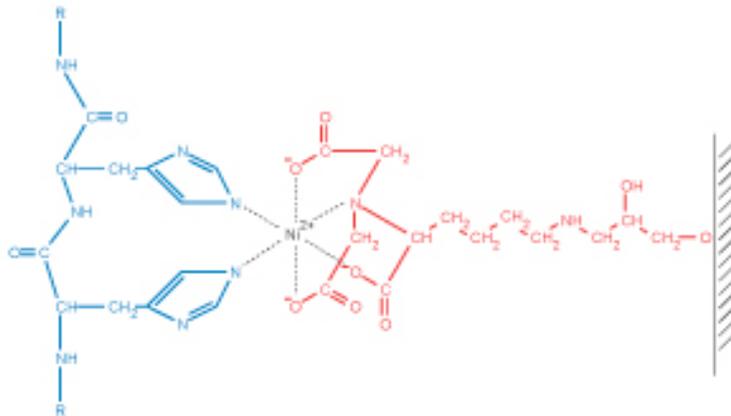
#### Protokoll zur Cy5-NHS-Ester-Markierung

Nach 3-4 Tagen in Kultur wurden NMDA-Rezeptor-exprimierenden Oozyten für 20 Minuten bei 4°C in 60  $\mu$ mol Cy5-NHS-Ester (Amersham, Biosciences) in 1xND96-Medium oder Natrium-Phosphatpuffer inkubiert. Nach dem Waschen mit 1xND96, pH 8,5 erfolgte die Protein-Aufreinigung anhand der 6xHistidin-Markierung von einer der im Rezeptor inkorporierten Untereinheiten.

#### **1.35.3 Aufreinigung von 6xHistidin-markierten Proteinen aus *Xenopus laevis* Oozyten**

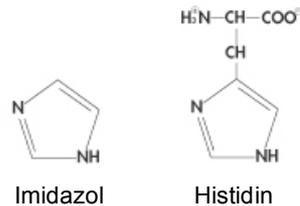
##### Theoretischer Hintergrund der 6xHistidin-vermittelten Proteinaufreinigung

Durch die hohe Bindungsaffinität der 6xHis-Markierung an Ni-NTA-Agarose-Beads wird die spezifische Aufreinigung von hexahistidyl-markierten Proteinen vermittelt. Die 6xHis-Markierung ist bei pH 8,0 nicht geladen und interferiert durch ihre geringe Größe meistens nicht mit der Struktur oder Funktion des aufgereinigten Proteins. Nitrioloacetic acid (NTA) komplexiert vier der sechs freien Bindestellen des Nickelions, wobei die zwei verbliebenen freien Bindestellen mit dem Imidazol-Ring in der Histidin-Seitenkette eines 6xHis-markierten Proteins interagieren. Die Bindung von NTA an die Agarose-Beads ist notwendig für die Immobilisierung (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8:** Wechselwirkung von benachbarten Resten einer Hexahistidyl-Markierung und der Ni-NTA-Matrix.

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen von nicht-markierten Proteinen an die Ni-NTA-Agarose-Beads während der Aufreinigung, wird dem Lyse- und Waschpuffer Imidazol in einer geringen Konzentration zugesetzt. Das Imidazol bindet an freie Nickelionen und verhindert so die unspezifische Bindung an Histidin-Seitenketten von nicht-markierten Proteinen (Abb. 3.9).



**Abb. 3.9:** Chemische Struktur von Imidazol und Histidin

Die zu untersuchenden NMDA-Rezeptoren sind membranständige Proteine. Damit die native Struktur des Rezeptors während der Aufreinigung erhalten bleibt, muss eine Substanz verwendet werden, welche die Plasmamembran imitiert. Dafür können Detergenzien verwendet werden. Hierbei wurden vier verschiedene Detergenzien erprobt: Dodecylmaltosid (0,5 %), Aminocapronsäure (5 mM), NP-40 (1 %) und Octylpuranosid (1 %).

#### Protokoll zur 6xHistidin-Aufreinigung

Nach 3-4 Tagen Inkubation von cRNA-injizierten Oozyten, wurden diese 3-4 mal in frischem, sterilfiltriertem 1xND96 gewaschen und der Überstand vollständig abgenommen. Nun wurden pro Oozyte in einem Ansatz 20  $\mu$ l

Homogenisierungspuffer zugegeben und durch 20-25-maliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Danach folgte die Solubilisierung der Membranproteine auf Eis für 15 Minuten und eine anschließende Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 15000 rpm. Zum Binden an die Ni-NTA-Agarosebeads wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und zum Bindungsansatz mit folgender Zusammensetzung zugegeben:

100  $\mu$ l Homogenat  
400  $\mu$ l Bindungspuffer  
30  $\mu$ l Ni-NTA-Agarosebeads  
5  $\mu$ l 1 M Imidazol pH 8.0

Der Bindungsansatz wurde für 30 Minuten und 4°C in einem Kopf-über-Kopf-Dreher inkubiert. Anschließend folgte die Zentrifugation der Proben für 1,5 Minuten, bei RT und 13200 rpm. Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde die Probe in Waschpuffer resuspendiert. Der Waschschrift und die anschließende Zentrifugation wurden insgesamt 4x wiederholt. Die Elution erfolgte in 2x 50  $\mu$ l Elutionspuffer bei RT unter Schütteln für insgesamt 10 Minuten.

#### **1.35.4 Analyse des N-Glykosylierungsverhaltens von Proteinen**

Zur Untersuchung der N-Glykosylierung der Proteinuntereinheiten wurden, vor der Gelelektrophorese, die [<sup>35</sup>S]-Methionin- bzw. Cy5-NHS-Ester-markierten Proteinproben mit zwei differentiellen-agierenden Enzymen behandelt. Es handelt sich um Endo- $\beta$ -N-Acetylglucosamidase H (EndoH) oder mit Peptid-N4-(Acetyl- $\beta$ -Glucosaminy)-Asparagin-Amidase (PNGaseF), welche bestimmte glykosidische Bindungen einer Zuckerseitenkette spalten. Das EndoH spaltet die glykosidische Bindung zwischen zwei N-Acetylglucosamin-Molekülen von nicht-komplex glykosylierten Proteinen. PNGaseF spaltet Typen Asparagin-gebundener N-Glycanketten, und zwar von komplex und nicht-komplex glykosylierten Proteinen. Eine Resistenz des Proteins gegen Deglykosylierung durch EndoH ist ein Indiz für komplex glykosylierte Proteinkomplexe, welche Golgi-spezifisch angelagerte Zuckerseitenketten besitzen. Da die komplexe Glykosylierung von Proteinen einen der letzten Protein-Modifikationsschritte darstellt, deutet diese auf Proteine hin, welche zur Membranoberfläche

transportiert worden sind. Zum Schutz der Glykosidasen vor dem SDS im Probenpuffer wurde das Detergenz Octylglucosid (0,7 %) angewandt. Folgende Mengen wurden verwendet:

10  $\mu$ l Proteinlösung

1x SDS-Probenpuffer

0,7 % Octylglucosid

+ 5 IUB milliunits EndoH oder PNGaseF

Die Behandlung erfolgte für 1 h bei 37°C.

### **1.35.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach dem Standardprotokoll von Coligan 1995. Natrium dodecyl sulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das in einem bestimmten Verhältnis Proteine bindet, so dass deren Eigenladung durch die negative Ladung von SDS überdeckt wird. Aufgründessen besitzen SDS-beladene Proteine nahezu identische Masse-Ladungs-Verhältnisse und können entsprechend ihrer Masse elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die SDS-PAGE ist ein denaturierendes Verfahren, bei dem durch die Bindung des Detergenz die Tertiärstruktur des Proteins zerstört wird. Außerdem können durch die Zugabe von Reduktionsmitteln wie DTT zusätzlich die Disulfidbrücken zerstört werden. Als Trägermatrix wurde Polyacrylamid verwendet. Polyacrylamidgele bestehen aus Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED und APS. Acrylamid ist ein Neurotoxin, welches während der Polymerisation zu Polyacrylamid wird. Durch die Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer wie Methylenbisacrylamid erhält man ein klares, durchsichtiges Gel Ammoniumperoxidsulfat-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (APS) dient hierbei als Katalysator für die Polymerisation von Acrylamid, die als Radikalkettenreaktion abläuft APS bildet in Wasser freie Radikale (SO<sub>4</sub>), welche mit Acrylamid reagieren. Das entstandene Acrylamidradikal kann nun mit einem weiteren Acrylamidmolekül (Monomer oder Polymer) reagieren. TEMED (N', N', N', N'-Tetramethylethyldiamin) dient ebenfalls als Katalysator der Polymerisation, indem es die Radikalbildung von APS erleichtert und dabei selbst ein stabileres Radikal darstellt. Da Sauerstoff-Kontakt zum Kettenabbruch führt, wurde das Gel für die Polymerisation mit ddH<sub>2</sub>O überschichtet. Die 1 mm dicken Gele

wurden nach Anleitung hergestellt (s. Kapitel 3.13.6), in die Phase Apparatur (Phase, Lübeck) eingebaut und diese mit Laufpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 100 V/Gel für 2-3 h.

#### SDS-Trenngel (8 %) für Phase-Apparatur:

	9,0 ml/Gel
ddH <sub>2</sub> O	4,96 ml
1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8.8	2,25 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	1,80 ml
TEMED	4,5 $\mu$ l
APS 10%	45 $\mu$ l

#### SDS-Gradienten-Trenngel für Phase-Apparatur:

Das Gradientengel, bestehend aus einem linearen Acrylamidgradienten (4-10 %), wurde mittels eines Zweikammer-Gradientenmischers gegossen.

	4 %	10 %
ddH <sub>2</sub> O	2,6 ml	0,5 ml
1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8.8	1 ml	1 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	0,4 ml	1 ml
	-	1,5 ml
40 % Saccharoselösung	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
TEMED	23 $\mu$ l	23 $\mu$ l
APS 10%	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l

Das Trenngel wurde sofort in eine Gelkammer gegossen und mit Wasser überschichtet. Die Polymerisation erfolgte mindestens 1 bis 1,5 h bei RT. Danach erfolgte die Überschichtung mit dem Sammelgel.

#### SDS-Sammelgel 4 % für Phase-Apparatur:

	5 ml/Gel
ddH <sub>2</sub> O	3,18 ml
1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 6.8	1,26 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	0,50 ml
TEMED	5 $\mu$ l
APS 10%	25 $\mu$ l

Die Lösung wurde in die Gelkammer auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Die Polymerisation erfolgte mit eingestecktem Kamm, und zwar für mindestens 1,5 h bei RT. Anschließend wurde das Gel in einer Essigsäure/Methanolhaltigen Lösung fixiert und unter Vakuum für 30 Minuten getrocknet.

### 1.35.6 Blaue native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)

Die BN-PAGE ist ein Trennsystem für native Proteinkomplexe, bei dem denaturierende Substanzen wie SDS weder im Gel noch im Laufpuffer eingesetzt werden. Hierbei dient der Proteinfarbstoff Coomassie G-250 der Maskierung der Proteinladung. Dieser negativ geladene Farbstoff lagert sich an basische Aminosäurereste an, ohne jedoch die Protein-Protein-Interaktion zu beeinflussen. Für die Auftrennung von Membranproteinen wurden 1 mm dicke Gele bestehend aus einem linearen Acrylamidgradienten (4-10 %) mittels eines Zweikammer-Gradientenmischers gegossen. Das Trenngel wurde mit einem 4 % Sammelgel übergossen, um eine bessere Auflösung der Banden zu bekommen. Das Gel wurde danach mit den Proben und dem nativen Proteinmarker beladen.

Die Protein-Protein-Interaktionen der einzelnen Untereinheiten im Rezeptorkomplex wurden sowohl unter reduzierenden Bedingungen, d.h. mittels DTT (100mM) als auch mit Hilfe von denaturierenden Substanzen wie SDS (1 %) untersucht. Die Gele wurden nach folgender Anleitung hergestellt:

Trenngel für Phase-Apparatur:

9 ml/Gel	4 %	10 %
ddH <sub>2</sub> O	2,4 ml	0,9 ml
3x Gelpuffer	1,43 ml	1,43 ml
30 % Acrylamid/0,8%	0,6 ml	1,43 ml
Bisacrylamid (37,5:1)		
Glycerin	-	0,75 ml
TEMED	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
APS 10%	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

## Sammelgel 4 % für Phase-Apparatur:

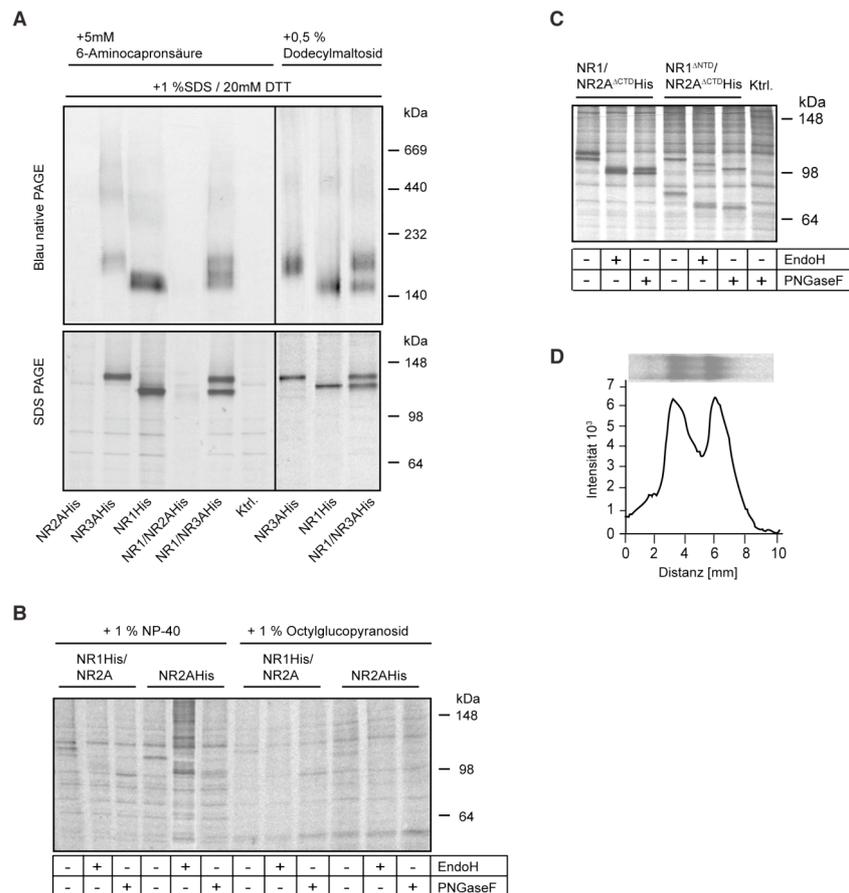
	5 ml/Gel
ddH <sub>2</sub> O	2,64 ml
3x Gelpuffer	1,67 ml
30 % Acrylamid/0,8%	0,667 ml
Bisacrylamid (37,5:1)	
TEMED	4 $\mu$ l
APS 10%	20 $\mu$ l

Die Proben wurden bei einer konstanten Spannung von 120 V/2-3h aufgetrennt. Das von Schägger und Jagow beschriebene Puffersystem bestand aus Anoden- und Kathodenpuffer, wobei der Letztgenannte 0,005 % Serva Blue G enthielt. Im nächsten Schritt wurden die Gele mit einer Coomassielösung (7 %) für 4-5 Minuten angefärbt und anschließend mit einer Essigsäure- und Methanol-enthaltenden Lösung entfärbt. Es folgte das Trocknen des Gels für 30 Minuten unter Vakuum. Bei metabolisch-markierten Proteinproben erfolgte die Bandendetektion mit Hilfe des Kodak® BioMax MR Films. Die Cy5-NHS-Ester-markierten Proteinproben wurden nach der SDS-PAGE mit einem Gel-Bildwandler (Typhoon 9400, Amersham) detektiert.

## Ergebnisse

### **1.36 Native affinitätschromatographische Aufreinigung von NR1/NR2A- und NR1/NR3A-Rezeptorkomplexen anhand der Hexahistidyl-Markierung unter verschiedenen Bedingungen**

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es das Assemblierungsverhalten sowie die Untereinheiten-Stöchiometrie von NR1/NR2- bzw. NR1/NR3-Rezeptoren zu untersuchen. Außerdem sollten mögliche Determinanten der NMDA-Rezeptorasssemblierung identifiziert werden. Dazu wurden die cRNAs der entsprechenden NMDA-Rezeptor-Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert und die Oozyten mit radioaktivem [<sup>35</sup>S]-Methionin versetzt. Dies resultierte in der radioaktiven Markierung aller Methionin-enthaltenden, in Oozyten exprimierten, Proteine. Die spezifische Isolation der NMDA-Rezeptorkomplexe erfolgte durch die Affinitätschromatographie über die Hexahistidyl(6xHistidin)-Markierung von einer der ko-exprimierten NMDA-Rezeptoruntereinheiten. Da vermeintlich die Ausbildung von Cystein-vermittelten Disulfid-Brücken zwischen NMDA-Rezeptoruntereinheiten eine entscheidende Rolle bei der Zusammenlagerung spielt (Meddows et al., 2001, Papadakis et al., 2004), fand die Aufreinigung der Proteinuntereinheiten unter nativen Bedingungen statt. Hierbei wurden zunächst verschiedene Detergenzien, welche die Plasmamembran für die membranständigen NMDA-Rezeptoruntereinheiten imitieren sollen, erprobt. Für Dodecylmaltosid (0,5 %) und 6-Aminocaprinsäure (5 mM) wurde bereits gezeigt, dass sie eine hohe Proteinstabilität in Lösungen und eine gute Auftrennung von Proteinkomplexen bedingen können (Nicke et al., 1998). Die Auftrennung der NMDA-Rezeptorkomplexe erfolgte mit Hilfe der Blau-nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) bzw. der SDS-PAGE. Hierbei erfolgte die Analyse von einzelnexprimierten NMDA-Rezeptoruntereinheiten, d.h. NR1His-, NR2AHis- und NR3AHis-Untereinheiten, als auch von NMDA-Rezeptorkomplexen, wie NR1/NR3AHis- und NR1His/NR2A-Rezeptoren (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Aufreinigung und Auftrennung von nativen NR1/NR3A- und NR1/NR2A<sup>ΔCTD</sup>-Rezeptorkomplexen unter verschiedenen Bedingungen.** A) BN- (oben) und SDS-PAGE (unten) von NR2A-His-, NR3AHis-, NR1His-, NR1/NR2AHis- und NR1/NR3AHis-Untereinheiten-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten, nach [<sup>35</sup>S]-Methionin-Markierung und nativer Aufreinigung über eine 6xHistidin-Markierung der jeweiligen Untereinheiten. Die Solubilisierung der Proteinproben erfolgte mit 0,5 % Dodecylmaltosid bzw. 5 mM 6-Aminocaprinsäure. B) SDS-PAGE von aufgereinigten NR1His/NR2A- (Gelspuren 1-3 bzw. 7-9) und NR2AHis-Proteinproben (Gelspuren 4-6 und 10-12), wie in A) beschrieben, wobei zur Solubilisierung 1 % NP-40 bzw. 1 % Octylglucopyranosid eingesetzt wurde. C) Effiziente Aufreinigung von NR2A-Untereinheiten nach der Entfernung der C-terminalen Domäne (CTD), gezeigt mit SDS-PAGE der ko-aufgereinigten NR1His/NR2A<sup>ΔCTD</sup>-Untereinheiten (Gelspuren 1-3) und NR1<sup>ΔNTD</sup>His/NR2A<sup>ΔCTD</sup>-Untereinheiten (Gelspuren 4-6). Die Kontrollen (Ktrl.) stellen jeweils Proteinproben aus nicht-injizierten Oozyten dar. Die EndoH- und PNGaseF-Behandlung ist jeweils unterhalb der Gelspuren gekennzeichnet. D) Quantitative Analyse der Intensitäten der Proteinbanden von wt-NR1 und CTD-entfernten NR2A-Untereinheiten gezeigt in C).

Wie mit der BN-PAGE gezeigt, ist die Auflösung von NR1- und NR3A-Untereinheiten mit Dodecylmaltosid und 6-Aminocaprinsäure von vergleichbarer Qualität (Abb. 4.1A, oben; Gelspuren 2, 3 und 7,8). Nach Ko-Expression der beiden Untereinheiten, konnte jedoch mit Dodecylmaltosid eine bessere Auftrennung der NR1/NR3A-Rezeptorproteine im Gel erreicht werden (Abb. 4.1A, oben; Gelspuren 5 und 9). Aufgrund dessen wurde in

nachfolgenden Versuchen zur Solubilisierung von NR1/NR3A-Rezeptoren Dodecylmaltosid verwendet.

Im Falle der NR2AHis- bzw. NR1/NR2AHis-Untereinheiten konnte weder mit Dodecylmaltosid noch mit 6-Aminocaprinsäure eine erfolgreiche Solubilisierung erreicht werden (Abb. 4.1A, Gelspuren 1 und 4, n = 2). Nachfolgend sollten weitere Detergenzien (1 % NP-40 und 1 % Octylglucopyranosid) für die Aufreinigung von NR1/NR2A-Rezeptoren erprobt werden, welche neben ihrer Solubilisierungseigenschaften auch zur Stabilisierung von Endoglykosidasen verwendet werden. Sowohl mit NP-40 als auch Octylglucopyranosid konnte nur ein geringes Maß an Proteinen solubilisiert werden (Abb. 4.1B). Zudem wurden nach Expression von NR1His/NR2A-Rezeptorkomplexen, nur NR1His-Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 116 kDa detektiert (Abb. 4.1B, Gelspuren 1 und 7). Nach alleiniger NR2AHis-Expression konnte eine Proteinbande mit einer Laufhöhe von 110 kDa nachgewiesen werden, welche 70 kDa unter dem kalkulierten NR2A-Molekulargewicht liegt (Abb. 4.1B, Gelspuren 4 und 10) und ein Abbauprodukt der NR2A-Untereinheit darstellen könnte.

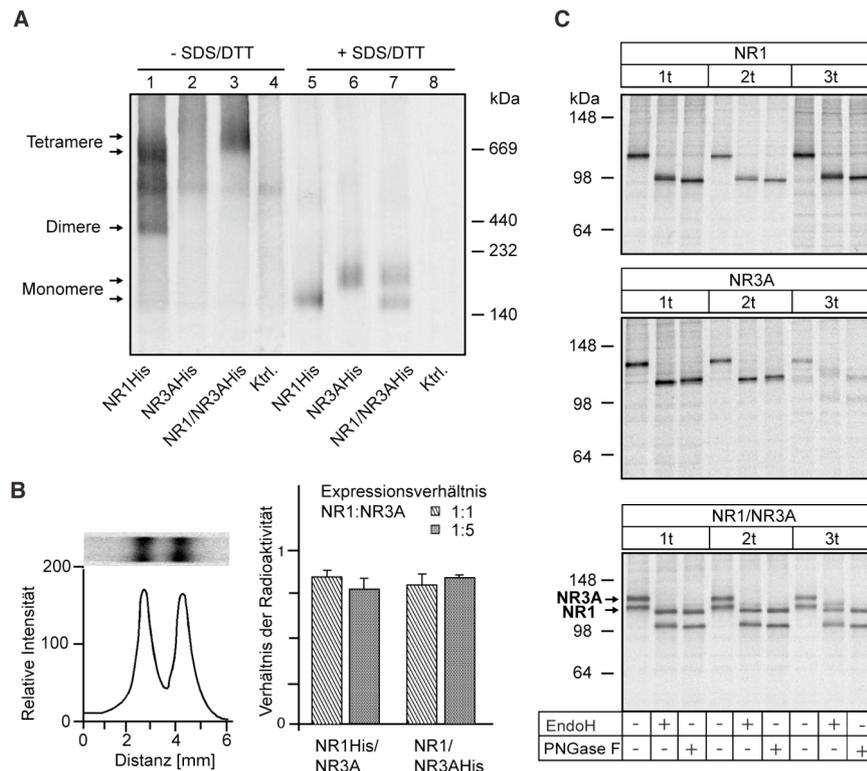
Im Folgenden sollte eruiert werden, ob möglicherweise die große intrazelluläre NR2A-C-terminale Domäne mit der C-terminal-lokalisierten 6xHis-Markierung der NR1-Untereinheiten interferieren und die biochemische Aufreinigung der Proteinkomplexe erschweren könnte. Daher wurden NR2A-Untereinheiten konstruiert, bei denen die CTD nach Aminosäure 930 durch eine Hexahistidyl-Markierung ersetzt wurde. Die Abbildung 4.1C zeigt, dass nach der NR2A-CTD-Deletion eine effiziente Aufreinigung von NR1/NR2A<sup>ΔCTD</sup>His-Rezeptorkomplexen über die Histidin-Markierung der NR2A-Untereinheit erreicht werden konnte (Abb. 4.1C, Gelspuren 1-3). Nach der Behandlung der Proteinproben mit den differentiell agierenden Endoglykosidasen EndoH oder PNGaseF konnte eine vergleichbar starke Reduktion der molekularen Massen der beiden Proteine detektiert werden (Abb. 4.1C, Gelspuren 2 und 3). Dies indiziert nur einen geringen Anteil an komplex-glykosylierten Proteinkomplexen. Zur präziseren Auftrennung der NR1- und NR2A<sup>ΔCTD</sup>-Untereinheiten wurden NTD-deletierte NR1- und NR2A<sup>ΔCTD</sup>His-Untereinheiten ko-exprimiert. Die NR1<sup>ΔNTD</sup>-Untereinheiten, mit einer molekularen Masse von 78 kDa (Abb. 4.1C, Gelspur 4) sind deutlich von den bei 110 kDa-migrierenden NR2A<sup>ΔCTD</sup>-

Proteinen zu unterscheiden. Hier führte die Behandlung mit PNGaseF zu Proteinbanden, deren molekulare Massen deutlich geringer waren, als jene der EndoH-behandelten (Abb. 4.1C, Gelspuren 5 und 6). Dies weist auf einen größeren Anteil an komplex-glykosylierten Proteinen hin. Die Analyse der Intensitäten der NR1/NR2A<sup>ΔCTD</sup>-Proteinbanden zeigte eine vergleichbare Menge an Radioaktivität in beiden Banden (Abb. 4.1D). Dies ist in Übereinstimmung mit einem theoretischen 2:2-Verhältnis, das anhand der Anzahl von Methioninen in den einzelnen Untereinheiten bestimmt ist (30 Methionine/NR1 und 28 Methionine/NR2A<sup>ΔCTD</sup>). Zusammenfassend wurde hier gezeigt, dass die Deletion der NR2A-CTD eine erfolgreiche Ko-Aufreinigung von NR1/NR2A-Untereinheiten ermöglicht hat. Davon ausgehend, dass NMDA-Rezeptoren Tetramere sind, scheinen NR1- und NR2-Untereinheiten in einem Verhältnis von 2:2 zu assemblieren.

### **1.37 Rolle der NTDs bei der Assemblierung von NR1/NR3A-Rezeptoren**

#### **1.37.1 Oligomerisierung und Stöchiometrie von NR1/NR3A-NMDA-Rezeptoren**

Die NR1-Untereinheiten sind in der Lage homo-oligomere Strukturen über Disulfid-Brückenbildung durch Cystein-Reste der NTDs auszubilden (Meddows et al, 2001). Im Unterschied dazu können NR2- und NR3-Untereinheiten nicht alleine assoziieren und benötigen die NR1-Untereinheit für eine effiziente Oligomerisierung (Perez-Otano, et al., 2001, Schuler et al., 2008). Da sowohl der Oligomerisierungsprozess als auch die Stöchiometrie des NR1/NR3A-NMDA-Rezeptors noch völlig ungeklärt sind, sollte dies mit Hilfe der BN- und SDS-PAGE im Nachfolgenden geklärt werden. Dafür wurde die cRNA von NR1- und NR3A-Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert und die exprimierten Proteine, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, aufgereinigt (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Charakterisierung der Oligomerisierung und Stöchiometrie von NR1- und NR3A-Untereinheiten anhand der BN- und SDS-PAGE.** A) Oozytenmembranen, die NR1His, NR3AHis oder NR1His/NR3A-Proteine exprimierten, wurden anhand der BN-PAGE in An- und Abwesenheit von SDS bzw. DTT analysiert. B) Untereinheiten-Stöchiometrie des hetero-oligomeren NR1/NR3A-NMDA-Rezeptors. *Xenopus laevis* Oozyten, die jeweils eine Histidin-markierte NR1- bzw. eine Histidin-markierte NR3A- mit einer nicht-markierten NR3A- bzw. einer nicht-markierten NR1-Untereinheit ko-exprimierten (NR1His/NR3A- bzw. NR1/NR3AHis) wurden mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert, affinitätschromatographisch aufgereinigt und die Rezeptorkomplexe über SDS-PAGE aufgetrennt. Die gemessenen Verhältnisse der Intensitäten der NR1- und NR3A-Untereinheiten wurden für ein 1:1- und ein 1:5- bzw. 5:1-Verhältnis bestimmt. C) SDS-PAGE von metabolisch markierten NR1His- (oben), NR3AHis- (mitte) und NR1/NR3AHis-Untereinheiten (unten). Die Sensitivität der markierten Untereinheiten auf die Glykosidasen EndoH und PNGaseF ist unterhalb des Gels gekennzeichnet.

Die unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgereinigten NR1-His-Untereinheiten migrierten bei der BN-PAGE als einzelne Untereinheiten bzw. als definierte Oligomere, die wahrscheinlich monomeren bzw. dimeren oder tetrameren NR1-Untereinheiten entsprechen (Abb. 4.2A, Gelspur 1). Zur weiteren Untersuchung der Anzahl von NR1-Untereinheiten in einem Komplex wurde das Detergenz SDS (1 %) eingesetzt. Dies führt zur Dissoziation von nicht-kovalenten Wechselwirkungen der Proteinuntereinheiten und resultierte in der Ausbildung von intermediären Komplexen mit niedrigerer molekularer Masse. Die Behandlung mit SDS reichte nicht aus, um eine Aufspaltung in monomere Strukturen zu verursachen (s. Kapitel 4.2.3, Abb. 4.3A, Gelspur 2).

Das zusätzliche Einsetzen der Reagenzie DTT (100 mM), welche intra- und intermolekulare Disulfidbrücken von Proteinen reduziert, resultierte jedoch in gut definierbaren monomeren NR1-Untereinheiten (Abb. 4.2A, Gelspur 5). Im Gegensatz dazu, wies die unter nicht-denaturierenden Verhältnissen isolierte NR3A-His-Untereinheit bei der BN-PAGE ausgedehnte, unspezifische Aggregate auf, die eine höhere molekulare Masse als die NR1-Oligomere besaßen (Abb. 4.2A, Gelspur 2). Diese breiten Banden enthalten undefinierbare Komplexe von NR3A-Untereinheiten. Die SDS- und DTT-Behandlung resultierte, vergleichbar mit dem Verhalten von SDS/DTT-behandelten NR1-His Proteinen (Abb. 4.2A, Gelspur 5), in einer einzelnen Proteinbande, die eindeutig der monomeren NR3A-Untereinheit entspricht (Abb. 4.2A, Gelspur 6). Dies zeigt, dass die NR3A-Untereinheit unter nicht-denaturierenden Bedingungen der Aufreinigung keine klaren homo-oligomeren Strukturen bildet, sondern zur Aggregation neigt. Nach Ko-Expression von NR3A- zusammen mit NR1-Untereinheiten hingegen, bildeten sich eindeutige hetero-oligomere Strukturen (Abb. 4.2A, Gelspur 3), die wahrscheinlich tetrameren Komplexen entsprechen und nach der Behandlung mit SDS und DTT zu monomeren NR1- und NR3A-Untereinheiten dissoziierten (Abb. 4.2A, Gelspur 7). Die densitometrische Auswertung der Proteinbandenintensitäten mit dem Phosphorimager zeigte auf, dass das Verhältnis der [<sup>35</sup>S]-Methionin-Radioaktivität, die in isolierten NR1 und NR3A-Polypeptiden enthalten waren, vergleichbar waren (Abb. 4.2A, Gelspur 7). Dies ist konsistent mit einem theoretischen 2:2-Verhältnis von NR1- und NR3A-Untereinheiten zueinander, welches aus der Anzahl der Methionine in den jeweiligen NR1- und NR3A-Untereinheiten resultiert (33 Methionine/NR3A-Untereinheit und 30 Methionine/NR1-Untereinheit). Zur genaueren Bestimmung der NR1/NR3A-Untereinheitenstöchiometrie sollten im Folgenden die NR1- und NR3A-Untereinheiten anhand der reduzierenden SDS-PAGE analysiert werden. Dabei wurden die NR1- oder die NR3A-Untereinheit im 1:1- bzw. 1:5-Verhältnis exprimiert und über die 6xHis-Markierung der NR1-Untereinheit aufgereinigt. Die quantitative Analyse der NR1- und NR3A-Banden zeigte auf, dass die ko-isolierten, nicht-markierten NR3-Untereinheiten 1,09-fach mehr Radioaktivität als die Histidin-markierten NR1-Polypeptide enthalten (Abb. 4.2B). Dies ist vereinbar mit einer Stöchiometrie von 2:2 der NR1- und NR3A-Untereinheiten. Außerdem ergab die Quantifizierung, dass der 5-fache Überschuss der NR3A-

Untereinheit keine Auswirkungen auf das relative Verhältnis der Radioaktivitäten zeigte (Abb. 4.2B), was auf ein stabiles Verhältnis der Untereinheiten innerhalb des NR1/NR3A-Heteromers hinweist. In einem inversen Experiment, bei dem die NR1-Untereinheit in einem 1:1- bzw. 5:1-Verhältnis exprimiert wurde und über die 6xHis-markierte NR3A-Untereinheit aufgereinigt wurde, zeigte die Quantifizierung der Proteinbandenintensitäten ein stabiles Verhältnis von 0,97:1 der NR1- zur NR3A-Untereinheit (Abb. 4.2B). Auch die Überexpression der NR1-Untereinheit gegenüber der Histidin-markierten NR3A-Untereinheit zeigte keine Auswirkungen auf das relative Verhältnis der Radioaktivitäten (Abb. 4.2B). Die annähernd identischen Verhältnisse, die aus allen durchgeführten Experimenten resultierten, deuten daraufhin, dass NR1- und NR3A-Untereinheiten mit einer unveränderlichen Stöchiometrie assemblieren. Basierend auf der Annahme einer tetrameren Struktur der NR1/NR3-NMDA-Rezeptoren, zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse eine feste Stöchiometrie von 2 NR1- und 2 NR3-Untereinheiten im hetero-oligomeren NR1/NR3-NMDA-Rezeptor. Des Weiteren weist die NR3-Untereinheit keine Dimerisierung auf, wogegen die NR1-Untereinheit homo-oligomere Komplexe bilden kann.

### **1.37.2 Proteinexpressions-Stabilität von einzelnexprimierten NR1- und NR3-Untereinheiten**

Um der Fragestellung nachzugehen, ob die spezifischen Eigenschaften der NR1- und NR3A-Untereinheiten bezüglich der Homo-Oligomerisierung mit einer unterschiedlichen subzellulären Lokalisation in der Zelle oder mit unterschiedlichen Eigenschaften der Proteinstabilität zusammenhängen, sollte eruiert werden, ob nach einer Einzel- bzw. Ko-Expression von NR1- und NR3A-Untereinheiten Unterschiede in der Proteinstabilität der jeweiligen Untereinheiten herrschen. In Abbildung 4.2C (unteres Bild, erste Gelspur) sind zwei Proteinbanden gezeigt, die jeweils der hexahistidyl-markierten NR1- und der NR3A-Untereinheit mit den apparenten molekularen Massen von 116 und 128 kDa entsprechen. Die Einzelexpression der jeweiligen Untereinheiten wies jedoch wesentliche Unterschiede in der Proteinstabilität auf. Trotz der vergleichbaren Expressionsniveaus der jeweiligen NR1- und NR3A-

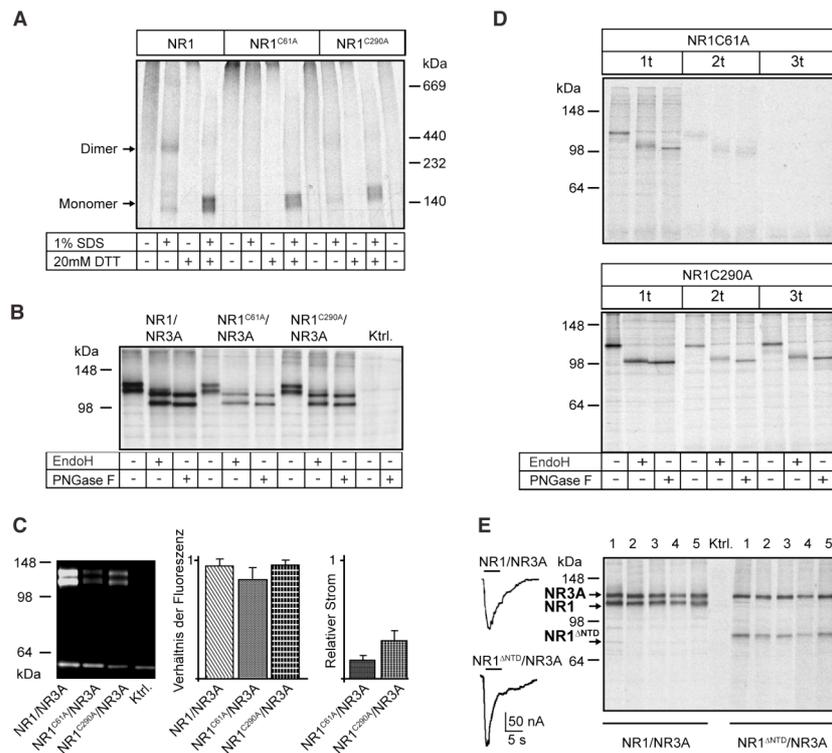
Untereinheiten einen Tag nach der Injektion der cRNA, wurde bereits nach 3 Tagen eine Abnahme der Intensität der NR3A-Proteinbande beobachtet (Abb. 4.2C, mittleres Bild), wohingegen die Intensität der NR1-Proteinbanden auch nach 3 Tagen unverändert blieb (Abb. 4.2C, oberes Bild und Abb. 3). Ko-Expression der beiden Untereinheiten erhöhte die Expression der ansonsten nicht-stabilen NR3A-Untereinheit auf ein Niveau, das vergleichbar mit dem der NR1-Untereinheit war (Abb. 4.2C, unteres Bild). Somit wurde hier gezeigt, dass NR1- und NR3A-Untereinheiten unterschiedlich stabile Proteinexpressionen aufzeigen, wenn sie einzeln exprimiert werden und die Stabilität der NR3A durch die Ko-Expression mit der NR1-Untereinheit deutlich erhöht wird.

Als nächstes stellte sich die Frage nach der subzellulären Lokalisation der NR1- und NR3A-Untereinheiten. Dazu wurde das Glykosylierungsverhalten der jeweiligen Untereinheiten anhand der Sensitivität auf unterschiedliche Endoglykosidasen beobachtet. Die Deglykosylierung der 6xHistidin-markierten NR1-Untereinheit mit den Glykosidasen, Endo H bzw. PNGaseF resultierte in der Reduktion der molekularen Massen um je 15 kDa (Abb. 4.2C, oberes Bild, Gelspuren 2, 3, 5, 6, 8, und 9). Dies weist auf ein Freistellen von N-glykosylierten Mannoseseitenketten und die Retention von reifen NR1-Untereinheiten im Endoplasmatischen Retikulum hin. Vergleichbar stellte sich heraus, dass die NR3A-Untereinheit die gleiche Sensitivität auf beide Endoglykosidasen, sowohl Endo H als auch PNGase F, aufweist (Abb. 4.2C, mittleres Bild). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass einzelnexprimierte NR1- und NR3A-Untereinheiten im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten werden, auch wenn sie Unterschiede in der Ausbildung von homo-oligomeren Strukturen aufweisen.

### **1.37.3 Effekte der Prävention der Ausbildung von NR1-Disulfidbrücken**

Zahlreiche Untersuchungen der NTDs von iGluRs haben aufgezeigt, dass diese Domänen intermolekular miteinander interagieren und eine Rolle bei der Rezeptorassembly zu spielen scheinen (Kuusinen et al., 1999; Kunishima et al., 2000). Anhand dieser Daten wurde ein Modell der Dimerisierung von Homo-Dimeren zum tetramären NMDA-Rezeptorkomplex bei NR1/NR2-Rezeptoren entwickelt. Von Papadakis und Kollegen (2004) wurden zwei

Cysteinreste (Cystein 61 und 290) in der NR1-NTD identifiziert, die vermeintlich wichtig für die Oligomerisierung von NMDA-Rezeptoruntereinheiten sind. Um den noch ungeklärten Einfluss dieser Aminosäure-Reste auf die Assemblierung und Stöchiometrie von NR1/NR3A-NMDA-Rezeptoren zu untersuchen, wurden diese Cysteinreste (NR1<sup>C61A</sup> und NR1<sup>C290A</sup>) in Alanine mutiert, anschließend einzelnexprimiert und über die BN-PAGE aufgetrennt (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3: Biochemische und elektrophysiologische Untersuchung der mutierten NR1<sup>C61A</sup> bzw. NR1<sup>C290A</sup> und NTD-deletierten NR1-Konstrukten nach Ko-Expression mit der NR3A-Untereinheit.** A) *Xenopus laevis* Oozyten, die NR1His<sup>-</sup>, NR1His<sup>C61A</sup>- und NR1His<sup>C290A</sup>-Untereinheiten exprimierten, wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt und die Homo-Oligomerisierung der jeweiligen Untereinheiten durch die BN-PAGE analysiert. B) SDS-PAGE der metabolisch markierten Rezeptoren bestehend aus NR1-, NR1<sup>C61A</sup>- bzw. NR1<sup>C290A</sup>- jeweils ko-exprimiert mit Histidin-markierten NR3A-Untereinheiten. Die Behandlung der markierten Untereinheiten mit den Glykosidasen EndoH und PNGaseF ist unterhalb der Gelspuren gekennzeichnet. C) SDS-PAGE von Cy5-, d.h. Zell-Oberfläche-markierten NR1<sup>C61A</sup>/NR3AHis- und NR1<sup>C290A</sup>/NR3AHis-Rezeptoren und die maximal-induzierbaren Glyzin-Ströme verglichen mit den wt-NR1/NR3AHis-Rezeptoren. D) Expressionsmuster von einzelnexprimierten NR1His<sup>C61A</sup>-Untereinheiten (oben) zeigte eine deutliche Reduktion der Proteinmenge im Vergleich zur wt-NR1-Untereinheit (s. zum Vergleich Abb. 4.1.), wobei NR1His<sup>C290A</sup>-Untereinheiten (unten) nur einen geringen Abfall der Proteinexpression zeigen. E) Vergleich der Glyzin-vermittelten Ströme (links) und der Stabilität der Proteinexpression von NR1/NR3A- und NR1<sup>NTD</sup>/NR3A-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Expressionsdauer (1-5 Tage, rechts, Gelspuren 1-5).

Die Anwesenheit von 1 % SDS führte zum Verlust von Homo-Oligomeren bei beiden mutierten NR1<sup>C61A</sup>- und NR1<sup>C290A</sup>-Untereinheiten (Abb. 4.3A, Gelspuren 6 und 10). Die Analyse dieser NR1-Mutanten nach Ko-Expression mit der wt-NR3A-Untereinheit über die SDS-PAGE zeigte, dass NR1<sup>C61A</sup>/NR3A- und NR1<sup>C290A</sup>/NR3A-Untereinheiten jeweils ko-aufgereinigt werden können (Abb. 4.3B, Gelspuren 4-6 und 7-9). Trotz der reduzierten Intensität der [<sup>35</sup>S]-Methionin-markierten Proteinbanden von NR1<sup>C61A</sup>/NR3A- und NR1<sup>C290A</sup>/NR3A-Rezeptorkomplexen, waren die Verhältnisse der jeweiligen NR1- und NR3A-Untereinheiten vergleichbar zum wt-NR1/NR3A-Rezeptor (Abb. 4.3B).

Die funktionelle Untersuchung von wt und Cystein-mutierten NR1/NR3A-Rezeptoren zeigte, dass die durchschnittlichen maximal-induzierbaren Rezeptorströme nach der Applikation von sättigenden Glyzin-Konzentrationen (1 mM) bei NR1<sup>C61A</sup>/NR3A- und NR1<sup>C290A</sup>/NR3A-Rezeptoren signifikant reduziert waren (65 % Reduktion;  $p < 0,01$ , ungepaarter Student's t-Test; Abb. 4.3C). Da ein verminderter Einbau in die Zellmembran oder eine Veränderung der Stöchiometrie der NR1<sup>C61A</sup>/NR3A- und NR1<sup>C290A</sup>/NR3A-Rezeptorkomplexe als Ursache nicht ausgeschlossen werden kann, wurden Zelloberfläche-Markierungs-Experimente mit dem membran-impermeablen NHS-Ester Cy5 durchgeführt. Im Einklang mit der elektrophysiologischen Analyse, zeigten die affinitätschromatographisch isolierten Cy5-markierten NR1<sup>C61A</sup>/NR3A- und NR1<sup>C290A</sup>/NR3A-Untereinheiten, verglichen zum wt-Rezeptor, eine verringerte Insertion in die Zellmembran (Abb. 4.3C). Die Intensitätsanalyse der Cy5-Fluoreszenzen von mutierten bzw. wt-NR1-Untereinheiten im Vergleich zu der jeweiligen NR3A-Proteinbande bestätigte eine unveränderte Stöchiometrie der jeweiligen Untereinheiten zueinander (Abb. 4.3C). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich NR1<sup>C61A</sup>/NR3A- und NR1<sup>C290A</sup>/NR3A-Rezeptoren auf der Zelloberfläche befinden, wobei eine unveränderte Stöchiometrie von 2 NR1- und 2 NR3A-Untereinheiten beibehalten wird.

Somit bleibt die Rolle der Cysteine 61 und 290 in der NR1-NTD nach wie vor ungeklärt. Da sie die Assemblierung bzw. die Stöchiometrie nicht entscheidend beeinflusst haben, tragen sie möglicherweise zur Stabilität von NR1-Untereinheiten bei. Um dies zu untersuchen, wurde das Expressionsmuster von einzelnexprimierten NR1<sup>C61A</sup>- und NR1<sup>C290A</sup>-Untereinheiten bis zu 3 Tagen nach der Injektion der jeweiligen cRNA in Oozyten analysiert. Die NR1<sup>C61A</sup>-

Untereinheit zeigte eine Abnahme der Proteinmenge bereits am 2. Tag der Expression (s. zum Vergleich Abb. 4.2B, oberes Bild und Abb. 4.3D, oberes Bild), wobei das Expressionsverhalten der NR1<sup>C290A</sup>-Untereinheit im Vergleich zum wt nicht verändert war (Abb. 4.2B, oberes Bild und Abb. 4.3D, unteres Bild). Demzufolge sind, basierend auf den elektrophysiologischen Ergebnissen sowie der metabolischen und Zell-Oberflächen-Markierung, die Cysteinreste 61 und 290 wichtig für die Proteinstabilität und Faltung der NR1-Untereinheit sowie die Oberflächeninsertion von NR1-enthaltenden Rezeptoren, jedoch nicht für die Stöchiometrie oder Assemblierung des NR1/NR3-Rezeptors.

#### **1.37.4 Auswirkung der NR1-NTD-Deletion auf die Assemblierung und Funktion von NR1/NR3A-Rezeptoren**

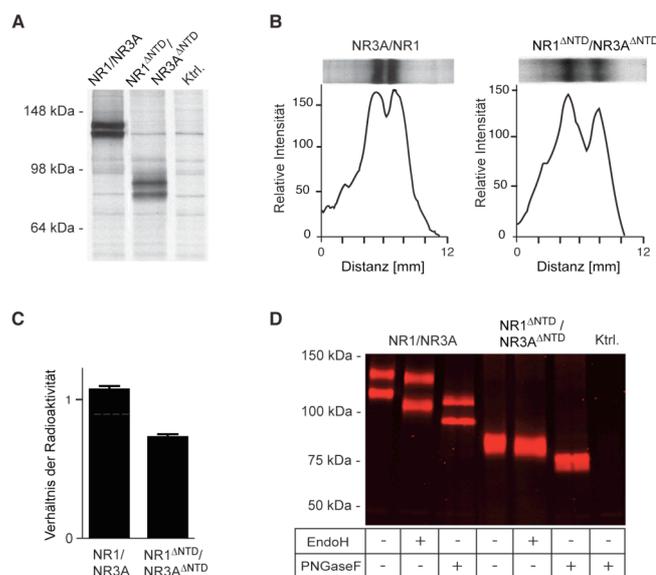
Zur weiteren Untersuchung der Rolle der NR1-NTD bei der Homo-Oligomerisierung und der NR1/NR3A-Rezeptorassemblierung, wurden NTD-deletierte NR1(NR1<sup>ΔNTD</sup>)- zusammen mit NR3A-Untereinheiten in Oozyten exprimiert und elektrophysiologisch sowie biochemisch untersucht (Abb. 4.3).

Die Ko-Expression resultierte in funktionellen Rezeptoren mit unveränderten maximal-induzierbaren Rezeptorströmen im Vergleich zum NR1/NR3A-Rezeptor (Abb. 4.3E, links). Dies lässt auf eine effiziente Assemblierung der NR3A- mit der NR1<sup>ΔNTD</sup>-Untereinheit schließen. Für die biochemische Untersuchung wurden NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3AHis-Untereinheiten bis zu 5 Tagen ko-exprimiert und wie in Kapitel 4.1 beschrieben aufgereinigt. In der Abbildung 4.3E (rechts, Gelspuren 6-10) sind jeweils zwei [<sup>35</sup>S]-markierte Untereinheiten gezeigt, die den NR1<sup>ΔNTD</sup>- und NR3A-Untereinheiten mit den molekularen Massen von 79 kDa und 128 kDa entsprechen. Die Quantifizierung der NR3A- und NR1<sup>ΔNTD</sup>-Bandenintensitäten zeigt ein Verhältnis von 1:0,6±0,1 (n = 3) (Abb. 4.3E, rechts). Aufgrund der reduzierten Anzahl der Methionine (18) in NR1<sup>ΔNTD</sup>- verglichen mit der NR3A-Untereinheit ist das 1:0,6±0,1-Verhältnis konsistent mit dem theoretischen Verhältnis von 1:0,55. Da sowohl die absoluten Intensitäten der NR1 und NR1<sup>ΔNTD</sup>-Untereinheit als auch die relativen Verhältnisse zur ko-exprimierten NR3A Ähnlichkeiten aufwiesen, scheinen sowohl die wt-NR1 als auch die NR1<sup>ΔNTD</sup>- mit der NR3A-Untereinheit in einem unveränderten Verhältnis von 2:2, mit ähnlicher Effizienz, zu assemblieren.

Somit bedeutet dies, dass die Entstehung von NR1/NR3A-Rezeptorkomplexen nicht von der NTD der NR1-Untereinheit abhängt, da weder die Funktion noch die Assemblierung dieser Rezeptoren nach der NTD-Entfernung beeinträchtigt waren. Die veränderte Oberflächenexpression der NR1<sup>C61A</sup>/NR3A- und NR1<sup>C290A</sup>/NR3A-Rezeptoren ist deswegen eher auf eine inkorrekte Faltung oder einen fehlerhaften Einbau der Rezeptoren in die Membran zurückzuführen.

### 1.37.5 Die Effizienz der NR1/NR3A-Rezeptorassemblierung und der Zelloberflächen-Insertion sind nicht durch NTDs bedingt

Es stellte sich die Frage, ob die vollständige NTD-Deletion einen Einfluss auf die NR1/NR3A-Rezeptorassemblierung oder Zelloberflächenexpression besitzt. Um diese Fragestellung zu klären, wurden die wt- und NTD-deletierten NR1/NR3A-Untereinheiten wie in Kapitel 4.1 beschrieben, aufgereinigt und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4.4).



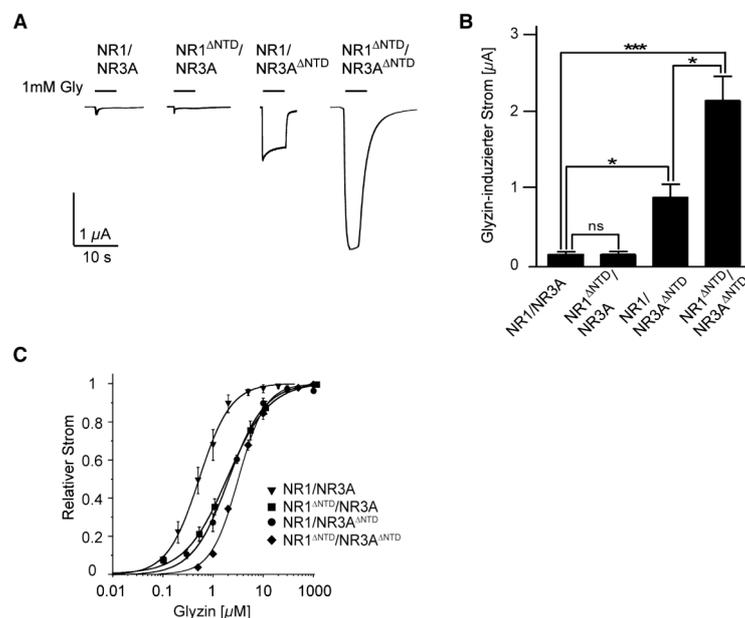
**Abb. 4.4.: Assemblierung von NR1/NR3A- und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptorkomplexen nach rekombinanter Expression in *Xenopus laevis* Oozyten.** A) NR1/NR3A- und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-exprimierende *Xenopus laevis* Oozyten wurden nach metabolischer Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin, affinitätschromatographisch aufgereinigt und über die SDS-PAGE analysiert. Die NR3A- und die NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Untereinheiten konnten jeweils mit einer Histidin-markierten NR1- bzw. NR1<sup>ΔNTD</sup>-Untereinheit ko-aufgereinigt werden. B) und C) Quantifizierung der Intensitäten der [<sup>35</sup>S]-markierten NR1- und NR3A- bzw. NR1<sup>ΔNTD</sup>- und NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Proteinbanden aus A). D) Vergleich der Cy5-Oberfläche-markierten NR1/NR3A- (Gelspuren 1-3) und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren (Gelspuren 4-6), welche affinitätschromatographisch aus Oozyten aufgereinigt und über die SDS-PAGE getrennt wurden. Die Kontrolle (Ktrl.) besteht aus Proteinproben nicht-injizierter Oozyten. Die Behandlung mit den Endoglykosidasen EndoH und PNGaseF ist unterhalb der jeweiligen Banden gekennzeichnet.

Im Falle der wt-NR1/NR3A-Rezeptoren wurden zwei Banden mit molekularen Massen von 116 und 128 kDa detektiert, die der NR1His- und der ko-aufgereinigten NR3A-Untereinheit entsprechen (Abb. 4.4A, Gelspur 1). Die Expression von NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren resultierte ebenfalls in der Ko-Aufreinigung von beiden Untereinheiten. Diese wiesen jeweils reduzierte molekulare Massen von 86 kDa bei der NR1<sup>ΔNTD</sup>- und 78 kDa bei der NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Untereinheit auf (Abb. 4.4A, Gelspur 2). Die Analyse der relativen Intensitäten der Proteinbanden in den NR1/NR3A- bzw. NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Gelbanden ergab vergleichbare Intensitäten für beide Rezeptorkomplexe (Abb. 4.4B). Grund hierfür ist die absolute Zahl der Methioninreste pro Untereinheit (30 Methionine/NR1 und 33 Methionine/NR3A; 18 Methionine/NR1<sup>ΔNTD</sup> und 16 Methionine/NR3A<sup>ΔNTD</sup>). Daher, zeigten sowohl die wt als auch die NTD-deletierten Rezeptorkomplexe eine NR1:NR3A-Untereinheitenstöchiometrie, die einem theoretischen 1:1-Verhältnis entspricht (Abb. 4.4C). Die gemessenen Verhältnisse von 1,07:1 und 1,29:1 (wt vs. NTD-entfernte Rezeptoren) stimmen mit den theoretischen Verhältnissen von 0,9:1 und 1,1:1 annähernd überein. Des Weiteren zeigte die Oberflächen-Färbung der rekombinanten wt und NTD-deletierten NR1/NR3A-Rezeptoren mit dem membran-impermeablen Farbstoff Cy5-NHS-Ester vergleichbare Mengen von membranständigen Rezeptoren (Abb. 4.4D, Gelspuren 1-3 und 4-6). Aufgrund der geringen Unterschiede der molekularen Masse erscheinen NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren als eine Doppelbande (Abb. 4.4D, Gelspuren 4-6). Die stärkere Reduktion der molekularen Masse nach der Behandlung mit PNGaseF im Vergleich zu EndoH deutet auf komplex N-glykosylierte Rezeptorproteine hin, welche an der Zelloberfläche lokalisiert sind (Abb. 4.4D, Gelspuren 3 und 6 bzw. 2 und 5). Somit hat die NTD-Entfernung von NR1- und NR3A-Untereinheiten keine Auswirkungen auf die Expression oder den Einbau der Rezeptorkomplexe in die Zellmembran.

## 1.38 NTDs determinieren die Funktion von NR1/NR3-Rezeptoren

### 1.38.1 Die Entfernung der NTDs der NR1/NR3A-Untereinheiten resultiert in funktionellen, hoch effizienten Glyzin-aktivierbaren NMDA-Rezeptoren

In einer vorherigen Studie wurde gezeigt, dass die NTDs das Ausmaß der  $Zn^{2+}$ -Potenzierung von Glyzin-induzierten NR1/NR3-Rezeptorströmen beeinflussen können (Madry et al., 2008). Da die biochemische Analyse der NR1/NR3A-Rezeptorkomplexe aufgezeigt hat, dass die NTDs keine Determinanten für die Rezeptorassembly darstellen, ergibt sich die Frage, ob sie möglicherweise eine Rolle bei der Funktion dieser Rezeptoren spielen könnten (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5.: Funktionelle Analyse von wt- und NTD-deletierten NR1/NR3A-Rezeptoren.** A) Beispiele der maximalen Stromantworten in Gegenwart sättigender Glycin-Konzentrationen (1mM) von NR1/NR3A-, NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A-, NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup>- und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren, die in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert wurden. Zu beachten ist hier die Erhöhung der NR1/NR3A-Rezeptoraktivität nach Entfernung beider NTDs. B) Quantitative Analyse der durchschnittlichen maximalen Glycin-induzierten Rezeptorströme von wt, partiell- und vollständig NTD-deletierten NR1/NR3A-Rezeptorkomplexe. C) Vergleich der Dosiswirkung von Glycin bei wt, partiell- und vollständig deletierten NR1/NR3A-Rezeptoren. Die vollständige NTD-Entfernung bedingt eine signifikante Erniedrigung der apparenten Glycin-Affinität (NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup> EC<sub>50</sub>: 33,7±2,4 μA, n = 10; p < 0,01, Student's t-Test) gegenüber dem wt-NR1/NR3A-Rezeptor.

Eine detaillierte Analyse von NTD-entfernten NR1/NR3A-Rezeptoren zeigte auf, dass die Deletion beider NTDs von NR1- und NR3A-Untereinheiten, verglichen mit den Maximalströmen des wt-NR1/NR3A-Rezeptors (NR1/NR3A I<sub>max</sub>:

0,103±0,02  $\mu\text{A}$ ,  $n = 11$ ; Abb. 4.5A, B und Tab. 4.1) in einer > 20-fachen Effizienzerhöhung von Glyzin-induzierten Maximalströmen resultierte (NR1 <sup>$\Delta$ NTD</sup>/NR3A <sup>$\Delta$ NTD</sup>  $I_{\text{max}}$ : 2,3  $\mu\text{A}$ ±0,41;  $n = 10$ ;  $p < 0.001$ , ungepaarter Student's t-Test, Abb. 4.5A, B and Tab. 4.1). Im Vergleich zum wt, bewirkte die Applikation von Glyzin (1mM) bei den partiell-deletierten NR1 <sup>$\Delta$ NTD</sup>/NR3A-Rezeptoren eine vergleichbar kleine Stromantwort (NR1 <sup>$\Delta$ NTD</sup>/NR3A  $I_{\text{max}}$ : 0,108±0,05  $\mu\text{A}$ ,  $n = 6$ ; Abb. 4.5A, B und Tab. 4.1). Die Stromantwort von NR1/NR3A <sup>$\Delta$ NTD</sup>- Rezeptoren war im Vergleich zum wt um das 9-fache erhöht (NR1/NR3A <sup>$\Delta$ NTD</sup>  $I_{\text{max}}$ : 0.9±0.24  $\mu\text{A}$ ,  $n = 11$ ;  $p < 0,05$ , ungepaarter Student's t-Test, Abb. 4.5A, B and Tab. 4.1). Der Vergleich der Glyzin-Dosiswirkungskurven von wt und NTD-entfernten NR1/NR3A-Rezeptoren zeigte, dass sich die EC<sub>50</sub>-Werte nur geringfügig erhöhen (NR1/NR3A EC<sub>50</sub>: 6,5±1,16  $\mu\text{M}$ ,  $n = 7$ ; NR1 <sup>$\Delta$ NTD</sup>/NR3A EC<sub>50</sub>: 19,3±3,2  $\mu\text{M}$ ,  $n = 6$ ; NR1/NR3A <sup>$\Delta$ NTD</sup> EC<sub>50</sub>: 23,6±0,95  $\mu\text{M}$ ,  $n = 7$  und NR1 <sup>$\Delta$ NTD</sup>/NR3A <sup>$\Delta$ NTD</sup> EC<sub>50</sub>: 33,7±2,4  $\mu\text{M}$ ,  $n = 10$ ; Tab. 4.1). Somit wurde hier gezeigt, dass die NTD-Deletion von beiden, sowohl von NR1- und im Besonderen der NR3A-Untereinheiten zu einer signifikanten Erhöhung der Glyzin-induzierten Strömen führte, ohne die Glyzin-Affinität bedeutend zu beeinträchtigen.

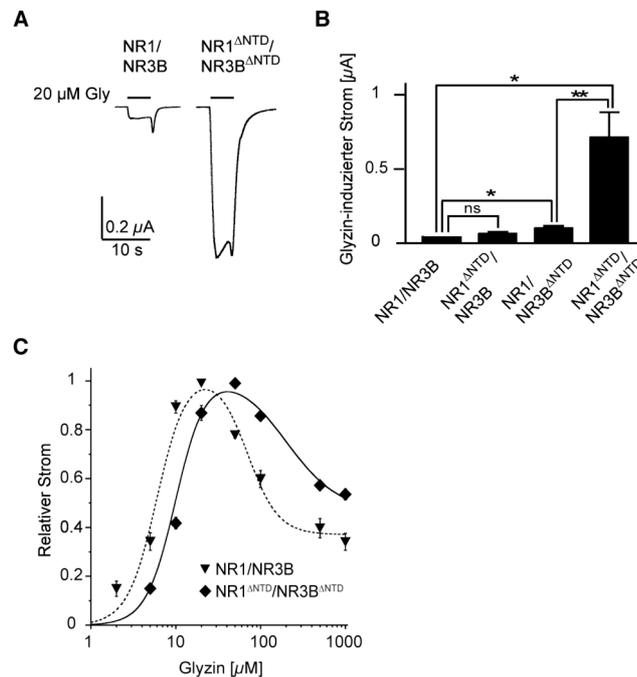
Tabelle 4.1: Pharmakologische Untersuchung von wt, partiell und vollständig NTD-deletierten NR1/NR3A-NMDA-Rezeptoren

Untereinheiten-zusammensetzung	EC <sub>50</sub> Glyzin [ $\mu\text{M}$ ]	$I_{\text{max}}$ [ $\mu\text{A}$ ]	Relative MDL-Potenzierung
NR1/NR3A	6,5±1,16 (11)	0,103±0,02 (11)	28,7±2,8 (3)
NR1 <sup><math>\Delta</math>NTD</sup> /NR3A	19,3±3,2 (6)	0,108±0,05 (9)	21,6±1,36 (4)
NR1/NR3A <sup><math>\Delta</math>NTD</sup>	23,6±0,95 (4)	0,9±0,24 (10)	3,5±0,85 (4)
NR1 <sup><math>\Delta</math>NTD</sup> /NR3A <sup><math>\Delta</math>NTD</sup>	33,7±2,4 (10)	2,3±0,41 (3)	2,2±0,19 (5)

### 1.38.2 NTD-Entfernung von NR1- und NR3B-Untereinheiten bewirkt, ähnlich den NR1/NR3A-Rezeptoren, die Erhöhung Glyzin-hervorgerufener NR1/NR3B-Rezeptorströme

Wie schon zuvor gezeigt, bewirkt die Zugabe von sättigenden Glyzin-Konzentrationen (20  $\mu\text{M}$ ) geringe NR1/NR3B-Rezeptorströme, ähnlich den NR1/NR3A-Rezeptorströmen (Madry et al., 2007b) (NR1/NR3B  $I_{\text{max}}$ : 0,03±0,002

$\mu\text{A}$ ,  $n = 3$ , Abb. 4.6A und Tab. 4.2), wobei NR1/NR3B-Rezeptorströme über die Zeit aufgetragen eine markante zweite Spitze aufweisen, die aus dem Auswaschen des Agonisten resultiert („Rebound-Effekt“; (Madry et al., 2007b), Abb. 4.6A).



**Abb. 4.6.: Analyse der Funktion von wt- und NTD-entfernten NR1/NR3B-Rezeptoren.** A) Vergleich der Maximalströme bei sättigenden Glycin-Konzentrationen (20  $\mu\text{M}$ ) von NR1/NR3B und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptorkomplexen nach Expression in *Xenopus laevis* Oozyten. Der Balken indiziert die Dauer der Glycin-Applikation (5 s). B) Die quantitative Analyse der gemittelten maximalen Glycin-Ströme von wt, partiell und vollständig NTD-deletierten NR1/NR3B-Rezeptoren ergab einen signifikanten Unterschied der vollständig NTD-entfernten NR1/NR3B-Rezeptorströme im Vergleich zum wt (~20-fache Erhöhung;  $p > 0,001$ ; gepaarter Student's t-Test; indiziert durch Sternchen). C) Vergleich der Glycin-Dosis-Wirkungs-Analyse von wt und NTD-deletierten NR1/NR3B-Rezeptorkomplexen. Die apparente Glycinaffinität ist nach der NTD-Deletion nur geringfügig erhöht ( $\text{EC}_{50}$ : NR1/NR3B:  $6 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ,  $n = 10$  und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>:  $11,4 \pm 0,51 \mu\text{M}$ ,  $n = 9$ ).

Die partielle Entfernung der NR1- bzw. NR3B-NTDs erhöhte die Rezeptorströme nur geringfügig (NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3B  $I_{\text{max}}$ :  $0,06 \pm 0,01 \mu\text{A}$ ,  $n = 4$ , n.s., gepaarter Student's t-Test und NR1/NR3B<sup>ΔNTD</sup>  $I_{\text{max}}$ :  $0,09 \pm 0,02 \mu\text{A}$ ,  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ; gepaarter Student's t-Test; Abb. 4.6A, B und Tab. 4.2). Die vollständige Entfernung der NTDs jedoch, erhöhte die Glycin-induzierten Ströme dieser NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren 20-fach, was im Einklang mit dem beobachteten Effekt bei den NTD-deletierten NR1/NR3A-Rezeptoren ist (NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>  $I_{\text{max}}$ :  $0,7 \pm 0,18 \mu\text{A}$ ,  $n = 5$ ;  $p < 0,05$  ungepaarter Student's t-

Test, Abb. 4.6A, B und Tab. 4.2). Ferner konnte anhand der Analyse der Dosis-Wirkungskurven von wt und NTD-deletierten NR1/NR3B-Rezeptoren kein signifikanter Unterschied der  $EC_{50}$ -Werte von wt und NTD-entfernten NR1/NR3B-Konstrukten beobachtet werden (NR1/NR3B  $EC_{50}$ :  $6 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ,  $n = 10$ ; NR1 <sup>$\Delta$ NTD</sup>/NR3B  $EC_{50}$ :  $12,6 \pm 0,69 \mu\text{M}$ ,  $n = 4$ ; NR1/NR3B <sup>$\Delta$ NTD</sup>  $EC_{50}$ :  $9,6 \pm 0,95 \mu\text{M}$ ,  $n = 4$  and NR1 <sup>$\Delta$ NTD</sup>/NR3B <sup>$\Delta$ NTD</sup>  $EC_{50}$ :  $11,4 \pm 0,51 \mu\text{M}$ ,  $n = 9$ ; Tab. 4.2).

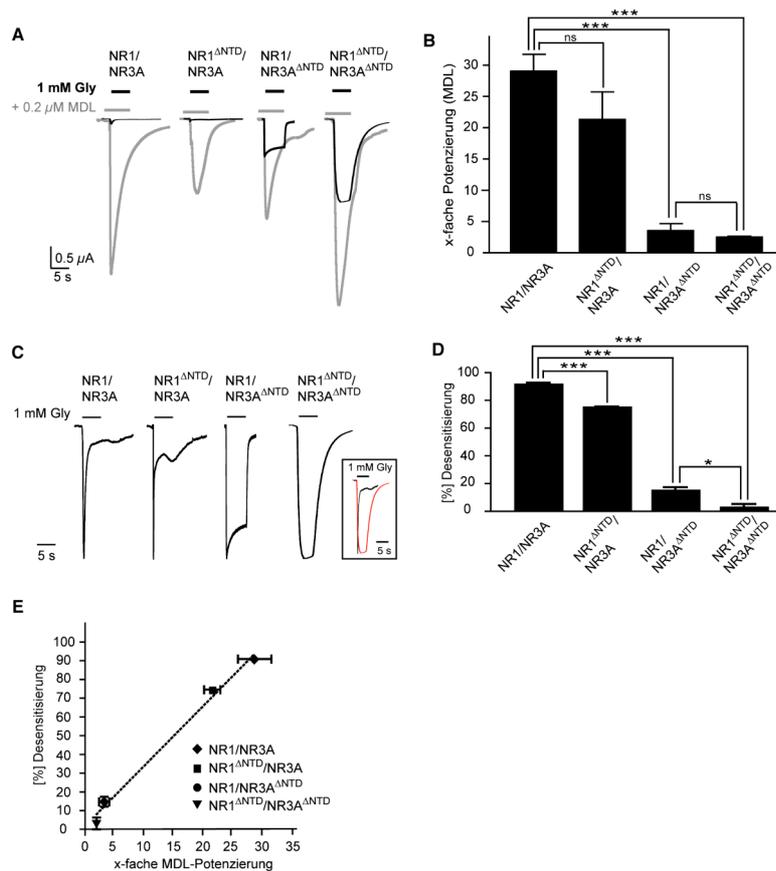
Gesamt betrachtet bedeutet das, dass die NTD-Deletion zu einer merklichen Erhöhung von Glyzin-induzierten NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptorströmen führt.

Tabelle 4.2: Pharmakologische Untersuchung von wt, partiell und vollständig NTD-deletierten NR1/NR3B-NMDA-Rezeptoren

Untereinheiten-zusammensetzung	$EC_{50}$ Glyzin [ $\mu\text{M}$ ]	$I_{\text{max}}$ [ $\mu\text{A}$ ]
NR1/NR3B	$6 \pm 0,3$ (3)	$0,03 \pm 0,002$ (3)
NR1/NR3B <sup><math>\Delta</math>NTD</sup>	$12,6 \pm 0,69$ (4)	$0,06 \pm 0,01$ (5)
NR1 <sup><math>\Delta</math>NTD</sup> /NR3B	$9,6 \pm 0,95$ (4)	$0,09 \pm 0,02$ (5)
NR1 <sup><math>\Delta</math>NTD</sup> /NR3B <sup><math>\Delta</math>NTD</sup>	$11,4 \pm 0,51$ (5)	$0,7 \pm 0,18$ (3)

### 1.38.3 Rolle der NTDs bei der Potenzierung durch den NR1-LBD-Antagonisten MDL und der Desensibilisierung von NR1/NR3A-Rezeptoren

Wie in vorhergehenden Studien gezeigt, führt die Antagonisierung der Glyzin-Bindetasche der NR1-LBD durch MDL zur beträchtlichen Potenzierung der kleinen, schnell desensibilisierenden Glyzin-induzierten NR1/NR3A-Rezeptorströme (Madry et al., 2007b). Im Folgenden war das Ziel, festzustellen, ob die Erhöhung von NR1/NR3A-Rezeptorströmen anhand der Antagonisierung der NR1-LBD und der NTD-Deletion auf dem gleichen Mechanismus basieren. Dafür wurde das Ausmaß der MDL-Potenzierung Glyzin-induzierter Rezeptorströme bzw. der Desensibilisierung von wt- mit demjenigen von NTD-deletierten NR1/NR3A-Rezeptoren verglichen (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7: Korrelation der Desensibilisierung und MDL-Potenzierung Glyzin-induzierter NR1/NR3A-, NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A-, NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup>- und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptorströme.** A) Vergleich der Glyzin- (schwarze Linie) bzw. Glyzin/MDL-induzierten Einzelströme (1 mM/0,2 μM, graue Linie) von wt, partiell- und vollständig NTD-entfernten NR1/NR3A-Rezeptorkomplexen, überlagernd dargestellt. B) Die Quantifizierung der Rezeptorströme aus A) ergab eine signifikante Erniedrigung des Ausmaßes der MDL-Potenzierung nach der Entfernung der NR3A- und zuzüglich NR1-NTDs (NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup>: 3-fach und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>: 2-fach;  $p < 0,01$ , Student's t-Test). C) Die normalisierten Einzelströme der wt, partiell- und vollständig verkürzten NR1/NR3A-Rezeptoren illustrieren die Unterschiede in der Kinetik der NR1/NR3A-, NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A-Rezeptoren gegenüber den NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup>- und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptorkomplexe durch sättigende Glyzin-Konzentrationen (1 mM). Die eingerahmte Abbildung verdeutlicht die Kinetik der wt (schwarze Linie) und NTD-deletierten (rote Linie) NR1/NR3A-Rezeptoren. D) Quantitative Analyse des Ausmaßes der Desensibilisierung, gemessen als das Verhältnis der Gleichgewichtsströme zur maximal-induzierbaren Glyzinantwort, in Prozent. E) Das Liniendiagramm stellt die Korrelation des Ausmaßes der MDL-Potenzierung, verglichen zum Ausmaß an Rezeptordesensibilisierung dar.

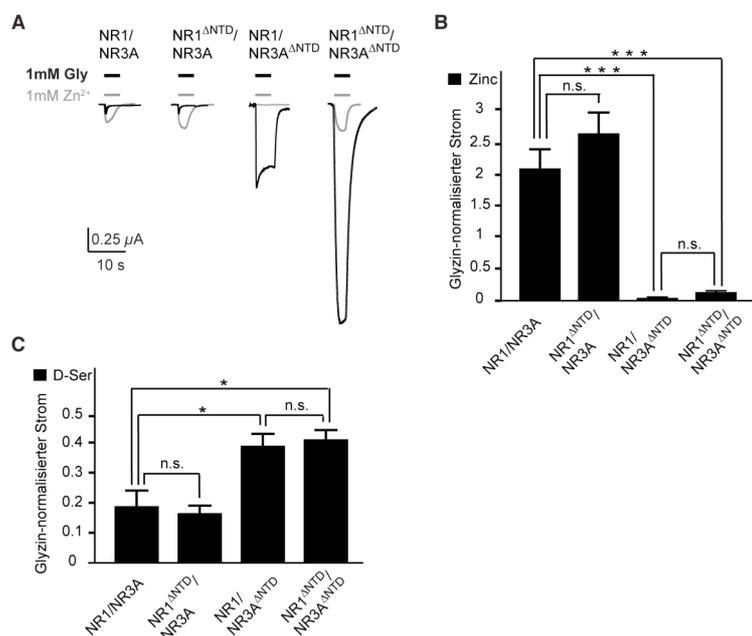
Sowohl wt-NR1/NR3A-Rezeptorströme, welche 29-fach potenziert wurden (Abb. 4.7A, B und Tab. 4.1), als auch die NR1-NTD-entfernten NR1/NR3A-Rezeptorströme wurden im gleichen Ausmaß durch MDL potenziert (NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A: ~22-fach; Abb. 4.7A, B und Tab. 4.1). Im Gegensatz dazu zeigten NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup>- und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren eine signifikante Erniedrigung der MDL-Potenzierung der Glyzin-induzierten Ströme

(NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup>: 3-fach und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>: 2-fach;  $p < 0,0001$ , Student's t-Test; Abb. 4.7A, B und Tab. 4.1).

Da der Effekt der MDL-Potenzierung vermeintlich mit der Erniedrigung der Rezeptordesensibilisierung einhergeht (Madry et al., 2008), wurde des Weiteren die Kinetik von wt- und NTD-entfernten NR1/NR3A-Rezeptorströmen nach kontinuierlicher Zugabe von sättigenden Glyzin-Konzentrationen (1 mM) untersucht. Das Ausmaß der Rezeptordesensibilisierung wurde anhand des Verhältnisses von maximal-induzierbaren ( $I_{max}$ ) und Gleichgewichtsströmen ( $I_{Gleichgewicht}$ ) ermittelt. Es wurde gefunden, dass sich die Desensibilisierung, prozentual ausgedrückt, in folgender Reihenfolge verringerte: NR1/NR3A wt ( $91,3 \pm 1,6$  %,  $n = 4$ ) > NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A ( $74,8 \pm 0,8$  %,  $n = 4$ ) > NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup> ( $14,8 \pm 2,6$  %,  $n = 6$ ) > NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup> ( $3,2 \pm 3,2$  %,  $n = 5$ ; Abb. 4.7C und D). Es konnten nur ein geringer, jedoch signifikanter Unterschied des Ausmaßes der Desensibilisierung zwischen wt und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A-Rezeptoren detektiert werden ( $p < 0,001$ , ungepaarter Student's t-Test, Abb. 4.7D). Die Deletion der NR3A-NTD reduzierte das Ausmaß der Rezeptordesensibilisierung deutlich ( $p < 0,001$ , ungepaarter Student's t-Test, Abb. 4.7C und D). Nach der Deletion von beiden NTDs konnte eine geringfügige, aber signifikante Erniedrigung der Rezeptordesensibilisierung im Vergleich zu NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren festgestellt werden ( $p < 0,05$ , ungepaarter Student's t-Test, Abb. 4.7C und D). Da die NR3A-NTD-Deletion eine stärkere Verringerung der Rezeptordesensibilisierung im Vergleich zur NR1-NTD-Deletion verursachte, deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass die NR3A-Untereinheit eine wichtige Rolle bei der Bestimmung des Ausmaßes der Desensibilisierung spielen könnte. Eine Regressionsanalyse zeigte, dass es einen direkten, linearen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der MDL-Potenzierung und dem Ausmaß der Rezeptordesensibilisierung gibt (Abb. 4.7E). Somit wurde gezeigt, dass die hohen Rezeptorströme von NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren mit einer erniedrigten Rezeptordesensibilisierung und einem geringen Ausmaß an MDL-Potenzierung einhergehen. Dies impliziert, dass die NTD-Deletion eine Aufhebung des NR1-LBD-vermittelten Antagonismus und der Rezeptordesensibilisierung verursacht.

### 1.38.4 Differentielle Effekte der NTD-Entfernung auf die maximal-induzierbaren NR1/NR3A-Rezeptorströme durch $Zn^{2+}$ und D-Serin

In einer vorhergehenden Studie wurde gezeigt, dass zusätzlich zu Glyzin, das divalente Kation  $Zn^{2+}$  als voller Agonist an NR1/NR3A-Rezeptoren wirkt und eine vergleichbare Effizienz zu Glyzin aufweist (Madry et al., 2008). Da die vollständige NTD-Entfernung die Aktivierung durch  $Zn^{2+}$  beeinträchtigt hatte (Madry et al., 2008), sollte hier eine detaillierte Analyse der Auswirkung von partieller NTD-Entfernung auf die  $Zn^{2+}$ -vermittelte NR1/NR3A-Stromantwort in Relation zu Glyzin-induzierten Rezeptorströmen erfolgen (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8:  $Zn^{2+}$  und D-Serin-Aktivierung von wt- und NTD-entfernten NR1/NR3A-Rezeptoren.** A)  $Zn^{2+}$ -induzierte Ströme (graue Linie) von wt, partiell und vollständig NTD-deletierten NR1/NR3A-Rezeptorkomplexen. Quantitative Analyse der B)  $Zn^{2+}$ - und C) D-Serin-induzierten durchschnittlichen NR1/NR3A-, NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR3A-, NR1/NR3A $^{\Delta NTD}$ - und NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR3A $^{\Delta NTD}$ -Rezeptorströme, die auf die jeweiligen Glycin-vermittelten Maximalströme normiert wurden, nach Applikation von sättigenden Konzentrationen von B) 1mM  $Zn^{2+}$  und C) 1mM D-Serin.

Hierbei waren die durch 1 mM  $Zn^{2+}$ -hervorgerufenen Stromantworten von NR1/NR3A-Rezeptoren ca. 2-fach höher als die Glycin-vermittelten (1 mM) Rezeptorströme ( $Zn^{2+}$ /Gly-Verhältnis wt NR1/NR3A:  $2,1 \pm 0,32$ ,  $n = 4$ , Abb. 4.8A, B und Tab. 4.3). Verglichen zum wt, konnten bei NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR3A-Rezeptoren keine Unterschiede der relativen  $Zn^{2+}$ -induzierten Ströme detektiert werden (NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR3A:  $2,6 \pm 0,35$ ,  $n = 4$ , Abb. 4.8A, B und Tab. 4.3). Im Gegensatz dazu verursachte die Deletion der NR3A-NTD eine drastischen Erniedrigung

von  $Zn^{2+}$ -induzierten NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptorströmen ( $Zn^{2+}$ /Gly-Verhältnis NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup>:  $0,04 \pm 0,005$ ,  $n = 8$ ;  $p < 0,001$ , ungepaarter Student's t-Test, Abb. 4.8A, B und Tab. 4.3). Nach der zusätzlichen NR1-NTD-Deletion wurde keine signifikante Veränderung des niedrigen Verhältnisses der  $Zn^{2+}$ /Glyzin-Antwort beobachtet ( $Zn^{2+}$ /Gly-Verhältnis NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>:  $0,13 \pm 0,04$ ,  $n = 3$ , Abb. 4.8A, B und Tab. 4.3). Die differentiellen Auswirkungen der NTD-Deletion auf das Ausmaß von Glyzin- bzw.  $Zn^{2+}$ -induzierten NR1/NR3A-Rezeptorströmen ist im Einklang mit der Annahme eines unabhängigen Aktivierungsmechanismus dieser beiden Agonisten.

Neben Glyzin, wurde kürzlich für den klassischen NR1-Glyzin-Bindetasche-Agonisten D-Serin die agonistische Rolle an löslichen NR3A-LBD-Konstrukten gezeigt (Yao and Mayer, 2006). Im Gegensatz hierzu wurde in einer früheren Veröffentlichung gemutmaßt, dass D-Serin Glyzin-induzierte Ströme von rekombinant expremierten NR1/NR3-Rezeptoren antagonisiert (Chatterton et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 1mM D-Serin kleine und schnell desensitisierende NR1/NR3A-Rezeptorströme bedingt, die jedoch verglichen zu Glyzin (1mM) geringer sind (D-Ser/Gly-Verhältnis NR1/NR3A:  $0,18 \pm 0,07$ ,  $n = 4$ , Abb. 4.8C und Tab. 4.3). In Analogie zur Auswirkung der NTD-Verkürzung auf Glyzin-induzierte Stromantworten, konnte bei NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A-Rezeptoren keine maßgebliche Veränderung der relativen D-Serin-vermittelten Stromantworten detektiert werden (D-Ser/Gly-Verhältnis NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A:  $0,16 \pm 0,03$ ,  $n = 5$ , Abb. 4.8C und Tab. 4.3). Im Gegensatz dazu verursachte die Deletion der NR3A-NTD eine Erhöhung der D-Serin-vermittelten Rezeptorantwort (D-Ser/Gly-Verhältnis NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup>:  $0,39 \pm 0,04$ ,  $n = 8$ ). Im Einklang mit den Ergebnissen von Glyzin, waren die D-Serin-induzierten Stromantworten von NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-vergleichbar mit denen von NR1/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren (NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>:  $0,41 \pm 0,03$ ,  $n = 4$ , Abb. 4.8C und Tab. 4.3). Zusammenfassend wurde gezeigt, dass D-Serin ein Agonist von NR1/NR3A-Rezeptoren ist und die Deletion der NTDs, analog zu Glyzin, zu einer Erhöhung der D-Serin-vermittelten Stromantwort führt.

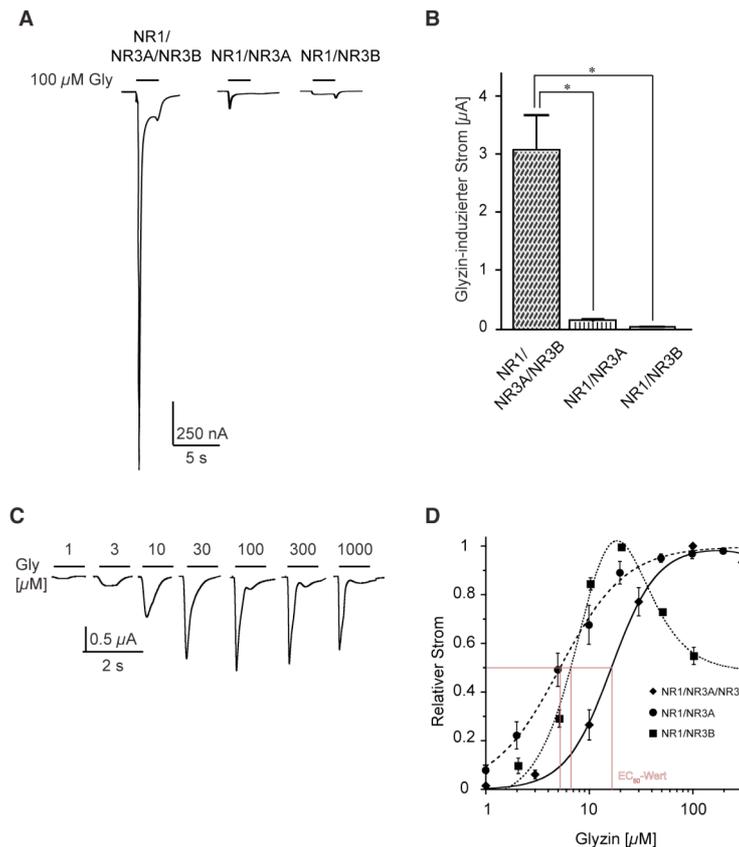
Tabelle 4.3: Aktivierung von wt, partiell und vollständig NTD-deletierten NR1/NR3A-NMDA-Rezeptoren durch  $Zn^{2+}$  und D-Serin

Untereinheiten-zusammensetzung	Relativer Strom [%] (1mM $Zn^{2+}$ )	Relativer Strom [%] (1mM D-Serin)
NR1/NR3A	2,1±0,32 (4)	0,18±0,07 (4)
NR1 <sup>ΔNTD</sup> /NR3A	2,6±0,35 (4)	0,16±0,03 (5)
NR1/NR3A <sup>ΔNTD</sup>	0,04±0,005 (8)	0,39±0,04 (8)
NR1 <sup>ΔNTD</sup> /NR3A <sup>ΔNTD</sup>	0,13±0,04 (3)	0,41±0,03 (4)

### 1.39 Triheteromere NR1/NR3A/NR3B-NMDA-Rezeptoren

#### 1.39.1 Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung von NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren

Neben NMDA-Rezeptorkomplexen, die aus zwei Arten von Untereinheiten bestehen, d.h. NR1/NR2- und NR1/NR3-Rezeptoren, wurden *in vivo* auch solche Rezeptoren detektiert, die sich aus drei verschiedenen Untereinheiten zu tetrameren NMDA-Rezeptoren zusammensetzen, z.B. NR1/NR2A/NR2B-Rezeptoren im Kortex (Sheng et al., 1994; Didier et al., 1995; Chazot and Stephenson, 1997; Luo et al., 1997). Diese wurden als triheteromere NMDA-Rezeptoren benannt (Hatton and Paoletti, 2005). Kürzlich berichteten Smothers und Woodward (2007), dass die Transfektion von HEK293-Zellen mit NR1-, NR3A- und NR3B-Konstrukten in der Expression von Rezeptoren in robusten, aber stark desensitisierenden Glyzin-induzierten Strömen resultiert. Diese zeigten sich unempfindlich gegenüber dem spannungsabhängigen  $Mg^{2+}$ -Block und verschiedenen Antagonisten von 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren, sowie des Glyzin-Rezeptors. Die Assoziation dieser Untereinheiten zum NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorkomplex in *Xenopus laevis* Oozyten wurde anhand von Fluoreszenz-Ko-Lokalisations-basierten Methoden bestätigt (Ulbrich and Isacoff, 2008). Im Folgenden sollte eine genauere Analyse der Funktion sowie der Assemblierung von triheteromeren NR1/NR3A/NR3B-NMDA-Rezeptoren erfolgen und die Ergebnisse in Relation zu den an NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren erhaltenen Daten gesetzt werden (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9.: Funktionelle Analyse von NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorkomplexen nach Expression in *Xenopus laevis* Oozyten.** A) NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorkomplexe (erste Stromantwort) zeigen im Vergleich zu NR1/NR3A- (zweite Stromantwort) und NR1/NR3B-Rezeptoren (dritte Stromantwort) eine starke Erhöhung der maximalen Glyzin-vermittelten Rezeptorströme nach Expression in *Xenopus laevis* Oozyten. B) Die quantitative Analyse der mittleren Maximalströme der NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren ergab einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den dimeren Rezeptorkompositionen bestehend aus NR1/NR3A- bzw. NR1/NR3B-Untereinheiten (~30-fache Erhöhung;  $n = 4$ ;  $p < 0,01$ , ANOVA one-way Test). C) Beispielströme von NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorkomplexen, hervorgerufen durch ansteigende Glyzin-Konzentrationen. D) Der Vergleich der Dosis-Abhängigkeit von Glyzin-induzierten Stromantworten von NR1/NR3A/NR3B- (◆) und NR1/NR3A- (●) bzw. NR1/NR3B-Rezeptoren (■) zeigte eine ~4-fache Erniedrigung der apparenten Glyzinaffinität ( $EC_{50}$ -Werte: NR1/NR3A/NR3B:  $17 \pm 2,5$ ,  $n = 4$ ).

Die NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren konnten durch 100  $\mu$ M Glyzin aktiviert werden (Abb. 4.9A, erste Stromantwort). Die erhaltene Stromantwort war gegenüber den Strömen von NR1/NR3A- (Abb. 4.9A, zweite Stromantwort) bzw. NR1/NR3B-Rezeptorströmen (Abb. 4.9A, dritte Stromantwort) 30-fach größer ( $I_{max}$  NR1/NR3A/NR3B:  $3,08 \pm 0,6 \mu$ A,  $n = 10$ ;  $p < 0,05$ , one-way ANOVA-Test, Abb. 4.9A, B und Tab. 4.1, 4.2 und 4.4). Ähnlich den NR1/NR3A-Rezeptoren (Chatterton et al., 2002; Awobuluyi et al., 2007; Madry et al., 2007b) (Abb. 4.5 und Abb. 4.7), waren die NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme stark desensibilisierend. Die Sättigung der NR1/NR3A/NR3B-Stromantwort

erfolgte bei 100  $\mu\text{M}$  Glyzin (Abb. 4.9C und D). Die Glyzin-Konzentration, die für eine halb-maximale Aktivierung ( $\text{EC}_{50}$ ) erforderlich war, betrug 17  $\mu\text{M}$  ( $n = 4$ , Abb. 4.9D und Tab. 4.4) und war damit nur geringfügig höher als die Werte, die an NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren gemessen wurden (Madry et al., 2007b). Somit lässt sich sagen, dass die Expression von NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten zu Glyzin-aktivierten Rezeptorströmen führt, welche verglichen zu denen der NR1/NR3A und NR1/NR3B-Rezeptoren eine drastische Effizienzsteigerung aufweisen.

Tabelle 4.4: Pharmakologie von wt-NR1/NR3A/NR3B-NMDA-Rezeptoren

	NR1/NR3A/NR3B
$I_{\text{max}}$ Glyzin [ $\mu\text{A}$ ]	3,08 $\pm$ 0,6 (10)
$\text{EC}_{50}$ Glyzin [ $\mu\text{M}$ ]	17 $\pm$ 2,5 (4)
$I_{\text{max}}$ $\text{Zn}^{2+}$ [ $\mu\text{A}$ ]	0,01 $\pm$ 0,001 (4)
x-fache MDL-Potenzierung	1,6 $\pm$ 0,07 (5) *
x-fache MDL/ $\text{Zn}^{2+}$ -Potenzierung	0,98 $\pm$ 0,15 (3) #
x-fache $\text{Zn}^{2+}$ -Potenzierung	0,36 $\pm$ 0,09 (4) ##
$\text{IC}_{50}$ -Wert $\text{Zn}^{2+}$ [ $\mu\text{M}$ ]	
- hoch-affin	0,065 $\pm$ 0,009 (4)
- nieder-affin	n.b. (4)

\* Bei 1 mM Glyzin und 0,2  $\mu\text{M}$  MDL

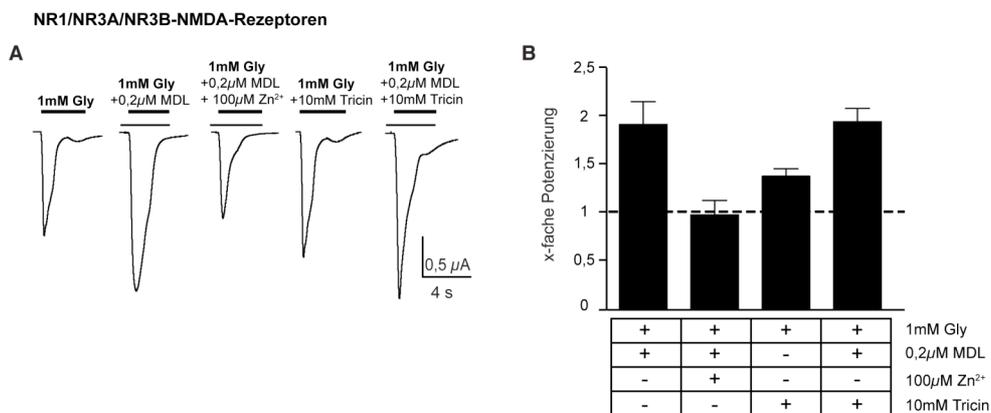
# Bei 1 mM Glyzin und 0,2  $\mu\text{M}$  MDL/100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$

## Bei 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  und 100  $\mu\text{M}$  Glyzin

### 1.39.2 Wirkung von NR1-Glyzinbindetaschen Antagonisten sowie $\text{Zn}^{2+}$ auf Glyzin-induzierte NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme

In vorhergehenden Studien wurde gezeigt, dass die Antagonisierung der NR1-LBD mit MDL-29951 zu einer starken Potenzierung der Glyzin-induzierten NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptorströme führt (Madry et al., 2007b). Dies geschieht durch die Aufhebung der NR1-LBD-bedingten Selbst-Inhibition („Auto-Inhibition“) des Rezeptors (Madry et al., 2007b) und resultiert somit in einer deutlichen Steigerung der Rezeptoreffizienz. Da NR1/NR3A/NR3B-, im Unterschied zu NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren, bereits eine deutlich erhöhte Rezeptoreffizienz zeigen, sollte aus diesem Grund der Einfluss des

hoch-selektiven NR1-Glyzin-Bindetasche Antagonisten MDL auf Glyzin-induzierte Ströme untersucht werden (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10: Einfluss des NR1-Glyzin-Bindetaschen Antagonisten MDL sowie von  $Zn^{2+}$  auf NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme.** A) Glyzin-vermittelte (1mM) Einzelströme von NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren (erste Stromantwort) nach Applikation von MDL (0,2  $\mu$ M) (zweite Stromantwort) bzw. MDL/ $Zn^{2+}$  (0,2  $\mu$ M/100  $\mu$ M) (dritte Stromantwort). Glyzin-vermittelte bzw. Gly/MDL-vermittelte Einzelströme nach Zugabe von 10 mM Tricin zur Pufferung von freiem  $Zn^{2+}$  (vierte Stromantwort bzw. fünfte Stromantwort) zeigten eine geringfügige Erhöhung gegenüber Tricin-freien Bedingungen (Glyzin/Tricin: ca. 1,2-fach und Glyzin/MDL/Tricin: 1,05-fach). B) Quantitative, gepaarte Analyse der maximal-induzierbaren Ströme ( $I_{max}$ ) der in A) gezeigten Bedingungen, dargestellt als x-fache Potenzierung im Vergleich zur Rezeptorantwort von Glyzin allein.

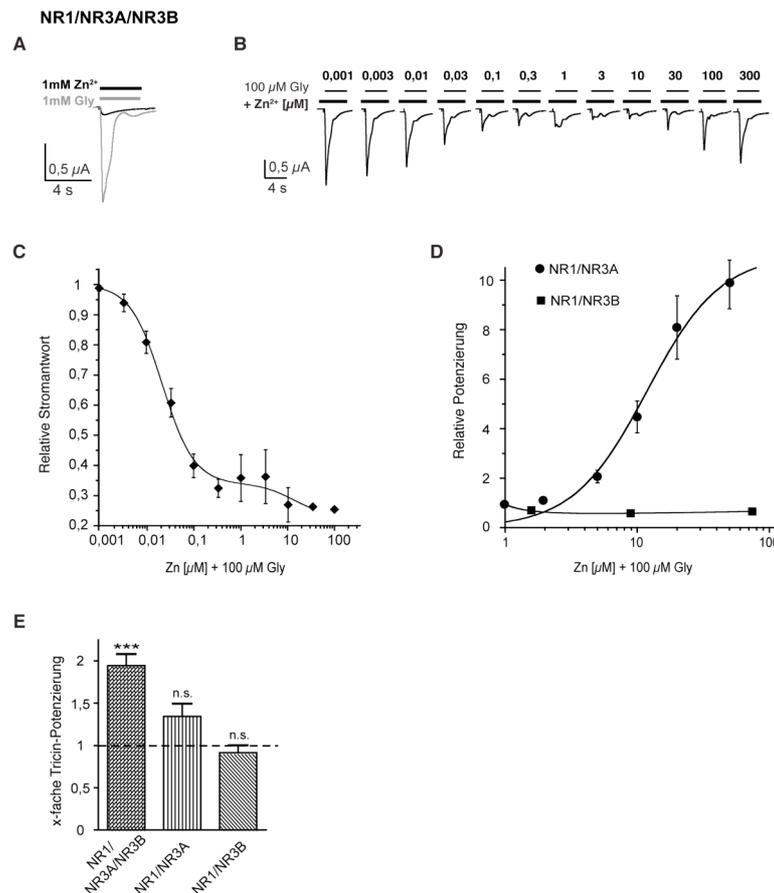
Es konnte gezeigt werden, dass die Vor- und Ko-Applikation von MDL (0,2  $\mu$ M), die durch sättigende Glyzin-Konzentrationen (1 mM) hervorgerufenen NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorantworten nur gering potenzierte (1,6-fach, Abb. 4.10 A, B und Tab. 4.4). Dies ist im Unterschied zu den an NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren erhaltenen Ergebnissen (s. Abb. 4.5 und 4.6). Zusammenfassend bedeutet dies, dass die Antagonisierung der NR1-LBD mit MDL, Glyzin-vermittelte NR1/NR3A/NR3B-Ströme nur geringfügig potenziert und demnach die Auto-Inhibition bei diesen Rezeptoren annähernd aufgehoben ist.

Zusätzlich zu MDL, wurde auch für das divalente Kation  $Zn^{2+}$  gezeigt, dass es Glyzin-vermittelte Ströme von NR1/NR3A-Rezeptoren potenziert (10-fach) (Madry et al., 2008) und im Zusammenspiel mit MDL zu einer bedeutenden, etwa 120-fachen 'supralinearen' Potenzierung der Glyzin-aktivierten Rezeptorströme führt (Madry et al., 2008). Da die MDL-Potenzierung Glyzin-vermittelter Ströme von NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren annähernd aufgehoben

war, sollte untersucht werden, ob bei diesen Rezeptoren auch die 'supralineare' Potenzierung beeinträchtigt wurde. Die gemeinsame Vor- und Ko-Applikation von Glyzin/MDL (1 mM/0,2  $\mu$ M) und  $Zn^{2+}$  (100  $\mu$ M) führte nicht zu einer Potenzierung, sondern, verglichen mit der Glyzin/MDL-, sogar zu einer 2-fach reduzierten Rezeptorantwort (Abb. 4.10A, B und Tab. 4.4). Um dieser scheinbar hemmenden Wirkung von  $Zn^{2+}$  auf die MDL-Potenzierung nachzugehen, sollten mit Hilfe von  $Zn^{2+}$ -puffernden Substanzen, wie z.B. Tricin (N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)Glyzin, 10 mM), die unausweichlich auftretenden nanomolaren  $Zn^{2+}$ -Kontaminationen in den applizierten Agonisten- bzw. Antagonistenlösungen beseitigt werden. Die Pufferung von  $Zn^{2+}$  führte zu einer leichten Erhöhung der Rezeptorströme, sowohl bei der Ko-Applikation mit der Glyzin- als auch mit der Glyzin/MDL-Lösung (Abb. 4.10A, B und Tab. 4.4). Diese Ergebnisse implizieren, dass  $Zn^{2+}$  eine hemmende Wirkung auf die Glyzin- bzw. Glyzin/MDL-vermittelte Aktivierung hat.

### **1.39.3 Geringe agonistische und modulatorische Wirkung von $Zn^{2+}$ auf Glyzin-induzierte NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme**

An NR1/NR3A-Rezeptoren wurde zusätzlich zu Glyzin, auch  $Zn^{2+}$  als ein voller Agonist von vergleichbarer Effizienz identifiziert (Madry et al., 2008).  $Zn^{2+}$  ist außerdem in der Lage Glyzin-induzierte Rezeptorströme zu potenzieren (Madry et al., 2008). Bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren führte die  $Zn^{2+}$ -Pufferung der Glyzin-Lösung, bei sättigender Konzentration, zur Erhöhung der Stromantwort (Abb. 4.10). Im Folgenden soll eine detaillierte Analyse der agonistischen und modulatorischen  $Zn^{2+}$ -Wirkung auf Glyzin-induzierte Ströme dieser Rezeptoren erfolgen (Abb. 4.11).



**Abb. 4.11: Zn<sup>2+</sup> inhibiert Glyzin-vermittelte Rezeptorströme und induziert nur geringe Ströme bei rekombinanten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren.** A) Vergleich der Glyzin- (1 mM) bzw. Zn<sup>2+</sup>-vermittelten (1 mM) Rezeptorströme. B) Glyzin-aktivierte Ströme (100 μM) von triheteromeren NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorkomplexe bei steigenden Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen (0,1-300 μM). Beachtenswert ist die Reduktion des Stroms mit zunehmender Zn<sup>2+</sup>-Konzentration. C) Grafische Darstellung der relativen Hemmung der Glyzin-vermittelten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorantworten (◆) durch nanomolare Konzentrationen von Zn<sup>2+</sup> (IC<sub>50</sub>-Wert: 0,065 ± 0,009 μM, n = 4). Die maximale Hemmung von 64 % erfolgte bei 10 μM Zn<sup>2+</sup>. D) Vergleichende Darstellung der Dosis-Wirkung von Zn<sup>2+</sup> auf Glyzin-induzierte Ströme bei NR1/NR3A- (●) bzw. NR1/NR3B-Rezeptorkomplexen (■). E) Vergleich der Auswirkung von 10 mM Tricin auf I<sub>max</sub>-Ströme von NR1/NR3A/NR3B-, NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren.

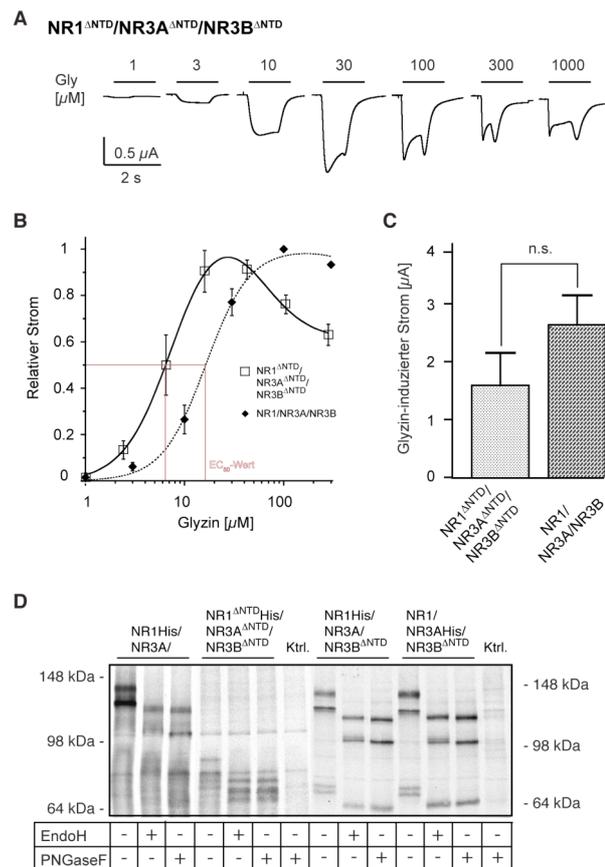
Es wurde beobachtet, dass die Zn<sup>2+</sup>-induzierten Stromantworten von NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren im Unterschied zu Glyzin-induzierten deutlich kleiner waren (I<sub>max</sub>: 0,01 μM±0,001, Abb. 4.11A und Tab. 4.4). Somit zeigt Zn<sup>2+</sup> eine geringfügige agonistische Wirkung bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren.

Als nächstes wurden in Gegenwart von sättigenden Glyzin-Konzentrationen (100 μM) steigende Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen (0,001-300 μM) vor- und ko-appliziert. Bereits bei nanomolaren Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen wurde eine Reduktion der NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme beobachtet. Die maximale Hemmung von 64 % erfolgte bei 10 μM Zn<sup>2+</sup> (IC<sub>50</sub>: 0,065±0,009 μM, n = 4, Abb. 4.11B, 4.11C und

Tab. 4.4). Diese Befunde stehen im Gegensatz zu der 10-fachen  $Zn^{2+}$ -Potenzierung bei NR1/NR3A- (Abb. 4.11D) (Madry et al., 2008) bzw. der geringfügigen Hemmung im mikromolaren Konzentrationsbereich bei NR1/NR3B-Rezeptoren (Abb. 4.11D). Des Weiteren führte bei NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren die  $Zn^{2+}$ -Pufferung durch Tricin zu keiner Erhöhung der Glyzin-induzierten Rezeptorströme (Abb. 4.11E), wie bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren beobachtet. Dies bedeutet, dass NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptorströme nicht durch nanomolare  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen beeinträchtigt werden. Somit wurde bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren die Ausbildung einer hoch-affinen hemmenden  $Zn^{2+}$ -Bindestelle detektiert, welche in den NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren nicht vorhanden ist.

#### **1.39.4 Funktionelle und biochemische Analyse von NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren**

Triheteromere wt-NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren weisen eine hohe Glyzin-vermittelte Rezeptoreffizienz auf. Dies steht im Gegensatz zu den Befunden an NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren, bei denen die Deletion der NTDs eine Rezeptoreffizienzsteigerung bewirkte (Abb. 4.5 und 4.6). Somit stellt sich für NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren die Frage, welche Rolle die NTDs bei der Glyzin-vermittelten Aktivierung besitzen. Dies soll im Folgenden durch die funktionelle Untersuchung von NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren geklärt werden (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12: Assemblierung und funktionelle Analyse von NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorkomplexen.** A) Beispielströme von NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptorkomplexen hervorgerufen durch ansteigende Glyzin-Konzentrationen (1-1000  $\mu$ M). B) Der Vergleich der Glyzin-Dosiswirkungskurven von wt und NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren ergab eine  $\sim$ 1,7-fache Erhöhung ( $n = 3$ ;  $p > 0,5$ , Student's t-Test) der apparenten Glyzin-Affinität der NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>- ( $\square$ ) im Vergleich zu den wt-NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren ( $\blacklozenge$ ). C) Die maximalen Glyzin-induzierten NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptorströme. D) SDS-PAGE von metabolisch markierten und mittels Affinitätschromatographie aus *Xenopus laevis* Oozyten aufgereinigten NR1His/NR3A-, NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-, NR1His/NR3A/NR3B<sup>ΔNTD</sup>\*- und NR1/NR3AHis/NR3B<sup>ΔNTD</sup>\*-Rezeptorkomplexe. Die Kontrolle (Ktrl.) besteht aus Proteinproben nicht-injizierter Oozyten. Die Behandlung mit den Glykosidasen EndoH und PNGaseF ist unterhalb der Gelspuren gekennzeichnet.

Die maximale Aktivierung des NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptors erfolgte, vergleichbar zum wt-Rezeptor, bei ca. 100  $\mu$ M Glyzin ( $I_{\max}$ :  $1,62 \pm 0,58$   $\mu$ A,  $n = 6$ , Abb. 4.12A, B, C und Tab. 4.5). Anders als beim wt, wiesen NTD-deletierte NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren langsam desensitierende Ströme auf. Die Verlangsamung der Rezeptorkinetik nach der NTD-Deletion ist konform mit den Beobachtungen an NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren (Abb. 4.5). Die, für die halb-maximale Rezeptorantwort benötigte Glyzin-Konzentration entsprach 10

$\mu\text{M}$  (Abb. 4.12B und Tab. 4.5). Die Rezeptorantwort von NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren war verglichen zum wt nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ , Student's t-Test) (Abb. 4.12B).

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob wt- und NTD-deletierte NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren veränderte Expressionsniveaus aufweisen. Dafür wurden, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, vollständig NTD-deletierte und NR3B-NTD-deletierte NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren biochemisch analysiert. Die letztere Rezeptorkombination wurde verwendet, da eine Aufreinigung der vollständigen NR3B-Untereinheit nicht möglich war. Das Expressionsniveau der NR1His/NR3A-Rezeptoren (Abb. 4.12D, Gelspuren 1-3) diente hierbei als Standard für das Maß der Expression der jeweiligen NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorkomplexe. Das Expressionsniveau der NR1/NR3A/NR3B <sup>$\Delta\text{NTD}$</sup> -Rezeptoren, welche entweder über das 6xHistidin-Motiv der NR1- (Abb. 4.12D, Gelspuren 8-10) bzw. der NR3A-Untereinheit (Abb. 4.12D, Gelspuren 11-13) aufgereinigt wurden, war vergleichbar mit dem wt NR1/NR3A-Rezeptor (Abb. 4.12D, Gelspuren 1-3). Die vollständig NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren wiesen eine etwas niedrigere Expression auf (Abb. 4.12D, Gelspuren 4-6). Die Behandlung der Proteinproben mit PNGaseF bedingte eine geringere molekulare Masse im Vergleich zu EndoH-behandelten Proben und somit komplex N-glykosylierte Rezeptorproteine (Abb. 4.12D, jeweils Gelspuren 2 und 3, 5 und 6, 9 und 10, 12 und 13). Zusammenfassend bedeutet das, dass die Expression von NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren vergleichbar zu der von NR1/NR3A-Rezeptorkomplexen war. Des Weiteren ging die NTD-Deletion mit einer Verringerung der NR1 <sup>$\Delta\text{NTD}$</sup> /NR3A <sup>$\Delta\text{NTD}$</sup> /NR3B <sup>$\Delta\text{NTD}$</sup> -Rezeptordesensibilisierung, jedoch nicht mit einer Erhöhung der Rezeptoreffizienz einher.

Tabelle 4.5: Pharmakologie von NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-NMDA-Rezeptoren

	NR1 <sup>ΔNTD</sup> /NR3A <sup>ΔNTD</sup> /NR3B <sup>ΔNTD</sup>
I <sub>max</sub> Glyzin [ $\mu$ A]	1,62±0,58 (6)
EC <sub>50</sub> Glyzin [ $\mu$ M]	10,6±3,3 (3)
I <sub>max</sub> Zn <sup>2+</sup> [ $\mu$ A]	1,07±0,06 (4)
x-fache MDL-Potenzierung	5,8±0,59 (4) *
x-fache MDL/Zn <sup>2+</sup> -Potenzierung	6,44±1,53 (5) #
x-fache Zn <sup>2+</sup> -Potenzierung	4,39±0,56 (4) ## 2,94±0,48 (4) **
IC <sub>50</sub> -Wert Zn <sup>2+</sup> [ $\mu$ M]	
- hoch-affin	0,06±0,06 (3)
- nieder-affin	

\* Bei 1 mM Glyzin und 0,2  $\mu$ M MDL

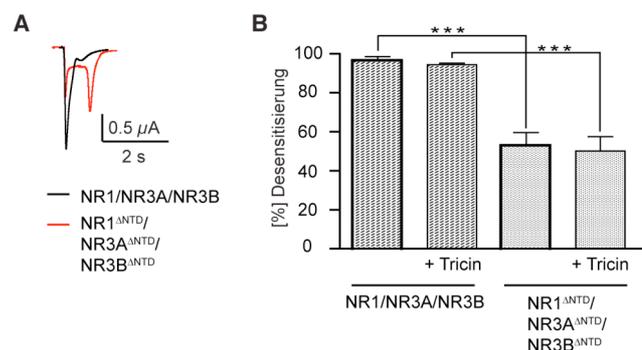
# Bei 1 mM Glyzin und 0,2  $\mu$ M MDL/100  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>

## Bei 3  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> und 100  $\mu$ M Glyzin

\*\* Bei 100  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> und 100  $\mu$ M Glyzin

### 1.39.5 Die NTD-Deletion bedingt eine Verringerung der Desensibilisierung von triheteromeren NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren

Im Folgenden wurde das Ausmaß der Rezeptordesensibilisierung von wt- und NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren quantifiziert. Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Kinetik dieser zwei Rezeptoren, sind Glyzin-induzierte Beispielströme, übereinander gelagert, dargestellt (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13: Verringerung der NR1/NR3A/NR3B-Rezeptordesensibilisierung nach der NTD-Deletion.** A) Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Rezeptorkinetik von NTD-deletierten und wt-Rezeptoren sind zwei übereinander gelagerte Beispielströme von NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>- (rot) und NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren (schwarz) bei sättigenden Glyzin-Konzentrationen (100  $\mu$ M) dargestellt. B) Quantifizierung des Ausmaßes der Rezeptordesensibilisierung von wt- und NTD-entfernten Rezeptoren in An- und Abwesenheit von 10 mM Tricin, gemessen anhand des Verhältnisses des Gleichgewichtsstroms im Vergleich zum maximal-induzierbaren Rezeptorstrom, in Prozent (%).

Das Ausmaß der Desensitisierung, welches das Verhältnis des gemittelten Gleichgewichts- zum Maximalstrom prozentual darstellt, zeigte, dass die Rezeptordesensitisierung von wt-Rezeptoren signifikant höher ist, als jene der NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren (95 % vs. 50 %;  $p < 0,001$ , Student's t-Test, Abb. 4.13B). Die  $Zn^{2+}$ -Pufferung durch Tricin (10 mM) hatte weder bei wt- noch bei NTD-deletierten Rezeptoren eine Auswirkung auf den Grad der Desensitisierung.

### 1.39.6 Die Auswirkung der NTD-Deletion auf die MDL- und MDL/ $Zn^{2+}$ -Potenzierung Glyzin-aktivierter NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme

Die NTD-Deletion war bei NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren, verglichen zum wt, an eine reduzierte MDL-Potenzierung Glyzin-induzierter Ströme und somit die annähernde Aufhebung der Auto-Inhibition gekoppelt. Die Tatsache, dass wt-NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren nur geringfügig durch MDL potenziert werden, implizierte, dass hier die NTDs nicht die Auto-Inhibition bedingen. Diese soll im Nachfolgenden an NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorkonstrukten untersucht werden (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14: Erhöhte MDL- und  $Zn^{2+}$ -Potenzierung bei NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren.**

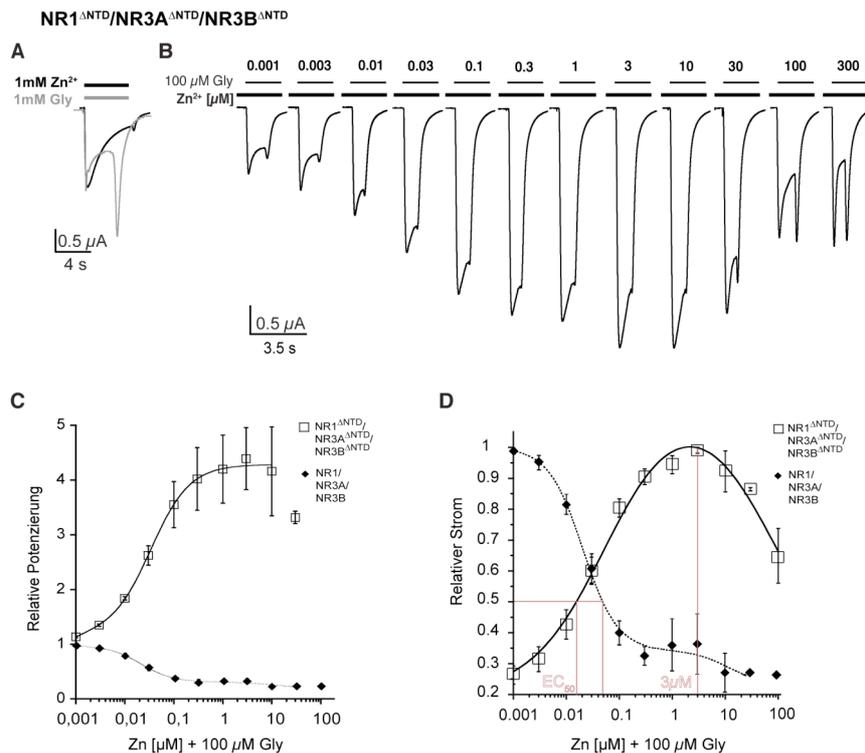
A) Dargestellt sind Beispielströme von NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren nach Applikation von 1 mM Glyzin, Glyzin/MDL (1 mM/0,2  $\mu$ M), Glyzin/MDL/ $Zn^{2+}$  (1 mM/0,2  $\mu$ M/100  $\mu$ M), Glyzin/Tricin (1 mM/10 mM) und Glyzin/MDL/Tricin (1 mM/0,2  $\mu$ M/10 mM). Die Pufferung von  $Zn^{2+}$  durch Tricin ging mit einer geringen Erniedrigung der NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptorströme nach Applikation von Glyzin bzw. Ko-Applikation von Glyzin und MDL einher. B) Quantifizierung der Ströme unter den in A) dargestellten Bedingungen. Das jeweilige Ausmaß der Potenzierung Glyzin-induzierter Ströme durch MDL oder eine MDL/ $Zn^{2+}$ - bzw. MDL/Tricin-Kombination ist nicht signifikant unterschiedlich (MDL: 5,8-fach,  $n = 4$ ; MDL/ $Zn^{2+}$ : 6,4-fach,  $n = 5$  und MDL/Tricin: 4,6-fach,  $n = 6$ ;  $p > 0,5$ , Student's t-Test).

Die Abbildung 4.14B zeigt, dass MDL die Glyzin-induzierten NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptorströme um das 5,8-fache potenzierte (Abb. 4.14 und Tab. 4.5). Somit führte die NTD-Deletion zu einer verstärkten MDL-Potenzierung im Vergleich zum wt-NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor. Dies bedeutet, dass NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren stärker durch die NR1-LBDs auto-inhibiert werden als im Falle des wt-Rezeptors beobachtet (Abb. 4.10).

Nachfolgend sollte die Wirkung von NTD-Deletionen auf die Rezeptormodulation Glyzin-vermittelter Rezeptorströme durch MDL/Zn<sup>2+</sup> (0,2 μM/100 μM) näher beleuchtet werden. Es erwies sich, dass das Ausmaß der Potenzierung durch eine Kombination aus MDL und Zn<sup>2+</sup>, gegenüber dem Effekt mit MDL allein, geringfügig höher war (6,4-fach, Abb. 4.14B und Tab. 4.5). Dies weist daraufhin, dass nach der NTD-Deletion, Zn<sup>2+</sup> das Ausmaß der MDL-Potenzierung nicht mehr reduziert, wie beim wt-Rezeptor beobachtet (Abb. 4.10). Im Einklang hiermit führte die Zn<sup>2+</sup>-Pufferung durch Tricin (10 mM) zu einem geringen Rückgang der MDL-Potenzierung bzw. der allein durch Glyzin hervorgerufenen Rezeptorantwort. Somit lässt sich sagen, dass bei NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren, die Ko-Applikation von Zn<sup>2+</sup> eine positive Auswirkung auf das Ausmaß der MDL-Potenzierung Glyzin-induzierter Ströme aufweist.

#### **1.39.7 Die potenzierende und agonistische Wirkung von Zn<sup>2+</sup> bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren nach der NTD-Deletion**

Die Ko-Applikation von Zn<sup>2+</sup> erhöhte geringfügig den Grad der MDL-Potenzierung Glyzin-induzierter Ströme (Abb. 4.14). Aufgrunddessen sollte im Folgenden die Wirkung von Zn<sup>2+</sup> als auch dessen Einfluss auf die Glyzin-vermittelte NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptorantwort untersucht werden (Abb. 4.15).



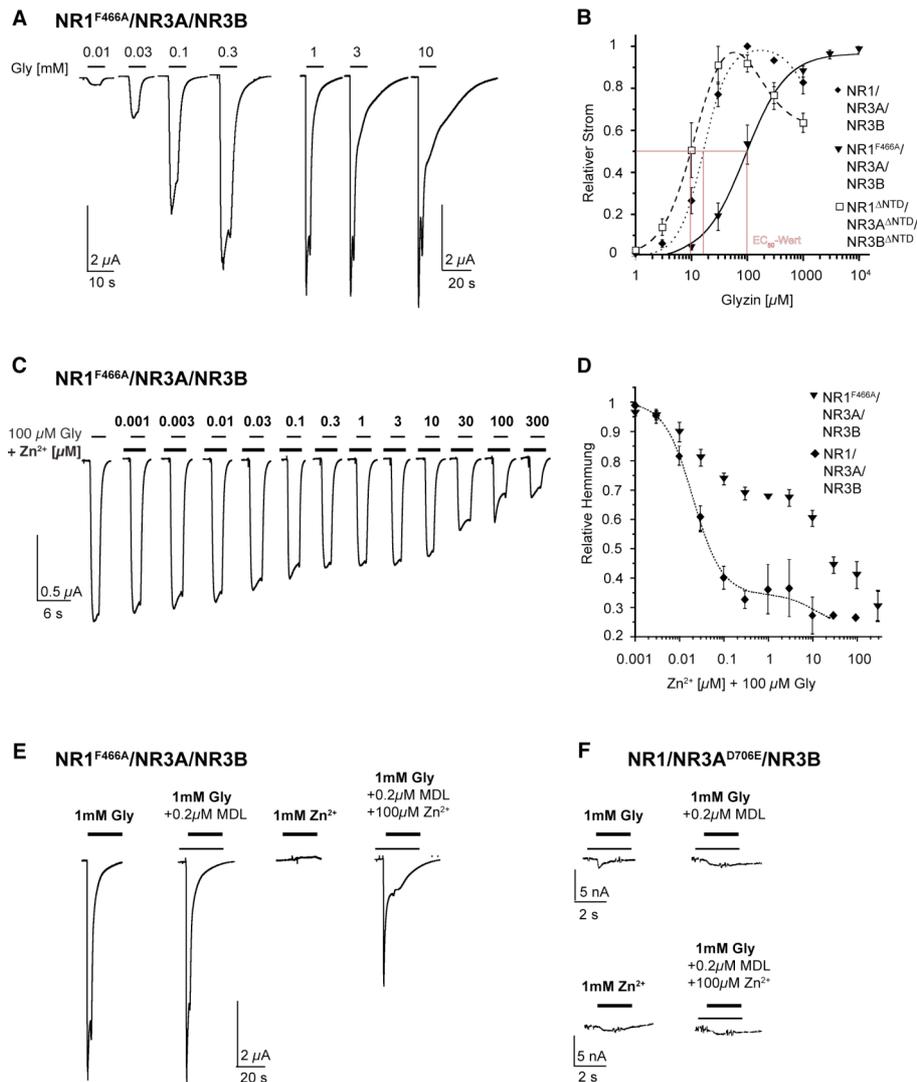
**Abb. 4.15: Zn<sup>2+</sup> potenziert Glycin-induzierte Ströme und wirkt als Agonist an NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptoren.** A) Einzelströme aus NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten nach Applikation von sättigenden Glycin- (1 mM, grau) bzw. Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen (1 mM, schwarz). B) Gezeigt sind Glycin-vermittelte (100 μM) NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Einzelströme in Anwesenheit von ansteigenden Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen (0,001-300 μM). C) Relative Potenzierung der maximalen NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Glycinantwort durch nanomolare Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen (volle Linie, □). Das höchste Ausmaß der Potenzierung von ca. 4,5-fach erfolgte bei 3 μM Zn<sup>2+</sup>. Zum Vergleich ist die Zn<sup>2+</sup>-bedingte Inhibition der Glycinantwort bei wt-NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren (gestrichelte Linie, ◆) dargestellt. D) Dosis-Abhängigkeit der Zn<sup>2+</sup>-Potenzierung von NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorkomplexen in Gegenwart von 100 μM Glycin (volle Linie, □; EC<sub>50</sub>-Wert: 0,06 ± 0,006 μM, n = 3). Beachtenswert ist, dass sich der EC<sub>50</sub>-Wert der NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>- und der IC<sub>50</sub>-Wert der NR1/NR3A/NR3B-Dosis-Wirkungs-Analyse (gestrichelte Linie, ◆) in einem Bereich von 0,06-0,08 μM befinden.

Die Applikation von 1mM Zn<sup>2+</sup> induzierte eine langsam desensitisierende Stromantwort (grau, Abb. 4.15A und Tab. 4.5), deren Ausmaß vergleichbar zum Glycin-induzierten Strom der gleichen Oozyte war (schwarz, Abb. 4.15A und Tab. 4.5). Die Vor- und Ko-Applikation von Zn<sup>2+</sup> (0,001-300 μM) potenzierte die Glycin-vermittelten NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>-Rezeptorströme (Abb. 4.15B). Der höchste Grad an Potenzierung von 4,2-fach konnte bei 3 μM beobachtet werden (Abb. 4.15B, C und Tab. 4.5). Vergleichend dazu ist der Effekt bei steigenden Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen des wt-NR1/NR3A/NR3B-Rezeptors dargestellt (Abb. 4.15 C, gestrichelte Linie). Die Zn<sup>2+</sup>-Konzentration, welche die

halbmaximale Rezeptorpotenzierung bedingte, beträgt  $0,06 \pm 0,006 \mu\text{M}$  (Abb. 4.15D und Tab. 4.5). Interessanterweise waren der  $\text{Zn}^{2+}$ - $\text{EC}_{50}$ -Wert der NTD-deletierten und der  $\text{Zn}^{2+}$ - $\text{IC}_{50}$ -Wert der NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren ( $0,065 \pm 0,009 \mu\text{M}$ ) vergleichbar (Abb. 4.15D, 4.11C und Tab. 4.5). Somit wurde hier gezeigt, dass bei NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren,  $\text{Zn}^{2+}$  ein Agonist und positiver Modulator von Glyzin-induzierten Rezeptorströmen ist.

#### **1.39.8 Einfluss der Mutation der NR1-LBD bzw. NR3A-LBD auf Glyzin-vermittelte NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme und die Modulation durch MDL und $\text{Zn}^{2+}$**

In vorherigen Studien an NR1/NR3A-Rezeptorkomplexen wurde gezeigt, dass die NR1-LBD für die  $\text{Zn}^{2+}$ -Aktivierung und -Modulation und die NR3A-LBD für die Glyzin-vermittelte Rezeptoraktivierung benötigt werden (Madry et al., 2008). Daher sollten hier im Detail die Auswirkungen der Mutation der NR1-LBD (NR1<sup>F466A</sup>) und NR3A-LBD (NR3A<sup>D706E</sup>) auf die Glyzin- und  $\text{Zn}^{2+}$ -Aktivierung, sowie die MDL- und  $\text{Zn}^{2+}$ -Potenzierung Glyzin-vermittelter NR1/NR3A/NR3B-Ströme untersucht werden.



**Abb. 4.16: Auswirkung der Mutation der NR1- bzw. NR3A-LBD auf die Glyzin-, MDL- und  $Zn^{2+}$ -Rezeptorantwort.** A) Einzelströme von  $NR1^{F466A}/NR3A/NR3B$ -Rezeptoren bei steigenden Konzentrationen von Glyzin (0,01-10 mM). Die maximale Aktivierung des Rezeptors erfolgte bei 10 mM Glyzin. B) Die Dosis-Wirkungsanalyse der Glyzin-vermittelten  $NR1^{F466A}/NR3A/NR3B$ -Rezeptoraktivierung (volle Linie,  $\blacktriangledown$ ;  $EC_{50}$ :  $103 \pm 27 \mu M$ ,  $n = 4$ ). In Relation dazu sind die Dosis-Wirkungskurven von wt und NTD-deletierten  $NR1/NR3A/NR3B$ -Rezeptoren dargestellt (gestrichelte Linien,  $\blacklozenge$  bzw.  $\square$ ). C) Glyzin-induzierte  $NR1^{F466A}/NR3A/NR3B$ -Beispielströme in Gegenwart steigender  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen. D) Die Dosis-Wirkungs-Analyse der relativen  $Zn^{2+}$ -Hemmung der Glyzinantwort von  $NR1^{F466A}/NR3A/NR3B$ -Rezeptoren. E) Effekt der Vor- und Ko-Applikation von MDL ( $0,2 \mu M$ ) bzw. MDL/ $Zn^{2+}$  ( $0,2 \mu M/100 \mu M$ ) auf Glyzin-induzierte  $NR1^{F466A}/NR3A/NR3B$ -Rezeptorströme. F) Auswirkung der Mutation der NR3A-LBD auf die Glyzin- und  $Zn^{2+}$ -Aktivierung bzw. die MDL und MDL/ $Zn^{2+}$ -Modulation.

Bei  $NR1^{F466A}/NR3A/NR3B$ -Rezeptoren wurden geringfügig höhere Glyzin-vermittelte Rezeptorströme (Abb. 4.16A und Tab. 4.6), verglichen mit dem wt- $NR1/NR3A/NR3B$ -Rezeptor, beobachtet. Zudem konnte eine verlangsamte Desensitisierung der Rezeptorströme detektiert werden (Abb. 4.16A). Die maximale Rezeptorantwort wurde erst bei Glyzin-Konzentrationen von ca. 10

mM detektiert (Abb. 4.16A, B und Tab. 4.6). Der  $EC_{50}$ -Wert war um das 6-fache gegenüber dem wt-NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor reduziert ( $EC_{50}$  NR1<sup>F466A</sup>/NR3A/NR3B:  $103 \pm 27 \mu\text{M}$ , Abb. 4.16B und Tab. 4.6). Die Vor- und Ko-Applikation von steigenden  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen ( $0,001$ - $300 \mu\text{M}$ ) führten zur biphasischen Hemmung Glyzin-induzierter NR1<sup>F466A</sup>/NR3A/NR3B-Rezeptorströme (Gesamthemmung: 69 %, Abb. 4.16C, D und Tab. 4.6). Die  $Zn^{2+}$ -Hemmung im nanomolaren Konzentrationsbereich war mit 33 % bei  $3 \mu\text{M}$   $Zn^{2+}$ , verglichen zum wt NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor (64 %, Abb. 4.11) deutlich reduziert ( $IC_{50}$ :  $0,017 \pm 0,003 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ; Abb. 4.16C, D und Tab. 4.5). Sie betrug im mikromolaren Konzentrationsbereich, bei  $300 \mu\text{M}$   $Zn^{2+}$ , 36 % ( $IC_{50}$ :  $17 \pm 5,78 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ; Abb. 4.16C, D und Tab. 4.6). Die MDL-Potenzierung war bei NR1<sup>F466A</sup>/NR3A/NR3B-Rezeptoren vollständig aufgehoben (Abb. 4.16E und Tab. 4.6). In Analogie zum wt-NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor, konnte auch an den NR1<sup>F466A</sup>/NR3A/NR3B-Rezeptoren keine agonistische Rolle von  $Zn^{2+}$  (1 mM) festgestellt werden (Abb. 4.16E und Tab. 4.6). Die Ko-Applikation von  $Zn^{2+}$  ( $100 \mu\text{M}$ ) führte, ähnlich dem wt-NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor zu einer Verminderung der MDL-Potenzierung (Abb. 4.16E und Tab. 4.6).

Nach Mutation der NR3A-LBD konnte keine Aktivierung durch Glyzin,  $Zn^{2+}$  oder Modulation durch MDL und  $Zn^{2+}$  detektiert werden (Abb. 4.16F und Tab. 4.6).

Hier wurde gezeigt, dass NR1<sup>F466A</sup>/NR3A/NR3B-Rezeptoren im Vergleich zum wt geringfügig höhere Glyzin-vermittelte Ströme aufweisen. Zusätzlich war hier die MDL-Potenzierung vollständig aufgehoben, die  $Zn^{2+}$ -Inhibition Glyzin-vermittelter Rezeptorströme jedoch erhalten. Im Gegensatz dazu waren NR1/NR3A<sup>D706E</sup>/NR3B-Rezeptoren nicht aktivierbar.

Tabelle 4.6: Pharmakologie von Glyzinbindetaschen-Mutanten in der NR1-LBD (NR1<sup>F466A</sup>) und der NR3A-LBD (NR3A<sup>D706E</sup>) bei NR1/NR3A/NR3B-NMDA-Rezeptoren

	NR1 <sup>F466A</sup> /NR3A/NR3B	NR1/NR3A <sup>D706E</sup> /NR3B
I <sub>max</sub> Glyzin [ $\mu$ A]	6,33±1,6 (5)	n.d. (5)
EC <sub>50</sub> Glyzin [ $\mu$ M]	103±27,2 (4)	n.d. (5)
I <sub>max</sub> Zn <sup>2+</sup> [ $\mu$ A]	n.d. (5)	n.d. (5)
x-fache MDL-Potenzierung	1,1±0,08 (4) *	n.d. (5)
x-fache MDL/Zn <sup>2+</sup> -Potenzierung	0,75±0,34 (4) #	n.d. (5)
x-fache Zn <sup>2+</sup> -Potenzierung	0,67±0,03 (3) ## 0,31±0,06 (3) **	n.d. (5)
IC <sub>50</sub> -Wert Zn <sup>2+</sup> [ $\mu$ M]		
- hoch-affin	0,017±0,003 (3)	n.d. (5)
- nieder-affin	17±5,78 (3)	

\* Bei 1 mM Glyzin und 0,2  $\mu$ M MDL

# Bei 1 mM Glyzin und 0,2  $\mu$ M MDL/100  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>

## Bei 3  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> und 100  $\mu$ M Glyzin

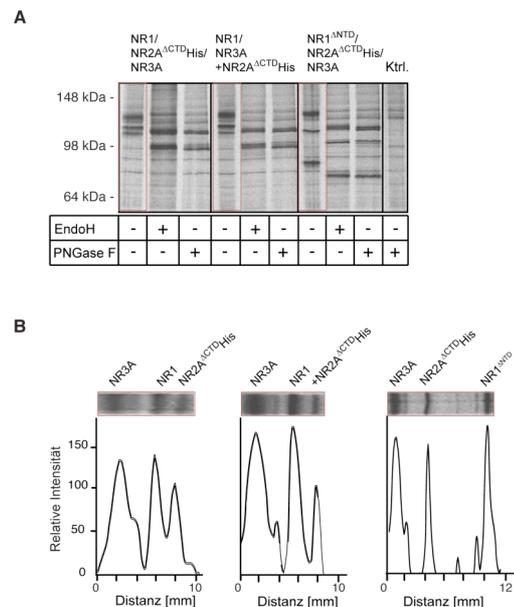
\*\* Bei 300  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> und 100  $\mu$ M Glyzin

## 1.40 Triheteromere NR1/NR2A/NR3A-NMDA-Rezeptoren

### 1.40.1 Ko-Assoziation von NR1-, NR2A- und NR3A-Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten

*In vivo* und *in vitro*-Studien haben gezeigt, dass NR3-Untereinheiten mit NR1/NR2A- oder NR1/NR2B-Untereinheiten ko-assoziiieren (Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995; Das et al., 1998; Nishi et al., 2001; Perez-Otano et al., 2001; Matsuda et al., 2002). Diese NR1/NR2/NR3-Rezeptorkomplexe wiesen, verglichen mit den 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren, eine geringere Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Mg<sup>2+</sup>-Block (Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995; Das et al., 1998; Nishi et al., 2001; Perez-Otano et al., 2001; Matsuda et al., 2002). Die funktionelle Untersuchung von triheteromeren NR1/NR2/NR3-Rezeptorkomplexen, stellt dennoch eine Herausforderung an das rekombinante Systeme dar, da das Fehlen von spezifischen Agonisten oder Antagonisten die Unterscheidung von triheteromeren NR1/NR2/NR3 von 'di-heteromeren' NR1/NR2- bzw. NR1/NR3-Rezeptorpopulationen erschwert. Zudem wurde von Ulbrich und Isacoff (2008)

vorgeschlagen, dass die Expression von NR1-, NR2- und NR3-Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten nicht bevorzugt zu einer Ko-Assoziation von allen drei Untereinheiten führt, sondern eine Favorisierung der 'di-heteromeren' Rezeptorkompositionen erfolgt. Um dies im Detail zu untersuchen, wurden NR1-, und NR3A- zusammen mit NR2A<sup>ΔCTD</sup>-Untereinheiten (s. Kapitel 4.1) nach Expression in Oozyten aufgereinigt und durch die SDS-PAGE analysiert. Hierfür wurde eine 6xHistidin-beinhaltende NR2A<sup>ΔCTD</sup>-Untereinheit verwendet. NR2-Untereinheiten können mit NR1-, jedoch nicht mit NR3-Untereinheiten heterodimerisieren (Perez-Otano et al., 2001). Somit bedeutet die Ko-Aufreinigung von NR3A- eine Ko-Assoziation aller drei NMDA-Rezeptoruntereinheiten. Des Weiteren wurden, zusätzlich zu der zeitgleichen, auch eine sequentielle cRNA-Injektion der drei Untereinheiten erprobt, da an 'di-heteromeren' NR1/NR2- und NR/NR3-NMDA-Rezeptoren gezeigt wurde, dass sie eine unterschiedliche optimale Expressionsdauer besitzen (Madry et al., 2007a, Madry et al., 2007b).



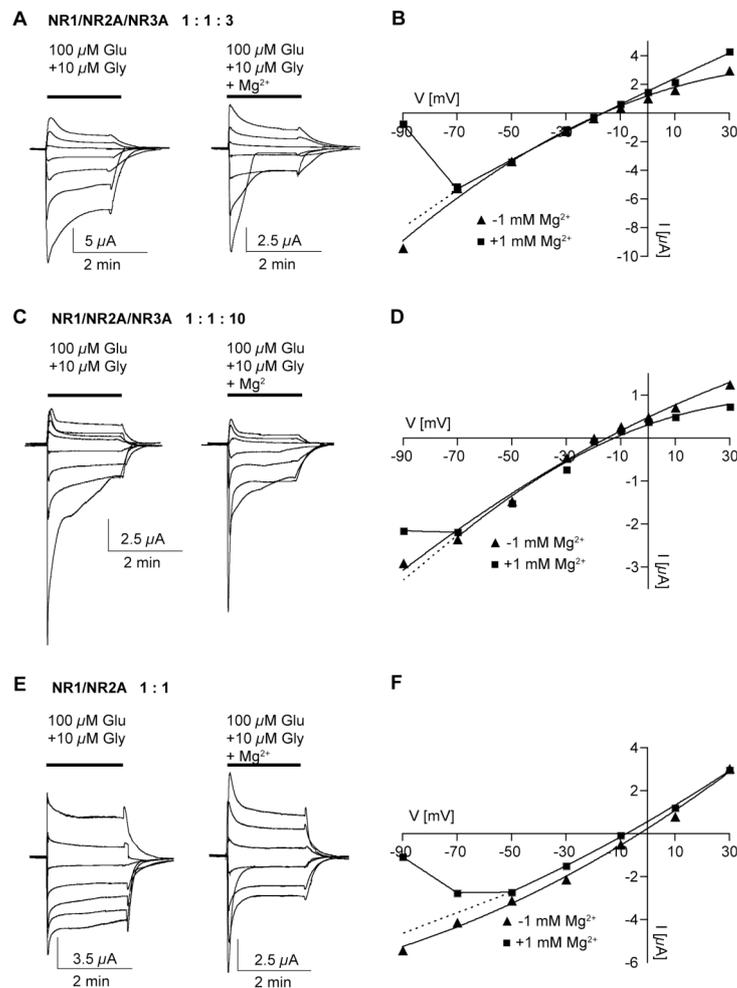
**Abb. 4.17: Ko-Aufreinigung von NR1-, NR2A<sup>ΔCTD</sup>- und NR3A-Untereinheiten aus *Xenopus laevis* Oozyten.** A) [<sup>35</sup>S]-Methionin-markierte NR1/NR2A<sup>ΔCTD</sup>His/NR3A-, sequentiell injizierte NR1/NR2A<sup>ΔCTD</sup>His/NR3A- und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR2A<sup>ΔCTD</sup>His/NR3A-Rezeptorkomplexe wurden aus Oozyten-Membranen mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und über die SDS-PAGE aufgetrennt. Die Kontroll-Probe (Ktrl.) stammt aus nicht-injizierten Oozyten. Die Behandlung der jeweiligen Proteinproben mit EndoH bzw. PNGaseF ist unterhalb der jeweiligen Gelspur gekennzeichnet. Zu beachten ist, dass die nicht-markierten NR1- und NR3A-Untereinheiten, effizient anhand der 6xHistidin-markierten NR2A<sup>ΔCTD</sup>-Untereinheiten ko-aufgereinigt werden können. B) Quantitative Analyse der Proteinbanden-Intensitäten aus A).

Wie anhand der SDS-PAGE gezeigt, konnten drei Proteinbanden detektiert werden, welche den molekularen Massen nach, den NR1-, NR2A<sup>ΔCTD</sup>- und NR3A-Untereinheiten entsprechen (116 kDa, 110 kDa und 128 kDa, Abb. 4.17A, Gelspur 1). Die molekularen Massen von EndoH- bzw. PNGaseF-behandelten Proteinproben wiesen keine bemerkbaren Unterschiede auf (Abb. 4.17A, Gelspuren 2 und 3). Dies weist auf einen geringen Anteil an komplex-glykosylierten NR1/NR2A<sup>ΔCTD</sup>His/NR3A-Rezeptorkomplexen hin. Die Proteinproben, welche aus der Aufreinigung von sequentiell injizierten NMDA-Rezeptor-Konstrukten stammen, haben sich in ihrer Proteinbandenintensität oder Sensitivität auf EndoH bzw. PNGaseF nicht von den Proben der zeitgleichen cRNA-Injektion unterschieden (Abb. 4.17A, Gelspuren 4-6 und 4.17B). Die Auswertung der Proteinbandenintensitäten zeigte ein vergleichbares Maß an [<sup>35</sup>S]-Methionin-Radioaktivität, die in den jeweiligen NR1-, und NR2A<sup>ΔCTD</sup>His- und NR3A-Untereinheiten enthalten waren (Abb. 4.17B). In beiden Fällen überlagerten sich jedoch die EndoH- und PNGaseF-behandelten Proteinbanden der NR1- und NR2A<sup>ΔCTD</sup>His-Untereinheiten. Deswegen wurde im Folgenden anstatt einer wt, eine NTD-deletierte NR1-Untereinheit mit NR2A<sup>ΔCTD</sup>- und NR3A-Untereinheiten ko-exprimiert, aufgereinigt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die nunmehr klare Auftrennung verdeutlicht zusätzlich die Zusammenlagerung von allen drei NMDA-Rezeptoruntereinheiten (Abb. 4.17A). Somit können NR1-, NR2A- und NR3A-Untereinheiten in Oozyten ko-assoziiieren, jedoch war der Anteil an EndoH-resistenten Rezeptorkomplexen gering.

#### **1.40.2 Die Überexpression von NR3A-Untereinheiten bedingt einen größeren Anteil von Mg<sup>2+</sup>-insensitiveren triheteromeren NR1/NR2A/NR3A-Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten**

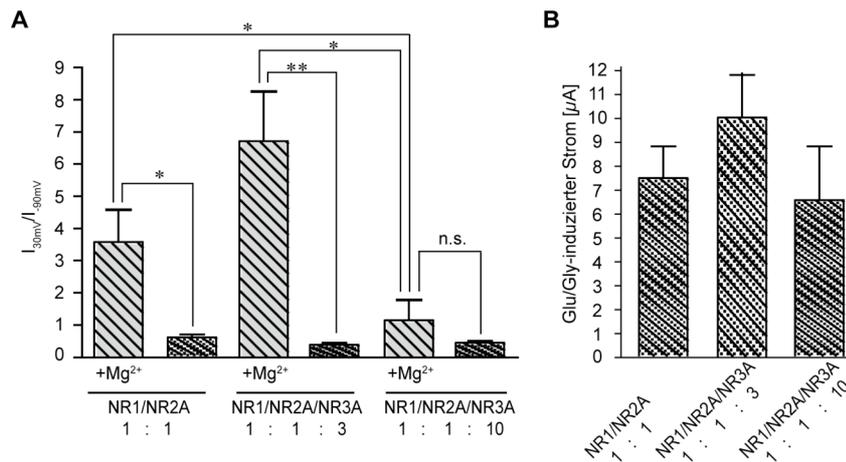
Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein bestimmtes Verhältnis der exprimierten NR1-, NR2A- und NR3A-Untereinheiten die Ausbildung von triheteromeren Rezeptorkomplexen bedingen kann. Dafür wurden diese Untereinheiten im Verhältnis von 1:1:3 bzw. 1:1:10 (NR1:NR2A:NR3A) in Oozyten exprimiert. Da gezeigt wurde, dass NR1/NR2/NR3-Triheteromere annähernd insensitiv gegenüber dem spannungsabhängigen Mg<sup>2+</sup>-Block sind,

sollten des Weiteren, 'NR1/NR2A-Kontaminationen' durch Zugabe von  $Mg^{2+}$ -enthaltenen Agonistenlösungen beseitigt werden. Als Referenz diente der wt-NR1/NR2A-Rezeptor. Gemessen wurde die Strom-Spannungs-Abhängigkeit der Glyzin/Glutamat-induzierten ( $10 \mu M/100 \mu M$ ) Gleichgewichtsströme der jeweiligen Rezeptorkombinationen in An- oder Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  (1 mM).



**Abb. 4.18: Die Überexpression der NR3A-Untereinheit begünstigt die Bildung von  $Mg^{2+}$ -insensitiveren triheteromeren NR1/NR2A/NR3A-Rezeptorkombinationen in *Xenopus laevis* Oozyten.** A), C) und E) Übereinander gelagerte Beispielströme von NR1/NR2A/NR3A-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten bei Potentialen von  $-90$  bis  $+30$  mV und sättigenden Glyzin/Glutamat-Konzentrationen ( $100 \mu M/10 \mu M$ ) in An- (jeweils rechts) oder Abwesenheit (jeweils links) von hemmenden  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen (1 mM). Das Verhältnis der NR1/NR2A/NR3-Untereinheiten ist in A) 1:1:3 und in C) 1:1:10. Applikation der Agonisten erfolgte jeweils bis zum Einstellen eines Gleichgewichtsstroms. B) Die Strom-Spannungsverhältnisse der Rezeptorströme bei Bedingungen unter A) ( $n = 3$ ). D) Die I-V-Verhältnisse der Rezeptorströme bei Bedingungen unter C) ( $n = 4$ ). Beachtenswert ist die Verringerung des  $Mg^{2+}$ -Blocks der NR1/NR2A/NR3A-Rezeptorströme bei  $-90$  mV nach erhöhter Expression der NR3A-Untereinheit. E) und F) Dargestellt sind zum Vergleich die Beispielströme und die I-V-Abhängigkeit der NR1/NR2A-Rezeptoren ( $n = 3$ ). Die gestrichelte Linie stellt jeweils die Extrapolation einer linearen I-V-Beziehung in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  bei  $-90$  mV dar.

In Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  wurde eine annähernd lineare Strom-Spannungs-Beziehung der Glyzin/Glutamat-induzierten NR1/NR2A/NR3A-Rezeptorantworten, sowohl beim 1:1:3- als auch beim 1:1:10-Verhältnis der NR1-, NR2A- und NR3A-Untereinheiten beobachtet (Abb. 4.18B und D). Dies ist durch die Darstellung der jeweiligen Einzelströme illustriert (Abb. 4.18A und C). Die Ko-Applikation der Glyzin/Glutamat-Lösung mit  $Mg^{2+}$  (1 mM) induzierte bei NR1/NR2A/NR3A(1:1:3)-, ähnlich den NR1/NR2A-Rezeptoren, einen starken spannungsabhängigen Block der Stromantworten bei  $-90$  mV ('Einwärtsrektifizierung', Abb. 4.18B und 4.18F), was somit auf eine verstärkte NR1/NR2A-Rezeptorpopulation hindeutet (Abb. 4.19A). Im Unterschied dazu wurde bei NR1/NR2A/NR3A(1:1:10)-Rezeptoren ein reduzierter  $Mg^{2+}$ -Block Glyzin/Glutamat-induzierter Ströme beobachtet (Abb. 4. 18D). Die dabei detektierten Rezeptorströme waren nicht signifikant unterschiedlich zu jenen in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  ( $p > 0,05$ , Student's t-Test, Abb. 4.19B). Dies weist auf die Detektion von  $Mg^{2+}$ -insensitiveren NR1/NR2A/NR3A-Rezeptorkomplexen hin und ist auch anhand des Rektifizierungsindex gezeigt, welcher hier das Verhältnis der Rezeptorströme bei  $-90$  mV im Vergleich zu denen bei  $+30$  mV darstellt (Abb. 4.19A). Der Rektifizierungsindex von 1 bei NR1/NR2A/NR3A(1:1:10)-Rezeptoren weist auf eine lineare Strom-Spannungs-Beziehung und damit die Unempfindlichkeit auf den  $Mg^{2+}$ -Block hin (Abb. 4.19A). Die maximal-induzierbaren Ströme der hier untersuchten Rezeptoren zeigten keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ , Student's t-Test, Abb. 4.19B).



**Abb. 4.19: Quantitative Analyse der NR1/NR2A- und NR1/NR2A/NR3A-Rezeptorströme.** A) Quantifizierung der Glutamat/Glyzin-induzierten (100  $\mu$ M/10  $\mu$ M) NR1/NR2A- (Balken 1 und 2), NR1/NR2A/NR3A- (1:1:3, Balken 3 und 4) und NR1/NR2A/NR3A- (1:1:10, Balken 5 und 6) Rezeptorströme bei  $-90$  mV relativ zu den Strömen bei  $+30$  mV, in An- oder Abwesenheit von 1 mM Mg<sup>2+</sup>. B) Die quantitative Analyse der Glutamat/Glyzin-induzierten NR1/NR2A-, NR1/NR2A/NR3A- (1:1:3) und NR1/NR2A/NR3A- (1:1:10) Rezeptorströme ohne Mg<sup>2+</sup>.

Zusammenfassend, führt die Überexpression der NR3A-Untereinheit zu einer vermehrten Ausbildung von Mg<sup>2+</sup>-insensitiveren triheteromeren NR1/NR2A/NR3A-Rezeptorkomplexen in *Xenopus laevis* Oozyten.

## Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die NTD-Deletion keinen Einfluss auf die Assemblierung, Stöchiometrie oder Zell-Oberflächen-Insertion von NMDA-Rezeptoren hat.

NTD-deletierte NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren zeigten jedoch bis zu 23-fach größere Glyzin-induzierte Ströme im Vergleich zum wt. Dies ging einher mit der annähernden Aufhebung der Potenzierung Glyzin-induzierter Ströme durch den NR1-LBD-Antagonisten MDL, welche bei wt-NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren detektiert wird. Folglich war bei den NTD-deletierten Rezeptoren diese NR1-LBD-vermittelte Auto-Inhibition aufgehoben und an die Erhöhung der Rezeptoreffizienz gekoppelt. Darüber hinaus, wurde bei NTD-deletierten NR1/NR3A-Rezeptoren eine geringe Desensibilisierung beobachtet. Dies als auch die Aufhebung der Auto-Inhibition wurden bereits nach der Deletion der NR3-NTD, jedoch nicht der NR1-NTD, beobachtet. Somit regulieren die NR3-NTDs maßgeblich die NR1/NR3-Rezeptorfunktion.

Triheteromere wt-NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren zeigten, im Unterschied zu wt-NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren, 30-fach größere Glyzin-vermittelte Ströme. Im Einklang mit der erhöhten Rezeptoreffizienz, wurden diese nicht durch die NR1-LBDs auto-inhibitiert. Aufgrundessen hatte die Deletion der NTDs keinen Einfluss auf die Rezeptoreffizienz. Sie war, ähnlich den Befunden an NR1/NR3A-Rezeptoren, an eine geringere Desensibilisierung gekoppelt. Die Ursache für das Vorhandensein der Auto-Inhibition in NR1/NR3A- und NR1/NR3B-, jedoch die Abwesenheit in NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren, kann auf Unterschiede in den Wechselwirkungen der funktionellen NR1/NR3-Dimere in den jeweiligen Rezeptoren zurückgeführt werden. Weiterhin wurde bei den NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren eine hoch-affine, hemmende  $Zn^{2+}$ -Bindestelle detektiert, welche bei NR1/NR3A- oder NR1/NR3B-Rezeptoren nicht existiert. Diese wurde durch die F466A-Mutation der NR1-LBDs beeinträchtigt, jedoch nicht aufgehoben. Somit besitzt  $Zn^{2+}$  noch eine weitere Bindestelle im NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor.

Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass durch die Überexpression von NR3-Untereinheiten, die Ausbildung der  $Mg^{2+}$ -insensitiveren NR1/NR2/NR3-Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten favorisiert wird.

### 1.41 Rolle der NTDs bei der Assemblierung von NMDA-Rezeptoren

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die NTDs von ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren die Homo-Dimerisierung von Rezeptoruntereinheiten vermitteln (Kuusinen et al., 1999; Kunishima et al., 2000). Diesen Domänen wurde weiterhin eine entscheidende Rolle beim Assemblierungsprozess von Mitgliedern der iGluRs, AMPA- und Kainat-Rezeptoren zugeschrieben (Ayalon and Stern-Bach, 2001; Matsuda et al., 2005). Deswegen war zunächst die Vorstellung, dass die NTDs bei allen Familienmitgliedern der iGluRs, d.h. auch bei den NMDA-Rezeptoren, die Rezeptorassemblierung beeinflussen würden, nicht auszuschließen. Die NMDA-Rezeptoren bilden tetramere Strukturen, wobei zwei Glyzin-bindende NR1- und zwei Glutamat-bindene NR2-Untereinheiten ko-assoziiieren (Laube et al., 1998; Furukawa et al., 2005). Diese wären dann in einer homo-dimeren Anordnung im Rezeptor orientiert (Schorge and Colquhoun, 2003; Stephenson, 2006). Die initiale Phase in der Ausbildung der NMDA-Rezeptor-Tetramere würde dabei von den NTDs geleitet (Meddows et al., 2001; Papadakis et al., 2004). Demnach wäre die Funktion der NTDs einerseits die Stabilisierung von Interaktionen mit einigen und andererseits die Verhinderung der Interaktion mit anderen Untereinheiten. Bei allen bisher untersuchten konventionellen NR1/NR2-Rezeptoren wurde eine Homo-Dimerisierung der NR1-Untereinheiten über Disulfid-Brücken der NTDs beobachtet. Somit wäre eine initiale NR1-NR1-Homo-Dimerisierung, vermittelt durch die Cystein-Reste 61 und 290, mit einer anschließenden Anlagerung von einem NR2- bzw. NR3-Homo-Dimer, ein attraktives Modell für die Assemblierung von NMDA-Rezeptoren. Das bedeutet, dass die Homo-Dimerisierung von NR1- und NR2- bzw. NR3-Untereinheiten eine Voraussetzung für die Assemblierung von tetrameren NMDA-Rezeptoren wäre.

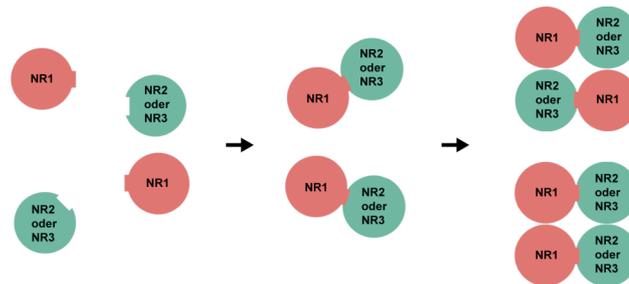
In dieser Studie wurde festgestellt, dass die Cystein-Reste 61 und 290 zwar für die Assoziation von NR1-NR1-Untereinheiten verantwortlich sind, jedoch nicht entscheidend zur Assemblierung von NMDA-Rezeptoren beitragen. Denn die Mutation dieser beiden Reste und selbst die Entfernung der kompletten NR1-NTDs hat nicht die Ausbildung von funktionellen NR1/NR3A-Rezeptoren verhindert (s. Kapitel 4.2.4 und 4.2.5). Zudem konnte gezeigt werden, dass die

NTD-medierte Homo-Dimerisierung der NR1-Untereinheiten nicht entscheidend zur NR1/NR3A-Rezeptorassemblierung beiträgt und auch nicht die Stöchiometrie des Rezeptors beeinträchtigt (s. Kapitel 4.2.3). Es gibt jedoch auch Studien, bei denen die Deletion der NR1-NTD die NMDAR-Assemblierung beeinträchtigt hat (Meddows et al., 2001) und damit die Vermutung unterstützt hat, dass die NTDs eine Notwendigkeit für den Assemblierungsprozess von NMDA-Rezeptoren darstellen. Diese Befunde können jedoch auf eine umfassendere Deletion der NR1-NTD zurückgeführt werden (380 Aminosäuren), als es bei dem, in der vorliegenden Arbeit genutzten Konstrukt der Fall ist (353 Aminosäuren). Der Befund, dass selbst die vollständige Entfernung der NTDs zu funktionellen NR1/NR3A-Rezeptorkanälen führt und die fixe 2:2-Stöchiometrie nicht beeinträchtigt ist, zeigt, dass die NTDs nicht in die Rezeptorassemblierung involviert sind und eine andere Rolle beim 'exzitatorischen Glyzinrezeptor' (Chatterton et al., 2002) haben. Dies gilt auch für konventionelle NMDA-Rezeptoren. So führt die Ko-Expression von NR1<sup>C61A</sup>- und NR1<sup>C290A</sup>-Mutanten mit NR2-Untereinheiten (Laube et al., 1993; Choi et al., 2001) bzw. von NTD-deletierten NR1- mit NR2-Untereinheiten (Madry et al., 2007a) zur Ausbildung von funktionellen NMDA-Rezeptorkanälen. Da die Mutation der Cystein-Reste 61 und 290 die Stabilität von einzelexprimierten NR1-Untereinheiten beeinträchtigte, ist anzunehmen, dass die Ausbildung von Disulfid-Brücken die Proteindegradierung im ER reduziert. Dies führt zu stabil expimierten NR1-Untereinheiten in Abwesenheit von anderen NMDA-Rezeptor-Untereinheiten (Atlason et al., 2007). Diese Befunde werden durch FRET-basierten Analysen unterstützt, bei denen stabile, intrazellulär lokalisierte Homo-Dimere von NR1-Untereinheiten detektiert wurden (Schuler et al., 2008). Zusammenfassend wurde hier gezeigt, dass die NTDs nicht für die Ausbildung von funktionellen NR1/NR3A-NMDA-Rezeptoren notwendig sind.

#### **1.41.1 Modellvorstellung für die Assemblierung von NMDA-Rezeptoren**

In dieser Studie wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von NR1-Untereinheiten keine Homo-Oligomerisierung von NR3-Untereinheiten stattfindet. Dies ist vereinbar mit FRET-basierten Analysen an NR1- und NR2-Untereinheiten (Schuler et al., 2008). Folglich ist die Homo-Dimerisierung von NR2- und NR3-

Untereinheiten unwahrscheinlich (Atlason et al., 2007). Im Gegensatz dazu wurde jedoch die Ausbildung von NR1/NR2- bzw. NR1/NR3-Hetero-Dimeren beobachtet (Schuler et al., 2008). Im Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen wurde kürzlich gezeigt, dass das Hetero-Dimer die funktionelle Einheit von 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren (Furukawa et al., 2005) und vom 'exzitatorischen Glyzinrezeptor' bildet (Madry et al., 2007b). Da NR2- und NR3-Untereinheiten nicht Homo-oligomerisieren und die NR1-Homo-Oligomerisierung nicht entscheidend für die Assemblierung von NMDA-Rezeptoren ist, führt dies zu der Annahme eines Zwei-Schritt-Assemblierungsweges: zunächst findet die Hetero-Dimerisierung einer NR1- und einer NR2- bzw. NR3-Untereinheit statt. Diese ist gefolgt von einer Dimerisierung mit einem zusätzlichen Hetero-Dimer, was letztendlich zu der Formation der tetrameren NMDA-Rezeptor-Struktur führt (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1.: Schematisches Modell für die Assemblierung der dimeren Hetero-Dimere von NMDA-Rezeptoren.** Dieses Modell basiert auf den Befunden, dass 1) weder die NR2- noch die NR3A-Untereinheit Homo- bzw. Hetero-Oligomere in der Abwesenheit von NR1-Untereinheiten bilden, 2) die Homo-Oligomerisierung von NR1-Untereinheiten nicht für eine korrekte Rezeptorassemblierung erforderlich ist und, dass 3) die LBDs von NMDA-Rezeptoren als Hetero-Dimere agieren. Daher können zwei Grundschriffe in der NMDA-Rezeptor-Assemblierung angenommen werden: 1) Hetero-Dimerisierung einer NR1- und einer NR2- oder NR3-Untereinheit und 2) Dimerisierung von zwei NR1/NR2- oder NR1/NR3-Hetero-Dimeren zum tetrameren Komplex, welches in 'di-heteromeren' NR1/NR2- und NR1/NR3- oder triheteromeren NR1/NR2/NR3-Rezeptoren resultiert. Die Anordnung der intermediären Hetero-Dimere ist noch unbekannt.

Diese Ausbildung von NR1/NR2- und NR1/NR3-Hetero-Dimeren bietet auch die Möglichkeit der Assoziation von drei Arten von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten im Rezeptorkomplex, z.B. NR1/NR2/NR3-NMDA-Rezeptoren, die folglich eine 2:1:1-Stöchiometrie aufweisen. Dies ist im Einklang mit *in vivo*-Studien an NR1/NR2A/NR3A-Rezeptoren (Perez-Otano et al., 2001).

### 1.41.2 Schlussfolgerung mit Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte dargelegt werden, dass die NTDs nicht für die Assemblierung von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten zu funktionellen Rezeptoren notwendig sind. Interessanterweise wurde kürzlich eine Studie publiziert, welche gezeigt hat, dass die NTDs von NR2A-Untereinheiten ein Endoplasmatisches Retikulum (ER)-spezifisches Retentionssignal enthalten, welches nur durch die Assemblierung mit NR1-Untereinheiten maskiert wird (Qiu et al., 2009). Somit könnten die NTDs von NR2A-Untereinheiten möglicherweise für die Bestimmung der ER-spezifischen Retention eine Rolle spielen. Es wurden jedoch auch ER-Retentionssignale im Bereich der C-terminalen- und Transmembrandomänen (TMDs) bei NR1- und NR2-Untereinheiten gefunden, welche durch die Zusammenlagerung dieser beiden Untereinheiten maskiert werden (Schorge und Colquhoun, 2003, Horak et al., 2008a). Dies bedeutet, dass NTD-deletierte, ähnlich den wt-NR2-Untereinheiten, für den Transport aus dem ER, die Ko-Assoziation mit NR1-Untereinheiten benötigen.

Für die Regulation der NMDA-Rezeptorassemblierung müssen somit andere Determinanten als die NTDs vorhanden sein. Folglich befinden sich diese in den verbleibenden NMDA-Rezeptor-Domänen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie bietet eine Grundlage für die Vermutung, dass die TMDs in die NMDA-Rezeptorassemblierung involviert sind (Horak et al., 2008b). In dieser Studie wurde zunächst gezeigt, dass ein Motiv direkt nach der TM4 der NR2B-Untereinheit, d.h. in der CTD, den Transport des Rezeptors zur Membranoberfläche verhindert hat. Jedoch führte die Ko-Expression eines TM4-Konstruktes, bei dem die CTD deletiert war, zusammen mit den TM4-deletierten NMDA-Rezeptor-Untereinheiten zu funktionellen Rezeptoren. Bei NR1/NR3-Rezeptoren ist die Fragestellung, inwiefern die TMDs in die Assemblierung involviert sind, noch völlig ungeklärt. Mithilfe der biochemischen Methoden, die in der vorliegenden Arbeit angewandt worden sind, kann die Untersuchung der Ko-Aufreinigung von TM4-deletierten zusammen mit TM4-Konstrukten von NR1- und NR3-Untereinheiten helfen, die Rolle der TMDs bei der NR1/NR3-Rezeptorassemblierung aufzuklären.

## 1.42 Einfluss der NTDs auf die NR1/NR3-Rezeptorfunktion

### 1.42.1 Die NTDs determinieren die NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoreffizienz über das Ausmaß der NR1-LBD-vermittelten Auto-Inhibition

Die NTDs sind bei NR1/NR2-NMDA-Rezeptoren für die allosterische Hemmung durch  $Zn^{2+}$  verantwortlich, welche über die Erhöhung der Desensibilisierung und damit die Verringerung der Rezeptoreffizienz vermittelt wird (Paoletti et al., 1997; Krupp et al., 1998; Low et al., 2000; Madry et al., 2007a; Gielen et al., 2008; Gielen et al., 2009). Bei NR1/NR3-Rezeptoren war die Rolle NTDs bezüglich der Modulation der Rezeptorfunktion bisher nicht ganz klar. Vielmehr ist bei NR1/NR3-Rezeptoren die Modulation durch die LBDs determiniert (Madry et al., 2007b; Madry et al., 2008). So wurde gezeigt, dass die Antagonisierung der NR1-LBD, jedoch nicht der NR3-LBD, zu einer Potenzierung der Glyzin-Antwort führt (Madry et al., 2007b). Dies implizierte, dass 1) die NR1- und NR3-LBDs differentielle Rollen bei der Aktivierung des Rezeptors haben und 2) NR1-Untereinheiten in die Auto-Inhibition des NR1/NR3-Rezeptors involviert sind, welche die geringe Rezeptoreffizienz verursacht (Madry et al., 2007b).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die NTD-Deletion bei NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren bis zu 23-fach größere Ströme bewirkte (s. Kapitel 4.3.1 und 4.3.2). Da weder die Assemblierung noch die Zell-Oberflächen-Expression von  $NR1^{\Delta NTD}/NR3A^{\Delta NTD}$ -Rezeptoren beeinträchtigt waren (s. Kapitel 4.2.5), bedingt die NTD-Deletion eine Erhöhung der Rezeptoreffizienz. Dies ging einher mit einer deutlichen Reduktion der Potenzierung Glyzin-induzierter  $NR1^{\Delta NTD}/NR3^{\Delta NTD}$ -Rezeptorströme durch den NR1-LBD-Antagonisten MDL im Vergleich zum wt (s. Kapitel 4.3.3). Folglich bedingt die NTD-Deletion eine annähernde Aufhebung der NR1-LBD-vermittelten Auto-Inhibition und verursacht dadurch die Erhöhung der NR1/NR3-Rezeptoreffizienz (s. Kapitel 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.3). Das bedeutet, dass die NTDs maßgeblich die NR1/NR3-Rezeptorfunktion determinieren. Weiterhin bedingte die NTD-Deletion die Verringerung der Desensibilisierung von NR1/NR3A-Rezeptoren (s. Kapitel 4.3.3). Vergleichbare Befunde wurden auch

an NR1/NR2-Rezeptoren erhalten (Madry et al., 2007a), wodurch impliziert wird, dass die Desensibilisierung bei NMDA-Rezeptoren generell über die NTDs reguliert wird. Bei NR1/NR3A-Rezeptoren korrelierte das Ausmaß der Rezeptordesensibilisierung mit dem der MDL-Potenzierung (s. Kapitel 4.3.3). Die Fragestellung, inwiefern die Desensibilisierung und der NR1-LBD-Antagonismus zusammenhängen, wird im Kapitel 5.7 näher erläutert.

Die Aufhebung der Auto-Inhibition und die Steigerung der Rezeptoreffizienz wurden sowohl bei NR1/NR3A- als auch NR1/NR3B-Rezeptoren beobachtet, was vermuten lässt, dass der zugrunde liegende Mechanismus, den beiden Rezeptortypen gemeinsam ist. Da dieser Effekt schon nach der selektiven NR3-NTD-Deletion beobachtet wird, deutet dies daraufhin, dass die NR3-NTDs maßgeblich die NR1/NR3-Rezeptoreffizienz determinieren. Ähnliches wurde an 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren gezeigt, bei denen vor allem die NR2-NTDs die Offenwahrscheinlichkeit des Rezeptorkanals und somit die Rezeptoreffizienz bestimmen (Madry et al., 2007a; Gielen et al., 2008; Gielen et al., 2009). Dennoch müssen die in der vorliegenden Arbeit gemachten Befunde durch biochemische Vergleiche der Expressionsniveaus von wt als auch teil- und vollständig NTD-deletierten NR1/NR3-Rezeptoren erhärtet werden. Die Fragestellung, wie die strukturelle Konsequenz der NTD-Teildeletion ist, kann vor allem durch kristallographische Untersuchungen aufgeklärt werden.

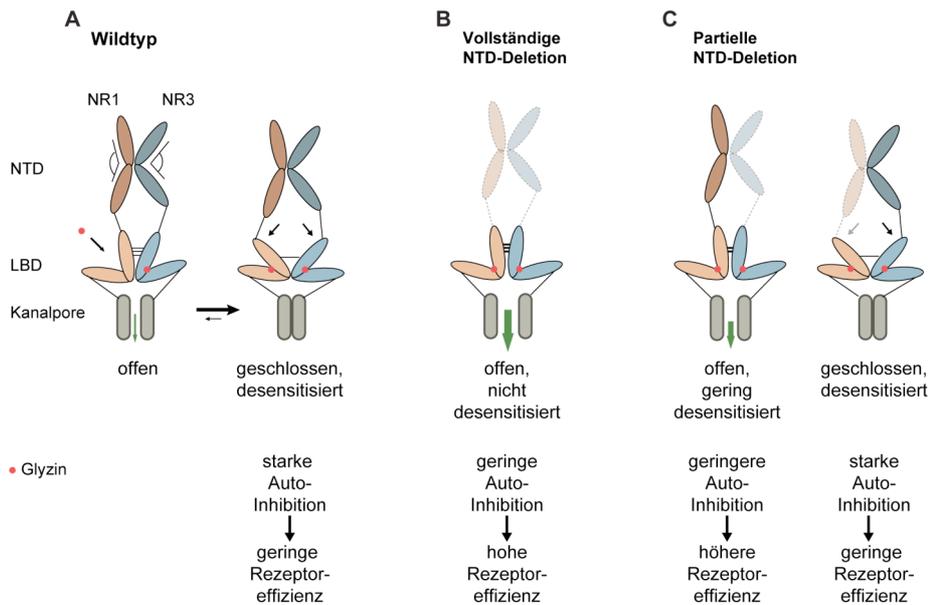
Somit wurde hier gezeigt, dass vor allem die NR3-NTDs das Ausmaß der Rezeptoreffizienz bestimmen und demnach die NR1- und NR3-NTDs, ähnlich den NR1- und NR3-LBDs (Madry et al., 2007b), differentielle Rollen spielen.

#### **1.42.2 Mechanistische Modellvorstellung der Regulation der NR1/NR3-Rezeptoreffizienz durch die NTDs**

Durch kristallographische Untersuchungen an AMPA- und NMDA-Rezeptorfragmenten (Armstrong et al., 1998; Armstrong and Gouaux, 2000; Furukawa et al., 2003; Furukawa et al., 2005; Mayer, 2005; Mayer et al., 2008) wurde gezeigt, dass bei 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren die LBDs von NR1- und NR2-Untereinheiten nach Binden des Agonistes in einem 'Venusfliegen-Fallen-artigen' Mechanismus schließen, wodurch die Öffnung

des Rezeptorkanals ausgelöst wird (Furukawa et al., 2005; Madry et al., 2007b). Die LBDs sind dabei in einer 'Rücken-an-Rücken'-Anordnung organisiert (Furukawa et al., 2005), wobei die Stabilität der ausgebildeten intermolekularen Wechselwirkungen für die Effizienz von NMDA-Rezeptoren verantwortlich gemacht wird (Madry et al., 2007b; Gielen et al., 2008; Gielen et al., 2009). Für die NR1/NR2-NTDs wird vermutet, dass sie ähnlich den iGluR-LBDs, dimerisieren und nach einer Ligandierung, z.B. mit  $Zn^{2+}$ , die Rezeptoreffizienz bestimmen können (Madry et al., 2007a; Gielen et al., 2008; Gielen et al., 2009). Die Annahme von NMDA-Rezeptor-NTD-Dimeren wird durch zwei kürzlich publizierte Arbeiten der Kristallstrukturen von NTD-Dimeren bei AMPA-Rezeptor-GluR2 und Kainat-Rezeptor-GluR6 gestützt (Jin et al., 2009; Kumar et al., 2009).

Basierend auf den hier erhaltenen Daten ist anzunehmen, dass bei NR1/NR3-Rezeptoren, die NTDs die Wechselwirkungen zwischen den ligandierten NR1/NR3-LBDs schwächen und somit die Rezeptordesensibilisierung verursachen (Abb. 5.2). Dies würde auch eine Erklärung für die kleinen und schnell desensibilisierenden NR1/NR3-Rezeptorströme nach rekombinanter Expression liefern (Chatterton et al., 2002; Awobuluyi et al., 2007; Madry et al., 2007b). Die Schwächung der LBD-Wechselwirkungen bewirkt weiterhin, dass der NR1/NR3-Rezeptor über die NR1-LBDs auto-inhibiert und die Rezeptoreffizienz stark erniedrigt wird. Nach der Wegnahme der NTDs ist der negative Einfluss dieser Domänen auf die NR1/NR3-LBD-Wechselwirkungen nicht mehr vorhanden, was letztenendes in nicht-desensibilisierenden Rezeptorströmen, der Aufhebung der Auto-Inhibition und folglich der Effizienzerhöhung des NR1/NR3-Rezeptors resultiert (s. Abb. 5.2 und Kapitel 4.3.1).



**Abb. 5.2:** Schematisches Modell der Determinierung der NR1/NR3-Rezeptoreffizienz und Auswirkung der NTD-Deletion. Das Reaktionsschema zeigt die heterodimere Anordnung der NR1- und NR3-Untereinheiten. Zur Vereinfachung sind zwei Untereinheiten dargestellt. NTD: N-terminale Domäne; LBD- Ligandenbindungsdomäne; Kanalpore. A) Die Besetzung der hoch-affinen NR3-LBD führt zur Öffnung des Ionenkanals (links). Die Ligandierung der nieder-affinen NR1-LBD führt zur Schwächung der NR1/NR3-LBD-Wechselwirkungen, der Schließung des Ionenkanals und der Desensitierung. Dies ist an eine starke Auto-Inhibition und somit geringe Rezeptor-Effizienz gekoppelt (rechts). Diese Effekte werden durch den Druck der NTDs auf die NR1/NR3-LBD-Kontaktstelle verursacht. B) Die NTD-Deletion verhindert die Schwächung der LBD-Wechselwirkungen und bedingt damit nicht-desensitierende Ströme. Die geringe Rezeptor-Auto-Inhibition bedingt eine erhöhte Rezeptoreffizienz. C) Die selektive Deletion der NR3-NTDs (links), jedoch nicht der NR1-NTDs (rechts) führt zu geringer desensitierenden Strömen sowie zur Erhöhung der Rezeptoreffizienz. Die differentiellen NTD-Rollen können durch eine geschlossenere Konformation der NR3- gegenüber NR1-NTDs, gezeigt anhand der angelegten Winkelmaße, erklärt werden.

Die funktionelle Analyse der partiell NTD-deletierten NR1/NR3-Rezeptoren führt zudem zur Vermutung, dass NR3-NTDs eine größere Rolle bei der Bestimmung der Rezeptoreffizienz spielen (s. Abb. 5.2; Kapitel 4.3.1 und 4.3.2). Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen an NR1/NR2-Rezeptoren (Gielen et al., 2009). Demnach oszillieren die NR2-NTDs zwischen einer geöffneten und einer geschlossenen Konformation. Dabei stabilisiert das Binden eines allosterischen Inhibitors, wie z.B.  $Zn^{2+}$ , die geschlossene Konformation der NR2-NTDs. Dies hat eine Schwächung der NR1-NR2-LBD-Wechselwirkungen zur Folge und resultiert letztendlich in der Schließung des Rezeptorkanals (Paoletti et al., 1997; Krupp et al., 1998; Low et al., 2000; Paoletti et al., 2000; Zheng et al., 2001; Madry et al., 2007a; Gielen et al., 2008; Gielen et al., 2009). Für

NR1/NR3-Rezeptoren bedeutet dies, dass die NR3-NTDs in einer bevorzugt geschlossenen Konformation vorliegen und die NR1/NR3-LBD-Wechselwirkungen schwächen (Madry et al., 2007b). Im Gegensatz zu NR1/NR2-Rezeptoren (Madry et al., 2007a; Gielen et al., 2008; Gielen et al., 2009) konnte für die NR3-NTDs bisher noch keine Substanz gefunden werden, die für eine Ligandierung dieser Domäne verantwortlich wäre, möglicherweise aufgrund der bevorzugt geschlossenen Konformation, in der sie vorliegt.

### **1.42.3 Partieller Agonismus von D-Serin bei NR1/NR3A-Rezeptoren und Einfluss der NTD-Deletion**

Neben Glyzin wurde für die Aminosäure D-Serin gezeigt, dass sie an der NR1-Glyzin-Bindetasche agiert (Yao and Mayer, 2006) und zusammen mit Glutamat vergleichbare Rezeptorströme an NR1/NR2-Rezeptoren hervorruft (Matsui et al., 1995). Somit wurde ein weiterer endogener Ligand von konventionellen NMDA-Rezeptoren identifiziert (Schell et al., 1995; Mothet et al., 2000; Panatier et al., 2006; Oliet and Mothet, 2009), welcher den 'eigentlichen' Liganden Glyzin als Ko-Agonist von Glutamat an NR1/NR2-Rezeptoren ersetzen kann (Wolosker et al., 1999; Shleper et al., 2005). In bestimmten hippokampalen Regionen, nimmt D-Serin sogar eine dominantere Rolle als Glyzin ein (Shleper et al., 2005). In der Retina z.B. wirkt es als Agonist anstelle von Glyzin (Miller, 2004; Gustafson et al., 2007). Untersuchungen an löslichen NR1- und NR3-LBD-Konstrukten haben gezeigt, dass D-Serin an beide LBDs, jedoch mit unterschiedlichen Affinitäten, bindet (D-Serin  $K_d$  NR1: 7  $\mu$ M und NR3A: 643 nM; Yao und Mayer, 2006). Basierend auf dem postulierten Modell von Madry und Kollegen (2007) über die differentiellen Rollen der LBDs bei der Aktivierung des NR1/NR3A-Rezeptors sollte D-Serin aufgrund der höheren Affinität für die NR3A-LBD zunächst an diese binden und den Rezeptor aktivieren. Durch die anschließende Ligandierung der NR1-LBD sollte das Schließen dieser Domäne, die intramolekularen NR1/NR3A-LBD-Wechselwirkungen schwächen und die Rezeptorschließung verursachen. Im Vergleich zu Glyzin (Yao and Mayer, 2006), ist bei D-Serin die Differenz der Affinitäten für die NR1- und NR3A-LBD geringer. Folglich ist die D-Serin-Affinität für die 'aktivierende' NR3A-LBD vergleichsweise niedriger und diejenige für die 'inaktivierende'

NR1-LBD jedoch höher. Dies sollte eine niedrigere Rezeptoreffizienz aufgrund der vergleichsweise schnelleren Inaktivierung des NR1/NR3A-Rezeptorkanals bewirken. Das bedeutet, dass aufgrund der NR1-LBD-vermittelten Auto-Inhibition, die erhöhte Agonisten-Affinität für die NR1-Untereinheit mit einer reduzierten Effizienz der Rezeptoraktivierung verbunden ist. Folglich wirkt D-Serin als partieller Agonist von NR1/NR3A-Rezeptoren (s. Kapitel 4.3.4). Dieser Befund erklärt auch die von Chatterton et al. (2002) gemachten Beobachtungen, dass D-Serin die Glyzin-induzierten NR1/NR3A-Rezeptorströme reduziert. Des Weiteren konnte hier, wie für Glyzin, gezeigt werden, dass die NTDs auch die D-Serin-vermittelte NR1/NR3A-Aktivierung inhibierten, da die Deletion der NTDs eine Erhöhung der Rezeptoreffizienz bewirkt hat. Die Beobachtung, dass schon die Deletion der NR3A-NTD allein, jedoch nicht die der NR1-NTD, wirksam war (s. Kapitel 4.3.4), unterstützt die Annahme der differentiellen Rollen der NR1- und NR3-NTDs.

#### **1.42.4 Unterschiedlicher Einfluss der NTDs auf die $Zn^{2+}$ -Aktivierung von NR1/NR3A-Rezeptoren im Vergleich zu Glyzin**

Bisher wurde dem zweiwertigen Metallion  $Zn^{2+}$ , welches endogen im ZNS-Gewebe vorkommt (Frederickson et al., 2006; Paoletti et al., 2009) eine inhibitorische Rolle zugeschrieben, wie z.B. die des allosterischen Inhibitors von Glyzin/Glutamat-vermittelten NR1/NR2A-Rezeptorströmen, und zwar über das Binden an die NTDs von NR2-Untereinheiten (Paoletti et al., 1997; Krupp et al., 1998; Low et al., 2000; Zheng et al., 2001; Madry et al., 2007a). Kürzlich wurde  $Zn^{2+}$ , neben Glyzin, als ein nieder-affiner voller Agonist von rekombinanten NR1/NR3A-Rezeptoren identifiziert (Madry et al., 2008). Im mikromolaren Konzentrationsbereich potenziert  $Zn^{2+}$  auch Glyzin-vermittelte Ströme. Zwar wurde für beide Effekte gezeigt, dass sie durch die F466A-Mutation der Glyzin-Bindetasche der NR1-LBD aufgehoben werden, dennoch wurde vermutet, dass  $Zn^{2+}$  nicht an der gleichen Region wie Glyzin bindet (Madry et al., 2008). Zunächst ist die Glyzin-Affinität in An- oder Abwesenheit von  $Zn^{2+}$  vergleichbar, was bedeutet, dass  $Zn^{2+}$  kein kompetitiver Agonist der NR1-Glyzinbindetasche ist (Madry et al., 2008). Außerdem kann der NR1-Glyzinbindetaschen-Antagonist MDL sowohl Glyzin-vermittelte (NR3A-LBD), als auch  $Zn^{2+}$ -

induzierte (NR1-LBD) Rezeptorströme potenzieren (Madry et al., 2008), was bedeutet, dass  $Zn^{2+}$  und MDL an unterschiedlichen Stellen in der NR1-LBD binden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass  $Zn^{2+}$  einen anderen Mechanismus zur NR1/NR3A-Aktivierung als Glyzin (Madry et al., 2008) und D-Serin benutzt.

Im Einklang mit dieser Annahme, wurde hier beobachtet, dass die NTDs einen unterschiedlichen Einfluss auf die  $Zn^{2+}$ -induzierte NR1/NR3A-Rezeptoraktivierung im Vergleich zu Glyzin haben. Anders als bei Glyzin (s. Kapitel 4.3.1) waren nach der Deletion beider NTDs die  $Zn^{2+}$ -vermittelten Stromamplituden im Vergleich zum Glyzin-induzierten Strom 20-mal kleiner (s. Kapitel 4.3.4). Das bedeutet, dass bezüglich  $Zn^{2+}$ , die Deletion beider NTDs keine Verbesserung der NR1/NR3A-Rezeptoreffizienz bedingt. Weiterhin zeigt die funktionelle Analyse, dass die selektive Deletion der NR3A-NTDs, jedoch nicht der NR1-NTDs, die  $Zn^{2+}$ -vermittelte NR1/NR3A-Rezeptoraktivierung beeinträchtigt hat (s. Kapitel 4.3.4). Die Beobachtung der differentiellen Rollen der NR1- und NR3-NTDs bei der  $Zn^{2+}$ -Aktivierung ist analog zu den vorherigen Ergebnissen mit Glyzin und D-Serin (s. Kapitel 4.3.1, 4.3.4, 5.2.1 und 5.2.3). Folglich spielen die NR3-NTDs, unabhängig von dem Aktivierungsmechanismus, grundsätzlich eine große Rolle bei der Bestimmung der Effizienz von NR1/NR3-Rezeptoren. Weiterhin unterstützen die hier gemachten Beobachtungen, die Annahme der unterschiedlichen Mechanismen der NR1/NR3A-Rezeptoraktivierung bei  $Zn^{2+}$  und Glyzin/D-Serin (Madry et al., 2008).

### **1.43 Vergleich der Rolle der NTDs von NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren**

Die ionotropen und metabotropen GluRs sind Rezeptorproteine mit einem modularen Aufbau (Nakanishi et al., 1990; O'Hara et al., 1993; Stern-Bach et al., 1994; Mayer, 2006), wobei die iGluRs durch die Fusion von einem prokaryotischen Ionenkanal und zwei bakteriellen, periplasmatischen Aminosäurebindeproteinen entstanden zu sein scheinen (Nakanishi et al., 1990; Stern-Bach et al., 1994; Madden, 2002; Mayer, 2006). So wurde gefunden, dass die LBDs von NMDA-Rezeptoren Strukturverwandschaft mit

den Glutamin-Bindeproteinen (QBPs) und die NTDs eine strukturelle Homologie zu den Leucin-Isoleucin-Valin-Bindeproteinen (LIVBPs) aufweisen (Nakanishi et al., 1990; Stern-Bach et al., 1994). Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren besitzen jedoch nur eine extrazelluläre Domäne, die LIVBP-homologe Domäne, welche sich hier zu der Bindungsdomäne für Glutamat entwickelt hat (O'Hara et al., 1993). Trotz der Gemeinsamkeiten bei der Struktur und Funktion von bestimmten Domänen bei den iGluRs, z.B. den hoch-konservierten TMDs bzw. den strukturhomologen LBDs scheint, dass die NTDs von non-NMDA- und NMDA-Rezeptoren nur wenige Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer Funktion besitzen (Gielen et al., 2008; Gielen et al., 2009; Jin et al., 2009; Kumar et al., 2009). Kürzlich veröffentlichte Kristallstrukturen haben Vermutungen bestätigt, dass die NTDs von AMPA-Rezeptor-GluR2- und Kainat Rezeptor-GluR6-Untereinheiten, so wie für mGluR-LIVBPs gezeigt (Kunishima et al., 2000), dimerisieren können (Jin et al., 2009; Kumar et al., 2009). Dabei bilden die NTDs zwei-blättrige 'Venusfliegen-Fallen-artige' Strukturen aus, welche in einer 'Rücken-an-Rücken'-Anordnung organisiert sind und durch starke intermolekulare Wechselwirkungen interagieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Domänen 1 und vor allem die hydrophoben Aminosäurereste der Domäne 2 (L1L2 in GluR2 bzw. R1R2 in GluR6), an den NTD-Wechselwirkungen beteiligt sind, welche die zwei-blättrige Struktur in einer stetig halb-geschlossenen Konformation zu halten scheinen (Jin et al., 2009; Kumar et al., 2009). Dies, sowie die hohe Affinität der NTD-Dimerisierung (mikromolarer Bereich) und die Tatsache, dass bisher noch kein Ligand für diese Domänen gefunden wurde, führen zur Annahme, dass im Gegensatz zu den NMDA-Rezeptoren die NTDs von AMPA- und Kainat Rezeptoren nicht die Rezeptorfunktion modulieren und primär für die Rezeptorassemblierung zuständig zu sein scheinen (Jin et al., 2009; Kumar et al., 2009). Für die NTDs von NMDA-Rezeptoren wurde bisher noch keine Kristallstruktur publiziert, jedoch scheint vor allem bezüglich der Fläche der Domäne 2 mit ihren hydrophilen Aminosäureresten eine größere Homologie zu den Glutamat-bindenden mGluR-LIVBPs als zu non-NMDA-Rezeptor-NTDs zu bestehen (Kumar et al., 2009). Dies unterstützt unter anderem die Annahme, dass die NMDA-Rezeptor-NTDs, so wie die mGluR-LIVBPs, mehrere Konformationen annehmen können, z.B. eine geöffnete Konformation im nicht-ligandierten

Zustand und eine geschlossene nach der Besetzung eines Agonisten, wie z.B.  $Zn^{2+}$ . Diese Schlussfolgerungen wurden anhand von Mutagenese- und NTD-Deletionsstudien gezogen (Paoletti et al., 1997; Krupp et al., 1998; Low et al., 2000; Zheng et al., 2001; Madry et al., 2007a). Sie können jedoch erst durch eine kristallographische Analyse dieser Domänen erhärtet werden.

#### **1.44 Regulatorische Rolle der NTDs bei der NMDA-Rezeptorfunktion**

Die Aktivierung von postsynaptisch lokalisierten Rezeptorkomplexen ist eine der Voraussetzungen für die adäquate Signalweiterleitung bei Nervenzellen und spielt eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems. Die Aktivierung von postsynaptischen Rezeptoren, im speziellen von NMDA-Rezeptoren, bewirkt außerdem die Initialisierung von prä- und postsynaptischen Signalkaskaden, welche die Grundlage für wichtige Prozesse, wie Lernen und Gedächtnis darstellen (Choi, 1995). Jedoch ist die präzise Kontrolle des Ausmaßes der Rezeptoraktivierung mindestens genauso wichtig, da eine Übererregung von Nervenzellen, die zum Teil durch übermäßigen  $Ca^{2+}$ -Einstrom über NMDA-Rezeptoren zur Beschädigung oder zum Absterben von Nervenzellen führen kann (Choi, 1995).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Regulation der NMDA-Rezeptoraktivierung auch Rezeptor-intrinsisch, durch spezielle Domänen, nämlich die NTDs, erfolgt. Das spezifische Abschneiden dieser Domänen könnte demnach eine Steigerung der Rezeptoreffizienz *in vivo* bewirken. Für 'konventionelle' NMDA-Rezeptoren wurde berichtet, dass der Gewebefibrinolyse-Aktivator (tPa), welcher zahlreiche physiologische, aber auch pathophysiologischen Prozesse bedingt (Mizutani et al., 1996; Gingrich and Traynelis, 2000; Tomimatsu et al., 2002; Traynelis and Trejo, 2007), in der Lage ist, mit NR1-NTDs zu interagieren und diese vom NMDA-Rezeptor abzuschneiden (Nicole et al., 2001; Fernandez-Monreal et al., 2004). Dies führt zur Verminderung der tonischen  $Zn^{2+}$ -Hemmung und folglich zur Erhöhung von NR1/NR2-Rezeptorströmen. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich berichtet, dass die Serinprotease Plasmin, welche ein Spaltungsprodukt von

tPA darstellt, das Abschneiden der NR2A-NTDs und somit die vollständige Aufhebung der tonischen  $Zn^{2+}$ -Inhibition bedingt (Yuan et al., 2009).

Bezüglich der NR1/NR3-Rezeptoren wäre es denkbar, dass sie stetig durch die NR1-LBDs auto-inhibiert werden und aufgrund dessen *in vivo* noch nicht detektiert werden konnten. So, wie für NR2A-Untereinheiten, könnten auch für NR3-Untereinheiten spezifische Proteasen existieren, welche durch gezielte Signale freigesetzt werden. Sie könnten nachfolgend, eventuell in Zusammenarbeit mit tPA, das Abschneiden der NR3-NTDs und die Aufhebung der NR1/NR3-Rezeptor-Auto-Inhibition bedingen. Auf diese Weise könnte *in vivo* ein ineffizienter 'exzitatorischer Glyzinrezeptor' (Chatterton et al., 2002) in einen effizienten 'exzitatorischen Glyzinrezeptor' umgewandelt werden. Die Detektion dieses Rezeptors sollte verhältnismäßig unkompliziert sein.

## **1.45 Funktionelle Charakterisierung von triheteromeren NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren**

### **1.45.1 Die Aufhebung der NR1-LBD-vermittelten Auto-Inhibition bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren und die Rolle der NTDs**

In einer kürzlich veröffentlichten Studie haben Smothers und Woodward (2007) gezeigt, dass NR1-, NR3A- und NR3B-Untereinheiten in HEK-Zellen ko-assoziiieren und ähnlich den NR1/NR3A- bzw. NR1/NR3B-Rezeptoren nach Expression in *Xenopus laevis* Oozyten (Chatterton et al., 2002; Awobuluyi et al., 2007; Madry et al., 2007b) Rezeptorkomplexe bilden, die durch Glyzin aktivierbar sind. Diese sogenannten triheteromeren NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren bilden dabei tetramere Strukturen aus, die sich aus einem NR1/NR3A- und einem NR1/NR3B-Dimer zusammensetzen (Ulbrich and Isacoff, 2008). Da deren funktionelle Analyse in HEK-Zellen und nicht im Oozyten-Expressionssystem durchgeführt wurde, in welchem die Charakterisierung von NR1/NR3A- bzw. NR1/NR3B-Rezeptoren erfolgt ist (Chatterton et al., 2002; Awobuluyi et al., 2007; Madry et al., 2007b), konnten bisher keine direkten funktionellen Vergleiche dieser drei Rezeptorklassen gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst beobachtet werden, dass auch in Oozyten die Ko-Expression von NR1-, NR3A- und NR3B-Untereinheiten zu funktionellen Rezeptorkanälen geführt hat, welche durch Glyzin allein aktivierbar waren (s. Kapitel 4.4.1). Anders als bei NR1/NR3A- bzw. NR1/NR3B-Rezeptoren, wiesen NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren erhöhte Glyzin-vermittelte Rezeptorströme auf. Diese waren nicht an ein erhöhtes Expressionsniveau dieser Rezeptorkomplexe (s. Kapitel 4.4.4) oder eine verringerte Desensibilisierung der Rezeptorströme geknüpft (s. Kapitel 4.4.5). Folglich ist die NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoreffizienz deutlich erhöht. Im Einklang mit den Ergebnissen an NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren, dass die Aufhebung der Auto-Inhibition und eine erhöhte Rezeptoreffizienz gekoppelt sind, war die Potenzierung der Glyzin-induzierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme durch den NR1-LBD-Antagonisten MDL annähernd aufgehoben (s. Kapitel 4.4.2). Dies führt zur Schlussfolgerung, dass, im Gegensatz zu NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren (Awobuluyi et al., 2007; Madry et al., 2007b), NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren nicht auto-inhibiert werden und dies die Ursache für die starke Erhöhung der Glyzin-vermittelten Rezeptoreffizienz ist.

Die Deletion der NTDs bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren hatte zwar eine Verringerung der Rezeptordesensibilisierung zur Folge (NR1/NR3A/NR3B: ~95 % und NR1<sup>ΔNTD</sup>/NR3A<sup>ΔNTD</sup>/NR3B<sup>ΔNTD</sup>: ~50 %, s. Kapitel 4.4.5) und bedeutet, dass ähnlich den NR1/NR3A-Rezeptoren, die NTDs das Ausmaß der Desensibilisierung bestimmen. Jedoch hatte NTD-Deletion keine erhöhte Glyzin-vermittelte Rezeptoreffizienz zur Folge. Diese Fragestellung, inwiefern bei NR1/NR3A-Rezeptoren das Ausmaß der Desensibilisierung und die Rezeptoreffizienz zusammenhängen wird im Kapitel 5.7 näher diskutiert. In Anlehnung an die Befunde an NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren, bedeutet die Unwirksamkeit der NTD-Deletion auf die NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoreffizienz, dass bei diesen Rezeptoren die Auto-Inhibition aufgehoben ist (s. Kapitel 5.5.1). Im Gegenteil, die NTD-Deletion führte zu einer Erhöhung der MDL-Potenzierung verglichen zum wt NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor und bedeutet damit, dass NTD-deletierte NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren stärker durch die NR1-LBDs auto-inhibiert werden. In Anlehnung an das erstellte

Modell über die Rolle der NTDs auf die NR1/NR3A- bzw. NR1/NR3B-Rezeptorfunktion (s. Abb. 5.2), können bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren die NTDs nicht die NR1-NR3-LBD-Wechselwirkungen derart schwächen, was letztenendes die erhöhte Rezeptoreffizienz beim wt bedingt. Eine weiterführende, vergleichende Diskussion über die Effekte der NTD-Deletion auf die NR1-LBD-vermittelte Auto-Inhibition von NR1/NR3A-, NR1/NR3B- und NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren erfolgt in Kapitel 5.8.

#### **1.45.2 Zn<sup>2+</sup> ist ein hoch-affiner allosterischer Inhibitor von Glyzin-induzierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströmen**

An NR1/NR2A-Rezeptoren wurde bereits gezeigt, dass die Zn<sup>2+</sup>-Inhibition der Glyzin/Glutamat-vermittelten Rezeptorströme bereits bei nanomolaren Konzentrationen stattfindet und nach der NR2A-NTD-Deletion aufgehoben ist (Paoletti et al., 1997; Krupp et al., 1998; Low et al., 2000; Zheng et al., 2001; Madry et al., 2007a).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Zn<sup>2+</sup> als ein allosterischer Inhibitor von Glyzin-induzierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströmen agiert (68 % Hemmung; s. Kapitel 4.4.3). Die Hemmung der Rezeptorströme war biphasisch und teilte sich in einen stärker ausgeprägten hoch-affinen (IC<sub>50</sub>: ~65 nM, ~64 %-Hemmung, s. Kapitel 4.4.3) und einen deutlich geringer ausgeprägten nieder-affinen Bereich (IC<sub>50</sub>: nicht bestimmbar, s. Kapitel 4.4.3). Somit wurden zum ersten Mal Gemeinsamkeiten bezüglich der Wirkung von Zn<sup>2+</sup> auf Agonisten-induzierte Ströme zwischen dem 'exzitatorischen Glyzinrezeptor' (Chatterton et al., 2002) und den 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren, hier folglich den NR1/NR3A/NR3B- und NR1/NR2A-Rezeptoren, aufgezeigt. Die Letzteren weisen auch einen biphasischen Verlauf der Zn<sup>2+</sup>-Inhibitionskurve, mit IC<sub>50</sub>-Werten im nano- und mikromolaren Konzentrationsbereich auf (Madry et al., 2007a). Jedoch hatte bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren die NTD-Deletion keine vergleichbare Auswirkung auf die Zn<sup>2+</sup>-Inhibition. Bei NTD-deletierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren war zwar die hoch-affine Zn<sup>2+</sup>-Bindestelle noch erhalten, jedoch war nun die Hemmung in eine Potenzierung umgekehrt worden (s. Kapitel 4.4.7). Somit bestimmen die NTDs bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren nicht das

Vorhandensein, sondern die Richtung der  $Zn^{2+}$ -vermittelten Modulation Glyzin-induzierter Rezeptorströme. Da die Affinität der  $Zn^{2+}$ -vermittelten Modulation fast unverändert war, könnte daraus geschlossen werden, dass die gleiche Stelle im Rezeptor für die  $Zn^{2+}$ -Potenzierung und -Inhibition verantwortlich ist. Ein vergleichbarer Effekt konnte bei einer anderen Klasse von Ligandengesteuerten Ionenkanälen beobachtet werden, nämlich dem Glyzin-Rezeptor. Dort führte die Mutation einer Aminosäure in der Ligandenbindungsdomäne zur Umkehr der hemmenden Wirkung von  $Zn^{2+}$  in eine Aktivierung (Grudzinska et al., 2008). Für diese Fragestellung, d.h. die Aufklärung, wie die NTDs die Richtung der  $Zn^{2+}$ -vermittelten Modulation Glyzin-induzierter Rezeptorströme determinieren, muss primär geklärt werden, wodurch die Entstehung der hoch-affinen  $Zn^{2+}$ -Bindestelle bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren verursacht wird. Eine Möglichkeit ist die Ausbildung von differentiellen Wechselwirkungen, entweder intra- oder intermolekular, die bei NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren nicht existieren (s. auch Kapitel 5.8). Diese könnten nach Ligandierung mit  $Zn^{2+}$  und Glyzin Konformationsänderungen der Untereinheiten im Rezeptor bewirken, welche letztendlich die Glyzin-Effizienz reduzieren. Durch die NTD-Deletion würde dies verhindert und die Glyzin-Effizienz gesteigert.

Bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren wird die hoch-affine  $Zn^{2+}$ -Hemmung vielmehr durch die NR1-LBD determiniert. (s. Kapitel 4.4.8). Das Ausmaß der  $Zn^{2+}$ -Hemmung war bei NR1<sup>F466A</sup>/NR3A/NR3B-Rezeptoren um die Hälfte reduziert (~33 % Hemmung, s. Kapitel 4.4.8), ohne eine bedeutende Änderung des  $IC_{50}$ -Wert ( $IC_{50}$ : ~20 nM s. Kapitel 4.4.8). Mit diesem Effekt ging eine Erhöhung des Anteils der nieder-affinen Hemmung einher (36 %-Hemmung, s. Kapitel 4.4.8). Ähnliche Beobachtungen, bezüglich der Erhaltung von spezifischen modulatorischen Eigenschaften, wurden bei triheteromeren NR1/NR2A/NR2B-Rezeptoren gemacht (Hatton and Paoletti, 2005). Die Affinität der  $Zn^{2+}$ -Hemmung war beim NR1/NR2A/NR2B-Rezeptor, verglichen zu jener bei NR1/NR2A-Rezeptoren, unverändert. Es konnte aber eine Reduktion des Ausmaßes der Hemmung beobachtet werden (Hatton and Paoletti, 2005). Zusammenfassend zeigen die hier gemachten Beobachtungen, dass die Glyzinbindetasche in der NR1-LBD nicht allein für die  $Zn^{2+}$ -vermittelte Hemmung verantwortlich ist und, dass  $Zn^{2+}$  neben dieser noch mindestens eine weitere Bindestelle im NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor besitzt. Es ist jedoch noch

ungewiss, welche Struktur in die hoch-affine  $Zn^{2+}$ -Hemmung involviert ist. Eine Vermutung ist, dass die  $Zn^{2+}$ -Bindestelle schon bei den NR1/NR3A- bzw. NR1/NR3B-Rezeptoren vorhanden ist und erst nach der Ko-Assoziation der NR1-, NR3A- und NR3B-Untereinheiten detektiert werden kann. Da jedoch die  $Zn^{2+}$ -Pufferung durch Tricin bei NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren keine signifikante Auswirkung auf Glyzin-induzierte Maximalströme zur Folge hatte (s. Kapitel 4.4.3), kann diese Vermutung ausgeschlossen werden. Die wahrscheinlichere Ursache dafür hat mit der Anordnung der Untereinheiten im Rezeptor zu tun und wird im Kapitel 5.8 näher behandelt.

Eine wichtige Fragestellung, die sich aus den hier erhaltenen Daten ergibt, ist die Lokalisation der weiteren  $Zn^{2+}$ -Bindestelle/n im NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor. Dafür und auch bei der Frage, welchen Einfluss die NTDs bei der  $Zn^{2+}$ -Hemmung spielen, kann durch Modell-basiertes Design anhand von vorhandenen Kristallstrukturen eine mögliche  $Zn^{2+}$ -Bindestelle, z.B. in den LBDs, vorausgesagt werden. Die hier erhaltenen Ergebnisse und die Studie von Madry und Kollegen (2008) haben gezeigt, dass die  $Zn^{2+}$ -Effekte über die NR1-LBDs vermittelt werden. Eine weitere  $Zn^{2+}$ -Bindestelle in der LBD der NR1-Untereinheit ist damit nicht unwahrscheinlich.

### **1.45.3 Agonistische Wirkung von $Zn^{2+}$ bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren**

In der vorliegenden Arbeit wurde bereits dargelegt, dass  $Zn^{2+}$  als Agonist bei NR1/NR3A-Rezeptoren fungiert (Madry et al., 2008). Bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren konnte nur eine geringe agonistische Wirkung von  $Zn^{2+}$  festgestellt werden (s. Kapitel 4.4.3). Das steht im Gegensatz zur stark erhöhten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoreffizienz durch Glyzin im Vergleich zu NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren (s. Kapitel 4.4.1, 5.2.1 und 5.2.2). Interessanterweise hatte im Gegensatz zu Glyzin, die Deletion der NTDs eine starke Erhöhung der  $Zn^{2+}$ -induzierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme zur Folge (s. Kapitel 4.4.7). Somit werden die Glyzin- bzw.  $Zn^{2+}$ -induzierten NR1/NR3A/NR3B-Rezeptorströme durch die NTD-Deletion differentiell beeinflusst. Dies ist im Einklang mit den Beobachtungen an NR1/NR3A-Rezeptoren (s. Kapitel 5.2.1, 5.2.2 und 5.2.4) und unterstützt die Annahme von

unterschiedlichen Mechanismen der Glyzin- bzw.  $Zn^{2+}$ -NR1/NR3-Rezeptoraktivierung (Madry et al., 2008).

#### **1.46 Isolation von triheteromeren NR1/NR2A/NR3A-NMDA-Rezeptoren in rekombinanten Systemen**

Verschiedene *in vivo* und *in vitro* Studien haben berichtet, dass NR1- und NR2- mit NR3-Untereinheiten ko-assoziiieren können (Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995; Das et al., 1998; Perez-Otano et al., 2001; Matsuda et al., 2002). Für diese Klasse von triheteromeren NMDA-Rezeptoren wird, genauso wie für NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren, angenommen, dass sie zu tetrameren Komplexen mit einem NR1/NR2- und einem NR1/NR3-Dimer assemblieren (Perez-Otano et al., 2001; Ulbrich and Isacoff, 2008). Kürzlich wurde aber von Ulbrich und Isacoff (2008) impliziert, dass die Ko-Expression von NR1-, NR2-, und NR3-Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten nicht bevorzugt in der Ko-Assemblierung dieser Untereinheiten resultiert. Dies würde bedeuten, dass eine funktionelle Charakterisierung von NR3-enthaltenden Rezeptorkomplexen und die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den NR1/NR2- und NR1/NR3-Hetero-Dimeren in Oozyten nicht möglich wäre.

Die Arbeit von Ulbrich und Isacoff (2008) steht im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen, die zeigen, dass mit einem erhöhten Verhältnis der NR3A- gegenüber den NR1- und NR2-Untereinheiten, die Expression von NR1/NR2/NR3-Rezeptoren möglich ist (s. Kapitel 4.4.10). Diese NMDA-Rezeptoren besaßen einen signifikant erniedrigten spannungsabhängigen  $Mg^{2+}$ -Kanalblock, welcher üblicherweise NR1/NR2A-Rezeptor-spezifisch ist. Hierbei kann es sich, wie von Ulbrich und Isacoff (2008) behauptet, jedoch nicht um  $Mg^{2+}$ -unempfindliche NR1/NR3A-Rezeptorkomplexe handeln, da diese deutlich geringere und schnell desensitisierende Ströme aufweisen (Chatterton et al., 2002; Awobuluyi et al., 2007; Madry et al., 2007b). Zusammenfassend bedeutet das, dass in Oozyten die Überexpression einer Untereinheit, in diesem Falle der NR3A, die Favorisierung von bestimmten Rezeptorpopulationen, hier von NR1/NR2A/NR3A-Rezeptorkomplexen, bedingt. Die elektrophysiologische Analyse konnte außerdem durch die biochemischen Untersuchungen gestützt werden, denn anhand der Histidin-

Markierung der NR2A-Untereinheit wurden sowohl die NR1- als auch die NR3A-Untereinheit ko-aufgereinigt (s. Kapitel 4.4.9). Es wurde gezeigt, dass NR2- und NR3-Untereinheiten zwar ko-assoziiieren können, aber ohne die NR1-Untereinheit nicht zur Zelloberfläche transportiert werden (Perez-Otano et al., 2001). Dies bedeutet, dass eine Ko-Aufreinigung der NR3A-Untereinheit auf die Interaktion mit NR1- und NR2A-Untereinheiten zurückzuführen ist.

Somit ist die biochemische und funktionelle Untersuchung von solchen triheteromeren NR1/NR2/NR3-Komplexen in Oozyten nicht ganz ausgeschlossen.

### **1.47 Desensitisierung von NMDA-Rezeptoren und Rolle der NTDs**

Rezeptordesensitisierung ist ein Phänomen, das bei vielen Ligandengesteuerten Ionenkanälen nach der Rezeptoraktivierung auftritt und bezeichnet einen Zustand, bei dem der Ligand an den Rezeptor gebunden, jedoch der Kanal geschlossen ist. Somit bedingt sie den Schutz vor einer zu starken Aktivierung und damit der Übererregung des Rezeptors. Bei den iGluRs ist der Mechanismus der Desensitisierung vor allem an AMPA-Rezeptoren untersucht worden. Dort wurde gezeigt, dass die LBDs in einer 'Rücken-an-Rücken'-Anordnung vorliegen und die benachbarten S1-Domänen intermolekulare Wechselwirkungen ausbilden (Rosenmund et al., 1998, Sun et al., 2002, Armstrong et al., 2006). Nach der Öffnung des Ionenkanals durch die Ligandenbindung, bewirkt eine Konformationsänderung der LBDs das Schwächen der intermolekularen Wechselwirkungen und entkoppelt damit die Ligandierung des Rezeptors von der Kanalöffnung. Dies resultiert letztendlich in der Desensitisierung des Rezeptors (Sun et al., 2002, Armstrong et al., 2006). Da AMPA- und NMDA-Rezeptoren Ähnlichkeiten bezüglich des Mechanismus der Rezeptoraktivierung aufweisen (Übersicht in Mayer, 2006), basieren auch viele Modellvorstellungen über die Desensitisierung von NMDA-Rezeptoren auf den Ergebnissen und mechanistischen Modellen von AMPA-Rezeptoren. Dennoch ist der Mechanismus der Desensitisierung von NMDA-Rezeptoren noch nicht ganz verstanden. Viele Studien zeigen jedoch, dass hierbei die NTDs eine große Rolle spielen (die vorliegende Arbeit, Madry et al., 2007a, Gielen et al., 2008). Die Deletion dieser Domänen führt sowohl bei NR1/NR2-

als auch bei NR1/NR3A-Rezeptoren zu weniger- oder sogar nicht-desensitisierenden Rezeptorströmen, welche möglicherweise durch stabilere LBD-Wechselwirkungen vermittelt werden (die vorliegende Arbeit; Awobuluyi et al., 2007; Madry et al., 2007a). Bei NR1/NR3A-Rezeptoren tritt zusätzlich zu der Aufhebung der Rezeptordesensitierung nach der NTD-Deletion jedoch eine 'Begleiterscheinung' auf, nämlich die Erhöhung der Stromamplitude. Die hier erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass dieser Effekt durch die Aufhebung der NR1-LBD-bedingten Auto-Inhibition vermittelt ist. Somit bestimmen die NTDs bei NR1/NR3A-Rezeptoren zwei voneinander unabhängige Ereignisse: das Ausmaß der Rezeptordesensitierung, wie bei NR1/NR2-Rezeptoren beobachtet, als auch die Rezeptor-Auto-Inhibition. Diese Schlussfolgerung wird von den Ergebnissen an den NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren unterstützt. Diese Rezeptoren zeigen eine geringe Auto-Inhibition sowie eine hohe Stromamplitude, wobei das Ausmaß der Desensitierung weiterhin von den NTDs abhängt. Da vor allem die NR3-NTDs wichtig für die Auto-Inhibition von NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren sind, könnten, z.B. NTD-Austausch-Experimente zwischen NR3- und NR2-Untereinheiten untersucht werden, ob die Rezeptor-Auto-Inhibition weiter erhalten bleibt.

#### **1.48 Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Einheiten im NMDA-Rezeptor**

Eine wichtige Frage, die sich aufgrund der erhaltenen Ergebnisse an NR1/NR3-Rezeptoren stellt ist, wieso bei NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren eine NR1-LBD-vermittelte Auto-Inhibition bezüglich Glyzin als Agonisten beobachtet wird und bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren dies nicht der Fall ist. Die Mechanismen der NR1/NR3-Aktivierung sowie der Auto-Inhibition basieren auf den Befunden an NR1/NR2-Rezeptoren, welche zeigen, dass das NR1/NR2-Hetero-Dimer die funktionelle Einheit im tetrameren NR1/NR2-Rezeptor ist. Dies beruht auf der Beobachtung, dass die Stabilität der NR1/NR2-LBD-Wechselwirkungen das Ausmaß der Rezeptoraktivierung bestimmt (Furukawa et al., 2005). Die Frage, ob es Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Einheiten im NMDA-Rezeptor gibt, ist bisher noch nicht untersucht worden.

Wenn es dort keine Wechselwirkungen gäbe und die funktionellen Einheiten unabhängig voneinander agieren würden, dann müsste das Ausmaß der Rezeptoraktivierung bei NR1/NR3A-, NR1/NR3B- und NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren vergleichbar sein. Diese These steht im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen. Das bedeutet, dass die funktionellen Einheiten sehr wahrscheinlich Wechselwirkungen ausbilden und in Zusammenarbeit das Ausmaß der Rezeptoraktivierung und somit die Rezeptoreffizienz kontrollieren. Bei NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren bestimmen negative Wechselwirkungen über die NTDs, die NR1-LBD-vermittelte Auto-Inhibition (s. Abb. 5.3A und B). Bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren beeinflussen sich die funktionellen Einheiten positiv, was auch die Aufhebung der Auto-Inhibition bei diesen Rezeptoren erklären würde (Abb. 5.3C).

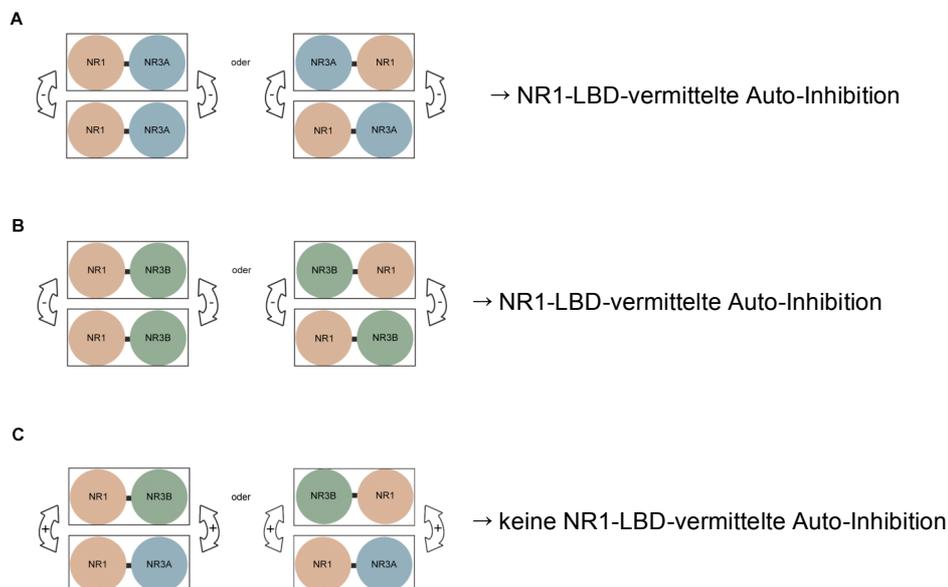


Abb. 5.3: Schematische Modellvorstellungen der Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Einheiten im tetrameren NR1/NR3A-, NR1/NR3B- und NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor. Diese Modellvorstellungen basieren auf den Befunden, dass das Hetero-Dimer die funktionelle Einheit im NMDA-Rezeptor darstellt und dass NR1/NR3A- sowie NR1/NR3B-Rezeptoren eine geringe und NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren eine hohe Rezeptoreffizienz besitzen. A) und B) Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Einheiten von NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren. Unabhängig von der Orientierung der Hetero-Dimere ist die Wechselwirkung zwischen den Dimeren von negativer Art und bewirkt bei beiden Rezeptorklassen die Auto-Inhibition. C) Bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren ist die Wechselwirkung zwischen den funktionellen Einheiten von positiver Art und verhindert die Auto-Inhibition dieser Rezeptoren.

Es könnte von Bedeutung sein, wie diese funktionellen Einheiten im Rezeptor orientiert sind. Frühere Arbeiten an NR1/NR2-Rezeptoren legen die Vermutung

nahe, dass die NR1-Untereinheiten nebeneinander angeordnet sind (Schorge und Colquhoun, 2003, Furukawa et al., 2005, Stephenson, 2006). Bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren würde damit eine Kontaktstelle zwischen den NR3A- und NR3B-Untereinheiten entstehen, welche im Unterschied zu NR3A/NR3A- bzw. NR3B/NR3B-Wechselwirkungen die Rezeptor-Auto-Inhibition verhindert (s. Abb. 5.3 und 5.4).

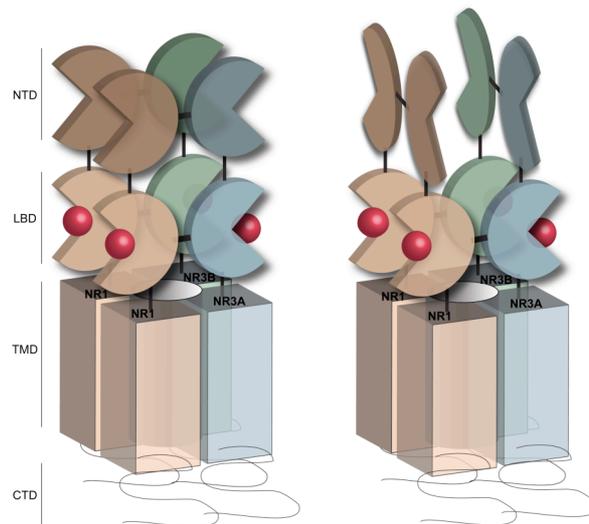


Abb. 5.4: Schematisches Modell der Anordnung der Untereinheiten im tetrameren NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor, verändert nach Furukawa et al., (2005). NTD: N-terminale Domäne, LBD: Ligandenbindungsdomäne, TMD: Transmembrandomäne; CTD: C-Terminale Domäne. Die NR1- bzw. NR3A/NR3B-Untereinheiten sind nebeneinander angeordnet. Mögliche Wechselwirkungen zwischen den NTDs und LBDs, jeweils, sind durch schwarze Balken dargestellt. Links sind Wechselwirkungen zwischen NR1/NR3A- bzw. NR1/NR3B-NTDs und rechts sind Wechselwirkungen zwischen den NR1- bzw. NR3A/NR3B-NTDs dargestellt.

Die NR3A/NR3B-Kontaktstelle könnte möglicherweise auch das Entstehen der hoch-affinen  $Zn^{2+}$ -Bindestelle bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren erklären. Diese Schlussfolgerungen und Vermutungen müssen jedoch durch weiterführende Untersuchungen in zukünftigen Studien erhärtet werden.

Die hier gemachten Beobachtungen könnten auch etwas Aufschluss über die Wechselwirkungen der funktionellen Einheiten bei den, bereits *in vivo* detektierten, triheteromeren NR1/NR2/NR3-Rezeptoren geben. Hier stellt sich die Frage, welche Konsequenzen die Ligandierung der LBDs auf die Funktion dieser Rezeptoren hat. Bei NR1/NR2-Rezeptoren hat die Bindung eines Liganden an die LBDs die Aktivierung und bei NR1/NR3-Rezeptoren die Auto-

Inhibition zur Folge (die vorliegende Arbeit; Furukawa et al., 2005; Madry et al., 2007b; Awobuluyi et al., 2007; Übersicht in Mayer, 2006). Die Assemblierung zu triheteromeren Rezeptoren würde jedoch, wie anhand von NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren erörtert, nicht in zwei unabhängig voneinander wirkenden Einheiten im Rezeptor resultieren. Somit sollten die NR1/NR2- und NR1/NR3-Hetero-Dimere interagieren und könnten dadurch die Funktion des NR1/NR2/NR3-Rezeptors regulieren (Abb. 5.5).

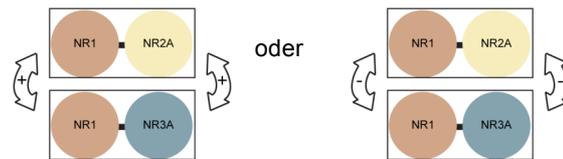


Abb. 5.5: Schematisches Modell der Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Einheiten im triheteromeren NR1/NR2/NR3-Rezeptor. Dieses Modell basiert auf dem Befund, dass das Hetero-Dimer die funktionelle Einheit in NMDA-Rezeptoren darstellt. Dargestellt sind NR1/NR2- und NR1/NR3-Hetero-Dimere im tetrameren NMDA-Rezeptor. Basierend auf den Vermutungen für NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren, sind die NR1-Untereinheiten als benachbart dargestellt. Die Art der Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Einheiten könnte von positiver als auch von negativer Art sein.

Bisher sind jedoch noch keine NR1/NR2/NR3-spezifischen Agonisten oder Antagonisten gefunden worden, welche bei der Untersuchung der Funktion dieser Rezeptoren angewendet werden könnten.

Besonders wichtig ist die Untersuchung dieser triheteromeren NR1/NR2/NR3-Rezeptoren, da deren Existenz bereits *in vivo* verifiziert wurde (Sucher et al., 1995; Ciabarra et al., 1995; Perez-Otano et al., 2001; Nishi et al., 2001). So konnte eine Ko-Lokalisation von NR1, NR2- und NR3-Untereinheiten *in vivo* im Rückenmark, Thalamus, Hypothalamus und im Hirnstamm detektiert werden. Das Vorhandensein von triheteromeren NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren ist *in vivo* bisher noch nicht nachgewiesen worden. Jedoch kann anhand der Expressionsmuster der NR3A- und NR3B-Untereinheiten eine Ko-Lokalisation z.B. im Bereich des Hirnstamms nicht ausgeschlossen werden.

Das schematische Modell in der Abb. 5.4 wurde von Herrn C. Tamer erstellt.

### 1.49 Schlussfolgerungen mit Ausblick

Ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit war es die Rolle der NTDs bei der Assemblierung und Funktion von NMDA-Rezeptoren zu untersuchen. Durch die vorliegende Arbeit wurde gezeigt, dass die NTDs nicht für die Assemblierung von NMDA-Rezeptoren benötigt werden (s. Kapitel 5.1). Folglich müssen andere Determinanten als die NTDs existieren, welche diese Assemblierung regulieren. Eine kürzlich veröffentlichte Studie legt die Vermutung nahe, dass die TMDs in diesen Prozess involviert sind (Horak et al., 2008b). Diese Fragestellung, welche Rolle die TMDs bei der Assemblierung von NMDA-Rezeptoren spielen, kann mithilfe der in dieser Arbeit angewandten biochemischen Methoden, z.B. an NR1/NR3-Rezeptoren, näher untersucht werden.

Vielmehr wurde in dieser Studie dargelegt, dass die NTDs eine wichtige Rolle bei der NR1/NR3-Rezeptorfunktion spielen. Sie bestimmen über die Stabilität der NR1/NR3-LBD-Wechselwirkungen die Rezeptor-Auto-Inhibition und dadurch auch die Rezeptoreffizienz. Die NR3-NTDs sind hierbei maßgebliche Determinanten, da deren Deletion allein, für die Erhöhung der Rezeptoreffizienz ausreichend war (s. Kapitel 5.2). Befunde, die auf Studien mit NR1/NR2-Rezeptoren basieren, legen nahe, dass die Ursache dafür eine bevorzugt geschlossene Konformation dieser Domänen sein könnte. Dies sowie die Annahme, dass die NMDA-Rezeptor-NTDs, so wie die LBDs, eine zwei-blättrige Struktur bilden und in einem 'Venusfliegenfallen-artigen' Mechanismus nach Binden eines Liganden schließen (Gielen et al., 2008; Gielen et al., 2009), können jedoch erst anhand einer Kristallstruktur dieser Domänen eindeutig geklärt werden. Weiterhin führte die NTD-Deletion zur Aufhebung der Rezeptordesensibilisierung, was mit Untersuchungen an NR1/NR2-Rezeptoren konform ist (Madry et al., 2007a.). Somit bestimmen bei NR1/NR3- und NR1/NR2-Rezeptoren die NTDs generell das Ausmaß der Rezeptordesensibilisierung. Bei NR1/NR3A-Rezeptoren korrelierte das Ausmaß der Desensibilisierung mit dem Ausmaß der Auto-Inhibition. Beide Effekte werden zwar von den NTDs bestimmt, jedoch können beide Ereignisse als unabhängig voneinander betrachtet werden. Da die Auto-Inhibition vor allem von den NR3-NTDs bestimmt ist, kann durch NTD-Austausch-Experimente

zwischen NR3- und NR2-Untereinheiten dieser Sachverhalt näher untersucht werden.

NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren teilen sich mehrere Aspekte der Rezeptorpharmakologie und –kinetik. Erstaunlicherweise verhalten sich NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren konträr zu den gemeinsamen Eigenschaften der NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren. Dieser irrationale Umstand kann nur dadurch erklärt werden, dass unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Einheiten in den jeweiligen Rezeptoren existieren. Bei NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren würden negative Wechselwirkungen die Auto-Inhibition 'fördern', während positive Wechselwirkungen zwischen den NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Einheiten im NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor die Auto-Inhibition verhindern würden. Die Anordnung der Untereinheiten im Rezeptor könnte eine Grundlage für den Unterschied der Wechselwirkungen bieten. Frühere Studien haben angedeutet, dass in 'konventionellen' NMDA-Rezeptoren die NR1-Untereinheiten benachbart liegen (Schorge and Colquhoun, 2003; Stephenson, 2006). Dies würde für NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren die Ausbildung einer NR3A/NR3B-Kontaktstelle bedeuten und könnte die Aufhebung der Auto-Inhibition erklären. Weiterhin wurde bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren das Auftreten einer hoch-affinen  $Zn^{2+}$ -Hemmung beobachtet, die in NR1/NR3A- und NR1/NR3B-Rezeptoren nicht vorhanden ist. Die  $Zn^{2+}$ -Hemmung bei NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren ist zwar durch die Mutation der NR1-Glyzinbindetasche in ihrem Ausmaß beeinträchtigt, jedoch nicht aufgehoben. Dies weist auf eine weitere  $Zn^{2+}$ - Bindestelle im NR1/NR3A/NR3B-Rezeptor hin.

Diese Fragestellung nach der Anordnung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten im Rezeptorkomplex und Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Einheiten ist außerdem relevant für die Untersuchung von NR1/NR2/NR3-Rezeptoren. Diese tetrameren Rezeptoren bestehen aus einem NR1/NR2- und einem NR1/NR3-Dimer (Perez-Otano et al., 2001; Ulbrich and Isacoff, 2008). Die Untersuchung dieser Rezeptorklasse ist unter anderem deswegen interessant, da Substanzen, wie z.B.  $Zn^{2+}$  oder MDL bei NR1/NR2- und NR1/NR3-Rezeptoren, entgegengesetzt wirken können (Chen et al., 1997; Paoletti et al., 1997; Madry et al., 2007b; Madry et al., 2008) und diese

NR1/NR2/NR3-Rezeptoren *in vivo* gefunden wurden (Sucher et al., 1995; Ciabarra et al., 1995; Perez-Otano et al., 2001).

Die in der vorliegenden Studie erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich die Komplexität der NMDA-Rezeptorfunktion. Weiterhin wurde festgestellt, dass die NTDs erheblich zur Heterogenität der Rezeptorfunktion beitragen. Welche Rolle eine Subdomäne im Rezeptor einnimmt, hängt stark von den inkorporierten Untereinheiten ab. Zusätzlich zu diesen mechanistischen Aspekten wurde in dieser Studie vor allem aufgezeigt, dass die Rezeptoraktivierung auch Rezeptor-intrinsisch durch selektive Domänen reguliert werden kann. Somit würde diese Regulation als eine stetige 'Maßnahme' dienen, die Zelle vor Überstimulierung (Exzitotoxizität) zu schützen. Es könnten aber auch spezielle Signalwege existieren, welche eine gezielte Freistellung dieser regulatorischen Domänen, der NTDs, auslösen würden. So würde, z.B. durch den Einsatz von spezifischen Proteasen, welche folglich die NR1- und NR3-NTDs entfernen, die Steigerung der NR1/NR3-Rezeptoraktivität erfolgen.

Zusammenfassend, können die hier erhaltenen Befunde dazu dienen, ein tiefergehendes Verständnis über wichtige Zellvorgänge zu erhalten, die der Prävention der Überstimulierung von Rezeptorkanälen dienen. Denn diese ist maßgeblich an dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-vermittelten Absterben von Neuronen und neurologischen Erkrankungen, wie z.B. Ischämie-bedingter Hirninfarkt, beteiligt. Eine bessere Kenntnis der Regulation solcher Vorgänge kann als Basis für die Entwicklung von spezifischen Therapeutika dienen, welche der Unterdrückung der Rezeptor-Überstimulierung dienen. Weiterhin können die hier erhaltenen Daten Anhaltspunkte liefern, die NR1/NR3A-, NR1/NR3B- und NR1/NR3A/NR3B-Rezeptoren aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften *in vivo* zu detektieren.

## Literaturverzeichnis

- Armstrong N, Gouaux E (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 28:165-181.
- Armstrong N, Mayer M, Gouaux E (2003) Tuning activation of the AMPA-sensitive GluR2 ion channel by genetic adjustment of agonist-induced conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5736-5741.
- Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E (1998) Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 395:913-917.
- Asztely F, Gustafsson B (1996) Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 12:1-11.
- Atlason PT, Garside ML, Meddows E, Whiting P, McIlhinney RA (2007) N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor. *J Biol Chem* 282:25299-25307.
- Awobuluyi M, Yang J, Ye Y, Chatterton JE, Godzik A, Lipton SA, Zhang D (2007) Subunit-specific roles of glycine-binding domains in activation of NR1/NR3 N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 71:112-122.
- Ayalon G, Stern-Bach Y (2001) Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* 31:103-113.
- Bolton MM, Blanpied TA, Ehlers MD (2000) Localization and stabilization of ionotropic glutamate receptors at synapses. *Cell Mol Life Sci* 57:1517-1525.
- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* 485 (Pt 2):403-418.
- Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppertsberg JP, Gunther W, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257:1415-1419.
- Cavara NA, Hollmann M (2008) Shuffling the deck anew: how NR3 tweaks NMDA receptor function. *Mol Neurobiol* 38:16-26.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-798.
- Chazot PL, Stephenson FA (1997) Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *J Neurochem* 69:2138-2144.
- Chen GQ, Cui C, Mayer ML, Gouaux E (1999) Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature* 402:817-821.
- Chen N, Moshaver A, Raymond LA (1997) Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Mol Pharmacol* 51:1015-1023.

- Choi DW (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18:58-60.
- Choi Y, Chen HV, Lipton SA (2001) Three pairs of cysteine residues mediate both redox and  $Zn^{2+}$  modulation of the nmda receptor. *J Neurosci* 21:392-400.
- Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15:6498-6508.
- Collingridge GL, Lester RA (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41:143-210.
- Collingridge GL, Bliss TV (1995) Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* 18:54-56.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.
- Danscher G, Stoltenberg M (2005) Zinc-specific autometallographic in vivo selenium methods: tracing of zinc-enriched (ZEN) terminals, ZEN pathways, and pools of zinc ions in a multitude of other ZEN cells. *J Histochem Cytochem* 53:141-153.
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N (1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393:377-381.
- Didier M, Xu M, Berman SA, Bursztajn S (1995) Differential expression and co-assembly of NMDA zeta 1 and epsilon subunits in the mouse cerebellum during postnatal development. *Neuroreport* 6:2255-2259.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Fayyazuddin A, Villarroel A, Le Goff A, Lerma J, Neyton J (2000) Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity  $Zn^{2+}$  binding to NMDA receptors. *Neuron* 25:683-694.
- Fernandez-Monreal M, Lopez-Atalaya JP, Benchenane K, Cacquevel M, Dulin F, Le Caer JP, Rossier J, Jarrige AC, Mackenzie ET, Colloc'h N, Ali C, Vivien D (2004) Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J Biol Chem* 279:50850-50856.
- Frederickson CJ (1989) Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int Rev Neurobiol* 31:145-238.
- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Thompson RB (2000) Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr* 130:1471S-1483S.
- Frederickson CJ, Giblin LJ, 3rd, Balaji RV, Masalha R, Frederickson CJ, Zeng Y, Lopez EV, Koh JY, Chorin U, Besser L, Hershinkel M, Li Y, Thompson RB, Krezel A (2006) Synaptic release of zinc from brain slices: factors governing release, imaging, and accurate calculation of concentration. *J Neurosci Methods* 154:19-29.
- Furukawa H, Gouaux E (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *Embo J* 22:2873-2885.

- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438:185-192.
- Gielen M, Siegler Retchless B, Mony L, Johnson JW, Paoletti P (2009) Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459:703-707.
- Gielen M, Le Goff A, Stroebel D, Johnson JW, Neyton J, Paoletti P (2008) Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* 57:80-93.
- Gilbert W (1978) Why genes in pieces? *Nature* 271:501.
- Gingrich MB, Traynelis SF (2000) Serine proteases and brain damage - is there a link? *Trends Neurosci* 23:399-407.
- Grudzinska J, Schumann T, Schemm R, Betz H, Laube B (2008) Mutations within the agonist-binding site convert the homomeric alpha1 glycine receptor into a Zn<sup>2+</sup>-activated chloride channel. *Channels (Austin)* 2:13-18.
- Gustafson EC, Stevens ER, Wolosker H, Miller RF (2007) Endogenous D-serine contributes to NMDA-receptor-mediated light-evoked responses in the vertebrate retina. *J Neurophysiol* 98:122-130.
- Hatton CJ, Paoletti P (2005) Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron* 46:261-274.
- Herin GA, Aizenman E (2004) Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur J Pharmacol* 500:101-111.
- Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J (1996) The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6031-6036.
- Hogner A, Kastrup JS, Jin R, Liljefors T, Mayer ML, Egebjerg J, Larsen IK, Gouaux E (2002) Structural basis for AMPA receptor activation and ligand selectivity: crystal structures of five agonist complexes with the GluR2 ligand-binding core. *J Mol Biol* 322:93-109.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Horning MS, Mayer ML (2004) Regulation of AMPA receptor gating by ligand binding core dimers. *Neuron* 41:379-388.
- Hu B, Zheng F (2005) Molecular determinants of glycine-independent desensitization of NR1/NR2A receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 313:563-569.
- Ivanovic A, Reilander H, Laube B, Kuhse J (1998) Expression and initial characterization of a soluble glycine binding domain of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit. *J Biol Chem* 273:19933-19937.
- Jin R, Banke TG, Mayer ML, Traynelis SF, Gouaux E (2003) Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 6:803-810.
- Jin R, Singh SK, Gu S, Furukawa H, Sobolevsky AI, Zhou J, Jin Y, Gouaux E (2009) Crystal structure and association behaviour of the GluR2 amino-terminal domain. *Embo J* 28:1812-1823.
- Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531.
- Kohr G (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* 326:439-446.

- Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL (1998) N-terminal domains in the NR2 subunit control desensitization of NMDA receptors. *Neuron* 20:317-327.
- Kumar J, Schuck P, Jin R, Mayer ML (2009) The N-terminal domain of GluR6-subtype glutamate receptor ion channels. *Nat Struct Mol Biol.*
- Kuner T, Seeburg PH, Guy HR (2003) A common architecture for K<sup>+</sup> channels and ionotropic glutamate receptors? *Trends Neurosci* 26:27-32.
- Kuner T, Wollmuth LP, Karlin A, Seeburg PH, Sakmann B (1996) Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 17:343-352.
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407:971-977.
- Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12:1291-1300.
- Kuusinen A, Abele R, Madden DR, Keinänen K (1999) Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit GluRD. *J Biol Chem* 274:28937-28943.
- Laube B, Kuhse J, Betz H (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-2961.
- Laube B, Kuryatov A, Kuhse J, Betz H (1993) Glycine-glutamate interactions at the NMDA receptor: role of cysteine residues. *FEBS Lett* 335:331-334.
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18:493-503.
- Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Kohr G, Herb A, Seeburg PH, Wisden W (1993) The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett* 315:318-322.
- Low CM, Zheng F, Lyuboslavsky P, Traynelis SF (2000) Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11062-11067.
- Luo J, Wang Y, Yasuda RP, Dunah AW, Wolfe BB (1997) The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol Pharmacol* 51:79-86.
- Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3:91-101.
- Madry C, Mesic I, Betz H, Laube B (2007a) The N-terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn<sup>2+</sup> inhibition and glycine affinity of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 72:1535-1544.
- Madry C, Betz H, Geiger JR, Laube B (2008) Supralinear potentiation of NR1/NR3A excitatory glycine receptors by Zn<sup>2+</sup> and NR1 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12563-12568.
- Madry C, Mesic I, Bartholomäus I, Nicke A, Betz H, Laube B (2007b) Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* 354:102-108.

- Maren S, Baudry M (1995) Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 63:1-18.
- Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 100:43-52.
- Matsuda S, Kamiya Y, Yuzaki M (2005) Roles of the N-terminal domain on the function and quaternary structure of the ionotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* 280:20021-20029.
- Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, Wada K (1995) Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J Neurochem* 65:454-458.
- Mayer ML (2005) Crystal structures of the GluR5 and GluR6 ligand binding cores: molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity. *Neuron* 45:539-552.
- Mayer ML (2006) Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* 440:456-462.
- Mayer ML, Westbrook GL (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28:197-276.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.
- Mayer ML, Ghosal A, Dolman NP, Jane DE (2006) Crystal structures of the kainate receptor GluR5 ligand binding core dimer with novel GluR5-selective antagonists. *J Neurosci* 26:2852-2861.
- Meddows E, Le Bourdelles B, Grimwood S, Wafford K, Sandhu S, Whiting P, McIlhinney RA (2001) Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 276:18795-18803.
- Miller RF (2004) D-Serine as a glial modulator of nerve cells. *Glia* 47:275-283.
- Mizutani A, Saito H, Matsuki N (1996) Possible involvement of plasmin in long-term potentiation of rat hippocampal slices. *Brain Res* 739:276-281.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4926-4931.
- Nakanishi N, Shneider NA, Axel R (1990) A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron* 5:569-581.
- Nakanishi S, Okazawa M (2006) Membrane potential-regulated Ca<sup>2+</sup> signalling in development and maturation of mammalian cerebellar granule cells. *J Physiol* 575:389-395.
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17:3016-3028.

- Nicole O, Ali C, Docagne F, Plawinski L, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A (2001) Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 21:3024-3033.
- Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 21:RC185.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.
- O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL, Mulvihill ER (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 11:41-52.
- Oliet SH, Mothet JP (2006) Molecular determinants of D-serine-mediated gliotransmission: from release to function. *Glia* 54:726-737.
- Oliet SH, Mothet JP (2009) Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience* 158:275-283.
- Oswald RE, Changeux JP (1982) Crosslinking of alpha-bungarotoxin to the acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* by ultraviolet light irradiation. *FEBS Lett* 139:225-229.
- Panatier A, Theodosios DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775-784.
- Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7:39-47.
- Paoletti P, Ascher P, Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* 17:5711-5725.
- Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M (2009) Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158:126-136.
- Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I, Neyton J (2000) Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* 28:911-925.
- Papadakis M, Hawkins LM, Stephenson FA (2004) Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors. *J Biol Chem* 279:14703-14712.
- Perez-Clausell J, Danscher G (1985) Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. *Brain Res* 337:91-98.
- Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF (2001) Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 21:1228-1237.
- Qiu S, Zhang XM, Cao JY, Yang W, Yan YG, Shan L, Zheng J, Luo JH (2009) An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-Methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 284:20285-20298.
- Qureshi N (1996) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 334:1406.

- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280:1596-1599.
- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3948-3952.
- Schorge S, Colquhoun D (2003) Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci* 23:1151-1158.
- Schuler T, Mesic I, Madry C, Bartholomaeus I, Laube B (2008) Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem* 283:37-46.
- Scott L, Aperia A (2009) Interaction between N-methyl-D-aspartic acid receptors and D1 dopamine receptors: an important mechanism for brain plasticity. *Neuroscience* 158:62-66.
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368:144-147.
- Shleper M, Kartvelishvili E, Wolosker H (2005) D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. *J Neurosci* 25:9413-9417.
- Smothers CT, Woodward JJ (2007) Pharmacological characterization of glycine-activated currents in HEK 293 cells expressing N-methyl-D-aspartate NR1 and NR3 subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 322:739-748.
- Stephenson FA (2006) Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. *Biochem Soc Trans* 34:877-881.
- Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, Sheppard PO, O'Hara PJ, Heinemann SF (1994) Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 13:1345-1357.
- Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15:6509-6520.
- Sucher NJ, Kohler K, Tenneti L, Wong HK, Grunder T, Fauser S, Wheeler-Schilling T, Nakanishi N, Lipton SA, Guenther E (2003) N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR3A in the retina: developmental expression, cellular localization, and functional aspects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4451-4456.
- Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E (2002) Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* 417:245-253.
- Tomimatsu Y, Idemoto S, Moriguchi S, Watanabe S, Nakanishi H (2002) Proteases involved in long-term potentiation. *Life Sci* 72:355-361.
- Traynelis SF, Trejo J (2007) Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Curr Opin Hematol* 14:230-235.
- Ulbrich MH, Isacoff EY (2008) Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14163-14168.
- Valente T, Auladell C, Perez-Clausell J (2002) Postnatal development of zinc-rich terminal fields in the brain of the rat. *Exp Neurol* 174:215-229.

- Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1991) Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252:1715-1718.
- Watkins JC, Evans RH (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21:165-204.
- Watkins JC, Jane DE (2006) The glutamate story. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S100-108.
- Wo ZG, Oswald RE (1995) Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci* 18:161-168.
- Wollmuth LP, Sobolevsky AI (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* 27:321-328.
- Wood MW, VanDongen HM, VanDongen AM (1995) Structural conservation of ion conduction pathways in K channels and glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4882-4886.
- Yao Y, Mayer ML (2006) Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *J Neurosci* 26:4559-4566.
- Yashiro K, Philpot BD (2008) Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55:1081-1094.
- Yuan H, Vance KM, Junge CE, Geballe MT, Snyder JP, Hepler JR, Yepes M, Low CM, Traynelis SF (2009) The serine protease plasmin cleaves the amino-terminal domain of the NR2A subunit to relieve zinc inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 284:12862-12873.
- Zheng F, Erreger K, Low CM, Banke T, Lee CJ, Conn PJ, Traynelis SF (2001) Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. *Nat Neurosci* 4:894-901.
- Zuo J, De Jager PL, Takahashi KA, Jiang W, Linden DJ, Heintz N (1997) Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* 388:769-773.

## Originalarbeiten

### 1.50 Publikation 1

Madry C, **Mesic I**, Betz H, Laube B (2007a) The N-terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn<sup>2+</sup> inhibition and glycine affinity of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 72:1535-1544.

### 1.51 Publikation 2

Madry C, **Mesic I**, Bartholomäus I, Nicke A, Betz H, Laube B (2007b) Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* 354:102-108.

### 1.52 Publikation 3

Schuler T, **Mesic I**, Madry C, Bartholomäus I, Laube B (2008) Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem* 283:37-46.

### 1.53 In Präparation

**Mesic I**, Madry C, Betz H, Laube B (2009) N-terminal Domains of NR1/NR3 NMDA Receptore determine glycine-mediated auto-inhibition.

## Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei PD. Dr. Bodo Laube für die Betreuung meiner Dissertationsarbeit bedanken. Ich danke ihm für die Diskussionsbereitschaft, die Unterstützung und seine positive Art, wodurch er meine Promotionszeit außerordentlich bereichert hat. Er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Seine enorme Fachkenntnis hat mich immer wieder einfach ins Staunen versetzt.

Mein besonderer Dank gilt natürlich auch Prof. Dr. Ralf Galuske für die Bereitschaft, meine Dissertation zu begutachten.

Weiterhin möchte ich ganz herzlich Prof. Dr. Heinrich Betz dafür danken, dass er mir die Möglichkeit geboten hat, in seiner Abteilung an diesem Thema zu arbeiten. Er hat mich mit seiner außerordentlichen Fachkenntnis, seiner Diskussionsbereitschaft und seiner Begeisterung während meiner Promotionszeit sehr unterstützt.

Neben den oben Genannten, möchte ich mich vom ganzen Herzen bei meiner ganzen Arbeitsgruppe bedanken: Christian, Cey, Petra, Gosia, Michael, Kirsten, Adriana, Anja, Elena, Tanja, Joanna und Thomas. Eine bessere Arbeitsgruppe als diese gibt es nicht!

Außerdem danke ich allen anderen Freunden und Kollegen: Yvonne und Helene (gleichermaßen), Corinne, Regina, Ben, Isabel. Ihr habt, zusammen mit meiner AG, alle enorm dazu beigetragen, dass ich meine Promotionszeit als eine Bereicherung meines Lebens ansehe! Ich möchte mich bei Mirko, Leslie, Suneel, Afsaneh und Felix für ihre Unterstützung bedanken und auch dafür, dass sie mir zusammen mit allen anderen Kollegen und Freunden, die ich vergessen habe namentlich zu erwähnen, eine schöne Zeit am MPIH beschert haben. Last but not least, danke ich Yusuf für seine Ratschläge und die zahlreichen Gespräche über Gott und die Welt...

Zum Schluss, will ich mich bei meiner Familie bedanken, im Besonderen bei meiner Mutter Jelena, meinem Bruder Igor und seiner Freundin Mara, die ich alle sehr liebe und die mich immer unterstützt haben. Ohne euch wäre ich nicht die, die ich bin.

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

---

**Name:** Ivana Mesic  
**Geburtsdatum:** 11.09.1980  
**Geburtsort:** Sarajevo / Bosnien  
**Familienstand:** ledig  
**Staatsangehörigkeit:** bosnisch  
**Sprachkenntnisse:** Serbokroatisch  
Englisch  
Französisch

**Schulbildung:**

1987 – 1992 Grundschole Dusan Pajic Dasic  
1992 – 1993 Gesamtschole Janko Veselinovic  
1993 – 2000 Gymnasium Freiherr-vom-Stein Schule

**Studium**

2000 – 2005 Biologie-Studium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main  
September 2002 Vordiplom im Fachbereich Biologie  
Oktober 2004 –  
Juni 2005 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main in der Neurochemie-Abteilung von Prof. Heinrich Betz, bei PD. Dr. Bodo Laube  
2005 Diplom im Fachbereich Biologie, Spezialisierung im Fach Neurobiologie

**Promotion**

Seit Juli 2005 Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main, in der Neurochemie-Abteilung von Prof. Heinrich Betz, bei PD. Dr. Bodo Laube