

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. GRUNDLAGEN DER SYNAPTISCHEN TRANSMISSION .....	2
1.2 KURZZEITPLASTIZITÄT .....	5
1.3 AUFKLÄRUNG DES PRÄSYNAPTISCHEN PROTEOMS .....	8
1.4 STRUKTUR UND FUNKTION DER UNC-13/MUNC13-PROTEINE... ..	10
1.5 VORARBEITEN ZUR RIM1/MUNC13-BINDUNG.....	19
1.6 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT .....	23
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>26</b>
2.1 MATERIAL.....	26
2.1.1 Geräte .....	26
2.1.2 Chemikalien und Enzyme.....	27
2.1.3 Kits .....	28
2.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	29
2.1.5 Materialien für die Zellkultur .....	29
2.1.6 Medien und Lösungen.....	30
2.1.7 Bakterienstämme, Hefen und Zell-Linien .....	37
2.1.8 Vektoren .....	37
2.1.9 cDNA-Klone.....	38
2.1.10 Antikörper .....	41
2.1.11 Synthetische Oligonukleotide .....	42
2.1.12 Synthetische Peptide .....	42
2.2 METHODEN .....	43
2.2.1 MOLEKULARE SUBKLONIERUNG .....	43
2.2.1.1 Herstellung von elektrokompetenten Bakterien.....	43
2.2.1.2 Elektrottransformation von Plasmid-DNA in Bakterien .....	44
2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA.....	44
2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	45
2.2.1.5 <i>In-vitro</i> Rekombination von DNA-Molekülen.....	46
2.2.1.6 Polymerasekettenreaktion .....	49
2.2.1.7 Einführung von Punktmutationen in doppelsträngige DNA .....	50
2.2.1.8 DNA-Sequenzierung .....	50
2.2.2 HEFE-DOPPELHYBRIDSYSTEM .....	50
2.2.2.1 Transformation eines Köder/Beute-Plasmid-Paares.....	53
2.2.2.2 Transformation mit einer pVP16-3-cDNA-Bibliothek.....	53
2.2.2.3 $\beta$ -Galaktosidase Filtertest.....	54
2.2.2.4 DNA-Isolierung aus Hefe und Transformation in elektrokompetente HB101-Bakterien .....	55
2.2.2.5 Erzeugung einer zufällig mutierten pLexN-Köderhybrid-Bibliothek .....	56
2.2.2.6 Isolierung von mutierten pLexN-Köderhybrid-Konstrukten mit Funktionsverlust .....	57
2.2.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	58
2.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	58
2.2.3.2 SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen .....	58
2.2.3.3 Coomassie-Färbung.....	59

2.2.3.4	Transfer von Proteinen auf Membranen .....	59
2.2.3.5	Immundetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz .....	59
2.2.3.6	Entfernen von Antikörpern von einer Nitrozellulose-Membran .....	60
2.2.3.7	Herstellung von Rohsynaptosomen aus Rattenhirn.....	61
2.2.3.8	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen .....	61
2.2.3.9	Kosedimentation von Proteinen des Rattenhirns an immobilisierten GST-Fusionsproteinen.....	63
2.2.3.10	Koimmunpräzipitation.....	63
2.2.3.11	Photoaffinitätsmarkierung.....	64
2.2.3.12	Qualitative fluoreszenzspektroskopische Rezeptor/Ligand Bindungsanalyse .....	65
2.2.4	SEMLIKI-WALD-VIRUS-EXPRESSIONSSYSTEM .....	66
2.2.4.1	In-vitro Transkription .....	68
2.2.4.2	Kultur von BHK-Zellen.....	68
2.2.4.3	Elektroporation von BHK-Zellen mit RNA.....	69
2.2.4.4	Aktivierung von Semliki-Wald-Viren.....	69
2.2.4.5	Titerbestimmung .....	70
2.2.5	PRIMÄRE ZELLKULTUR VON HIPPOCAMPALEN NEURONEN..	70
2.2.5.1	Tierhaltung.....	71
2.2.5.2	Astrozytenkultur .....	71
2.2.5.3	Präparation und Kultur von hippocampalen Neuronen .....	72
2.2.6	PATCH-CLAMP-TECHNIK (MEMBRANFLECKENKLEMME).....	73
2.2.6.1	Messplatz .....	74
2.2.6.2	Ganz-Zell-Ableitungen .....	75
2.2.6.3	Phorbolsterapplikation.....	76
2.2.6.4	Statistik.....	76
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>77</b>
3.1	BIOCHEMIE UND FUNKTION DER MUNC13-1/RIM-1-INTERAKTION .....	77
3.1.1	Kartierung der Munc13-1-bindenden Region und der Rab3-bindenden Region in RIM1.....	77
3.1.2	Munc13-1/RIM1-Bindung aber nicht Rab3/RIM1-Bindung ist von einem intakten RIM1-Zinkfinger abhängig.....	80
3.1.3	Rab3 und Munc13-1 sind kompetitive RIM1-Bindungspartner .....	82
3.2	BIOCHEMIE UND FUNKTION DER MUNC13/CAM-INTERAKTION .	86
3.2.1	CaM interagiert mit Munc13-1 und ubMunc13-2 im Hefe- Doppelhybridsystem .....	86
3.2.2	Kartierung der CaM-Bindungsdomäne in Munc13-1 .....	89
3.2.3	Identifizierung einer klassischen, evolutionär konservierten CaM- Erkennungssequenz in Munc13-1 und ubMunc13-2 .....	91
3.2.4	Munc13-1 und ubMunc13-2 binden CaM mit einer 1:1 Stöchiometrie und weisen ein konserviertes Trp als Ankerpunkt auf.....	95
3.2.5	Trp/Arg-Austausch in der CaM-Erkennungssequenz ist inkompatibel mit CaM-Bindung an Munc13-Proteine .....	102
3.2.6	Reversion des Phänotyps von Munc13-1/2-DKO-Neuronen durch Expression von Trp/Arg-mutierten Munc13-Varianten .....	106

3.2.7 Aufhebung der Munc13/CaM-Bindung führt zu starken Defekten in der Kurzzeitplastizität.....	110
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>114</b>
4.1 FUNKTION VON RIM1 UND MUNC13-1/UBMUNC13-2 IN DER REIFUNG VON SYNAPTISCHEN VESIKELN ZUR FUSIONSKOMPETENZ .....	114
4.1.1 Organisation der Rab3A/C-bindenden Region von RIM1 .....	114
4.1.2 Weitere Bindungspartner von RIM1/2.....	118
4.1.3 Funktion des Munc13-1/RIM1-Komplexes .....	121
4.1.4 RIM1-Funktion in Moosfaser-LTP und die Rolle von Phosphorylierungen durch PKA.....	124
4.2 DER CAM/MUNC13-KOMPLEX REGULIERT DIE SYNAPTISCHE WIRKSAMKEIT WÄHREND KURZZEITPLASTISCHER PROZESSE ...	127
4.2.1 Funktionelle Analyse von synaptischen Protein-Protein-Interaktionen ....	127
4.2.2 Ca <sup>2+</sup> -Dynamik im präsynaptischen Terminal .....	129
4.2.3 CaM-insensitive Varianten von Munc13-1/ubMunc13-2 sind funktionell und weisen keine strukturellen Beeinträchtigungen auf .....	132
4.2.4 Der CaM/Munc13-Komplex ist ein Ca <sup>2+</sup> -Sensor/Effektor-Komplex für die schnelle Regulation der synaptischen Wirksamkeit .....	133
4.2.5 Munc13-Proteine sind Ziele der DAG- und Ca <sup>2+</sup> -Signaltransduktion.....	136
4.3 AUSBLICK.....	138
4.3.1 Mausmodelle für die verhaltensbiologische Analyse der Funktion des CaM/Munc-13-Komplexes .....	138
4.3.2 Koordination der DAG- und Ca <sup>2+</sup> /CaM-Signaltransduktion auf Munc13-Proteine.....	138
4.3.3. Analyse der RIM1/Munc13-1-Interaktion durch <i>Rescue</i> -Experimente....	140
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>141</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>144</b>