



Harald Jobst Junge (Autor)

Funktion von Munc13-Proteinen in präsynaptischen Regulationsmechanismen der Neurotransmission

Harald Jobst Junge

**FUNKTION VON MUNC13-PROTEINEN
IN PRÄSYNAPTISCHEN REGULATIONSMECHA-
NISMEN DER NEUROTRANSMISSION**



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3079>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1. EINLEITUNG	1
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
2. MATERIAL UND METHODEN	26
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 β -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
3.	ERGEBNISSE.....	77
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
4. DISKUSSION	114
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 ²⁺ -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 ²⁺ -Sensor/Effektor-Komplex für die schnelle Regulation der synaptischen Wirksamkeit	133
4.2.5 Munc13-Proteine sind Ziele der DAG- und Ca ²⁺ -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 ²⁺ /CaM-Signaltransduktion auf Munc13-Proteine.....	138
4.3.3. Analyse der RIM1/Munc13-1-Interaktion durch <i>Rescue</i> -Experimente....	140
ZUSAMMENFASSUNG	141
LITERATURVERZEICHNIS.....	144