

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Rolle des Aktin-Zytoskeletts für Struktur und Funktion der Synapse	1
1.1.1 Aktin in der präsynaptischen Endigung	1
1.1.2 Aktin in der Postsynapse	3
1.1.3 Aktin und synaptische Plastizität	5
1.2 Der Aktin-Tretmühlenmechanismus und seine Modulation.....	6
1.3 Regulatorische Proteine der Aktin-Dynamik und ihre Funktion in der Synapse.....	9
1.3.1 Proteine der ADF/Cofilin-Familie.....	9
1.3.2 Familie der Cyclase-assoziierten Proteine (CAP)	10
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien.....	14
2.2 Primäre Antikörper.....	16
2.3 Sekundäre Antikörper	17
2.4 Fluoreszenzfarbstoffe	18
2.5 Puffer und Lösungen.....	19
2.5.1 SDS-PAGE und Western Blot	19
2.5.2 Co-Immunpräzipitation	20
2.5.3 Präparative Methoden	20
2.5.4 Puffer für Immunhistochemie und Immunzytochemie.....	22
2.5.5 Medien und Puffer für primäre Zellkultur	23
2.6 Versuchstiere	24
2.7 Histologie	26
2.7.1 Transkardiale Perfusion von Mäusen	26
2.7.2 Anfertigung von Hirschnitten	26
2.7.3 X-Gal-Färbung	27
2.7.4 Immunfluoreszenzfärbung.....	28

2.8 Primäre hippocampale Kulturen der Maus	28
2.8.1 Vorbereitung der Deckgläser	28
2.8.2 Präparation der hippocampalen Neurone	29
2.8.3 Immunzytochemische Färbung primärer hippocampaler Kulturen	30
2.9 Mikroskopie	31
2.9.1 Hellfeld- und Epifluoreszenz-Mikroskopie	31
2.9.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	32
2.9.3 Bearbeitung und Auswertung der konfokalen Aufnahmen	33
2.10 Präparative Methoden	33
2.10.1 Subzelluläre Fraktionierung nach Guillemin	33
2.10.2 Isolierung von Synaptosomen	35
2.10.3 Subsynaptische Fraktionierung nach Phillips	39
2.11 Biochemische Methoden	40
2.11.1 Arbeiten mit Proteinen	40
2.11.2 Quantifizierung von Proteinen	40
2.11.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	40
2.11.4 Analyse des F-/G-Aktin-Verhältnisses in Synaptosomen	42
2.11.5 Behandlung von Synaptosomen mit Aktin-modifizierenden Toxinen	43
2.11.6 Bestimmung des v-SNARE/t-SNARE-Verhältnisses in Synaptosomen	44
2.12 Physiologische Methoden	46
2.12.1 Analyse der Glutamatfreisetzung aus Synaptosomen	46
2.12.2 Bestimmung der Größe des RRP	50
2.13 Auswertung und Statistik	51
3 Ergebnisse	52
3.1 Zelluläre und synaptische Expression von ADF	52
3.2 Erhöhte n-Cofilin-Expression in synaptischen Strukturen von ADF ^{-/-} -Tieren	55
3.3 Analyse der CaMKII α -Cre-Expression	57
3.4 Bedeutung der Deletion von ADF & n-Cofilin für die zelluläre und synaptische Aktin-Expression	63
3.5 Bedeutung der Deletion von ADF & n-Cofilin für die synaptische Aktin-Dynamik	64

3.5.1 Gestörte depolarisationsinduzierte Aktin-Dynamik durch Deletion von ADF & n-Cofilin	65
3.5.2 Reduzierte intrinsische Aktin-Dynamik in ACC-Synaptosomen.....	69
3.6 Bedeutung der Deletion von ADF & n-Cofilin für die Expression wichtiger synaptischer Proteine	73
3.7 Bedeutung der Deletion von ADF & n-Cofilin für die Rate gedockter Vesikel in ACC-Mutanten	75
3.8 Bedeutung der Deletion von ADF & n-Cofilin für die synaptosomale Glutamatfreisetzung.....	76
3.8.1 Extrasynaptosomales Glutamat und spontane Glutamatfreisetzung	76
3.8.2 Ca^{2+} -abhängige Glutamatfreisetzung nach Depolarisation	78
3.8.3 Erhöhter Gesamt-Glutamatgehalt in ACC-Synaptosomen	80
3.8.4 Rolle der Vesikel-Pools bei der unterschiedlichen Glutamatfreisetzung in WT- und ACC-Synaptosomen	82
3.9 Neuronale Expression des Aktin-bindenden Proteins CAP2.....	84
4 Diskussion	88
4.1 Synaptische Expression und Bedeutung von ADF für die zelluläre und synaptische Aktin-Expression	89
4.2 Untersuchung des Deletionsmusters von n-Cofilin in der nCof ^{flx/flx, CaMKII-Cre} Maus und Implikationen für die Hyperaktivität der ACC-Maus.....	90
4.3 Rolle von ADF und n-Cofilin für die zelluläre und synaptische Aktin-Dynamik.....	92
4.4 Rolle von ADF und n-Cofilin für die synaptische Transmitter- freisetzung	95
4.5 Die neuronale Expression und Funktion von CAP2	101
5 Literatur.....	105
Abbildungsverzeichnis	122
Abkürzungsverzeichnis	123
Lebenslauf	125