

Die Rolle von LRP1 in der Funktion des NMDA-Rezeptors

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Von

Wladislaw Maier

geboren am 1. Oktober 1981
in Kant

Mainz im Juni 2013

Inhalt

| | | |
|--------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Die Familie der LDL-Rezeptoren | 1 |
| 1.1.1 | Struktur und Funktionen des Lipoprotein Rezeptor-related Protein 1 (LRP1) 3 | |
| 1.1.2 | Die Rolle des LRP1 in der neuronalen Signaltransduktion | 5 |
| 1.2 | Glutamat-Rezeptoren | 7 |
| 1.2.1 | Ionotrope Glutamat-Rezeptoren..... | 7 |
| 1.2.2 | Aufbau und Signaltransduktion des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors | 7 |
| 1.2.3 | Regulation der NMDA-Rezeptoren durch die Phosphorylierung..... | 9 |
| 1.3 | Zielsetzung der Arbeit..... | 13 |
| 2 | Material | 15 |
| 2.1 | Chemikalien..... | 15 |
| 2.2 | Antibiotika..... | 16 |
| 2.3 | Geräte und Laborhilfsmittel..... | 16 |
| 2.4 | Verbrauchsmaterialien..... | 17 |
| 3 | Methoden | 19 |
| 3.1 | Primäre Zellkultur | 19 |
| 3.1.1 | Präparation und Kultivierung primärer kortikaler Neurone | 19 |
| 3.1.2 | Bestimmung der Zellvitalität im AlamarBlue Assay | 20 |
| 3.1.3 | Behandlung primärer Neurone mit Cycloheximid..... | 21 |
| 3.2 | Proteinbiochemische Methoden | 21 |
| 3.2.1 | Zelllyse und Proteinbestimmung | 21 |
| 3.2.2 | Herstellung der Hirnlysate..... | 22 |
| 3.2.3 | Dephosphorylierung der Proteine mit alkalischer Phosphatase..... | 22 |
| 3.2.4 | Oberflächenbiotinylierung von Neuronen..... | 23 |
| 3.2.5 | Internalisierungsexperimente mit spaltbarem Sulfo-NHS-SS-Biotin..... | 24 |
| 3.2.6 | Co-Immunopräzipitation..... | 25 |
| 3.2.7 | Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 26 |
| 3.2.8 | Western Blot | 27 |
| 3.2.9 | Immunologischer Nachweis der Zielproteine | 28 |
| 3.2.10 | Densitometrische Auswertung der Westen Blots und Statistik..... | 28 |
| 3.3 | Verhaltensexperimente..... | 28 |
| 3.3.1 | Open Field Paradigma | 28 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.3.2 | Morris Water Maze..... | 29 |
| 3.3.3 | Monitoring des Verhaltens | 29 |
| 3.4 | Antikörper | 30 |
| 4 | Ergebnisse..... | 32 |
| 4.1 | Primäre kortikale LRP1 Δ NPxY2 Neurone zeigen keine Abweichungen in der Zellvitalität oder in der Expression der synaptischen Marker | 33 |
| 4.2 | NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1/NR2B zeigen höhere Expressionsraten an der Zelloberfläche der LRP1 Δ NPxY2 Neurone | 35 |
| 4.3 | LRP1 und NR1/NR2B-Rezeptoruntereinheiten demonstrieren verminderte Internalisierungsraten in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen | 37 |
| 4.4 | Die NR2B-Rezeptoruntereinheit weist ein verändertes Phosphorylierungsmuster in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen auf..... | 43 |
| 4.4.1 | Die Internalisierungssignale der NR2B-Rezeptoruntereinheit sind in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen verstärkt aktiviert..... | 43 |
| 4.4.2 | Die Expression und die Regulierung der CKII und Fyn Kinasen demonstrieren in den LRP1 Δ NPxY2-Neuronen keine Abweichungen | 45 |
| 4.5 | LRP1 bindet stärker an die NR2B-Rezeptoruntereinheit in LRP1 Δ NPxY2 Neuronen | 46 |
| 4.6 | Die Interaktion zwischen LRP1 und NR2B wird durch die Phosphorylierung reguliert | 47 |
| 4.7 | LRP1 Δ NPxY2 Tiere sind hyperaktiv und haben Defizite im direkten und umgekehrten räumlichen Lernvermögen..... | 49 |
| 4.7.1 | Die knock-in Mutation in das NPxY2 Motiv von LRP1 führt zu einer verminderten Aktivierung der Erk1/2 und GSK3 α/β Kinasen | 51 |
| 5 | Diskussion..... | 54 |
| 6 | Ausblick..... | 65 |
| 7 | Zusammenfassung..... | 67 |
| 8 | Literaturverzeichnis..... | 67 |
| 9 | Anhang..... | 77 |
| 9.1 | Lebenslauf..... | 77 |
| 9.2 | Eidesstattliche Erklärung | 80 |