

Abschließender Sachbericht

Titel des Vorhabens:

**Leibniz Graduate School Genetik synaptischer
Funktionen und Dysfunktionen
(Genetics of synaptic functions and dysfunctions)**

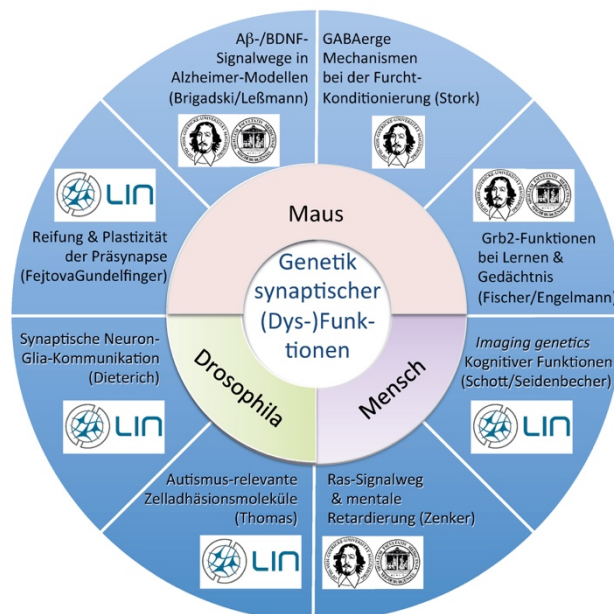


Leibniz-Einrichtung: LIN Magdeburg
Aktenzeichen: SAW-2014-lfN-499
Projektlaufzeit: 01.04.2011 - 31.12.2015

Ansprechpartner: Eckart Gundelfinger, Constanze Seidenbecher

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Executive Summary	3
Milestones und Highlights der LGS Synaptogenetics	4
Wissenschaftliche Berichte der Teilprojekte	5
TP 1: Bedeutung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs für kognitive Funktionen – Rolle von aktivierenden Mutationen bei mentaler Retardierung beim Menschen	5
TP 2: Imaging Genetics kognitiver Funktionen	6
TP 3: Grb2-Funktionen bei Lernen und Gedächtnis	8
TP 4: GABAerge Interneurone bei der Furchtkonditionierung	9
TP 5: Das Zusammenspiel von β -Amyloid- und BDNF-Signalwegen bei der hippocampalen Neurogenese	11
TP 6: Genetische Manipulation von Synapsenproteinen: Redundante und exklusive Funktionen von Bassoon und Piccolo bei synaptischer Verschaltung und Plastizität	13
TP 7: Rolle der Neuron-Glia-Kommunikation während der Synaptogenese in Drosophila: Charakterisierung zellspezifischer Proteomdynamik durch transgene zellspezifische Click-Chemie	15
TP 8: Koordination von Neurexin-Neurologin-Adhäsionsmodulen durch assoziierte Gerüstproteine bei der Organisation glutamaterger Synapsen in Drosophila	17
Anhang	19
LGS-Publikationen	19
LGS-Abschlussarbeiten, Qualifizierungen	20
Master-Arbeiten	20
Promotionen	20
Apl-Professuren	21
Rufe	21
Auszeichnungen, Preise, Drittmittel	21
Presseberichte	21
Öffentlichkeitsarbeit	22
Ausgewählte Vorträge der Stipendiaten	22



Executive Summary

Warum sind Lernen und Gedächtnisbildung, aber auch andere kognitive Prozesse individuell höchst variabel? Die Leibniz-Graduate School „Genetik synaptischer Funktionen und Dysfunktionen“ ging dieser Frage nach und verfolgte das wissenschaftliche Ziel, die genetisch begründete Varianz von plastischen Prozessen im Nervensystem, insbesondere bei der synaptischen Signalübertragung, zu untersuchen. Die LGS wurde vom LIN Magdeburg in Kooperation mit der Medizinischen Fakultät und der Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg getragen. In den 8 Teilprojekten kam ein breites Methodenspektrum zum Einsatz, angefangen von humangenetischen und Imaging-Studien mit Probanden oder Patienten bis zu tierexperimentellen Versuchsansätzen mit den genetischen Modellsystemen Maus und Taufliede.

Herausragende Publikationen der LGS-Teilprojekte beschäftigen sich mit der Zell-selektiven Markierung des Proteoms in *Drosophila* (Erdmann et al., *Nature Commun.*, 2015) und deren Anwendbarkeit in einem Fliegen-Modell für die Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie (Niehues et al., *Nature Commun.*, 2015), mit der Rolle der Kinase Ndr2 beim Integrin-vermittelten Auswachsen von Neuriten (Rehberg et al., *J Neurosci*, 2014) oder mit einer unerwarteten epistatischen Wechselwirkung zweier genetischer Risikovarianten für Depression bei neuronalen Prozessen der Gedächtnisbildung (Schott et al. *Translational Psychiatry* 2014).

Die in der LGS erzeugten proteomischen Daten werden über die am LIN ansässige Datenbank SynProt gesammelt und verfügbar gemacht. Im Teilprojekt 2 wurde eine große Kohorte junger gesunder Probanden aufgebaut, die durch enge Ein- und Ausschlusskriterien definiert ist und über vielfältige psychologische Tests, genetische und Kernspindaten charakterisiert ist. Diese Kohorte steht auch anderen Gruppen am Standort zur Verfügung, und die daraus gewonnenen Daten können anonymisiert für weitere Studien eingesetzt werden.

Obwohl es sich bei den Projekten der LGS zunächst um reine Vorhaben der Grundlagenforschung handelte, haben einige Ergebnisse das Potential, darauf aufbauend langfristig Anwendungen zu entwickeln, wie beispielsweise die Befunde zur GAD65-vermittelten Stress-Vulnerabilität, die Bedeutung für verbesserte Modelle der posttraumatischen Belastungsstörung haben und damit eine Verwertung der Erkenntnisse künftig möglich machen.

Über die gesamte Laufzeit wurden in der LGS 8 naturwissenschaftliche und 3 Medizinikarbeiten betreut und 22 Masterarbeiten abgeschlossen. Vier thematisch passende Doktorarbeiten waren mit der LGS assoziiert. Die Kollegiaten kamen aus 10 verschiedenen Ländern und bereicherten die Internationalität und kulturelle Vielfalt am Standort. Sie haben zur alljährlichen „Langen Nacht der Wissenschaft“, zu den Career Days und bei wissenschaftlichen Veranstaltungen das Campus-Leben enorm bereichert. Auszeichnungen der Kollegiaten mit weiterführenden Stipendien, dem Doktorandenpreis der Medizinischen Fakultät oder dem Hugo-Junkers-Preis des Landes Sachsen-Anhalt (2. Platz) zeugen von der erfolgreichen Arbeit der LGS.

Die Graduate School trug insgesamt dazu bei, die Doktorandenausbildung am LIN nachhaltig zu strukturieren: sie hat die neurowissenschaftliche Nachwuchsausbildung in Magdeburg um den Bereich Genetik erweitert und fungierte gleichwohl als Blaupause für ein strukturiertes Promotionsprogramm mit individuell abgeschlossenen Promotionsvereinbarungen, Thesis Committees und Research Proposals. Derzeit soll darauf aufbauend ein Standort-übergreifendes Graduiertenprogramm „Neuroscience“ im Rahmen des CBBS-Forschungscampus etabliert werden.

Milestones und Highlights der LGS Synaptogenetics

Frühjahr 2011: Start der LGS; Kick-off der PIs; Entwicklung des Logos
internationale Ausschreibung der Stipendien

Sommer 2011: Auswahl der Kandidatinnen

VIII/11-III/12: Start der Projekte

Bildung von Thesis Committees

Frühjahr 2012: *Go life* der neuen LGS-Website

Herbst 2012: Kurzvorträge von Kollegiaten auf dem DGPPN Kongress Berlin 2012

Januar 2013: 1. LGS-Retreat in Wernigerode

März 2013: Kurzvorträge von Kollegiaten auf dem TEAP Kongress in Wien

Mai 2013: Lange Nacht der Wissenschaft

Herbst 2013: Kurzvorträge von Kollegiaten auf dem DGPPN Kongress Berlin 2013

Herbst 2013: Women's Career Day

Februar 2014: 2. LGS-Retreat in Weimar

Juni 2014: Women's Career Day

Mai 2014: Lange Nacht der Wissenschaft

2014: erste LGS-Promotion erfolgreich verteidigt (A. Barman, Summa cum laude)

Februar 2015: XIII. Magdeburg International Symposium „Learning&Memory“

März 2015: Kurzvorträge von Kollegiaten auf dem 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society

Juni 2015: Women's Career Day

Herbst 2015: Preise: Doktorandenpreis der Medizinischen Fakultät der OvGU (J. Teuber)

Hugo-Junkers-Preis für Forschung und Innovation aus Sachsen-Anhalt 2015 in der Kategorie Innovativste Vorhaben aus der Grundlagenforschung (I. Erdmann)



Wernigerode 2013



Weimar 2014

Wissenschaftliche Berichte der Teilprojekte

TP 1: Bedeutung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs für kognitive Funktionen – Rolle von aktivierenden Mutationen bei mentaler Retardierung beim Menschen

Martin Zenker

Patienten mit RASopathien, einer durch aktivierende Keimbahnmutationen in Genen für verschiedene Komponenten des Ras-MAPK-Signalwegs verursachte Erkrankungsgruppe, zeigen neben verschiedenen körperlichen Anomalien auch kognitive Defizite unterschiedlicher Ausprägung. Die zentrale Bedeutung des RAS-Signalwegs für die Regulation synaptischer Plastizität ist andererseits aus neurobiologischen Untersuchungen bekannt. Auf dem Boden dieses Wissens war es Ziel dieses Teilprojekts, die Bedeutung von genetisch bedingten Störungen des Signalnetzwerks um RAS für mentale Retardierung (MR) beim Menschen weiter zu erforschen und nach Mutationen in Modulatoren dieses Signalnetzwerks bei mentaler Retardierung auch außerhalb des syndromalen Kontextes der RASopathien (Noonan-Syndrom) zu suchen. Zu diesem Zweck wurde zunächst *in silico* mit Hilfe verschiedener Programme (Cytoscape, STRING, IntAct Molecular Interaction Database) ein Interaktionsnetzwerk um die RAS-Moleküle erstellt (Abb.). So identifizierte Moleküle mit Bezug zum RAS-Signaling wurden weiter nach verschiedenen Kriterien (neuronal Expression, bekannter neuro-psychologischer Phänotyp, bekanntes Mausmodell) priorisiert, und daraus eine Liste von 329 Kandidatengenen für die Untersuchungen bei Menschen generiert. Dieses Gen-Panel wurde mittels Next-Generation-Sequencing in einer Kohorte von 144 Patienten mit ungeklärter/unspezifischer mentaler Retardierung untersucht sowie einer Kontrollgruppe von 96 Probanden ohne mentale Retardierung. So identifizierte Sequenzvarianten wurden nach Vorkommen in Datenbanken (ExAC, 1000genomes, ClinVar) und der *in silico* vorhergesagten Auswirkungen auf das Genprodukt gefiltert. Im Durchschnitt wurden in den untersuchten RAS-Signalweg-Genen pro Individuum ~4 sehr seltene oder unbekannte Varianten identifiziert (Range: 0-12). Die besten Kandidaten wurden durch konventionelle Sequenzierung und Untersuchungen zur Segregation in der Familie validiert.

Bei den 144 Studienpatienten konnte so in 5 Fällen die sehr wahrscheinlich ursächliche genetische Veränderung in Genen identifiziert werden, die inzwischen als MR-Gene bekannt sind (Mutationen in BRAF, CTNNB1, SOS1) Darüber hinaus fanden sich bei 20 Patienten Varianten in neuen MR-Kandidatengenen (SHANK2, SHANK3, BSN, PCLO, NPTN, RASGRF). Diese werden gegenwärtig noch weiter durch *in silico* und *in vitro*-Analysen validiert. Die Ergebnisse zeigen, dass selbst in einer für eine so heterogene Erkrankung wie mentale Retardierung monogene Defekte von Molekülen mit Bezug zum RAS-Signalweg einen kleinen aber relevanten Anteil ausmachen.

Für den Kausalitätsbeweis von Varianten in neuen Kandidatengenen stellte sich in dem Projekt aber eine grundsätzliche Problematik, dass für einen wesentlichen Aspekt der Beweiskette, nämlich für die Bestätigung von Mutationen im gleichen Gen in weiteren MR-Fällen (mit ähnlichem Phänotyp) die primäre Studienkohorte zu klein und klinisch zu heterogen war.

Zur Identifikation weiterer Mutationen sollen daher für die besten neuen Kandidatengene noch gezielte Untersuchungen in größeren Kohorten erfolgen und/oder durch Kooperationen mit anderen Gruppen, die Exom-Sequenzierung in MR-Kohorten betrieben haben, weitere bestätigende Fälle gesammelt werden. Aus diesen Gründen konnten aus dem Projekt auch Ergebnisse noch nicht publiziert und die Promotion der in dem Projekt beschäftigten Naturwissenschaftlerin, Sangamitra Boppudi noch nicht abgeschlossen werden. Innerhalb des Projekts wurden am Institut für Humangenetik NGS-Analysen spezifischer Gen-Panels etabliert. Allerdings waren wegen der dynamischen Entwicklungen technischer Möglichkeiten

auf dem Gebiet der NGS-Technologie Anpassungen des Arbeitsplanes sinnvoll (erhebliche Ausweitung des Genpanels, Wechsel der Sequenzierplattform), die den Start verzögerten.

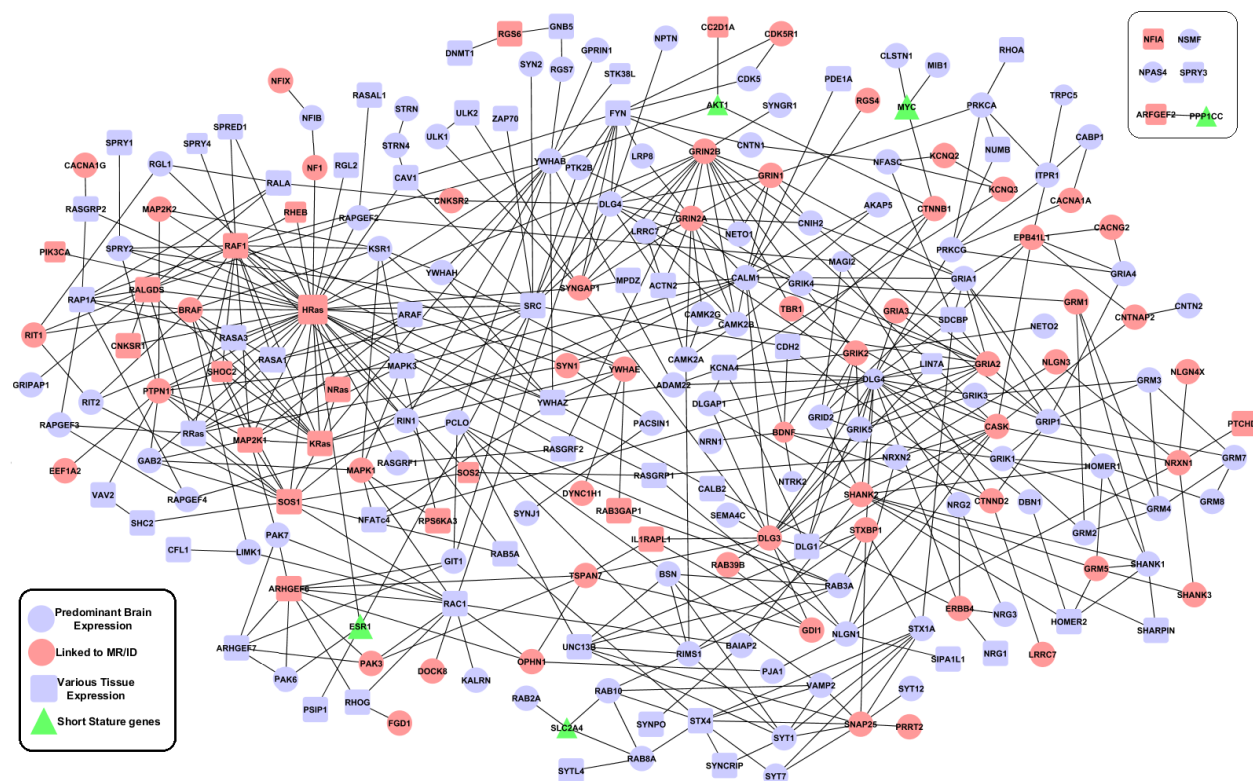


Abbildung TP1: Netzwerk von Molekülen mit Bezug auf den RAS-Signalweg und deren Interaktionspartner. Das Interaktionsnetzwerk wurde generiert mit Hilfe der Cytoscape software, (version 3.3) basierend auf STRING interactions (Version 10). Linien stehen für mindestens moderate Evidenz (STRING score > 0.3) für Protein-Interaktionen beim Menschen. Insgesamt sind 221 Moleküle mit direktem oder indirektem Bezug zum RAS-Signalweg dargestellt.

Ein erstes Pilotprojekt der Doktorandin zur Anwendung des NGS-Technologie (noch auf der GS-Junior-Sequenzierplattform) diente der Validierung zweier neuer Kandidatengene für MR, die sich als positionelle Kandidaten aufgrund eines Patienten mit Mikrodeletion ergeben hatten. Die Arbeiten trugen dazu bei, NF1B als neues MR-Kandidatengenen zu etablieren. Eine Publikation ist in Vorbereitung. Ein neues Forschungsfeld am Rand des eigentlichen Fokus des Projekts ergab sich durch die Möglichkeit genetischer Forschungen zu einer Gruppe neurokutaner Erkrankungen, die nicht durch Keimbahnmutationen sondern durch somatische Mosaik-Mutationen in Genen des RAS-Signalwegs und des funktionell verbundenen PI3-Kinase-ATK-Signalwegs verursacht werden. Hier konnte die Doktorandin ihre im Projekt gewonnene Expertise einbringen und spezifische KRAS-Mutationen als Ursache des okuloektodermalen Syndroms und der enzephalo-cranio-cutanen Lipomatose nachweisen und damit die Zuordnung dieser verwandten Erkrankungen zur Gruppe der „Mosaik-RASopathien“ belegen (Boppudi et al., 2016). Eine weitere Publikation zu PIK3CA-Mosaikerkrankungen ist in Vorbereitung.

TP 2: Imaging Genetics kognitiver Funktionen

Björn Schott & Constanze Seidenbecher

Ziel von TP 2 war die Charakterisierung genetischer Einflussfaktoren auf Lern- und Gedächtnisprozesse des Menschen, wobei der besondere Fokus auf genetischen Varianten

des Ras/Raf-Signalweges lag. Eine genetische Variante in der regulatorischen Region des *RASGRF1*-Gens (rs8027411), welches für das an der Aktivierung des Ras-Signalweges RasGRF1 kodiert, war zuvor in einer Genom-weiten Assoziationsstudie (GWAS) zur Kurzsichtigkeit identifiziert worden (Hysi et al., 2010). Da *RASGRF1*-defiziente Mäuse neben okulären Auffälligkeiten auch Störungen des Hippocampus-abhängigen Gedächtnisses zeigen, untersuchten wir die Auswirkungen dieses Polymorphismus auf Gedächtnisfunktionen beim Menschen. Dabei zeigten Träger des zuvor mit Kurzsichtigkeit assoziierten T-Allels eine bessere Abrufleistung in Hippocampus-abhängigen Gedächtnisaufgaben sowie eine verstärkte Aktivierung des Hippocampus bei der Enkodierung neuer und belohnter Information (Barman et al., 2014).

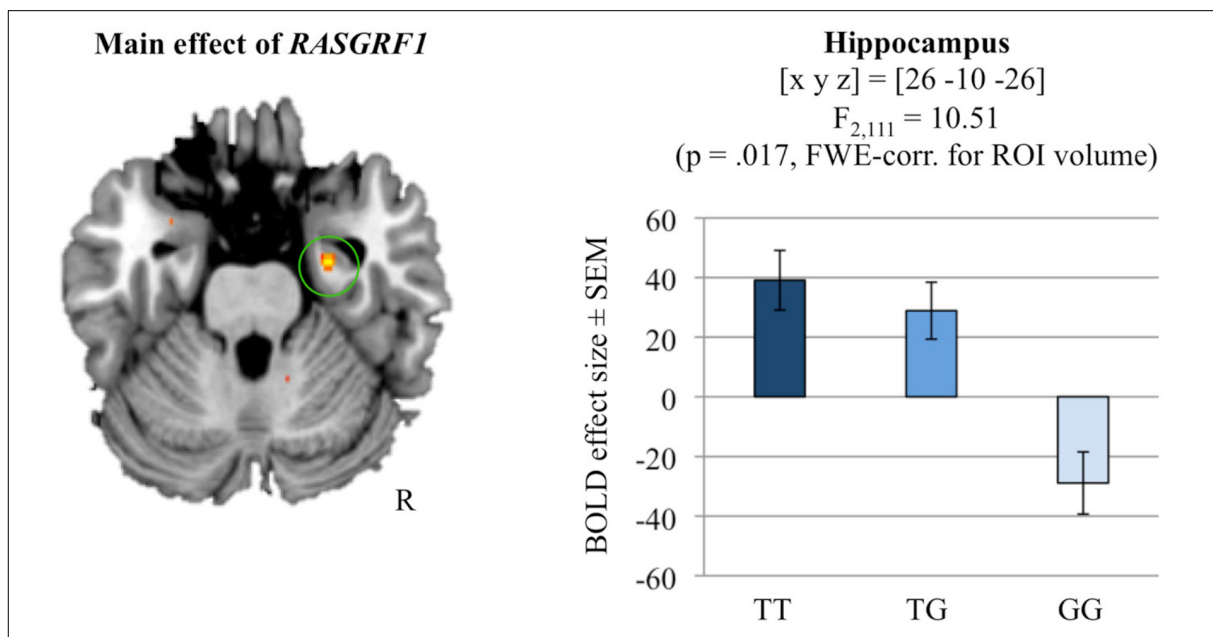


Abbildung TP2: Die Verarbeitung von Neuheit im Hippocampus wird durch den RasGRF1-Genotyp moduliert. Bei TT-homozygoten Probanden fanden wir eine signifikant gesteigerte Hippocampus-Aktivierung im Vergleich mit Trägern des G-Allels ($p < 0,017$; FWI-korrigiert für ROI-Volumen). Das Balkendiagramm zeigt die Stärke des BOLD-Effektes nach Genotypen unter Angabe der Standardfehler der Mittelwerte (aus Barman et al., 2014).

Ein wichtiges Signal für die postsynaptische Aktivierung des Ras-Signalweges ist der Calcium-Einstrom, welcher unter anderem durch spannungsgesteuerte L-Typ-Calciumkanäle nach Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren erfolgen kann. Polymorphismen in den Genen der L-Typ-Calciumkanal-Untereinheit $Ca_v1.2$ (*CACNA1C*) und des an der Glutamat-Freisetzung beteiligten präsynaptischen Proteins Piccolo (*PCLO*) wurden zuvor als Risikovarianten für psychiatrische Erkrankungen, insbesondere affektive Störungen, identifiziert. Wir konnten zeigen, dass die mit Depressionsrisiko assoziierten Varianten der *CACNA1C*- und *PCLO*-Gene bei der Gedächtnisbildung eine komplexe Interaktion im subgenualen Cingulum zeigen, einer Hirnregion, die bei der Ätiologie der Depression eine wichtige Rolle spielt (Schott, Assmann, et al., 2014). Träger der Depressions-Risikovariante des *PCLO*-Gens –aber nicht des *CACNA1C*-Gens– zeigen darüber hinaus eine reduzierte Lernleistung bei verbalen Gedächtnisaufgaben und eine reduzierte Aktivierung des Hippocampus bei der Enkodierung. Der Ras-Signalweg kann durch neuromodulatorische Transmitter wie Dopamin kreuzaktiviert werden, was für die langfristige Ausprägung von Plastizitätsvorgängen, beispielsweise bei der späten Phase der LTP, von Bedeutung ist. Im dopaminergen System sind insbesondere für den D2-Dopamin-Rezeptor (DRD2) genetische Varianten bekannt, welche mit veränderter

Expression des Rezeptors assoziiert sind. Wir konnten zeigen, dass Träger von niedrig exprimierenden DRD2-Varianten eine erhöhte Sensitivität für Belohnungen bei Aufmerksamkeits-Tests und ein besseres Gedächtnis für belohnte Stimuli haben, aber Schwierigkeiten beim belohnten Inhibitionslernen zeigen (Richter et al., 2013, 2014, in Revision).

Genetische Varianten im Ras-Signalweg wurden zuvor mit mentaler Retardierung und mit Autismus assoziiert (siehe auch TP1). Autistische Merkmale, welche sich mit dem Autismus-Quotienten (AQ) quantifizieren lassen, finden sich in subklinischer Ausprägung auch in der Normalbevölkerung, wobei Männer typischerweise einen höheren AQ aufweisen, als Frauen. Wir konnten zeigen, dass Geschlechter-Unterschiede bei der Verarbeitung sozialer Belohnungen durch den AQ moduliert werden (Barman et al., 2015).

TP 3: Grb2-Funktionen bei Lernen und Gedächtnis

Klaus-Dieter Fischer & Mario Engelmann

Das bearbeitete Projekt befasste sich mit den Konsequenzen des Fehlens von Grb2 im Hippocampus in Verhaltenstests für Langzeitgedächtnis und Emotionalität. Da Neurotrophine eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der RAS-Signalkaskade spielen, wurde postuliert, dass u. a. die hippocampale Neurogenese beeinflusst ist und dass das seinerseits Konsequenzen für die Verhaltensleistungen der betroffenen Tiere hat. Eine signifikante Reduktion des Grb2-Proteins wurde bei Grb2-cKO-Mäusen im Hippocampus, frontalen Cortex, Striatum und Bulbus olfactorius, nicht aber im Cerebellum gemessen. Interessanterweise blieben davon in den genannten Hirnarealen die Proteinkonzentrationen für die MAP-Kinase und der Phosphorylierungsstatus für p42 und p44 unbeeinflusst. Zudem fanden wir beim zellulären Mapping der Aktivität in von einer Lernsession in der sozialen Diskrimination aktivierten Hirnarealen eine verstärkte Synthese von c-Fos im ventralen, nicht aber im dorsalen Hippocampus. Zu unserer Überraschung fanden wir in unserem konditionalen (CamK-Cre) Grb2-cKO-Modell schon im unbehandelten Phänotyp ein gestörtes Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis (siehe **Abb.**).

Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Studie auf die Applikation von mildem Stress zur Untersuchung der Grb2-Funktion verzichtet und stattdessen eine genauere Charakterisierung des Grb2-cKO-Phänotypes mittels ausgewählter Verhaltenstests vorgenommen. Dazu gehörten die olfaktorische Habituation/Dishabituation, die Objektwiedererkennung und die klassische wie auch die kontextuelle Furchtkonditionierung. Die Ergebnisse belegen, dass das gestörte Langzeitwiedererkennungsgedächtnis der Grb2-cKO-Mäuse nicht mit einer gestörten Verarbeitung olfaktorischer Signale *per se* erklärt werden kann, da die Tiere eine intakte olfaktorische Habituation/Dishabituation aufwiesen. Tatsächlich zeigten die Mutanten nicht nur ein gestörtes soziales Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis, sondern konnten – anders als die Wildtypen – ein vorher kennengelerntes Objekt nicht von einem für sie neuen unterscheiden. Im Modell der Angstkonditionierung konnten die Grb2-cKO-Mäuse sowohl das bei der Lernsession präsentierte Tonsignal als auch den Lernkontext mit dem Fußschock assoziieren. Allerdings war die Verhaltensantwort „Fruchtstarre“ in beiden Modellen weniger stark ausgeprägt als bei Wildtypmäusen. Das impliziert – zusammen mit Ergebnissen in anderen, hier nicht weiter beschriebenen Verhaltenstests – eine signifikant höhere (loko)motorische Aktivität der Grb2-cKO-Tiere im Vergleich zu den Wildtypen. Insgesamt erbrachten die durchgeführten Experimente ein komplexes Bild der Konsequenzen des Fehlens von Grb2 in definierten Hirnarealen für das Verhalten. So scheint die ausreichende Verfügbarkeit von Grb2 für die Konsolidierung des unkontingierten Mittelfristigen- zum

Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis essentiell, unabhängig davon, ob Artgenossen oder Objekte erinnert werden sollen. Demgegenüber scheint die Rolle, die Grb2 für das konditionierte Furchtgedächtnis spielt, für die korrekte Stimulus-Stimulus-Assoziation nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Weitergehende Studien laufen und sind in Planung. In diesen sollen die hier beschriebenen Effekte des Fehlens von Grb2 auf das Mausverhalten neuronalen Netzwerken zugeordnet und mögliche, die Verhaltensdefizite kompensierende, pharmakologische Interventionen („*cognitive enhancer*“) eingesetzt werden.

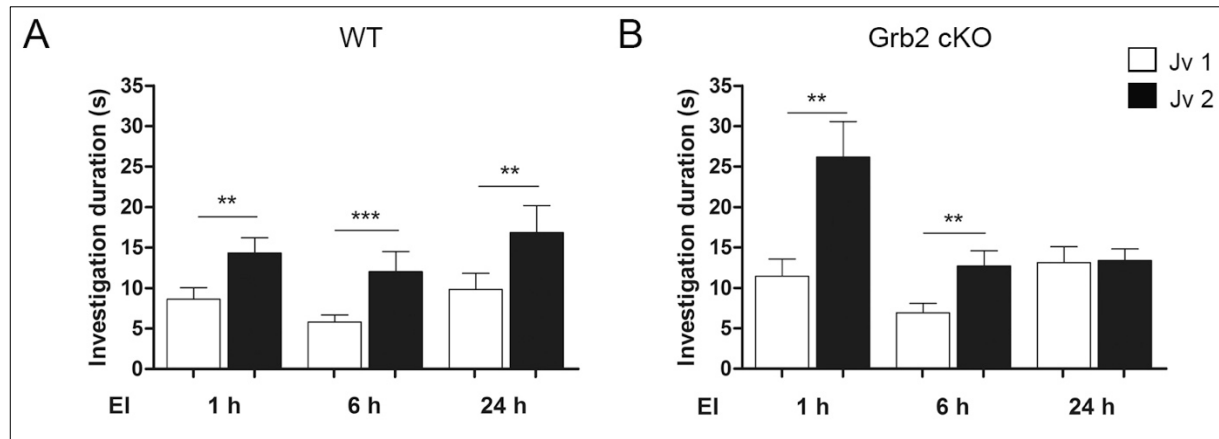


Abbildung TP 3: CamK-Cre-Grb2-konditionierte KO-Mäuse (Grb2 cKO, **B**) zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT, **A**) ein ebenso intaktes Kurzzeit- (1 h), Mittelfristiges (6 h) aber ein gestörtes Langzeit- (24 h) Wiedererkennungsgedächtnis. Dargestellt sind die gemessenen Untersuchungszeiten der Versuchstiere im sozialen Diskriminationstest während der Gedächtnis-Session (investigation duration), die entweder 1 h oder 6 h oder 24 h nach der Lern-Session stattfand (Expositionsintervall: EI). Eine signifikant erhöhte Untersuchungsdauer des (unbekannten) Stimulustieres 2 (Jv 2) gegenüber dem (bekannten) Stimulustier 1 (Jv 1) zeigt ein intaktes Wiedererkennungsgedächtnis an. $n = 20$ für A und B. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, gepaarter T-Test nach Student.

TP 4: GABAerge Interneurone bei der Furchtkonditionierung

Oliver Stork

Im Teilprojekt 4 wurde von Iris Müller die Rolle GABAerger Interneurone bei verschiedenen Aspekten der Furchtgedächtnisbildung (Salienzcodierung, Generalisierung, Extinktion) untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Rolle der synaptischen Isoform des GABA synthetischen Enzyms, Glutamat Dekarboxylase (GAD) 65.

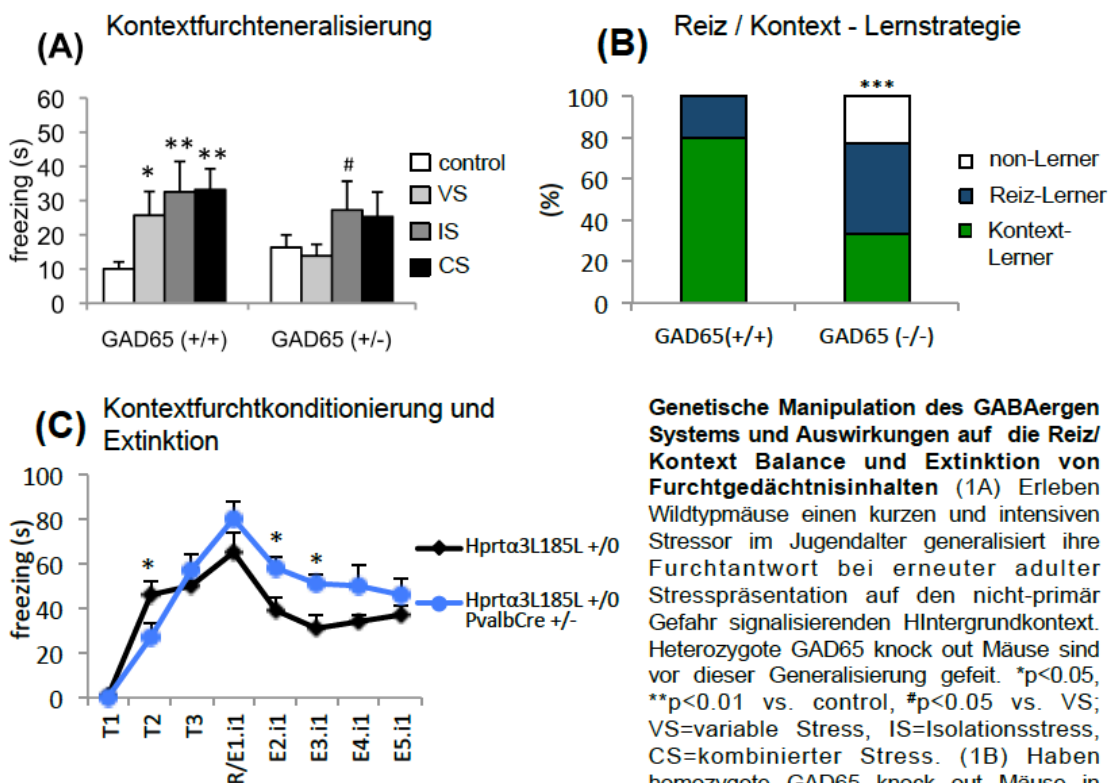
Heterozygote GAD65 knock out Mäuse unterscheiden sich auf Verhaltensebene nicht von Wildtypmäusen, auf molekularer Ebene jedoch weisen sie eine verzögerte postnatale Reifung des GABAergen Systems auf. Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass diese Tiere nach einer Stresserfahrung im Jugendalter eine Resilienz gegenüber einem zweiten adulten Stressor entwickeln. Heterozygote GAD65 knock out Mäuse entwickelten, anders als Wildtyp-Geschwistertiere, keine pathologische Gedächtnisgeneralisierung auf den nicht primär Gefahr signalisierenden (Hintergrund)kontext der Episode, wenn der juvenile Stress intensiv und von kurzer Dauer war (Fig. 1A). Lasercapture-Mikrodissektion von Amygdala und Hippokampus und Expressionsanalyse GABAerger Gene in naiven Tieren zeigten eine dauerhafte Reduktion der GAD65 Expression im Hilus, einer Subregion des Hippokampus, die für die Suppression kontextueller Gedächtnisgeneralisierung verantwortlich ist.

Für homozygote GAD65 knock out Mäuse ist ein Ungleichgewicht in der Gedächtnisbildung diskreter Reize und kontextueller Umgebung in aversiven klassischen

Konditionierungsparadigmen gut beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde einerseits die hiermit verbundenen Veränderungen in der neuronalen Aktivität im amygdalo-hippokampalen System aufgeklärt. Darüber hinaus wurde die Analyse auf appetitive operante Konditionierungsbedingungen erweitert. Auch hier ist in homozygoten GAD65 knock out Mäusen die Verarbeitung zugunsten diskreter Reize verschoben (Fig. 1B), was auf eine veränderte Interaktion der beteiligten Regionen, Hippokampus, Amygdala und dorsalem Striatum, hinweist.

Des Weiteren wurde eine konditionale knock-in Maus mit erhöhter präsynaptischer Aktivität in parvalbuminergen Interneuronen eingesetzt ($Hprt^{3L185L+/0}$; $Pvalb^{Cre+/-}$ Maus). Es konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte präsynaptische Aktivität dieser Zellen, durch erhöhte Generierung und Fortleitung von „sharp-wave-ripples“ im Hippokampus, die Extinktion von kontextuellem Furchtgedächtnis unterbindet (Fig. 1C).

In den drei geförderten Masterprojekten wurde diese Untersuchung von Interneuronfunktionen systematisch begleitet. Zunächst analysierte Ahsan Raza epigenetische Mechanismen der Regulation von GAD65/67 Expression. Er konnte zeigen, dass eine systemische Stimulation von Methylierung durch Injektion von s-Methionin die Expression von GAD67 und des Interneuron spezifischen Neuropeptid Y im Hippokampus, aber nicht in der Amygdala reduziert. Deniz Madencioglu und Jan Teuber untersuchten die Rolle der Serin/Threonin Kinase Ndr2 und der Ubiquitin Ligase Praja1 bei der neuronalen Differenzierung.



Genetische Manipulation des GABAergen Systems und Auswirkungen auf die Reiz/Kontext Balance und Extinktion von Furchtgedächtnisinhalten (1A) Erleben Wildtypmäuse einen kurzen und intensiven Stressor im Jugendalter generalisiert ihre Furchtantwort bei erneuter adulter Stresspräsentation auf den nicht-primär Gefahr signalisierenden Hintergrundkontext. Heterozygote GAD65 knock out Mäuse sind vor dieser Generalisierung gefeit. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. VS; VS=variable Stress, IS=Isolationsstress, CS=kombinierter Stress. (1B) Haben homozygote GAD65 knock out Mäuse in einem operanten Konditionierungsparadigma die Wahlmöglichkeit sich an einem konkreten

Hinweisreiz oder dem kontextuellen Umfeld zu orientieren um die Belohnungslokalisation zu erinnern, entscheiden sie sich meist für eine Hinweisreiz-Strategie und wurden deshalb als Reizlermer klassifiziert. Der Großteil der Wildtypen hingegen verwendete eine kontextuelle Strategie. *** $p < 0.001$ Chi²-Test. (1C) Die genetische Aktivitätssteigerung von Parvalbumin-positiven Neuronen führt zu einer verzögerten Furchtgedächtnisbildung und anschließend zu beeinträchtigter Extinktion in einem Kontextfurchtkonditionierungsparadigma im Vergleich zu Cre-negativen Kontrolltieren. * $p < 0.05$ vs. Kontrolltiere; T1-3=Training 1-3, R=Retrieval, E=Extinktion, i1=Intervall 1 (die ersten 2 Min. der Einheit).

Beide sind stark in Interneuronen des Hippokampus und der Amygdala exprimiert und tatsächlich konnte eine Wirkung auf GAD-Expression regulierende Transkriptionsfaktoren (Ndr2 auf NF- κ B und Praja1 auf Dlx5) in diesen Arbeiten gezeigt werden.

Reduzierte Funktionalität von PMCAs wird darüber hinaus als wichtiger Faktor bei der Alterung von Neuronen diskutiert. Frühere elektrophysiologische Studien lieferten bereits Hinweise, dass Dlg präsynaptisch an der Etablierung eines niedrigen $[Ca^{2+}]_i$ beteiligt sein könnte. Unsere konfokalmikroskopischen Analysen belegen eine hochgradige Kolo-kalisierung von Dlg und PMCA an NMJs. Mit Hilfe von Reporterkonstrukten konnten wir ferner zeigen, dass Spleißvarianten von PMCA *in vivo* differentiell mit Dlg interagieren. In Abwesenheit von Dlg ist PMCA an NMJs reduziert, eine ähnlich starke Abhängigkeit wie für andere Dlg Interaktionspartner ist jedoch nicht gegeben. Vielmehr konnten wir zeigen, dass ein membranständiges Protein der Immunglobulinfamilie essentiell für die Stabilisierung der PMCA an der NMJ ist. Unsere derzeitigen Aktivitäten sind auf die nähere Charakterisierung dieser wichtigen Beziehung, die auch in Säugern - und dort auch in Zellen ausserhalb des Nervensystems - konserviert ist, ausgerichtet. Insbesondere werden die Phänotypen bei RNAi-vermitteltem Knock-down der PMCA bzw. ihres Stabilisators auf prä- wie postsynaptischer Seite vergleichend untersucht. Hierbei werden vor allem solche Parameter untersucht, die sensibel auf Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase reagieren, wie etwa die Ausschüttung synaptischer Vesikel aber auch das Mikrotubuli-Zytoskelett in den Nervterminalien an NMJs.

Parallel wurde die projektierte Zusammenarbeit mit TP7 zur Etablierung eines *in vivo* Verfahrens zur Zelltyp-spezifischen Markierung von Proteinen erfolgreich umgesetzt. Die unten aufgeführten Publikationen Erdmann et al. und Niehues et al. entstammen dieser Zusammenarbeit.

TP 5: Das Zusammenspiel von β -Amyloid- und BDNF-Signalwegen bei der hippokampalen Neurogenese

Tanja Brigadski & Volkmar Leßmann

Ein ausgeprägtes neuropathologisches Merkmal der Alzheimer-Demenz (AD) sind die stark atrophischen Veränderungen im Bereich des Hippokampus, einer Hirnregion mit Fähigkeit zur anhaltenden Neurogenese. Zusätzlich zur charakteristischen Neurodegeneration bei der AD deuten neue Studien auf eine gesteigerte Neurogenese im Hippokampus, sowie auf eine erhöhte Anzahl unvollständig ausdifferenzierter Neurone hin. Das für die AD zentrale Peptid β -Amyloid konnte für eine verstärkte Proliferation verantwortlich gemacht werden. Die Ursachen und zugrundeliegenden Mechanismen für das Ausbleiben der Differenzierung zu reifen Neuronen und das Absterben der Zellen sind allerdings unbekannt. Verschiedene Studien legen jedoch nahe, dass ein Mangel an neurotrophen Faktoren, z.B. in Folge reduzierter Neurotrophin-Expression oder reduzierter aktivitätsabhängiger Ausschüttung der Faktoren, für diese Prozesse mitverantwortlich ist.

In dem vorliegenden Projekt haben wir die Bedeutung von β -Amyloid und BDNF bei der Entstehung und Reifung von Neuronen in organotypischen Hirnschnitt-Kulturen mit Hilfe von BrdU-Färbungen sowie die aktivitätsabhängige Ausschüttung von BDNF in neuronalen Kulturen transgener Alzheimermäuse untersucht. Die Identifizierung von Stammzellen (Nestin+) und die Charakterisierung der Neuroblasten (BrdU+/DCX+), der neu gebildeten Neurone (BrdU+/DCX+/NeuN+) sowie der reifen Neurone (BrdU+/DCX-/NeuN+ und BrdU+/Calbindin+) erfolgte mittels immunhistochemischer Methoden. In dem verwendeten System konnten wir zwei proliferative Zonen eindeutig identifizieren. Neben der Neurogenese

im Gyrus dentatus war in den organotypischen Schnittkulturen die Entstehung neuer Neurone in der subcortikalen weißen Substanz zu beobachten. Beide Regionen waren reich an proliferierenden Zellen sowie unreifen neugeborenen Neuronen. Die neugeborenen Neurone des Gyrus Dentatus reiften zu exzitatorischen Calbindin-positiven Körnerzellen heran, wobei die neugeborenen Neurone der subcortikalen weißen Substanz sich zu GABAergen GAD67-positiven Interneuronen differenzierten.

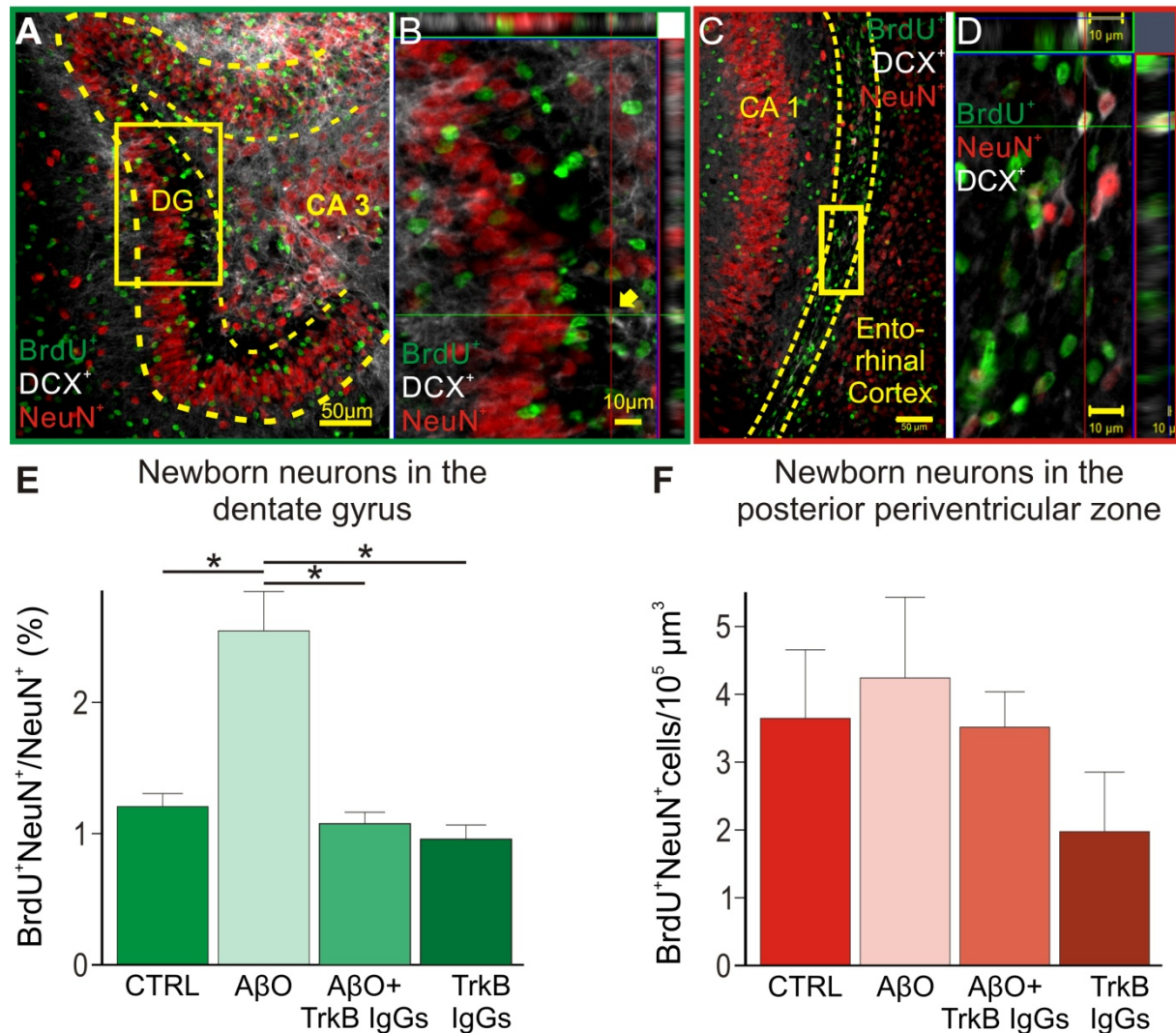


Abbildung: Neurogenese in organotypischen Schnittkulturen des Hippocampus. Es konnten zwei proliferative Zonen identifiziert werden: der Gyrus dentatus (DG) und die subcortikale weiße Substanz (posteriore periventriculäre Zone). **A-B**) Neugeborene Neurone des Gyrus Dentatus. Organotypische hippocampale Schnittkulturen wurden für 2 Tage mit BrdU behandelt und anschließend immunhistochemisch mit Markern für proliferierende Zellen (BrdU), unreife Neurone (Dcx) und reife Neurone (NeuN) gefärbt. **B**) Ausschnittsvergrößerung des Rechteckes aus A. Dreifach-positive Neurone zeigen die Anwesenheit unreifer neu generierter Neurone im Gyrus dentatus. **C-D**) Neugeborene Neurone in der subventrikulären weißen Substanz. **D**) Ausschnittsvergrößerung des Rechteckes aus C. Die Anwesenheit aller 3 Marker identifiziert Zellen als unreife neu generierte Neurone in der subventrikulären weißen Substanz. **E**) Einfluss von β -Amyloid und BDNF auf die Generierung neuer Neurone im Gyrus Dentatus. Die Behandlung mit β -Amyloid-Oligomeren zeigte eine BDNF-abhängige Zunahme reifer neu generierter Neurone. **F**) Einfluss von β -Amyloid und BDNF auf die Generierung neuer Neurone in der subventrikulären weißen Substanz. Ein proliferierender Einfluss von β -Amyloid konnte in dieser neurogenen Region nicht beobachtet werden.

Die Behandlung mit β -Amyloid-Oligomeren resultierte in einer Zunahme neugeborener Neurone spezifisch im Gyrus Dentatus.

Diese β -Amyloid-induzierte Generierung neuer Neurone konnte durch gleichzeitige Applikation von TrkB-IgG, einem *Scavenger* (Fänger) von endogenem BDNF, inhibiert werden. Experimente in dissoziierten hippokampalen Neuronen eines transgenen Alzheimer Mausmodells (5xFAD-Mäuse) zeigten jedoch keine Beeinträchtigung der aktivitätsabhängigen Ausschüttung von BDNF. Zusammenfassend konnten wir zwei neurogene Regionen in organotypischen hippokampalen Schnittkulturen identifizieren. Lediglich im Gyrus dentatus konnten wir einen proliferativen Einfluß von β -Amyloid-Oligomeren beobachten. Die Reifung der neu entstandenen Neurone konnte durch Blockade des BDNF/TrkB-Signalweges verhindert werden.

TP 6: Genetische Manipulation von Synapsenproteinen: Redundante und exklusive Funktionen von Bassoon und Piccolo bei synaptischer Verschaltung und Plastizität

Eckart Gundelfinger & Anna Fejtová

Die Ausschüttung von Neurotransmittern aus präsynaptischen Strukturen erfolgt an der sogenannten aktiven Zone. Bassoon und Piccolo sind sehr große verwandte Proteine, die exklusiv an aktiven Zonen lokalisiert und an der Organisation und Regulation der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt sind. Beide Proteine kommen in der präsynaptischen Cytomatrix sowohl von erregenden als auch von hemmenden Synapsen des Zentralnervensystems vor. Darüber hinaus werden sie an neuromodulierenden Synapsen, die beispielsweise Dopamin freisetzen, gefunden. Da konstitutive *Bassoon*-(*Bsn*)-Mutanten massive Einschränkungen zeigen (Epilepsie, starke Beeinträchtigung von Hören und Sehen), wurden konditionelle Mausmutanten hergestellt um die physiologische Funktion dieses Proteins weiter zu untersuchen. Im Einzelnen wurde durch entsprechende Verkreuzung mit Mauslinien, die die Cre-Rekombinase unter verschiedenen Promotoren exprimieren, das gefloxtete *Bsn*-Gen zunächst in glutamatergen Neuronen des Vorderhirns (*Emx1-Cre*, B2E) sowie in dopaminergen Neuronen (*DAT-Cre*, B2D) ausgeschaltet. Damit fehlt in B2E-Tieren Bassoon an exzitatorischen Synapsen des Vorderhirns, nicht aber an inhibitorischen Synapsen oder an glutamatergen Synapsen des Kleinhirns (Abb.). In B2D-Tieren wird Bassoon nicht an Dopamin-freisetzenden Boutons gefunden (nicht gezeigt). Während B2D-Mäuse nur minimale Einschränkungen beim Lernverhalten zeigen, konnten in B2E-Tieren deutliche Verhaltensänderungen nachgewiesen werden. Sie zeigen eine verbesserte Performance bei der Erkennung von neuen Objekten und reagieren stärker bei der Furchtkonditionierung. Letzteres jedoch nur unter Bedingungen, die den dorsalen Hippocampus in den Lernvorgang einbeziehen (*background contextual conditioning*).

Diese Änderungen im Lernverhalten gehen mit Veränderungen in der synaptischen Funktion und der Architektur von Neuronen einher. Die Untersuchungen wurden von Sabrina Müller (Mausgenetik) und Anil Annamneedi (Charakterisierung der B2E-Mutanten) in enger Kooperation mit TP4 (Stork) durchgeführt und werden derzeit zur Publikation vorbereitet.

Im Rahmen einer Masterarbeit (Eneko Pina) wurde die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems bei durch das A β -Peptid ausgelöster präsynaptischer Plastizität untersucht. Unter physiologischen Bedingungen stimuliert das „Alzheimer-Peptid“ A β präsynaptische Aktivität. Die Arbeit zeigt eine komplexe Interaktion von A β -Wirkung und proteasomaler Aktivität beim plastizitätsbedingten Umbau der präsynaptischen Cytomatrix an der aktiven Zone.

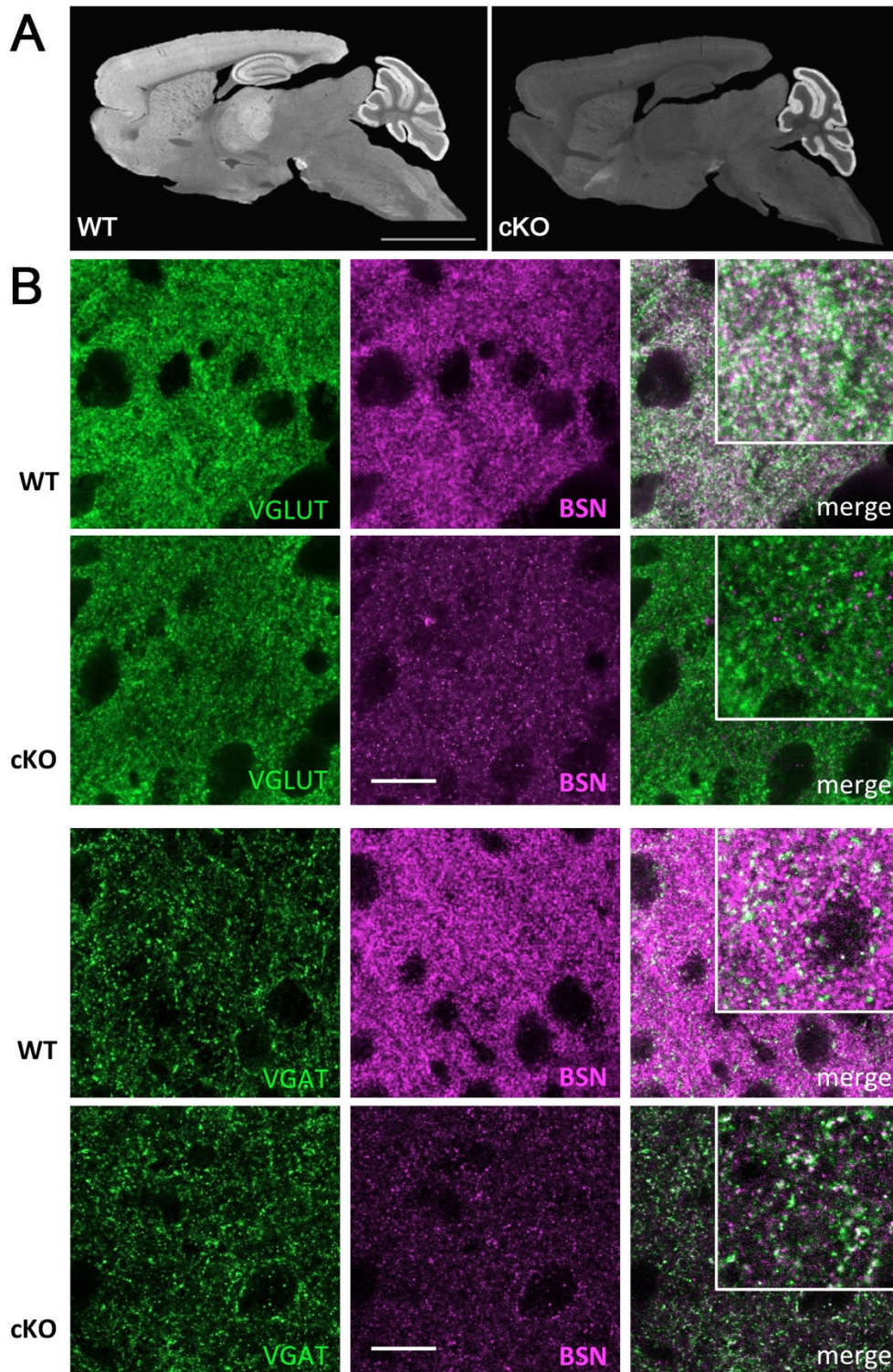


Abbildung TP6: Konditionelle Deletion des präsynaptischen Gerüstproteins Bassoon in exzitatorischen Synapsen des Vorderhirns durch Verkreuzen von *Emx1*-Cre- mit *Bsn^{lox/lox}*-Mäusen (cKO). Wildtyp-Kontrolltiere (WT) sind genotypisch *Bsn^{lox/lox}* ohne Cre-Expression. **A)** Färbung von Gesamthirn-Sagittalschnitten mit Bassoon-Antikörpern (BSN). *Emx1* ist im Cerebellum nicht exprimiert, sodass dort Bassoon auch in cKO-Tieren normal lokalisiert ist. **B)** Vergleichsfärbungen eines Ausschnittes der Großhirnrinde für Bassoon und den spezifisch in exzitatorischen Präsynapsen lokalisierten vesikulären Glutamat-Transporter 1 (VGLUT) zeigen, dass in cKO-Tieren Bassoon fehlt, während die beiden Proteine in Wildtypen kolokalisiert sind. Der vesikuläre GABA-Transporter (VGAT), ein Marker für inhibitorische Synapsen, kolokalisiert mit Bassoon auch in cKO-Tieren, wie die Weißfärbung im Überlagerungsbild (merge) anzeigt. Größenmaßstab: 3 mm in A) und 10 μ m in B).

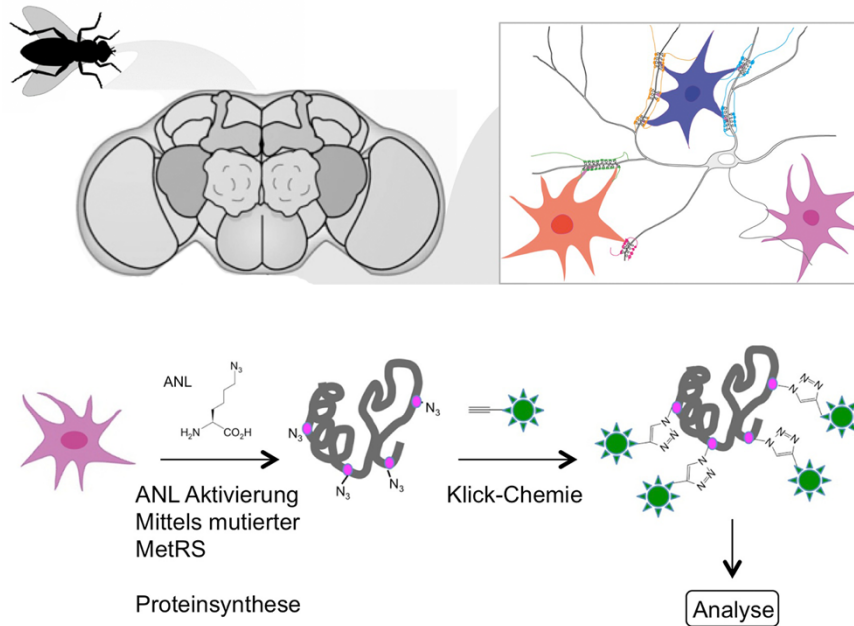
Des Weiteren ergaben sich Hinweise auf eine veränderte proteasomale Aktivität in Gehirnen von *Bsn*-mutanten Mäusen. Im Rahmen seiner Doktorarbeit untersucht Herr Pina nun die Rollen von Bassoon und Piccolo bei der Regulation der Transmitterausschüttung und dem Recycling synaptischer Vesikel. In erster Linie nutzt er für diese Untersuchungen neuronale Primärkulturen von Wildtypmäusen sowie von *Bsn*- und *Pclo*-Mutanten. Wichtige bisherige Ergebnisse sind: Im Gegensatz zu Bassoon beeinflusst Piccolo nicht die akute Transmitterfreisetzung, also den ohne Verzögerung freisetzbaren Pool von synaptischen Vesikeln. Calciummessungen mit einem genetisch kodierten Calciumsensor zeigten, dass Piccolo keinen signifikanten Einfluss auf den Calcium-Einstrom in die Präsynapse nach Ankunft von Aktionspotentialen hat. Das ist überraschend angesichts der Verwandtschaft der beiden Proteine. Piccolo beeinflusst aber den Gesamtpool der freisetzbaren Vesikel, scheint also eher an globaleren Regulationsmechanismen beteiligt zu sein. Ein weiteres wichtiges Ergebnis der laufenden Arbeiten ist, dass insbesondere Bassoon bei der Langzeitanpassung von synaptischen Funktionen an physiologische Gegebenheiten (homöostatische Plastizität) eine signifikante Rolle spielt. Dies ist insbesondere für die Einschätzung chronisch pathologischer Hirnprozesse von Bedeutung und wird weiter untersucht.

TP 7: Rolle der Neuron-Glia-Kommunikation während der Synaptogenese in *Drosophila*: Charakterisierung zellspezifischer Proteomdynamik durch transgene zellspezifische Click-Chemie

Daniela Dieterich

Die Anpassungsfähigkeit von Zellen und somit von Organen und gesamten Organismen beruht auf der Veränderbarkeit ihrer Proteinzusammensetzung, d.h. ihrer Proteome. Die Neusynthese von Proteinen spielt dabei eine entscheidende Rolle. So ist z.B. die Bildung von Langzeitgedächtnissen eng an die Synthese spezifischer Proteine gekoppelt und tatsächlich gehen Alterungsprozesse mit verminderter Proteinsynthese in Zellen des Gehirns einher. Welche speziellen Proteine dabei in welchen Zellen (noch) neu gebildet werden und wie diese in Signalwegen miteinander interagieren ist jedoch weitestgehend unerforscht. Als problematisch erweist sich insbesondere, dass man neugebildete Proteine kaum von bereits existierenden Proteinen unterscheiden kann und dass in komplexen Organen wie dem Gehirn die beiden Zell-Haupttypen, Neurone und Gliazellen, dicht gepackt nebeneinander vorkommen und zudem noch ein sehr ähnliches Repertoire an Proteinen und Signalwegen aufweisen. Um neusynthetisierte Proteine zell-spezifisch im lebenden Organismus zu markieren, haben wir ein Enzym der Proteinsynthese-Maschinerie (die Methionyl-tRNA-Synthetase, MetRS), welches im Normalfall die Aminosäure Methionin für den Einbau in entstehende Proteine vorbereitet, so verändert, dass es in der Lage ist, die bioorthogonale, künstliche Aminosäure Azidonorleucin (ANL) anstelle von Methionin zu verwenden. Über das so genannte GAL4/UAS-System kann das mutierte Enzym in ausgewählten Zellpopulationen der Fruchtfliege hergestellt werden und so den Einbau der künstlichen, durch Fütterung zugeführten Aminosäure in die Proteine der betreffenden Zellen bewirken. Die Besonderheit der künstlichen Aminosäure besteht in einer Azidgruppe, die durch eine bio-kompatible chemische Reaktion, die sogenannte „Klick-Chemie“, an eine Alkylgruppe gekoppelt werden kann. Diese Alkylgruppe wiederum ist mit einem Markermolekül verbunden, welches unter dem Mikroskop oder im Anschluss an biochemische Aufreinigerungsverfahren detektiert werden kann.

A



B

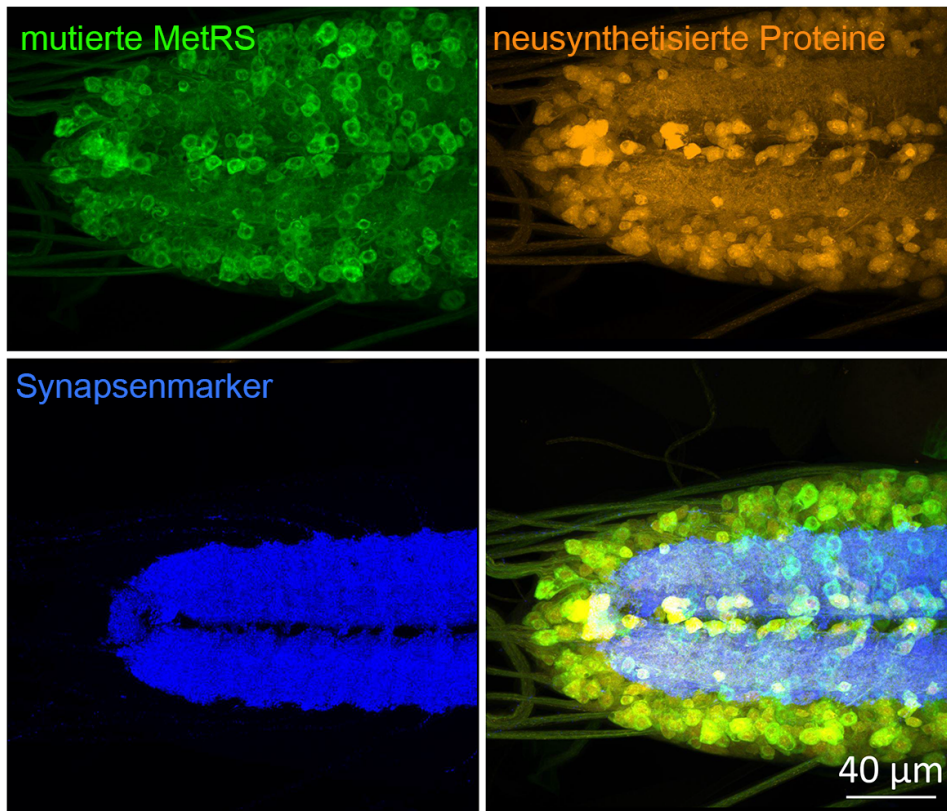


Abbildung TP7: In vivo zell-spezifische Proteinmarkierung mittels Klick-Chemie.

(A) Schematische Strategie für die Analyse zellspezifischer Proteine in lebenden Fruchtfliegen mittels Einbau der bio-kompatiblen, künstlichen Aminosäure Azidonorleucin (ANL) durch das mutierte Enzym MetRS und nachfolgender Klick-Chemie. (B) Visualisierung neusynthetisierter, ANL-enhaltender Proteine in Neuronen des larvalen Fliegenhirns. Dargestellt sind das Expressionsmuster der mutierten MetRS (grün), neusynthetisierte Proteine (orange) sowie ein Synapsenmarker (blau).

Dies ermöglicht nun die Untersuchung ganzer Proteinkompositionen (Proteome) oder auch einzelner Proteine in zelltyp-spezifischer Weise im lebenden Organismus. Das Verfahren ist auch auf andere Organismen anwendbar und kann damit Forschern verschiedener Disziplinen eine genauere Untersuchung von proteinsynthese-abhängigen Prozessen, vor allem auch in lebenden und sich verhaltenden Organismus, ermöglichen. Im Rahmen unserer Arbeiten innerhalb der LGS konnten wir zB zeigen, dass das synaptische Gerüstprotein Dlg nicht nur neuronalen Ursprungs ist, sondern auch in Gliazellen exprimiert wird (Erdmann et al., Nat. Comm. 2015). Des Weiteren konnten wir zusammen mit der Arbeitsgruppe aus Münster um Erik Storkebaum demonstrieren, dass eine verminderte Proteinsyntheserate speziell in Motoneuronen in einem Modell der Charcot-Marie-Tooth Neuropathie besteht. Unser Verfahren kann daher erstmalig das komplexe Zusammenspiel verschiedener Zelltypen auf Proteomebene, insbesondere auch unter pathologischen Zuständen, untersuchen und damit die Möglichkeit eröffnen, zellspezifische Medikamente und erweiterte Therapie-möglichkeiten zu entwickeln.

TP 8: Koordination von Neurexin-Neuroigin-Adhäsionsmodulen durch assoziierte Gerüstproteine bei der Organisation glutamaterger Synapsen in *Drosophila*

Ulrich Thomas

Die larvale neuromuskuläre Verknüpfung (NMJ) von *Drosophila* ist ein weithin genutztes Modellsystem für glutamaterge Synapsen, an dem wir molekulare Grundlagen synaptischer Architektur und ihrer physiologischen und pathophysiologischen Modulationen untersuchen. Dem Projekt lagen eigene Vorarbeiten zugrunde, denen zufolge ein aus den Proteinen Dlg, Metro und Lin-7 gebildeter Gerüstkomplex die Größe von Glutamatrezeptorfeldern an NMJs begrenzt. Eine ähnliche Rolle war auch Vertretern der Autismus-relevanten Neurexin- und Neuroigin (Nrx; Nlg) Proteinfamilien zugeordnet worden. Zudem konnten wir für Nrx und Nlg3 *in vitro* Bindungen an Metro darstellen. Da Nrx präsynaptisch lokalisiert, war es wichtig, dass wir eine präsynaptische Lokalisierung des Dlg-Komplexes auch zweifelsfrei darstellen konnten. Durch Vergleich mit publizierten Nrx-Daten wurde jedoch deutlich, dass der Dlg-Komplex und Nrx unterschiedliche Abschnitte der präsynaptischen Membran besetzen und allenfalls geringfügig überlappen. Auch aus genetischen (epistatischen) Experimenten ergaben sich keine klaren Hinweise auf eine *in vivo* relevante Interaktion zwischen Nrx und Metro. Da zwischenzeitlich andere Gerüstproteine als maßgebliche Interaktionspartner von Nrx an NMJs bekannt wurden, verlagerten wir frühzeitig (und einvernehmlich mit der Promotionsstipendiatin), den Schwerpunkt unserer Untersuchungen auf die Interaktion zwischen Dlg und der Plasmamembran-gebundenen Ca^{2+} -ATPase (PMCA), die wir in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen als Bindungspartner für Dlg gefunden hatten. PMCA ist an NMJs wie auch an Säugersynapsen nach Stimulations-bedingtem Ca^{2+} -Einstrom für die Wiederherstellung eines niedrigen zytosolischen Ca^{2+} -Levels $[Ca^{2+}]_i$ verantwortlich. Genetisch oder pharmakologisch ausgelöste Störungen von PMCAs führen bei Säugern zu Beeinträchtigungen neuronaler Exzitabilität und synaptischer Plastizität.

Reduzierte Funktionalität von PMCAs wird darüber hinaus als wichtiger Faktor bei der Alterung von Neuronen diskutiert. Frühere elektrophysiologische Studien lieferten bereits Hinweise, dass Dlg präsynaptisch an der Etablierung eines niedrigen $[Ca^{2+}]_i$ beteiligt sein könnte. Unsere konfokalmikroskopischen Analysen belegen eine hochgradige Kolo-kalisierung von Dlg und PMCA an NMJs. Mit Hilfe von Reporterkonstrukten konnten wir ferner zeigen, dass Spleißvarianten von PMCA *in vivo* differentiell mit Dlg interagieren.

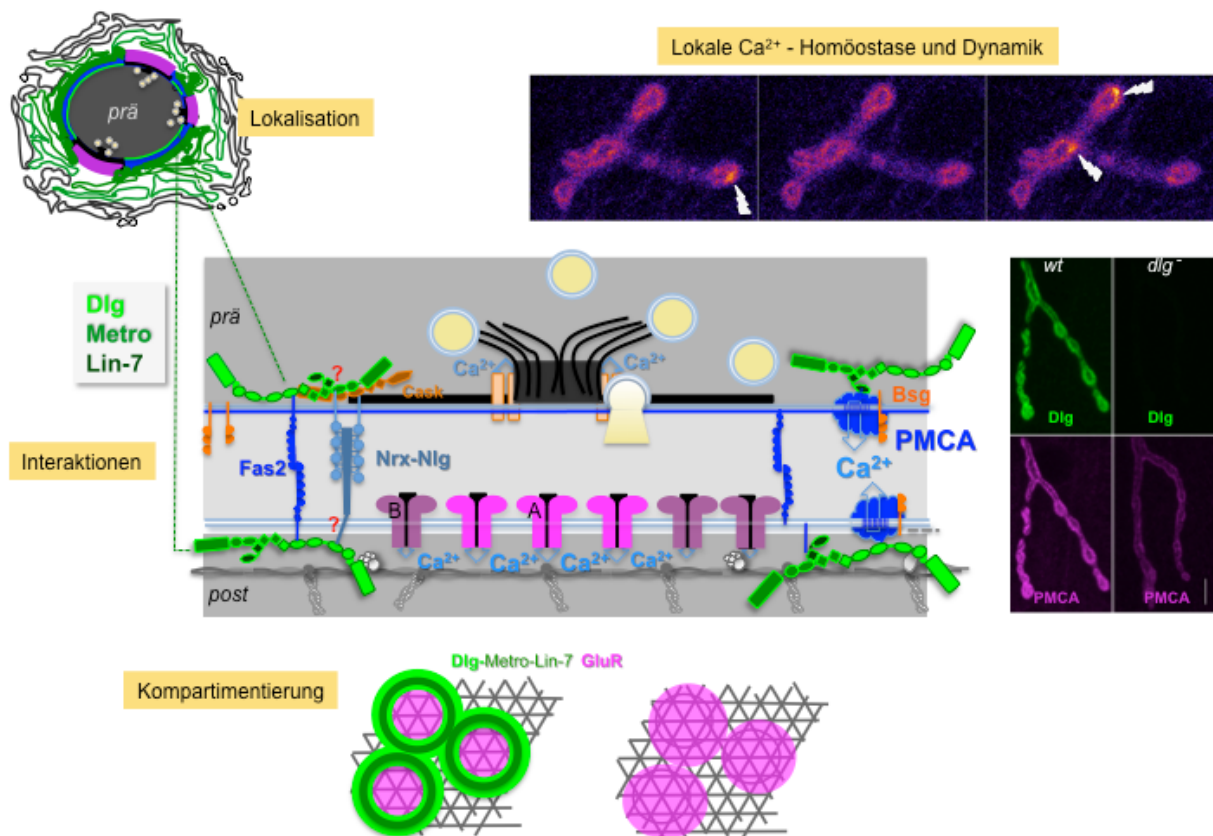


Abbildung TP8: Untersuchungen zur Rolle des Dlg-Komplexes und seiner Interaktionspartner an larvalen NMJs. Die Nervterminalien von Motoneuronen bilden Boutons (oben links) mit jeweils mehreren aktiven Zonen, denen postsynaptisch Glutamaterezeptorfelder (magenta) gegenüber liegen (mitte). Der perisynaptische Dlg-Komplex (grün) begrenzt die Ausdehnung der aktiven Zonen und Rezeptorfelder (unten). Die Hypothese, dass hierfür eine Interaktion mit dem Nrx-Nlg Zelladhäsionskomplex relevant ist, konnte nicht bestätigt werden. Dlg und das Ig-Domänenprotein Bsg kontrollieren jedoch die Lokalisierung der Ca^{2+} -Pumpe PMCA (mitte rechts). Die Rolle dieser Interaktionen für die synaptische Struktur und Funktion der NMJs wird derzeit im Detail untersucht, beispielsweise durch Verwendung eines genetisch kodierten Ca^{2+} -Sensors, der die Ausschüttung einzelner synaptischer Vesikel anzeigt (oben rechts, Detektion von 3 Vesikelfusionen im Verlauf von 2 Sekunden).

In Abwesenheit von Dlg ist PMCA an NMJs reduziert, eine ähnlich starke Abhängigkeit wie für andere Dlg Interaktionspartner ist jedoch nicht gegeben. Vielmehr konnten wir zeigen, dass ein membranständiges Protein der Immunglobulinfamilie essentiell für die Stabilisierung der PMCA an der NMJ ist. Unsere derzeitigen Aktivitäten sind auf die nähere Charakterisierung dieser wichtigen Beziehung, die auch in Säugern - und dort auch in Zellen außerhalb des Nervensystems - konserviert ist, ausgerichtet. Insbesondere werden die Phänotypen bei RNAi-vermitteltem Knock-down der PMCA bzw. ihres Stabilisators auf prä- wie postsynaptischer Seite vergleichend untersucht. Hierbei werden vor allem solche Parameter untersucht, die sensibel auf Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase reagieren, wie etwa die Ausschüttung synaptischer Vesikel aber auch das Mikrotubuli-Zytoskelett in den Nervterminalien an NMJs.

Parallel wurde die projektierte Zusammenarbeit mit TP7 zur Etablierung eines *in vivo* Verfahrens zur Zelltyp-spezifischen Markierung von Proteinen erfolgreich umgesetzt. Die Publikationen Erdmann et al. und Niehues et al. entstammen dieser Zusammenarbeit.

Anhang

LGS-Publikationen

- Barman A, Assmann A, Richter S, Soch J, Schütze H, Wüstenberg T, Deibele A, Klein M, Richter A, Behnisch G, Düzel E, Zenker M, Seidenbecher CI, Schott BH (2014). Genetic variation of the RasGRF1 regulatory region affects human hippocampus-dependent memory. *Frontiers in Human Neuroscience* 8:260.
- Barman A, Richter S, Soch J, Deibele A, Richter A, Assmann A, Wüstenberg T, Walter H, Seidenbecher CI, Schott BH (2015). Gender-specific modulation of neural mechanisms underlying social reward processing by Autism Quotient. *Social, Cognitive and Affective Neuroscience* 10:1537-1547.
- Bergado-Acosta JR, Müller I*, Richter-Levin G, Stork O. (2014) The GABA-synthetic enzyme GAD65 controls circadian activation of conditioned fear pathways. *Behav Brain Res* 260:92-100.
- Boppudi S., Bögershausen N., Hove H.B., Zenker M et al., (2016). Specific mosaic KRAS mutations affecting codon 146 cause oculoectodermal syndrome and encephalocraniocutaneous lipomatosis. *Clin Genet*. 2016 Mar 11. doi: 10.1111/cge.12775.
- Frischknecht R, Seidenbecher CI. Brevican: a key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain. Review *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Jul;44(7):1051-4
- Gorny X, Mikhaylova M, Seeger C, Reddy PP, Reissner C, Schott BH, Helena Danielson U, Kreutz MR, Seidenbecher C. AKAP79/150 interacts with the neuronal calcium-binding protein caldendrin. *J Neurochem*. 2012 Aug;122(4):714-26.
- Caliskan G, Müller I*, Semtner M, Winkelmann A, Raza AS, Hollnagel JO, Rösler A, Heinemann U, Stork O and Meier JC. (2016) Identification of Parvalbumin Interneurons as Cellular Substrate of Fear Memory Persistence. *Cerebral Cortex*. 1-16. *equal contribution
- Camats Perna, J., Wotjak, C.T., Stork, O., Engelmann, M. (2015). Timing of presentation and nature of stimuli determine retroactive interference with social recognition memory in mice. *Physiol. & Behav.* 14, 10-14.
- Camats Perna, J., Engelmann, M. (2015). Recognizing others: rodent's social memories. *Current Topics in Behavioral Neurosciences - Social Behavior from Rodents to Humans: Neural Foundations and Clinical Implications*. (im Druck).
- Erdmann, I., Marter, K., Kobler, O. et al. (2015) Cell-selective labelling of proteomes in *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun*, 6, 7521.
- Li K, Müller I, Patil S, Höger H, Pollak A, Russo-Schlaff N, Lubec G and Li L. (2012) Strain-independent global effect of hippocampal proteins in mice trained in the Morris water maze. *Amino Acids* 43(4):1739-49.
- Müller I, Caliskan, G and Stork O. (2015) The GAD65 knock out mouse - a model for GABAergic processes in fear- and stress-induced psychopathology. *Genes Brain Behav.* 14(1): 37-45.
- Müller I, Obata K, Richter-Levin G and Stork O. (2014) GAD65 haplodeficiency conveys resilience in animal models of stress-induced psychopathology. *Front Behav Neurosci.* 8:265
- Niehues, S., Bussmann, J., Steffes, G. et al. (2015) Impaired protein translation in *Drosophila* models for Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mutant tRNA synthetases. *Nat Commun*, 6, 7520.
- Rehberg K, Kliche S, Madencioglu DA, Thiere M, Müller B, Meineke B, Freund C, Budinger E and Stork, O. (2014). The serine/threonine kinase Ndr2 controls integrin trafficking and integrin-dependent neurite growth. *J Neurosci*, 34(15), 5342–54.
- Richter A, Guitart-Masip M, Barman A, Libeau C, Behnisch G, Czerney S, Schanze D, Assmann A, Klein M, Düzel E, Zenker M, Seidenbecher CI, Schott BH (2014). Valenced action/inhibition learning in humans is modulated by a genetic variant linked to dopamine D2 receptor expression. *Frontiers in Systems Neuroscience* 8:140.
- Richter A, Richter S, Barman A, Soch J, Klein M, Assmann A, Behnisch G, Wüstenberg T, Seidenbecher CI, Schott BH (2013). Motivational salience and genetic variability of dopamine D2 receptor expression interact in the modulation of interference processing. *Frontiers in Human Neuroscience* 7:250.
- Schott BH, Assmann A, Schmierer P, Soch J, Garbusow M, Mohnke S, Pöhland L, Romanczuk-Seiferth N, Barman A, Wüstenberg T, Haddad L, Grimm O, Witt S, Richter S, Klein M, Schütze H, Mühleisen T, Cichon S, Rietschel M, Nöthen MM, Tost H, Gundelfinger ED, Düzel E, Heinz A, Meyer-Lindenberg A, Seidenbecher CI, Walter H (2014). Epistatic interaction of genetic depression risk variants in the human subgenual cingulate cortex during memory encoding. *Translational Psychiatry* 4:e372.
- Seeger C, Gorny X, Reddy PP, Seidenbecher C, Danielson UH Kinetic and mechanistic differences in

the interactions between caldendrin and calmodulin with AKAP79 suggest different roles in synaptic function.. *J Mol Recognit.* 2012 Oct;25(10):495-503.

Teuber J, Mueller B, Fukabori R, Lang D, Albrecht A and Stork O. (2013). The Ubiquitin Ligase Praja1 Reduces NRAGE Expression and Inhibits Neuronal Differentiation of PC12 Cells. *PLOS ONE*, 8(5), e63067.

Thomas U., Sigrist S.J. (2012) Glutamate Receptors in Synaptic Assembly and Plasticity: Case Studies on Fly NMJs. *Adv Exp Med Biol.* 970:3-28.

LGS-Abschlussarbeiten, Qualifizierungen

Master-Arbeiten

Cervenková, Zdenka: MSc, 2013, Integrative Neuroscience: „Relevance of balanced expression of scaffold molecules at glutamatergic neuromuscular junctions in *Drosophila*“

Dinca, Ana: MSc, 2011: „Impact of Metro and Discs Large on the Glutamatergic Neuromuscular Junction of *Drosophila melanogaster*“

Erdmann, Ines: "Establishment and implementation of metabolic labeling of proteins in *Drosophila melanogaster*" Msc. 2011

Fürst, Carina: MSc, 2014: „Mobility analysis of the low-voltage-activated T-type calcium channel $Ca_v3.2$ in dorsal root ganglion neurons“

Georgi, Julia "Analysis of the microglia cytoskeleton: Roles of Vav Rho GEFs" Msc. 2012

Herbert, Isabel: MSc, 2014, FSU Jena: „Zur Bedeutung Dlg-artiger Gerüstproteine und des Ig-Domäne Proteins Neuroplastin für die subzelluläre Verteilung des Ionenkanals Kv1.3 und der Ca^{2+} -Pumpe PMCA in T-Lymphozyten“

Jagannath, Vinita: MSc, 2014 „Assessing protein turnover rates in primary cortical cultures“

Khalil, Radwa: „Short term plasticity effects in developed and developing neocortical networks: A parametric study based on MEAs cell culture experimental data“ Msc. 2015

Klein, Marieke: „Der Einfluss von Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und Serotonin 2a Rezeptor Polymorphismen auf die neuronalen Mechanismen der Gedächtnisbildung beim Menschen“ Msc. 2012

Madencioglu, Deniz: MSc, "Determining the phenotype and brain morphology of *Ndr2* knockout mice" 2013

Pina, Eneko: "The role of UPS-dependent protein degradation in amyloid-beta induced presynaptic plasticity". Universidad Autónoma de Madrid, Medical Faculty, Madrid (Spain) Msc. 2014

Pötschke, Rebecca: MSc, 2013, Integrative Neuroscience: „Extracellular tagging of the voltage-gated potassium channel hKv1.3 for assessment of its surface mobility in living T cells“

Quaß, Gunnar: „The Role of Brevican in Axon Initial Segment Structural Plasticity“ Msc. 2013

Rama, Ramya: „Role of Neuroplastins in dendritic arborization and the underlying signaling cascades“ 2015

Raza, Ahsan: MSc, Epigenetics and analysis of GABAergic interneurons in fear memory 1.9.2012, Skövde University, Prädikat „A“ („sehr gut“)

Richter, Anni: „Neurobiologie motivierten Verhaltens: Untersuchung der Interaktion von Motivation und Kognition in einem Experiment mit funktioneller Magnetresonanztomographie“ 2012

Säring, Paula: MSc, 2013, Integrative Neuroscience, „Functional of immunoproteasomes in neurons and astrocytes of mouse and rat“

Sommermeier, Heike: In vivo analysis of ameliorating effects by 7,8-dihydroxiflavone towards a fear learning deficit in heterozygous BDNF knockout mice. Msc. 2012

Spuhn, Alexandra; MSc 2012, „Local substance application in neural co-cultures using mikrofluidics“

Promotionen

Barman, Adriana: „Auswirkung genetischer Variationen im RAS/RAF- Signalweg auf menschliche Lern- und Gedächtnisprozesse“ *Summa cum Laude*-Abschluss der Promotion 2014

Erdmann, Ines: „Deciphering proteome dynamics using cell-type selective metabolic protein labeling in the fruit fly *Drosophila melanogaster*“, eingereicht März 2016, Verteidigung September 2016

Müller, Iris: Dr. rer. nat. "Interneuron function in pathological memory processes – Relevance for posttraumatic stress disorder, 2016 OVGU. Prädikat: "magna cum laude".

Parlog, Alexandru: "Neuronal alterations in chronic cerebral *Toxoplasma gondii* infection" 2015

Richter, Anni: „Auswirkungen genetischer Variabilität der DRD2-Expression auf motivierte Kontroll-, Lern- und Gedächtnisprozesse des Menschen“ *Summa cum Laude*-Abschluss der Promotion 2016

Teuber, Jan: Dr. med., "The E3 ubiquitin ligase Praja1 inhibits the development of a neuronal phenotype in PC12 cells". OVGU-FME, 2015, Prädikat: „summa cum laude“

Apl-Professuren

Constanze Seidenbecher, Medizinische Fakultät der OVGU Magdeburg, 2016

Rufe

Anna Fejtova, W2-Professur für Molekulare Psychiatrie, FAU Erlangen, 2016

Tanja Brigadski, Professur an der Fachhochschule Kaiserslautern, Zweibrücken, 2016

Auszeichnungen, Preise, Drittmittel

- Erdmann, Ines: 2. Hugo-Junkers-Preis für Forschung und Innovation aus Sachsen-Anhalt 2015 in der Kategorie Innovativste Vorhaben aus der Grundlagenforschung (Bild rechts Mitte, gemeinsam mit K. Marter, U. Thomas, O. Kobler, D. Dieterich, v.l.n.r.)
- Richter, Anni: NWG travel grant für die Teilnahme am FENS Forum in Kopenhagen 2016
- Boppudi, Sangamitra: Stipendium der Medizinischen Fakultät der OVGU 2016
- Carmats, Judith: Stipendium der Medizinischen Fakultät der OVGU 2015, Stipendium der Uni Wien 2016
- DFG- Sachbeihilfeprojekt STO 488/6-1 Vulnerability and resilience to pathological fear memory - a role for neuropeptidergic modulation in the dentate gyrus. PIs O. Stork, G. Richter-Levin 2016-2019
- Teuber, Jan: Bester Doktorand der Medizinischen Fakultät der OVGU, 2015 (Bild rechts: 3.v.l.); Promotionsstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes 2015/16



Presseberichte

- Suche nach Ursachen von Parkinson und Demenz - Bund fördert zwei Projekte an Uni Magdeburg. Volksstimme, 30.12.2010
- Verknüpfungen im Hirn auf der Spur. In Magdeburg wird eine neue Graduiertenschule für Neurobiologen aufgebaut. Mitteldeutsche Zeitung, 19.01.2011
- Rätsel Gehirn: Lernforschung in Magdeburg. Zeit Wissen Nr. 5, 2011.
- www.bildungsklick.de vom 3.5.12: Neues Autismus-Gen charakterisiert
- www.news4teachers.de vom 7.5.12: Forscher identifizieren für Autismus verantwortlichen Gen-Defekt
- Südwest-Presse, Lokales Ulm/Neu-Ulm 15.5.12: Schlüssel zum Autismus
- Missverständnisse: Anna Fejtova erforscht am Magdeburger Leibniz-Institut für Neurobiologie Transportwege im Gehirn, Volksstimme vom 15.02.2014

Öffentlichkeitsarbeit

- Jährliche Präsentationen, Vorträge und Mitmachangebote der Kollegiaten und Betreuer zur Magdeburger „Lange Nacht der Wissenschaft“ (Bild rechts: Kollegiatinnen Adriana Barman und Anni Richter mit Anna Deibele v.r.n.l.)
- Betreuung von Schülern beim jährlichen Girls&Boys Zukunftstag
- Mitorganisation der alljährlichen Womens Career Days in Magdeburg seit 2013



Ausgewählte Vorträge der Stipendiaten

Richter, A., Richter, S., Barman, A., Soch, J., Klein, M., Libeau, C., Wüstenberg, T., Seidenbecher, C.I., and Schott, B.H. (2013). DRD2-TaqIA polymorphism modulates motivational enhancement of interference processing. *“Tagung experimentell arbeitender Psychologen”, TeAP, Wien, Austria.*

Assmann, A., Soch J, Barman A, Seidenbecher C, Schott B. Einfluss des mit Bipolaren Störungen und Schizophrenie assoziierten NCAN-SNP (rs1064395) auf das Default-Mode-Network bei gesunden Probanden. *DGPPN Kongress Berlin 2013.*

Assmann, A. Schmierer P, Soch J, Barman A, Seidenbecher C, Gundelfinger E, Heinz A, Meyer-Lindenberg A, Erk S, Walter H, Schott B. A complex interaction of CACNA1C and Piccolo depression risk alleles on the subgenual cingulate activity during self-referential processing and associative memory encoding. *DGPPN Kongress Berlin 2012.*

Barman A., Schott B, Deibele A, Libeau C, Soch J, Krämer UM, Seidenbecher C, Münte TF, Richter S. An fMRI study of gender differences in threat and punishment behaviour. *DGPPN Kongress Berlin 2012.*

Barman A., Richter S, Soch J, Deibele A, Seidenbecher C, Schott B. Autistischer Endophänotyp moduliert Geschlechtsunterschiede im belohnungsorientierten Verhalten. *DGPPN Konferenz Berlin 2013.*

Heyne JH., Lichtenecker P, Leßmann V, Brigadski T. Opposing effects of cAMP-effectors PKA and Epac on activity-dependent BDNF secretion in dissociated hippocampal neurons. 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society (2015).

Annamneedi, A Conditional mutants of Bassoon in excitatory forebrain synapses and dopaminergic synapses, to study their contribution in learning and memory processes. 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society (2015) // Invited talk from submitted poster abstracts